



## INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO INÓCULO/SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS DO RESÍDUO RUMINAL BOVINO EM ENSAIO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO

DOI: <http://dx.doi.org/10.55449/conresol.6.23.XII-22>

Paula Polastri (\*), Wardleison Martins Moreira, Danielly Cruz Campos Martins, Daniel Tait Vareschini, Marcelino Luiz Gimenes

\* Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, paulapolastri1983@gmail.com

### RESUMO

A digestão anaeróbia de resíduos orgânicos tem sido relatada e recebido atenção crescente nos últimos anos como uma tecnologia amplamente utilizada no tratamento eficiente de resíduos e na produção simultânea de biogás. Logo, como um dos resíduos sólidos de destaque, o resíduo ruminal bovino (RRB) que compreende o conteúdo estomacal composto por material lignocelulósico parcialmente digerido, representa o resíduo de maior geração no processo de abate de bovinos. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da relação inóculo/substrato (RIS) na produção de biogás do RRB. O ensaio de potencial bioquímico de metano (BMP) foi conduzido para três diferentes RIS 1, 2 e 3. O melhor resultado obtido foi na RIS 2 com uma produção de biogás de 184,61 NmL  $g_{STV}^{-1}$ , e diferença estatística significativa quando comparado com a RIS 3 e 1. Além disso, o perfil da produção acumulada de biogás e metano apresentou comportamento normal, corroborando com a viabilidade técnica de se utilizar o RRB como substrato para a produção de biogás.

**PALAVRAS-CHAVE:** biodegradabilidade, biogás, digestão anaeróbia, lodo anaeróbio, resíduo sólido.

### ABSTRACT

Anaerobic digestion of organic waste has been reported and received increasing attention in recent years as a widely used technology for efficient waste treatment and simultaneous biogas production. Therefore, as one of the outstanding solid residues, the bovine ruminal waste (BRW), which comprises the stomach content composed of partially digested lignocellulosic material, represents the residue with the highest generation in the bovine slaughter process. Thus, this study aimed to evaluate the influence of the inoculum to substrate ratio (ISR) on the production of biogas from the BRW. The biochemical methane potential (BMP) assay was conducted for three different ISR 1, 2 and 3. The best result obtained was in ISR 2 with a biogas production of 184.61 NmL  $g_{VS}^{-1}$ , and statistically significant difference when compared with ISR 3 and 1. In addition, the profile of accumulated production of biogas and methane showed normal behavior, corroborating the technical feasibility of using BRW as a substrate for biogas production.

**KEY WORDS:** biodegradability, biogas, anaerobic digestion, anaerobic sludge, solid waste.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, os problemas globais como intensificação do aquecimento global e a crise energética exigem um uso mais eficiente das biotecnologias, a exemplo das tecnologias que visam a produção de biocombustíveis e energia renovável (LOPÉZ *et al.*, 2015). Adicionalmente, com a crescente regulamentação sobre a destinação ambientalmente adequada de resíduos sólidos, os tratamentos biológicos de resíduos orgânicos, como a a digestão anaeróbia (DA), estão ganhando importância como uma opção para reduzir a poluição da água e do solo, assim como as emissões de gases de efeito estufa (BUENDIA *et al.*, 2009).

A digestão anaeróbia (DA) de resíduos orgânicos tem sido relatada e recebido atenção crescente nos últimos anos como uma tecnologia amplamente utilizada no tratamento eficiente de resíduos e na produção simultânea de biogás (RAPOSO *et al.*, 2011). A DA trata-se de um processo tecnológico bioquímico que envolve a degradação e estabilização de matéria orgânica complexa por microrganismos, em que o biogás produzido, composto em sua maior proporção por metano, pode ser utilizado como energia renovável em substituição fontes de energia fóssil (RAPOSO *et al.*, 2011).



Neste contexto de geração de resíduos e implementação de tecnologias energéticas limpas, as unidades frigoríficas têm se destacado. As unidades frigoríficas processam carne para consumo humano e subprodutos animais (por exemplo, farinha de carne, ossos e sangue, sebo e pele), assim como geram uma grande variedade de resíduos sólidos e volumes substanciais de águas residuárias resultantes das operações de limpeza (CUETOS *et al.*, 2008).

O Brasil, em 2021, posicionou-se como o segundo maior produtor de carne bovina atrás apenas dos Estados Unidos, apresentando uma produção de 9,71 milhões toneladas equivalente de carcaça (TCE), 13,66% da produção mundial (ABIECC, 2022). O resíduo ruminal bovino (RRB) que compreende o conteúdo estomacal composto por material lignocelulósico parcialmente digerido (López *et al.*, 2006), representa o resíduo de maior geração no processo de abate de bovinos (ASTALS *et al.*, 2014).

Em processos de DA, a determinação do potencial bioquímico de metano (em inglês, *biochemical methane potential - BMP*) é amplamente utilizado para determinar a biodegradabilidade, o rendimento de biogás e metano de diferentes resíduos sólidos orgânicos (ANGELIDAKI *et al.*, 2009). Neste ensaio, para encontrar o potencial máximo de biogás e metano é necessário um equilíbrio correto entre o substrato e os microrganismos (RAPOSO *et al.*, 2020).

Logo, a relação inóculo/ substrato (RIS), ou seja, a relação entre as massas, em gramas, dos sólidos totais voláteis (STS) do inóculo e do substrato ( $g_{STV}$  do inóculo/ $g_{STV}$  do substrato) trata-se de um parâmetro de extrema importância, pois afeta a eficiência da degradação anaeróbia (DECHRUGSA *et al.*, 2013). Recomenda-se que a proporção em termos de sólidos totais voláteis (STV) do inóculo seja maior que a do substrato para minimizar problemas de acidificação ou inibição por excesso de substrato, sendo considerado padrão o uso de  $RIS \geq 2$  (HOLLIGER *et al.*, 2016; VDI, 2016). Estudos anteriores mostraram que o aumento da RIS afeta positivamente o rendimento de biogás e metano (CAILLET *et al.*, 2019; YORUKLU *et al.*, 2018).

Estudos foram reportados sobre a utilização do RRB como substrato para a produção de biogás, incluindo estudos de mono (monoDA) e co-digestão anaeróbia (coDA). Buendía *et al.* (2009) avaliaram a mono e a coDA do RRB com lodo residual da estação de tratamento de águas residuária de um frigorífico aplicando uma RIS 0,82. Astals *et al.* (2014) avaliaram a monoDA do RRB e também a sua misrura com outros resíduos gerados em um frigorífico, aplicando uma ISR 2. López *et al.* (2015) e Ware e Power (2016) avaliaram a monoDA do RRB na ISR 2,84 e 2, respectivamente. Ihoeghian *et al.* (2022) reportaram estudos de BMP de RRB, assim como da mistura com resíduo alimentar, no entanto, os autores não reportam a ISR aplicada no estudo.

## OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo determinar o potencial de produção de biogás do resíduo ruminal bovino (RRB) em três diferentes relações inóculo/substrato (RIS) em ensaio de potencial bioquímico de metano.

## METODOLOGIA

### Coleta e preparo do inóculo e substrato

Como inóculo foi utilizado um lodo anaeróbio com 110 dias mantido em um biorreator em condições mesofílicas, obtido a partir da mistura de lodo de biorreator de uma estação municipal de tratamento de esgoto, localizada em Maringá, Paraná, Brasil, e do tratamento de águas residuárias de suinocultura em uma fazenda-escola de uma universidade em Londrina, Paraná, Brasil. O RRB foi disponibilizado por um frigorífico de bovinos, localizado no município de Paçandu, Paraná, Brasil. Os materiais utilizados no estudo são apresentados na Figura 1.

As fontes de inóculo apresentavam materiais grosseiros, desta forma, previamente a mistura, estes materiais foram removidos por peneiramento por meio de uma peneira com malha de 5 mm, conforme sugerido por Holliger *et al.* (2016). Após a coleta, a amostra de RRB foi transportada para o laboratório e uma alíquota cortada com tesoura e triturada em processador para atingir um tamanho de partícula de 10 mm (Figura 1a), conforme recomendações da diretriz técnica da Associação de Engenheiros Alemães (em inglês *Verein Deutscher Ingenieure - VDI*) VDI 4630 (VDI, 2016) e Holliger *et al.* (2016).



Figura 1: Materiais utilizados nos experimentos: (a) resíduo ruminal bovino sendo peneirado; (b) resíduo ruminal bovino após peneiramento; (c) inóculo. Fonte: Autores, 2023.

Para verificação do tamanho de partícula, posteriormente ao preparado, a amostra de RRB foi peneirado em peneira com malha  $<10$  mm.

### Caracterização do inóculo e substrato

A caracterização físico-química do inóculo e do resíduo seguiu as metodologias descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998). A composição elementar do BDM em termos de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) foi determinada usando um analisador elementar CHNS (*Thermo Scientific, FlashSmart*). O oxigênio (O) foi determinado pela diferença da soma do teor de C, H, N, S e sólidos totais fixos (STF), com base no teor de sólidos totais (ST).

### Ensaio de potencial bioquímico de metano

O ensaio de BMP foi utilizado para determinar a biodegradabilidade do RRB, sendo realizado de acordo com as recomendações descritas na VDI 4630 (VDI, 2016) e nos protocolos de padronização do ensaio descritos na literatura (HAFNER *et al.*, 2020a; HOLLIGER *et al.*, 2016).

Para realização do ensaio, foi utilizado reatores de vidro âmbar de 250 mL, com volume de *headspace* de 75 mL, conforme apresentado na Figura 2. Biorreatores “brancos”, considerados controle negativo foram realizados para obter o BMP a partir da atividade do inóculo. A RIS foi calculada com base no teor de sólidos totais voláteis (STV), e RIS 3, 2 e 1 foram investigadas. Antes da vedação de cada biorreator, aplicou-se nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) por 30 segundos, visando estabelecer condições anaeróbias (KOCH *et al.*, 2015). Todos os biorreatores foram mantidos em temperatura mesofílica ( $37 \pm 1^\circ C$ ) em banho termostático por 45 dias e agitados manualmente uma vez ao dia.

O volume de biogás dos biorreatores foi medido diariamente utilizando seringa graduadas. A pressão manométrica foi medida no *headspace* dos biorreatores por meio do septo com uma seringa conectada a um transdutor de pressão digital. Os volumes de biogás foram normalizados para temperatura e pressão padrão (273,15 K e 1013,25 mbar) e indicado como mililitro normal (NmL) (HAFNER *et al.*, 2020b; VDI, 2016) e a pressão de vapor da água foi calculada como sugerido por Strömberg *et al.* (2014), conforme representados pelas Equações 1 e 2.

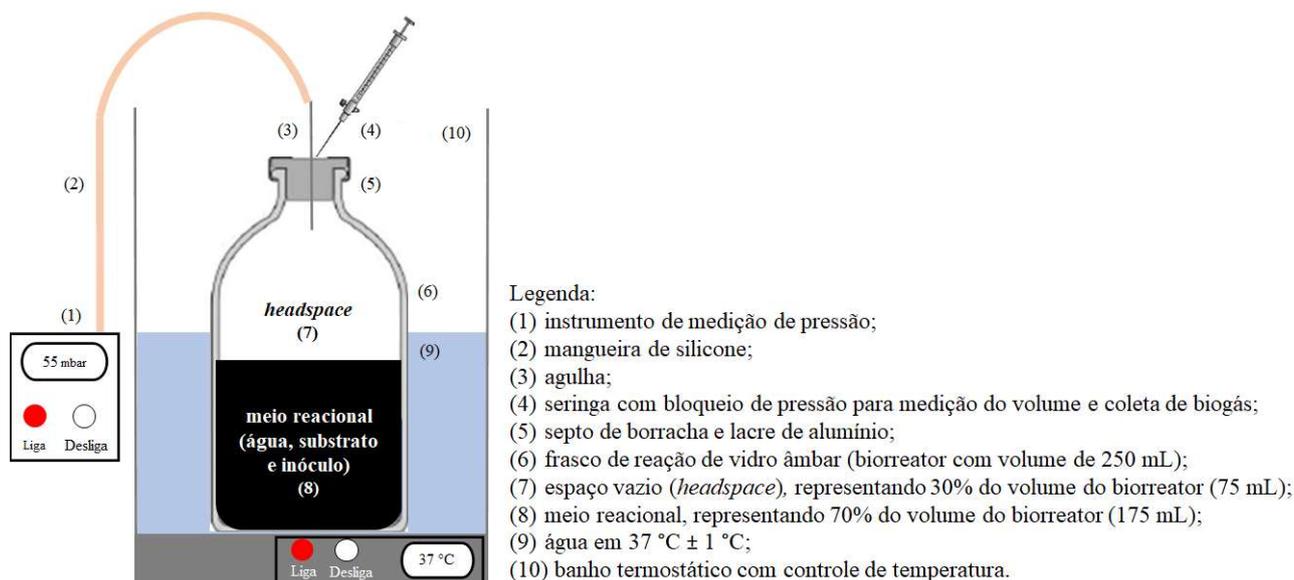
$$V_N = V \times \frac{(P_{atm} - P_{vap}) \times T_N}{P_N \times T} \quad \text{Equação (1)}$$

$$P_{vap} = 10^{8,1962 \left( \frac{1730,63}{T - 39,724} \right)} \quad \text{Equação (2)}$$

Na Equação 1,  $V_N$  corresponde ao volume de biogás normalizado, em NmL; V o volume de biogás medido pelo método volumétrico, em mL;  $P_{atm}$  a pressão atmosférica no momento da medição, em mbar;  $P_{vap}$  a pressão de vapor da água em



função da temperatura ambiente ou de operação, em mbar;  $T_N$  a temperatura normal, 273,15 K;  $P_N$  a pressão normal, 1013,25 mbar; e  $T$  a temperatura do biogás, ou seja, a temperatura de operação, em K. Na Equação 2,  $P_{vap}$  corresponde a pressão de vapor da água, em mbar; e  $T$  a temperatura do biogás, em K.



**Figura 2: Representação esquemática do aparato experimental no ensaio de potencial bioquímico de metano.**

Fonte: Adaptado de Hansen *et al.*, 2004, Angelidaki *et al.*, 2009; VDI, 2016.

A produção de biogás dos biorreatores substrato, conteúdo RRB e inóculo, foi subtraída da produção média de biogás dos biorreatores brancos (produção do inóculo) e dividida pela massa de substrato adicionada com base nos sólidos voláteis. Todos os valores de produção biogás foram expressos em termos de rendimento específico ( $\text{NmL g}_{\text{STV}}^{-1}$ ). O ensaio de BMP foi encerrado quando a produção diária de biogás foi inferior a 0,5% por três dias consecutivos em relação à produção acumulada, assim como todas as condições estudadas foram encerradas simultaneamente, quando todos os biorreatores atenderam a esse critério (VDI, 2016).

### Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos na produção acumulada de biogás para todas RIS investigadas foram analisados usando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando um *software* estatístico.

## RESULTADOS

### Caracterização dos materiais

As características do resíduo sólido utilizado como substrato e da mistura de lodos anaeróbios de duas fontes distintas compreendendo o inóculo da pesquisa, são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Caracterização físico-química do inóculo e substrato.**

Fonte: Autores, 2023.

Parâmetro	Unidade	Inóculo	Resíduo ruminal bovino
Sólidos totais (ST)	%	3,57 ( $\pm 0,07$ )	15,03 ( $\pm 0,26$ )
Sólidos totais voláteis (STV)	%	2,38 ( $\pm 0,09$ )	13,29 ( $\pm 0,23$ )
STV/ST	-	0,66	0,88
Carbono (C)	%ST	ND	43,02 ( $\pm 1,55$ )
Hidrogênio (H)	%ST	ND	5,35 ( $\pm 0,22$ )
Nitrogênio (N)	%ST	ND	2,20 ( $\pm 0,06$ )
Enxofre (S)	%ST	ND	0,11 ( $\pm 0,00$ )
Oxigênio (O)	%ST	ND	47,58



C/N

-

ND

19,55

Nota: ND = não determinado; STV/ST = relação entre sólidos totais voláteis e sólidos totais; C/N = relação entre carbono e nitrogênio. Os valores médios são relatados e valores entre parênteses representam o desvio padrão (n = 3).

Os valores de ST e STV do RRB (15,03% e 88,43%ST) são semelhantes aos valores reportados por Ihoeghian *et al.* (2022), em que relataram valores para ST e STV de 10,85% e 89,00%ST, respectivamente. A relação STV/ST obtida indica alto potencial de transformação orgânica do RRB apresentando boa biodegradabilidade (88%), uma vez que substratos que apresentam relação STV/ST maior do que 0,70 podem ser considerados de fácil biodegradabilidade (PAVAN *et al.*, 2000).

A relação C/N determinada a partir da composição elementar do RRB (19,55) encontra-se próxima da faixa recomendada como ótima para a digestão anaeróbia (20-30) (PARKIN; OWEN, 1986). Relações C/N para o RRB de 21,27 e 23,70, foram relatadas por Ware e Power (2016) e Ihoeghian *et al.* (2022), respectivamente.

### Produção de biogás

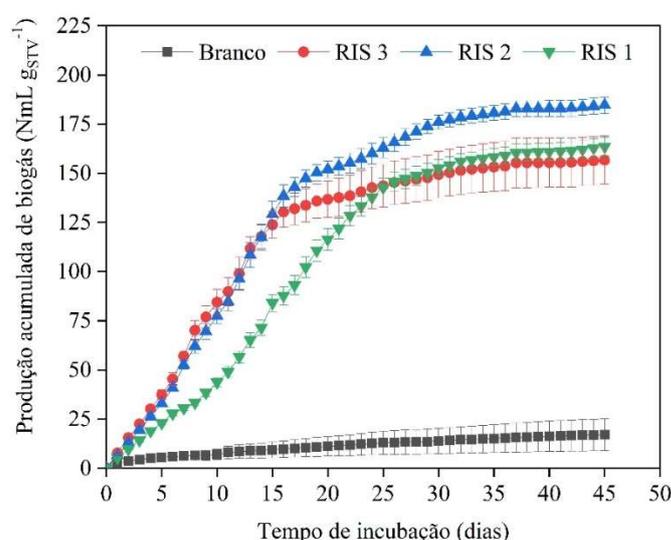
A produção acumulada de biogás do RRB para cada RIS avaliada no ensaio de BMP são apresentadas na Tabela 2. A RIS 2 apresentou o melhor desempenho no processo de digestão anaeróbia, resultando na maior produção de biogás (184,61 NmL  $g_{STV}^{-1}$ ), assim como mostrou diferença significativa quando comparada a RIS 3 e 1.

**Tabela 2: Produção de biogás do resíduo ruminal bovino em diferentes relações inóculo/substrato.**

Biorreator	Relação inóculo/substrato	Produção acumulada de biogás (NmL $g_{STV}^{-1}$ )
Branco	NA	16,98 ( $\pm 8,12$ )
RRB 3	3	156,71 ( $\pm 12,31$ ) <sup>a</sup>
RRB 2	2	184,61 ( $\pm 4,10$ ) <sup>b</sup>
RRB 1	1	163,52 ( $\pm 4,70$ ) <sup>a</sup>

Nota: Letras diferentes indicam que a diferença das médias é significativa ao nível de 0,05; NA = não aplicável; RRB = resíduo ruminal bovino; STV = sólidos totais voláteis; NmL: mililitro normal a 273,15 K e 1013,25 mbar. Os valores médios são relatados e os valores entre parênteses representam o desvio padrão (n = 4).

Ihoeghian *et al.* (2022) relataram uma produção de biogás para o RRB de 216,52 NmL  $g_{STV}^{-1}$ , valor próximo ao obtido no BMP observado. Buendía *et al.* (2009) explicam que o baixo rendimento de biogás obtido pode ser devido aos compostos lignocelulósicos lentamente degradáveis que estão presentes no RRB e para os quais a hidrólise é difícil e lenta. Adicionalmente, os resultados obtidos podem ser avaliados por meio do perfil da curva da produção acumulada de biogás para cada SIR testada, conforme mostra a Figura 3.



**Figura 3: Curvas de produção acumulada de biogás do resíduo ruminal bovino nas relações inóculo/substrato (RIS) 3, 2 e 1 do ensaio de potencial bioquímico de metano em 45 dias de incubação. Fonte: Autores, 2023.**



Nota: Os valores médios são relatados e os desvios padrão representam barras verticais (n = 4).

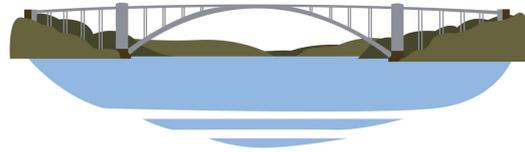
O perfil da produção acumulada de biogás do RRB para a RIS 3 e 2, mostra uma curva normal de produção de biogás, em que o biogás foi imediatamente produzido, assim como, um comportamento similar de produção até o dia 15. Por outro lado, na RIS 1, o substrato é degradado após uma fase *lag*, podendo indicar a hidrólise como a etapa limitante da digestão anaeróbia (FILER *et al.*, 2019). Substâncias que se degradam com dificuldade (como substâncias contendo lignina, por exemplo) exibem uma curva de formação de biogás “retardada”, como ocorreu na RIS 1, sendo que a forma da curva também pode ser devido a uma ligeira inibição pelo excesso de substrato, por exemplo (VDI, 2016).

## CONCLUSÕES

A produção de biogás e metano nos ensaios de BMP utilizando RRB como substrato na RIS 2 apresentou melhor desempenho, com maior rendimento de biogás e diferença estatística significativa quando comparado com a RIS 3 e 1. Além disso, o perfil da produção acumulada de biogás e metano apresentou comportamento normal. No entanto, a RIS 2 mostrou ser a mais indicada para o resíduo em estudo, assim como corroborou com a indicação na literatura quanto a utilização de  $RIS \geq 2$  como padrão em ensaios BMP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angelidaki, I. *et al.* Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. **Water Science Technology**, v. 59, p. 927–934, 2009.
2. American Public Health Association (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. USA: APHA: 1998.
3. Astals, S. *et al.* Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 421–427, 2014.
4. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). 2022. **Beef Report: perfil da pecuária no Brasil 2022**. São Paulo: ABIEC, 2022. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>. Acesso em: 10 abr. 2023.
5. Buendía, I. M. *et al.* Feasibility of anaerobic co-digestion as a treatment option of meat industry wastes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1903–1909, 2009.
6. Caillet, H. *et al.* Influence of inoculum to substrate ratio on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests of sugarcane distillery wastewater. **Procedia Manufacturing**, v. 35, p. 259–264, 2019.
7. Cuetos, M. J. *et al.* Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (SHW) at laboratory scale: influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 99–106, 2008.
8. Dechruga, S. *et al.* Effects of inoculum to substrate ratio, substrate mix ratio and inoculum source on batch co-digestion of grass and pig manure. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 101–108, 2013.
9. Filer, J. *et al.* Biochemical Methane Potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. **Water**, v. 11, n. 5, p. 1–29, 2019.
10. Hafner, S. D. *et al.* Improving inter-laboratory reproducibility in measurement of Biochemical Methane Potential (BMP). **Water**, v. 12, p. 1–30, 2020a.
11. Hafner, S. D. *et al.* Calculation of methane production from volumetric measurements. **Standard BMP Methods Document 201, Version 1.9**, n. October, p. 1–5, 2020b.
12. Hansen, T. L. *et al.* Method for determination of methane potentials of solid organic waste. **Waste Management**, v. 24, p. 393–340, 2004.
13. Holliger, C. *et al.* Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 2016.
14. Ihoeghian, N. A. *et al.* Anaerobic co-digestion of cattle rumen content and food waste for biogas production: Establishment of co-digestion ratios and kinetic studies. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, n. March, p. 101033, 2022.
15. Koch, K. *et al.* Influence of headspace flushing on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 173–178, 2015.
16. López, I. *et al.* Validation of a simple kinetic modelling approach for agro-industrial waste anaerobic digesters. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 509–516, 2015.
17. Parkin, G. F.; Owen, W. F. Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges. **Journal of Environmental Engineering**, v. 112, n. 5, p. 867–920, 1986.



18. Pavan, P. et al. Performance of thermophilic semi-dry anaerobic digestion process changing the feed biodegradability. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 75–81, 2000.
19. Raposo, F. *et al.* Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 861–877, 2011.
20. Raposo, F. *et al.* Predictive regression models for biochemical methane potential tests of biomass samples: pitfalls and challenges of laboratory measurements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 127, 2020.
21. Strömberg, S.; Nistor, M.; Liu, J. Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 1939–1948, 2014.
22. Verein Deutscher Ingenieure (VDI). **VDI 4630**: fermentation of organic materials: characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Düsseldorf, Germany, 2016.
23. Ware, A.; Power, N. Biogas from cattle slaughterhouse waste: Energy recovery towards an energy self-sufficient industry in Ireland. **Renewable Energy**, v. 97, p. 541–549, 2016.
- 24.