



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI RESTRIÇÃO
DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL
2025**



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS A
PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO
METAGENÔMICA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

Luana Bertin Lora

CAXIAS DO SUL

2025

Luana Bertin Lora

**PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS A
PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO
METAGENÔMICA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Suelen Osmarina Paesi

CAXIAS DO SUL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L865p Lora, Luana Bertin

Processo de digestão anaeróbia em dois estágios a partir de glicerol residual e caracterização metagenômica das comunidades microbianas [recurso eletrônico] / Luana Bertin Lora. – 2025.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

Orientação: Suelen Osmarina Paesi.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Digestão anaeróbia. 2. Biotecnologia. 3. Hidrogênio. 4. Metano. I. Paesi, Suelen Osmarina, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 628.336.5.098.4

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

Luana Bertin Lora

**PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS A
PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO
METAGENÔMICA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche
Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Eloane Malvessi
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Univesidade de Caxias do Sul

Aos meus pais, Rejane e Rosmar

A minha cachorra, Kiara

Ao mar

A Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta etapa:

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Suelen Paesi, pela orientação e suporte. Sua experiência e sabedoria foram fundamentais nesse processo.

À Flaviane, pelas dicas e ensinamentos. Sua visão crítica e incentivos constantes me impulsionaram a alcançar meu melhor desempenho.

Aos meus colegas de laboratório, pela constante troca de ideias e pelas risadas que tornaram essa jornada muito mais enriquecedora.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela estrutura, confiança e financiamento para a execução deste projeto.

À minha família, que me incentivou e proporcionou amor, paciência e compreensão ao longo desta jornada.

Aos meus pais, meu mais sincero agradecimento. Não há palavras suficientes para expressar a gratidão que sinto pelo amor, paciência e apoio incondicional que sempre recebi.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO	9
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO I	9
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II	10
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO III	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Fundamentos e etapas da digestão anaeróbia	17
3.1.1. Formas de produção de hidrogênio	20
3.1.2. Produção de metano	25
3.1.3. Digestão anaeróbia em dois estágios	26
3.2. Glicerol como fonte energética	27
3.3. Aplicações do sequenciamento de nova geração na caracterização da microbiota da digestão anaeróbia	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
CAPÍTULO 1: Metagenomic characterization of two-stage anaerobic digestion applied to hydrogen and methane production using <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> and a microbial consortium	33
CAPÍTULO 2: Influence of different inoculum/substrate ratios on two-stage anaerobic digestion using <i>Clostridium bifermentans</i> from crude glycerol	67
CAPÍTULO 3: Microbial co-cultures applied in the two-stage anaerobic digestion process from crude glycerol	85
5. DISCUSSÃO GERAL	100
6. CONCLUSÕES GERAIS	103
7. PERSPECTIVAS	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

RESUMO

O biodiesel, produzido a partir de grãos, é uma das escolhas para reduzir o uso de combustíveis fósseis. O processo gera o glicerol residual, que contém impurezas que dificultam seu reaproveitamento, exigindo uma solução para a sustentabilidade do processo. A digestão anaeróbia (DA) surge como alternativa para converter esse resíduo em biogás. Embora tradicionalmente realizada em estágio único, a DA em dois estágios aprimora a degradação e a recuperação energética, ao separar a fase fermentativa – responsável pela produção de H₂ e ácidos graxos voláteis (AGV) – da fase metanogênica, na qual esses compostos são convertidos a CH₄ com papel central dos microrganismos. Assim, o objetivo foi investigar a composição e o desempenho da comunidade microbiana envolvida na digestão anaeróbia em dois estágios do glicerol residual com foco na geração de H₂ e CH₄. Na etapa fermentativa, foram utilizadas culturas isoladas de *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Clostridium bifermentans* (CB) e a co-cultura formada por ambas, testadas nas densidades óticas DO (0,3 e 0,6). Em frascos de 600 mL contendo 3% de glicerol residual, avaliando a produção de H₂, o consumo de substrato, AGV e álcoois). Na etapa metanogênica, o caldo fermentativo foi utilizado como substrato em testes de Potencial Bioquímico de Metano (BMP) conduzidos em reatores de 200 mL, empregando as razões inóculo/substrato (RIS), 2:1, 3:1 e 4:1, a 37°C. As análises metagenômicas foram realizadas ao final da etapa metanogênica, por meio da plataforma Oxford Nanopore Promethion, direcionadas ao gene rRNA 16S para bactérias e à região V3V5 do gene para arqueias. BA isolado apresentou o maior rendimento de H₂ (0,34 mmol H₂/mol glicerol). A digestão anaeróbia em dois estágios aumentou, em média, dez vezes a produção de CH₄, ao utilizar a maior RIS (2:1) em relação ao processo em estágio único. O caldo fermentativo de CB na razão 3:1 apresentou a maior produção cumulativa de metano, 1280 mL. As maiores RIS de caldo foram mais efetivas na produção de metano. Os AGVs produzidos pelo estágio I foram consumidos por BA (87%) e BC6 (93%) no estágio metanogênico. No caldo de BC3, houve consumo apenas de ácido acético, enquanto, no caldo de CB o ácido acético e propiônico foram produzidos. A digestão anaeróbia em dois estágios promoveu mudanças na comunidade microbiana metanogênica, associadas positivamente ao desempenho do processo. A arqueia acetoclástica *Methanotrix* teve maior predominância no processo em dois estágios bem como maior abundância de genes relacionados à via acetoclástica. Conclui-se que a digestão anaeróbia em dois estágios é uma estratégia eficiente para o aproveitamento do glicerol residual, pois aumentou significativamente a produção de CH₄ e favoreceu a conversão dos AGVs, configurando-se como uma alternativa para o manejo desse resíduo e a produção de energia renovável.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia em duas etapas; hidrogênio; metano; glicerol residual; *Bacillus*; *Clostridium*; co-culturas.

ABSTRACT

Biodiesel, produced from grains, is one of the options for reducing the use of fossil fuels. The process generates crude glycerol, which contains impurities that hinder its reuse, requiring a solution for the sustainability of the process. Anaerobic digestion (AD) emerges as an alternative to convert this waste into biogas. Although traditionally carried out in a single stage, AD in two projects aimed at improving handling and energy recovery, by separating the fermentative phase – responsible for the production of H₂ and volatile fatty acids (VFA) – from the methanogenic phase, in which these compounds are converted to CH₄, with microorganisms playing a central role. Thus, the objective was to investigate the composition and performance of the microbial community involved in the two-stage anaerobic digestion of crude glycerol, focusing on the generation of H₂ and CH₄. In the fermentation stage, isolated cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Clostridium bifermentans* (CB), and a co-culture formed by both were used, tested at optical densities OD (0.3 and 0.6). In 600 mL flasks containing 3% crude glycerol, evaluate H₂ production, substrate consumption, VFA, and alcohol. In the methanogenic stage, the fermentation broth was used as a substrate in prolonged Biochemical Methane Potential (BMP) tests in 200 mL reactors, employing inoculum/substrate ratios (RIS) of 2:1, 3:1, and 4:1 at 37°C. Metagenomic analyses were performed at the end of the methanogenic stage using the Oxford Nanopore Promethion platform, targeting the 16S rRNA gene for bacteria and the V3V5 region of the gene for archaea. Isolated BA showed the highest H₂ yield (0.34 mmol H₂/mol glycerol). Anaerobic digestion in two stages improved, on average, ten times the CH₄ production when using a higher RIS (2:1) compared to the single-stage process. The CB fermentation broth at a 3:1 ratio showed the highest cumulative methane production, 1280 mL. Broth RIS were more efficient in methane production. The VFAs produced by stage I were consumed by BA (87%) and BC6 (93%) in the methanogenic stage. In the BC3 broth, only acetic acid was consumed, while in the CB broth, both acetic and propionic acids were produced. Anaerobic digestion in two projects promoted changes in the methanogenic microbial community, positively associated with process performance. The acetoclastic archaea *Methanotrix* was more predominant in the process in two projects, as well as having a greater abundance of genes related to the acetoclastic pathway. It is concluded that two-step anaerobic digestion is an efficient strategy for utilizing residual glycerol, as it significantly increased CH₄ production and favored the conversion of volatile fatty acids (VFAs), thus representing an alternative for managing this waste elimination and producing renewable energy.

Keywords: Two-stage anaerobic digestion, Hydrogen, Methane, Crude glycerol, *Bacillus*, *Clostridium*.