

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE METANO DE VINHAÇA COM  
SUPLEMENTAÇÃO DE TORTA DE FILTRO EM REATORES  
UASB EM SÉRIE, MESOFÍLICOS E TERMOFÍLICOS:  
DESEMPENHO DO PROCESSO E DIVERSIDADE  
MICROBIANA**

**Valciney Gomes de Barros**  
Tecnólogo em Biocombustíveis

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE METANO DE VINHAÇA COM  
SUPLEMENTAÇÃO DE TORTA DE FILTRO EM REATORES  
UASB EM SÉRIE, MESOFÍLICOS E TERMOFÍLICOS:  
DESEMPENHO DO PROCESSO E DIVERSIDADE  
MICROBIANA**

**Valciney Gomes de Barros**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira**

**Coorientadora: Profa. Dra. Rose Maria Duda**

**Coorientadora: Dra. Carmen Susana de Deus Rodrigues**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

**2017**

B277p Barros, Valciney Gomes de  
Produção de metano de vinhaça com suplementação de torta de filtro em reatores UASB em série, mesofílicos e termofílicos: desempenho do processo e diversidade microbiana / Valciney Gomes de Barros. -- Jaboticabal, 2017  
xiv, 140 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Roberto Alves de Oliveira

Coorientadoras: Rose Maria Duda, Carmen Susana de Deus Rodrigues

Banca examinadora: Juliana Calábria de Araújo, José Tavares de Sousa, Giovana Tommaso, Leonardo Lucas Madaleno

Bibliografia

1. Carga orgânica volumétrica. 2. Biogás. 3. Recirculação do efluente. 4. Suplementação de nutrientes. 5. Reação de Fenton. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:662.767.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO DE METANO DE VINHAÇA COM SUPLEMENTAÇÃO DE TORTA DE FILTRO EM REATORES UASB EM SÉRIE, MESOFÍLICOS E TERMOFÍLICOS: DESEMPENHO DO PROCESSO E DIVERSIDADE MICROBIANA

AUTOR: VALCINEY GOMES DE BARROS

ORIENTADOR: ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA


COORIENTADORA: ROSE MARIA DUDA

COORIENTADORA: CARMEN SUSANA DE DEUS RODRIGUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA  
Departamento de Engenharia Rural / FCAV / UNESP - Jaboticabal



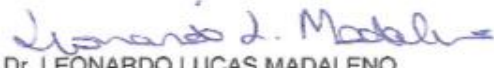
Profa. Dra. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO (Participação por Videoconferência)  
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental / Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. JOSE TAVARES DE SOUSA  
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental / Universidade Estadual da Paraíba / Campina Grande/PB



Profa. Dra. GIOVANA TOMMASO  
Departamento de Engenharia de Alimentos / USP / Pirassununga/SP



Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO  
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**VALCINEY GOMES DE BARROS** – Filho de José Pereira de Barros e Ana Gomes de Barros, nascido em Botumirim, no Estado de Minas Gerais, no dia 26 de agosto de 1985. Graduado em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC) - Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”, SP, em dezembro de 2010, fazendo parte da primeira turma de formados do curso. Em agosto de 2011, iniciou o curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, em nível de Mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista – (FCAV/UNESP), no Laboratório de Saneamento Ambiental (Departamento de Engenharia Rural), onde defendeu sua dissertação de mestrado em julho de 2013. Em agosto de 2013, ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, em nível de Doutorado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, no Laboratório de Saneamento Ambiental (Departamento de Engenharia Rural). No período de março a julho de 2017, realizou estágio de doutorado sanduíche pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Porto - Portugal, com bolsa-CAPES (Número do Processo: 88881. 132416/2016-01); realizou desenvolvimento de pesquisa sobre tratamento de vinhaça da cana-de-açúcar e de águas residuárias do processamento do café por combinação de degradação biológica e processos oxidativos avançados.

*Aos meus queridos pais **José e Ana**,  
muito obrigado pelos ensinamentos,  
pelo amor, carinho e incentivo. Amo muito vocês!!!*

*Aos meus **queridos irmãos**,  
agradeço pelo apoio, carinho e amor!!!*

*À minha esposa **Celina**, muito obrigado pelo apoio,  
carinho, amor e companheirismo!!!*

**DEDICO E AGRADEÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, pela saúde, por ter me proporcionado calma e sabedoria nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira, obrigado pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas contribuições e por todas as palavras de apoio e encorajamento.

A minha coorientadora Profa. Dra. Rose Maria Duda, obrigado pelas inúmeras contribuições, pelas críticas, compreensão e enorme disposição ao longo dos anos em que trabalhamos juntos.

A minha coorientadora Dra. Carmen Susana Deus Rodrigues, obrigado pelos conhecimentos transmitidos e por todo suporte oferecido para minha adaptação no exterior.

Aos supervisores no exterior, Prof. Dr. Luís Miguel Madeira e Prof. Dr. Rui Alfredo da Rocha Boaventura, por terem me recebido generosamente no LEPABE, por toda orientação e suporte para execução dos projetos desenvolvidos.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), em particular, o Laboratório de Saneamento Ambiental e o Departamento de Engenharia Rural, disponibilizando recursos e instalações para realizar este trabalho.

A Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), em especial ao Departamento de Engenharia Química e ao Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPAB) da FEUP por todos os meios colocados à disposição.

Aos professores e amigos da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC) que sempre se disponibilizaram em ajudar.

A Usina Pitangueiras, Iracema e São Martinho pelo fornecimento do material para realização desta pesquisa.

A professora Dra. Maria Inês T. Ferro (Departamento de Tecnologia) pela contribuição e por todos os meios colocados à disposição. Juliana e Wellington, obrigado pela valiosa contribuição na parte de biologia molecular.

A todos os meus amigos de laboratório da UNESP e da FEUP, em especial: Áureo, Daniele, Daiane, Luan, Wilmar, Kleber, Denis, Jorge, Renata, Amanda, Stella, Alexandra, Bruno e Vanessa. Também agradeço aos estagiários que passaram pelo laboratório. Obrigado pela amizade, companheirismo, ajuda e por todos os bons momentos que passamos juntos.

A todos os funcionários do Departamento de Engenharia Rural, pela amizade e contribuição. Ao pessoal do atendimento da Pós-Graduação, pela atenção e simpatia.

Aos componentes da banca de qualificação: Dr. Leonardo Lucas Madaleno, Dr. Luciano Santos Rodrigues, Dra. Juliana da Silva Vantini e Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, agradeço pela participação e contribuição.

Aos membros da comissão examinadora: Dra. Juliana Calábria de Araújo, Dr. José Tavares de Sousa, Dra. Giovana Tommaso e Dr. Leonardo Lucas Madaleno, agradeço pela participação e pelas contribuições importantes para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche no exterior através do programa PDSE.

A minha esposa Celina e nossas famílias; eu sou eternamente grato pelo apoio e por terem compreendido a minha ausência, principalmente durante o estágio no exterior, e por sempre estarem ao meu lado, mesmo distantes.



## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
2.1. Objetivo geral .....	5
2.2. Objetivos específicos .....	5
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>6</b>
3.1. Vinhaça de cana-de-açúcar .....	6
3.2. Torta de filtro .....	7
3.3. Vinhaça + torta de filtro para a digestão anaeróbia.....	8
3.4. Digestão anaeróbia .....	9
3.4.1. Bioquímica da digestão anaeróbia.....	10
3.4.2. Microbiologia da digestão anaeróbia .....	11
3.4.3. Diversidade microbiana na digestão anaeróbia da vinhaça.....	14
3.5. Digestão anaeróbia da vinhaça.....	15
3.5.1. Utilização de reatores UASB .....	17
3.5.2. Reatores em dois estágios .....	19
3.6. Processos de oxidação avançada (POA) e físico-químicos.....	22
3.6.1. Reação de Fenton .....	23
3.6.2. Coagulação/floculação e Fenton.....	25
3.6.3. Tratamento da vinhaça por Coagulação/floculação, Fenton e combinação dos processos. ....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. Local do experimento e instalações experimentais.....	29
4.1.1. Sistema termofílico .....	29
4.1.2. Sistema mesofílico.....	31
4.2. Afluente e lodo de inóculo utilizado.....	31
4.2.1. Torta de filtro e adição no afluente.....	33

4.3. Descrição da operação e acompanhamento dos sistemas de tratamento. ....	33
4.3.1. Operação do sistema de tratamento termofílico .....	33
4.3.2. Operação do sistema de tratamento mesofílico .....	35
4.4. Exames físicos e determinações de constituintes orgânicos e inorgânicos nos afluentes, efluentes, lodo e biogás. ....	37
4.4.1. Quantificação dos ácidos orgânicos .....	38
4.4.2. Análise estatística .....	38
4.5. Informações das amostras do DNA genômico dos micro-organismos.....	39
4.5.1. Amplificação do gene 16S rRNA com a Ion Tag e sequenciamento ....	39
4.5.2. Processamento dos dados brutos.....	40
4.6. Amostras para a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	41
4.6.1. qPCR: Quantificação absoluta.....	41
4.7. Tratamento da vinhaça biodigerida por processo oxidativo avançado e combinação de processos .....	43
4.7.1. Processo Fenton.....	43
4.7.2. Processo de Coagulação/Floculação.....	45
4.7.3. Combinação dos processos de Coagulação/Floculação seguida de Fenton.....	46
4.7.4. Métodos analíticos do tratamento da vinhaça biodigerida .....	46
4.7.5. Testes Metanogênicos- Ensaio de biodegradabilidade.....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. ....</b>	<b>50</b>
5. 1. Sistema termofílico composto pelos reatores UASB em série (TR1 e TR2) .	50
5.1.1. pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal (fases I, II e III).....	50
5.1.2. pH, alcalinidades, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal (fases IV a fase X) .....	56
5.1.3. Ácidos graxos voláteis .....	57
5.1.4. Demanda química de Oxigênio (DQO) e produção de metano .....	59
5.1.5. Macronutrientes e micronutrientes.....	65
5.1.6. Caracterização do lodo termofílico.....	68
5.1.7. Diversidade microbiana nos reatores anaeróbios termofílicos.....	70
5.1.8. PCR tempo real- quantificação absoluta (qPCR).....	76
5.2. Reatores UASB mesofílicos em série (MR1 e MR2) .....	78
5.2.1. Variações de temperatura durante a operação do sistema mesofílico .	78
5.2.2. pH, alcalinidade e ácidos voláteis .....	80
5.2.3. Ácidos graxos voláteis .....	86
5.2.4. Produção de metano e demanda química de oxigênio total .....	87

5.2.4.1. Efeito da variação da temperatura .....	92
5.2.5. Macronutrientes e micronutrientes .....	94
5.2.6. Sólidos totais e sólidos voláteis .....	97
5.2.7. Diversidade microbiana nos reatores UASB mesofílicos - Ion Torrent	102
5.2.8. PCR tempo real- quantificação absoluta (qPCR) .....	106
5.3. Comparação dos reatores UASB termofílicos (TR1 e TR2) com os reatores mesofílicos (MR1 e MR2) .....	108
5.3.1. Diversidade das bactérias nos reatores termofílicos e mesofílicos.....	109
5.3.2. Diversidade das arqueias nos sistemas termofílicos e mesofílicos.....	111
5.3.3. PCR tempo real - quantificação dos micro-organismos, condições termofílicas e mesofílicas.....	113
5.3.4. Desempenho dos sistemas sob condições mesofílicas e termofílicas	115
5.4. Tratamento físico-químico e de oxidação avançada e testes anaeróbios da vinhaça biodigerida.....	117
5.4.1. Caracterização do efluente .....	117
5.4.2 Fenton.....	118
5.4.2.1. Efeito do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	118
5.4.2.2. Efeito da dose de Fe <sup>3+</sup> .....	120
5.4.3. Coagulação/floculação seguida de reação de Fenton .....	122
5.4.4. Testes de biodegradabilidade .....	123
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>125</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>127</b>
<b>8. ANEXO A.....</b>	<b>140</b>

## PRODUÇÃO DE METANO DE VINHAÇA COM SUPLEMENTAÇÃO DE TORTA DE FILTRO EM REATORES UASB EM SÉRIE, MESOFÍLICOS E TERMOFÍLICOS: DESEMPENHO DO PROCESSO E DIVERSIDADE MICROBIANA

**RESUMO** - A produção de biogás a partir da vinhaça de cana de açúcar tem um enorme potencial do ponto de vista econômico, energético e ambiental. No entanto, a estabilidade da produção de metano e a qualidade da vinhaça biodigerida nos reatores anaeróbios ainda necessitam de estudos, quanto as exigências de nutrientes e alcalinidade, estratégias operacionais e conhecimento da microbiota. Neste trabalho, foram avaliados dois sistemas de tratamento compostos por reatores UASB, em série, para o tratamento da vinhaça na faixa de temperatura termofílica (Reatores - TR1 e TR2) e mesofílica (Reatores - MR1 e MR2). Os reatores foram operados com cargas orgânicas volumétricas (COV) crescentes de até 45 g DQOtotal (L d<sup>-1</sup>) (TR1) e 29 g DQOtotal (L d<sup>-1</sup>) (MR1). A vinhaça afluenta foi suplementada com torta de filtro e as maiores produções volumétricas de metano obtidas para o sistema termofílico e mesofílico foram de 4,0 (TR1) e 1,4 (TR2) L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> e de 2,1 (MR1) e 1,2 (MR2) L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup>, respectivamente. Os filos bacterianos mais abundantes no lodo dos reatores termofílicos (TR1 e TR2) foram o Thermotogae, Firmicutes e Bacteroidetes. Para o lodo dos reatores mesofílicos (MR1 e MR2) os filos bacterianos mais abundantes foram o Bacteroidetes e o Chloroflexi. Na PCR quantitativa observaram-se quantidades equilibradas de bactérias e arqueias, a ordem Methanobacteriales predominou no sistema termofílico e a ordem Methanosarcinales predominou no sistema mesofílico. A vinhaça resultante do sistema termofílico foi submetida a tratamentos físico-químicos e oxidativos avançados e obteve-se remoção de DQO de 81% e aumento da biodegradabilidade, de 0,10 para 0,44 (DBO:DQO), melhorando a qualidade do efluente para disposição final ou para recirculação nos reatores anaeróbios.

**Palavras-chave:** carga orgânica volumétrica, biogás, recirculação do efluente, suplementação de nutrientes, reação de Fenton.

**METHANE PRODUCTION FROM VINASSE WITH FILTER CAKE  
SUPPLEMENTATION IN UASB REACTORS IN SERIES, MESOPHILIC AND  
THERMOPHILIC: PERFORMANCE OF THE PROCESS AND MICROBIAL  
DIVERSITY**

**ABSTRACT** - Biogas production from sugarcane vinasse has enormous economic, energy, and environmental management potential. However, stability of methane production and quality of biodigested vinasse in anaerobic reactors still require studies, such as nutrient and alkalinity requirements, operational strategies and knowledge of the microbiota. In this work, two treatment systems composed of UASB reactors in two-stage configuration were evaluated for the treatment of vinasse in thermophilic temperature range (Reactors TR1 and TR2) and mesophilic (Reactors MR1 and MR2). The reactors were operated with increasing of organic loading rate (OLR) of up to 45 g totalCOD (L d)<sup>-1</sup> (TR1) and 29 g totalCOD (L d)<sup>-1</sup> (MR1). The influent vinasse was supplemented with filter cake and the highest volumetric methane production obtained in the thermophilic and mesophilic system were 4.0 (TR1) and 1.4 (TR2) L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> and 2.1 (MR1) and 1.2 (MR2) L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup>, respectively. The most abundant bacterial phyla in the sludge of thermophilic reactors (TR1 and TR2) were Thermotogae, Firmicutes, and Bacteroidetes. In mesophilic reactors sludge (MR1 and MR2), the most abundant bacterial phyla were Bacteroidetes and Chloroflexi. Quantitative PCR showed balanced amounts of bacteria and archaea, the order Methanobacteriales dominated in thermophilic system and Methanosarcinales predominated in mesophilic system. The vinasse biodigested from thermophilic system was subjected to advanced physicochemical and oxidative treatments; COD removal of 81% and biodegradability increase from 0.10 to 0.44 (BOD: COD) were achieved, improving effluent quality for final disposal or recirculation in anaerobic reactors.

**Keywords:** organic loading rate, biogas, effluent recirculation, nutrients supplementation, Fenton reaction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Al - Alcalinidade intermediária
- AP - Alcalinidade parcial
- AT - Alcalinidade total
- AVT – Ácidos voláteis totais
- AGV- Ácidos graxos voláteis
- DBO<sub>5</sub> - Demanda bioquímica de oxigênio
- DQO - Demanda química de oxigênio
- COT – Carbono orgânico total
- COV - Carga orgânica volumétrica
- N<sub>am</sub> - Nitrogênio amoniacal
- NK - Nitrogênio Kjeldahl
- P<sub>total</sub> - Fósforo total
- POA - Processos de oxidação avançada
- pH - Potencial hidrogeniônico
- ST - Sólidos totais
- SV - Sólidos voláteis
- TDH - Tempo de detenção hidráulica

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. Composição química aproximada da torta de filtro de cana de açúcar com teor de umidade de 60 %.	8
TABELA 2. Famílias de bactérias e arqueias em sistemas anaeróbios.	13
TABELA 3. Sistemas de tratamento anaeróbios utilizando reatores UASB e diferentes tipos de vinhaça.	18
TABELA 4. Sistemas de tratamento anaeróbios em dois estágios no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar.	20
TABELA 5. Processos de Fenton aplicados à vinhaça.	27
TABELA 6. Características da vinhaça e da torta de filtro.	33
TABELA 7. Exames e determinações, frequência e fontes das metodologias utilizadas.	37
TABELA 8. Organização técnica dos testes de biodegradabilidade.	48
TABELA 9. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e efluentes, das relações AVT/AT, AI/AP dos efluentes durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça.	51
TABELA 10. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI) no afluente e efluentes durante a operação do sistema termofílico composto pelos reatores UASB em série (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça.	54
TABELA 11. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da carga orgânica volumétrica (COV), DQOtotal no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQOtotal durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série TR1 e TR2 no tratamento anaeróbio da vinhaça.	60
TABELA 12. Produção volumétrica de metano, concentração de metano no biogás e produção específica de metano nos reatores UASB em séries no TR1 e TR2, durante as fases I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X no tratamento anaeróbio termofílico da vinhaça.	64

- TABELA 13. Concentrações (mg L<sup>-1</sup>) e eficiência de remoção (%) de macro nutrientes NTK, P-total e K no afluente e efluente dos reatores UASB termofílicos em série (TR1 e TR2), durante as fases I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X no tratamento anaeróbio da vinhaça..... 66
- TABELA 14. Valores médios e coeficiente de variação (em %) dos macronutrientes e micronutrientes (mg L<sup>-1</sup>) do afluente e efluente dos reatores UASB em série termofílicos (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça. .... 67
- TABELA 15. Concentrações de sólidos totais (ST), voláteis (SV), fixos (SF) e relação SV e ST, nos 4 pontos de coletas de lodo do reator UASB (TR1) no tratamento termofílico da vinhaça. .... 69
- TABELA 16. Concentrações de sólidos totais (ST), voláteis (SV), fixos (SF) e relação SV e ST, nos 4 pontos de coletas de lodo do reator UASB (TR2) no tratamento termofílico da vinhaça. .... 69
- TABELA 17. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das bactérias identificadas no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas. .... 73
- TABELA 18. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das arqueias identificadas no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas. .... 75
- TABELA 19. Valores médios e coeficiente de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a operação dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento mesofílico da vinhaça, nas fases I, II, III, IV, V, VI e VII, durante 650 dias de operação..... 80
- TABELA 20. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI), no afluente e efluente dos reatores UASB mesofílico em série, MR1 e MR2 no tratamento da vinhaça. .... 83
- TABELA 21. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e efluentes, das relações AVT/AT, AI/AP dos efluentes durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça. .... 84
- TABELA 22. Produção volumétrica de metano, concentração de metano no biogás e produção específica de metano nos reatores UASB em séries no R1 e R2, no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.. 88



- TABELA 23. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da carga orgânica volumétrica (COV), proporção da vinhaça e efluente MR2 (% vol.), DQOtotal no afluente (mg L-1) e efluente e eficiência de remoção de DQOtotal (%) durante a operação dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. ... 90
- TABELA 24. Concentrações (mg L-1) e eficiência de remoção (%) de macro nutrientes NK, P-total e K e eficiência de remoção (%), no afluente e efluente dos reatores UASB em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 95
- TABELA 25. Valores médios dos macronutrientes e micronutrientes (mg L-1) e coeficiente de variação (em %) do afluente e efluente dos reatores UASB em série mesofílicos (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 96
- TABELA 26. Concentrações de sólidos totais (g L-1)(ST), voláteis (SV), fixos (SF) e reação SV e ST, nos 8 pontos de coletas de lodo do reator UASB MR1 no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 99
- TABELA 27. Concentrações de sólidos totais (g L-1)(ST), voláteis (SV), fixos (SF), nos 8 pontos de coletas de lodo do reator UASB MR2 no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 100
- TABELA 28. Valores médios da relação sólidos voláteis e totais (SV/ST) e coeficiente de variação (em %) nos pontos de coletas de lodo dos reatores UASB (MR1 e MR2) no tratamento mesofílico da vinhaça. . 101
- TABELA 29. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das bactérias identificadas no lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2, no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça com as maiores COV aplicadas. .... 105
- TABELA 30. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das arqueias identificadas no lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas. .... 106
- TABELA 31. Índices calculados para avaliação da riqueza e diversidade de bactérias nos reatores mesofílicos em série (MR1 e MR2), e termofílicos em série (TR1 e TR2)..... 109
- TABELA 32. Composições taxonômicas dos Filos das comunidades bacterianas para as sequências obtidas sistema termofílico (TR1 e TR2) e mesofílico (MR1 e MR2). .... 110

TABELA 33. Índices calculados para avaliação da riqueza e diversidade de arqueias nos reatores mesofílicos em série (MR1 e MR2), e termofílicos em série (TR1 e TR2).....	111
TABELA 34. Comparação dos principais parâmetros entre os reatores UASB em série dos sistemas mesofílicos (MR1 e MR2) e termofílicos (TR1 e TR2) em série no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas.....	115
TABELA 35. Características da vinhaça biodigerida. ....	118
TABELA 36. Características da vinhaça biodigerida após reação de Fenton e respectivas remoções.....	121
TABELA 37. Características da vinhaça biodigerida e após os processos de coagulação/floculação e respectivas eficiências (as eficiências de remoção parcial são mostradas entre parênteses.....	123

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Fluxograma simplificado e adaptado da produção de açúcar e etanol na indústria sucroenergética. Adaptado de Christofolletti et al. (2013).  
..... 7
- FIGURA 2. Representação esquemática (A) e fotos do sistema termofílico composto pelos reatores UASB em série (TR1 e TR2). 1- painel de controle de temperatura, 2- bomba diafragma, 3- tanque do afluente, 4- UASB (TR1), 5- UASB (TR2), 6- tanque do efluente, 7 e 8- gasômetros..... 30
- FIGURA 3. Representação esquemática (A) e foto do sistema mesofílico (B) com os reatores UASB em série (MR1 e MR2). 1- tanque do afluente, 2- abrigo das bombas helicoidais, 3- UASB (MR1), 4- UASB (MR2), 5- tanque do efluente e 6- gasômetros..... 32
- FIGURA 4. Diagrama esquemático do sistema termofílico com período e condições operacionais dos reatores UASB em série (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbico da vinhaça, carga orgânica volumétrica (COV) em g DQOtotal (L d)-1, taxa de recirculação do efluente (vinhaça : efluente) em % vol., fontes de nutrientes para suplementação de N e P, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h) e fonte de alcalinidade. \*Recirculação do efluente proveniente de outro sistema de tratamento. .... 34
- FIGURA 5. Diagrama esquemático do sistema mesofílico com período e condições operacionais dos reatores UASB em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbico da vinhaça, carga orgânica volumétrica (COV) em g DQOtotal (L d)-1, taxa de recirculação do efluente (vinhaça : efluente) em % vol., fontes de nutrientes para suplementação de N e P, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h) e fonte de alcalinidade. .... 36
- FIGURA 6. Diagrama esquemático e (a) e fotografia (b) do reator de Fenton. ... 44
- FIGURA 7. Esquema do Jar-Teste utilizado nos ensaios de coagulação/floculação, (RODRIGUES, 2013). .... 45
- FIGURA 8. Combinação dos Processos de Coagulação/Floculação e de Fenton. .... 46
- FIGURA 9. Fotografia do sistema em modo de funcionamento, composto por: Computador conectado as caixas de conexão (BACCom12) ligadas aos sensores (sensores óticos BCP-CH4) e aos medidores (MilliGascounter® MGC-1) de metano, os quais estão acoplados aos reatores banho termostático com agitação..... 49

- FIGURA 10. Fotografias de alguns elementos da instalação experimental utilizada: (a) sensores óticos BCP-CH<sub>4</sub>; (b) MilliGascounter® MGC-1; (c) caixa de conexão BACCom 12 (AMORIN, 2015). ..... 49
- FIGURA 11. Nitrogênio amoniacal (N<sub>am</sub>), ácidos voláteis totais (TR<sub>2</sub>) dos afluentes e efluentes e das relações TR<sub>2</sub>/AT dos efluentes durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub> no tratamento anaeróbio da vinhaça. .... 52
- FIGURA 12. Valores de pH, alcalinidade total (AT) no afluente e efluentes dos reatores UASB termofílicos em série (TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub>) no tratamento da vinhaça. .... 55
- FIGURA 13. Valores de alcalinidade parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores UASB termofílicos em série (TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub>) tratamento da vinhaça. .... 55
- FIGURA 14. Valores das concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV) e da relação propionato/acetato no afluente e efluentes dos reatores UASB, TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub>, no tratamento anaeróbio da vinhaça sobre condições termofílicas. .... 58
- FIGURA 15. Valores de carga orgânica volumétrica (COV), DQO<sub>total</sub> no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO no tratamento anaeróbio da vinhaça nos reatores termofílicos em série. .... 61
- FIGURA 16. Produção volumétrica de metano, produção específica de metano e concentração de metano no biogás nos reatores UASB em séries no TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub> no tratamento anaeróbio termofílico da vinhaça. .... 63
- FIGURA 17. Concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), nos pontos de coletas de lodo dos reatores UASB em série TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub> no tratamento termofílico da vinhaça..... 70
- FIGURA 18. Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (a) e classes (b) das bacterianas e afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (c) e classes (d) das arqueias encontrados nas amostras de lodo dos reatores UASB, TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub>. Normalizado pelo tamanho da menor amostra (37.074 sequências). .... 72
- FIGURA 19. Quantificação absoluta dos micro-organismos, utilizando qPCR, dos domínios Bactéria e Arqueias, três ordens e duas famílias do domínio das arqueias, presentes no lodo dos reatores UASB, TR<sub>1</sub> e TR<sub>2</sub> nos pontos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>. SV: sólidos voláteis. .... 77
- FIGURA 20. Valores médios da temperatura do ar mínima (Min) e média (Med) durante o período de operação dos reatores UASB mesofílicos em série MR<sub>1</sub> e MR<sub>2</sub> no tratamento anaeróbio da vinhaça ..... 79

- FIGURA 21. Valores de pH, alcalinidade total (AT) parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores UASB mesofílicos em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça. .... 82
- FIGURA 22. Nitrogênio amoniacal (Nam) e ácidos voláteis totais dos afluentes e relações AVT/AT dos efluentes durante a operação dos reatores UASB mesofílicos em série, MR1 e MR2 no tratamento anaeróbio da vinhaça. .... 85
- FIGURA 23. Valores das concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV) e da relação propionato/acetato no afluente e efluentes dos reatores UASB, MR1 e MR2 no tratamento anaeróbio da vinhaça sobre condições mesofílicas. .... 87
- FIGURA 24. Produção volumétrica de metano, produção específica de metano e concentração de metano no biogás nos reatores UASB em séries no R1 e R2 no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 89
- FIGURA 25. Valores de carga orgânica volumétrica (COV), DQO<sub>total</sub> no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO<sub>total</sub> durante a operação dos reatores UASB mesofílicos em série, MR1 e MR2 no tratamento anaeróbio da vinhaça. .... 91
- FIGURA 26. Matriz de correlação de algumas variáveis críticas relacionadas à produção de metano e remoção de DQO e seu respectivo coeficiente de Pearson durante as fases IV a VII, período entre 280 a 650 dias. As correlações com  $p > 0,01$ , (representadas pelos quadrados brancos) são consideradas não significativas. T<sub>max</sub>: temperatura máxima; T<sub>min</sub>: temperatura mínima; T<sub>med</sub>: temperatura média; DQO: demanda química de oxigênio; PVM: Produção volumétrica de metano; COV: carga orgânica volumétrica; CH<sub>4</sub>: concentração metano no biogás; PEM: produção específica de metano. .... 93
- FIGURA 27. Concentrações de sólidos totais (ST) e de sólidos voláteis (SV), nos 8 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4 P5 P6, P7 e P8 dos reatores UASB em série, MR1, no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 98
- FIGURA 28. Concentrações de sólidos totais (ST) e de sólidos voláteis (SV), nos 8 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4 P5 P6, P7 e P8 dos reatores UASB em série, MR2, no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça. .... 98
- FIGURA 29. Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (a) e classes (b) das bacterianas e afiliações taxonômicas encontrados nas amostras de lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2. Normalizado pelo tamanho da menor amostra (37.074 sequências). Outros: <0,01 %. 104

- FIGURA 30. Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (a) e classes (b) das arqueias e afiliações taxonômicas encontrados nas amostras de lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2. Normalizado pelo tamanho da menor amostra (37.074 sequências). Outros: <0,01%. ..... 104
- FIGURA 31. Quantificação absoluta dos micro-organismos, utilizando qPCR, dos domínios Bactéria e Arqueias, três ordens e duas famílias das arqueias, presentes no lodo dos reatores UASB (MR1 e MR2) nos pontos de coletas P1, P2 e P3. SV: sólidos voláteis. .... 107
- FIGURA 32. Composições taxonômicas das arqueias metanogênicas ao nível do gênero dos reatores UASB em série termofílicos (TR1 e TR2) e mesofílicos (MR1 e MR2). ..... 112
- FIGURA 33. Quantificação absoluta dos micro-organismos, utilizando qPCR, dos domínios Bactéria e Arqueias (a), três ordens (b), duas famílias das arqueias (c), presentes no lodo dos reatores UASB termofílicos (TR1 e TR2) e mesofílicos (MR1 e MR2) tratando vinhaça. SV: sólidos voláteis. .... 114
- FIGURA 34. Aumento gradual da carga orgânica volumétrica (COV) nos reatores UASB em série sob condições termofílicas (TR1 e TR2) (a) e mesofílicas (MR1 e MR2) (b). ..... 116
- FIGURA 35. Produção volumétrica de metano nos reatores UASB em série, sob condições termofílicas (TR1 e TR2) e mesofílicas (MR1 e MR2). ..... 117
- FIGURA 36. Produção volumétrica de metano nos reatores UASB em série, sob condições termofílicas (TR1 e TR2) e mesofílicas (MR1e MR2). 117
- FIGURA 37. Efeito da dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na remoção do COT (a) e valores de pH durante a reação e remoção de TOC (b) (pH<sub>inicial</sub> = 5,0; T = 55 °C e Fe<sup>3+</sup> = 1,45 g L<sup>-1</sup>). ..... 119
- FIGURA 38. Efeito da dosagem de Fe<sup>3+</sup> na remoção do COT (a) e valores de pH durante a reação e remoção de TOC (b) (pH<sub>inicial</sub> = 5,0; T = 55 °C e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 26,5 g L<sup>-1</sup>). ..... 121
- FIGURA 39. Valores médio de DQO e COT obtidos em cada teste no início (t = 0) e no final (t = 15 dias) avaliando a diluição de 3 tipos de efluentes com a vinhaça bruta: (I) vinhaça biodigerida, (II) vinhaça biodigerida tratada com Fenton e (III) vinhaça biodigerida tratada com coagulação/floculação + Fenton. .... 124

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das indústrias sucroenergéticas brasileiras produz açúcar, bioetanol e eletricidade. Na safra 2016/2017, foram produzidas 652 mil toneladas de cana-de-açúcar, gerando 38,7 mil toneladas de açúcar e 27,2 bilhões de litros de bioetanol (UNICA, 2017). Na destilação do bioetanol são gerados, de 10 a 14 L de vinhaça para cada litro de etanol (ORTEGÓN et al., 2016). De acordo com Parnaudeau et al. (2008), a maior parte do material orgânico presente na vinhaça de cana-de-açúcar é composta por glicerol, ácido láctico, etanol e ácido acético.

No Brasil, a vinhaça é utilizada principalmente na fertirrigação dos canaviais (LEME; SEABRA, 2016), em virtude da presença de água, matéria orgânica, e nutrientes. No entanto, a fertirrigação é questionável em virtude do pH ácido, cor escura e presença de substâncias químicas que podem levar à contaminação das águas subterrâneas, colmatação do solo (ARIMI et al., 2014; FUES e GARCIA, 2014), o aumento da fitotoxicidade, o odor desagradável, consideráveis emissões de metano durante o armazenamento temporário, e também as emissões de óxido nitroso após a aplicação da vinhaça no solo (JANKE et al., 2016a).

Embora a digestão anaeróbia seja reconhecida como a melhor alternativa para o tratamento da vinhaça, ainda não é uma tecnologia bem estabelecida, em virtude das variações nas características e na presença de compostos inibitórios na vinhaça. Além disso, existem lacunas no processo que precisam ser estudadas para melhorar o potencial de aplicação da digestão anaeróbia na produção de bioenergia a partir da vinhaça (MOTA; SANTOS; AMARAL, 2013).

O acúmulo de ácidos voláteis em reatores anaeróbios utilizados no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016), pois a baixa alcalinidade e a elevada concentração de ácidos orgânicos da vinhaça resultam em um pH desfavorável (entre 3 e 5) para a metanogênese (CAMARILLO; RINCÓN, 2012). O processo anaeróbio em dois estágios, com reatores em série, pode ser um arranjo vantajoso para o tratamento da vinhaça, pois favorece o enriquecimento de micro-organismos específicos em reatores separados, previne as sobrecargas orgânicas e ácidas e atenua o efeito inibitório dos compostos tóxicos (CAMARILLO; RINCÓN, 2012), favorecendo a estabilidade e o controle do processo (DEMIREL;

YENIGÜN, 2006) e ainda proporciona uma maior produção de energia do sistema (ZHONG; STEVENS; HANSEN, 2015).

A vinhaça de cana-de-açúcar geralmente possui baixas concentrações de nitrogênio e fósforo (CHRISTOFOLETTI et al., 2013) e independentemente das diferentes matérias-primas utilizadas para a produção de etanol (caldo ou melaço), as concentrações de Ni e Cu estão abaixo dos valores ótimos para atender a digestão anaeróbia e obter a produção máxima de metano (JANKE et al., 2016a). As concentrações de Fe, Co, Mo, Mn, Se e Zn normalmente estão próximas da faixa mínima e podem não ser suficientes (JANKE et al., 2016a). A disponibilidade de nutrientes é fator importante para o desenvolvimento microbiano (ALPHENAAR et al., 1993) e caso necessário é importante a suplementação. A suplementação de nutrientes tem sido realizada de diversas maneiras, como por exemplo, com a utilização do bicarbonato de amônio como fonte de nitrogênio (N) e de alcalinidade, com a utilização de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) como fonte de fósforo (P) (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016).

A utilização da torta de filtro e a recirculação de efluente podem ser interessantes estratégias operacionais, fornecendo fonte de nutrientes e de alcalinidade. A torta de filtro é considerada como resíduo sólido da produção do açúcar, e é proveniente do tratamento físico-químico do caldo de cana-de-açúcar (processo de clarificação). São gerados de 30 a 50 kg de torta de filtro para cada tonelada de cana, com característica esponjosa, cor escura, forte odor e alta umidade (GEORGE et al., 2010). Este resíduo é rico em nutrientes, com concentrações de N e P de 1,72% e 0,6% dos sólidos totais (ST), respectivamente (JANKE et al., 2016b); e de K, Ca, Mg e S de 0,3; 2,1; 0,6 e 0,25% dos ST, respectivamente (PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013). Atualmente a torta de filtro é aproveitada como fertilizante na cultura da cana de açúcar (GEORGE et al., 2010; MAKUL; SUA-IAM, 2016). Durante a digestão anaeróbia, os nutrientes contidos na vinhaça, incluindo o N, P, K, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, geralmente são conservados e o efluente dos reatores podem ser utilizados na fertirrigação (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000) com menor impacto ambiental.

A vinhaça de cana-de-açúcar na indústria é produzida com temperaturas elevadas, de 90 a 95 °C. O tratamento anaeróbio termofílico para resíduos que já possuem temperaturas elevadas pode ser vantajoso (VAN LIER, 1996) e pode ser



considerada uma importante estratégia operacional. A temperatura pode afetar as reações bioquímicas, como o aumento das taxas de reação, o que permitiria o uso de menores tempos de detenção hidráulico (TDH), diminuindo os custos de capital e aumentando a degradação dos sólidos orgânicos e a produção de biogás. Mas de acordo com Van Haandel et al. (2014), considerando apenas o potencial da digestão anaeróbia, o tratamento em condições mesofílicas é mais vantajoso, pois a atividade metanogênica específica tende a ser maior no lodo mesofílico do que no termofílico. Além disso, segundo Vaccari et al. (2005) estão sendo instalados, em algumas indústrias, sistemas de aproveitamento da energia térmica da vinhaça, tornando interessante a digestão anaeróbia mesofílica. Ou seja, o tratamento anaeróbio termofílico e mesofílico possuem vantagens e desvantagens, que ainda necessitam de avaliações para o tratamento anaeróbio da vinhaça.

Para entender melhor as interações dos grupos microbianos na digestão anaeróbia, há grande interesse em investigar a estrutura e a dinâmica da comunidade microbiana em COV elevada, buscando otimizar as condições operacionais e melhorar o aproveitamento dos resíduos (DOHRMANN et al., 2011; DUDA et al., 2015). Além disso, mais de 95% da diversidade microbiana é desconhecida, e a previsão das taxas de intermediários limitantes na digestão anaeróbia é um desafio. As ferramentas genômicas oferecem oportunidade para acessar esses eventos bioquímicos e delinear condições que mostrem a máxima eficiência de desempenho (PALIWAL; PURANIK; PUROHIT, 2012).

No processo anaeróbio utilizado no tratamento da vinhaça a DQO convertida em biogás têm sido variável e foram obtidos 63% por Ferraz JR et al. (2016), 75% por Van Haandel et al. (2014), 77% por Kaparaju; Serrano; Angelidaki (2010) e 82% por Barros; Duda; Oliveira (2016). No entanto, apesar da redução da DQO, o efluente resultante da digestão anaeróbia ainda possui cor escura e alto teor de compostos orgânicos recalcitrantes e inibitórios para as atividades biológicas. É preocupante a presença destas substâncias na vinhaça biodigerida, pois parte das águas residuárias biodigeridas são recirculadas para a diluição do afluente.

A utilização dos processos coagulação/floculação química e oxidativos avançados (POA) são alternativas para o tratamento de águas residuárias que possuem substâncias biologicamente recalcitrantes e tóxicas (GILPAVAS;

DOBROSZ-GÓMEZ; ANGEL GÓMEZ-GARCÍA, 2017). A coagulação/floculação química baseia-se na desestabilização dos colóides presentes no efluente e, conseqüentemente formação de flocos através da adição, normalmente de sais de ferro ou alumínio; os flocos formados são separados por sedimentação ou filtração. Os POA são baseados na formação de radicais hidroxila, entre os POA destaca-se o processo de Fenton que gera os radicais hidroxilo, com elevado potencial de oxidação ( $E^{\circ}=2.8$  V), pela decomposição do peróxido de hidrogênio, em meio ácido, catalisado pelo íon ferro. Os processos físico-químicos e os POA podem ser eficientes na diminuição da toxicidade, aumento da biodegradabilidade e, reduzem a carga orgânica não degradada pelos processos biológicos.

Sendo assim, a proposta do presente projeto de doutorado foi o desenvolvimento de estratégias para a obtenção de estabilidade, aumento da produção de metano e qualidade da vinhaça biodigerida. O presente estudo conta com a avaliação dois sistemas (mesofílico e termofílico) com configurações em série. Os sistemas utilizados foram submetidos ao aumento gradual da COV para a obtenção de altas COV e produção de metano com a suplementação de nutrientes e alcalinidade através da torta de filtro e recirculação do efluente. Com as mais altas COV, avaliou-se a diversidade microbiana utilizando sequenciamento de última geração (Ion Torrent Plataforma) e PCR quantitativa em tempo real para a melhor compreensão dos processos bioquímicos e das interações microbianas, na configuração em série e nas diferentes condições de temperaturas, termofílicas e mesofílicas. Durante período de estágio sanduíche na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Portugal, avaliou-se o tratamento da vinhaça biodigerida, utilizando processos de coagulação/floculação química e POA processos oxidativos avançados, para melhoria da biodegradabilidade do efluente, visando a recirculação nos sistemas anaeróbios.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo principal foi avaliar um sistema em condições termofílicas e um sistema em condições mesofílicas, com configuração ainda pouco explorada, compostos por reatores UASB em série com separadores de fases em forma de Y para a produção de metano a partir da vinhaça. Os sistemas foram submetidos a aumento gradual da COV para melhorar a conversão anaeróbia da vinhaça, buscando elevada produção de metano em condições estáveis.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar a utilização da torta de filtro para suplementação de nitrogênio (N) e fósforo (P) na vinhaça (utilizada no afluente) para a produção de biogás.

Avaliar o efeito ocasionado pela utilização de reatores anaeróbios em série, para a manutenção da estabilidade na produção de biogás e qualidade da vinhaça biodigerida.

Avaliar a diversidade e quantidade de bactérias e arqueias, por sequenciamento de última geração (Ion Torrent Plataforma) e PCR quantitativa em tempo real. Espera-se que o trabalho relatado aqui contribua para o conhecimento sobre os mecanismos de resposta microbiana termofílica e mesofílica em combinação de máxima COV e produção de metano para melhoria da digestão anaeróbia da vinhaça.

Avaliar o tratamento químico utilizando os processos de coagulação/floculação e Fenton no tratamento da vinhaça biodigerida proveniente do sistema termofílico, para melhoria da biodegradabilidade e possível recirculação nos reatores anaeróbios.

Avaliar o retorno do efluente após o tratamento físico-químico na digestão anaeróbia, realizando testes metanogênicos, para verificar o possível aumento da produção de biogás, em virtude da possível diminuição dos compostos recalcitrantes e aumento da biodegradabilidade

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Vinhaça de cana-de-açúcar

A produção de bioetanol aumentou mundialmente e os Estados Unidos e o Brasil são responsáveis por 86% dessa produção (SEYBOTH et al., 2016). O Brasil lidera a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar, totalizou 27,2 bilhões de litros na safra 2016/2017 (UNICA, 2017), sendo considerada matéria-prima renovável de baixo custo e alta eficiência energética.

No processo de produção do bioetanol são gerados na etapa de destilação de 10 a 14 litros de vinhaça para cada litro de bioetanol (ORTEGÓN et al., 2016). Os principais componentes da vinhaça são: a matéria orgânica e os nutrientes, cuja composição da vinhaça pode variar dependendo da matéria-prima utilizada (cana-de-açúcar, beterraba, milho, etc). A produção de bioetanol, utilizando cana-de-açúcar como matéria prima, pode ser realizado através de vários tipos de mostos: utilizando o caldo da cana, melaço (subproduto da produção do açúcar) ou a mistura de melaço com o caldo de cana (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; MORAES et al., 2014; WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). Na Figura 1, está ilustrado um fluxograma esquemático simplificado do processo de produção do etanol e do açúcar, destacando a geração da vinhaça e torta-de-filtro.

A vinhaça pode apresentar outras importantes características que causam impacto negativo, tais como: a cor, em virtude da formação de melanoidinas a partir da reação de Maillard entre açúcares e proteínas; caramelos de açúcares superaquecidos e furfurais de hidrólise ácida; a presença de metais pesados e poluentes orgânicos, como clorofórmio, pentaclorofenol, fenol e cloreto de metileno; compostos fenólicos, como os ácidos tânico e húmico, oriundos da matéria-prima, etc. (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000).

Várias alternativas têm sido destacadas para o destino da vinhaça: digestão anaeróbia, combustão, produção de levedura, utilização na construção civil, produção de ração animal, porém a maioria estão apenas em etapas de desenvolvimento e pesquisa (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; LAIME et al., 2011). Entre as alternativas para o uso de vinhaça desenvolvidas em todo o mundo, a fertirrigação é a mais utilizada em virtude do baixo custo de manutenção e da disponibilidade.

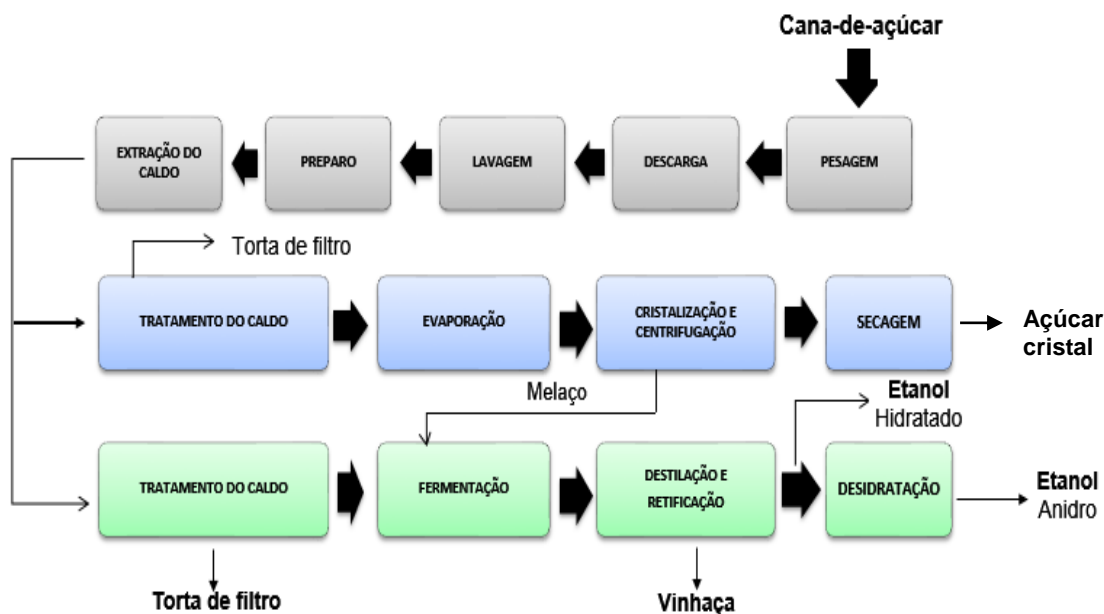


FIGURA 1. Fluxograma simplificado e adaptado da produção de açúcar e etanol na indústria sucroenergética. Adaptado de Christofolletti et al. (2013).

### 3.2. Torta de filtro

A torta de filtro é um resíduo sólido gerado durante o processo de tratamento do caldo de cana-de-açúcar, resultante da mistura de bagaço moído e lodo da decantação após a filtração mecânica. A composição química da torta de filtro é variável em função da variedade e da maturação da cana, tipo de solo, processo de clarificação do caldo e outros (Tabela 1). Apresenta na sua composição: partículas de solo inorgânico, pequenos pedaços de bagaço de cana-de-açúcar (JANKE et al., 2016b; PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013); possui altos teores de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio e cálcio; teores consideráveis de potássio, magnésio e expressivas quantidades de Fe, Mn, Zn (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2011). Em virtude das quantidades de nutrientes, principalmente N e P; é utilizada como adubo orgânico, após compostagem, no processo de adubação da cana-de-açúcar (EYKELBOSH et al., 2014; JANKE et al., 2015; MAKUL; SUA-IAM, 2016).

TABELA 1. Composição química aproximada da torta de filtro de cana de açúcar com teor de umidade de 60 %.

Parâmetros	Quantidade em g/kg	Parâmetros	Quantidade em g/Kg
<b>Nitrogênio</b>	14,2	<b>Manganês</b>	1,06
<b>Fósforo Total</b>	17,3	<b>Zinco</b>	0,2
<b>Potássio</b>	1,45	<b>Sódio</b>	0,34
<b>Cálcio</b>	25,3	<b>Ferro</b>	7,45
<b>Magnésio</b>	3,4	-	-

Fonte: Adaptado de Almeida Júnior et al. (2011).

A produção final da indústria sucroenergética brasileira na safra 2016/2017 foi de 652 milhões toneladas de cana de açúcar e 34 mil toneladas de açúcar (UNICA, 2017). Para cada tonelada de cana moída podem ser gerados aproximadamente 35 kg de torta de filtro (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2011). Portanto, estima-se que na safra 2016/2017 foram produzidos mais de 23 milhões de toneladas de torta de filtro.

### 3.3. Vinhaça + torta de filtro para a digestão anaeróbia

A vinhaça de cana-de-açúcar geralmente possui baixas concentrações de nitrogênio e fósforo (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; JANKE et al., 2016a), também possui composição altamente variável, na qual pode ser destacado as concentrações de DQO que podem chegar até 89000 mg L<sup>-1</sup>, quando utiliza-se o melaço para a produção de etanol (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). O nitrogênio e o fósforo são os principais nutrientes, em ordem decrescente de importância, necessários para a estimulação nutricional de micro-organismos metanogênicos, pois a deficiência desses nutrientes reduz a sua atividade (ALPHENAAR et al., 1993).

Em estudos recentes para o tratamento anaeróbio da vinhaça, têm sido reportado a utilização de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e uréia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) para suplementação de fósforo e nitrogênio (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; JANKE et al., 2016). Conforme Villa-Montoya et al. (2016), outras soluções tecnicamente e economicamente mais apropriadas para os tratamentos anaeróbios de resíduos industriais devem ser exploradas. A torta de filtro é uma alternativa

interessante para o processo de digestão anaeróbia da vinhaça, tendo em vista o aproveitamento dos nutrientes da torta de filtro que podem reduzir os custos dispensando o uso de compostos químicos.

### **3.4. Digestão anaeróbia**

A digestão anaeróbia representa um sistema ecológico equilibrado, onde a fração orgânica dos resíduos é decomposta na ausência de oxigênio, levando à produção de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , além de novas células bacterianas. O processo de conversão anaeróbia dos resíduos orgânicos depende da interação de pelo menos três grupos de micro-organismos: bactérias fermentativas (ou acidogênicas); bactérias sintróficas (ou acetogênicas) e arqueias metanogênicas. A aplicação bem-sucedida dos processos anaeróbios está sujeita ao cumprimento de uma série de requisitos, tais como: temperatura, pH, alcalinidade, ácidos voláteis, nutrientes (CHERNICHARO, 2007).

A digestão anaeróbia pode ocorrer nas faixas de temperatura psicrófila, mesófila e termófila. A temperatura é um dos fatores importantes no desempenho e na estabilidade do processo anaeróbio, está correlacionada com a variação da composição e da diversidade da comunidade microbiana, e também com as alterações nas vias e no equilíbrio termodinâmico das reações bioquímicas (LIN et al., 2016; PAP et al., 2015). Geralmente, considera-se que a digestão anaeróbia mesófila ocorre na faixa de 30 a 40 °C com temperatura ótima de 35 a 37 °C e a digestão termófila ocorre na faixa de 50 a 60 °C com temperatura ótima de 54 °C (VAN LIER, 1995).

A maioria dos micro-organismos metanogênicos crescem e produzem metano em condições neutras de pH ou ligeiramente alcalinas com um intervalo ótimo de 7,0 a 8,0. Os sistemas de digestão anaeróbia geralmente são mantidos nas condições ótimas com medidas de controle operacional, evitando o acúmulo acentuado das concentrações de ácidos voláteis totais (AVT), além da capacidade de tamponamento do sistema. A utilização de alcalinizantes químicos e/ou técnicas de recirculação do efluente tem sido adotadas para o aumento do pH e da capacidade de tamponamento do processo (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; JANKE et al., 2016a; VAN HAANDEL et al., 2014).

Os nutrientes são necessários para o crescimento e sobrevivência de grupos específicos de micro-organismos. As necessidades nutricionais das populações microbianas envolvidas nos processos biológicos são baseadas na composição química empírica da célula microbiana. Segundo Chernicharo (2007), a maioria das diretrizes contidas na literatura especializada referem-se a uma suplementação de nutrientes baseada na DQO. Na literatura são descritas quantidades de nutrientes variáveis e a relação DQO:N:P =350:5:1 é referenciada como suficiente, partindo do princípio de que os nutrientes presentes estão na forma disponível para os micro-organismos.

#### **3.4.1. Bioquímica da digestão anaeróbia**

O processo de conversão anaeróbia dos resíduos orgânicos depende da interação de micro-organismos e, nos últimos anos, foram intensamente investigados, por meio de isolamento e cultivo das espécies em condições de laboratório e análises bioquímicas. Esses estudos permitiram a identificação dos estágios sequenciais envolvidos nos processos metabólicos, que podem ser divididos em quatro fases principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (KOUGIAS et al., 2017).

A primeira fase no processo de digestão anaeróbia consiste na hidrólise de material particulado complexo (polímeros) em materiais dissolvidos mais simples (moléculas menores), que podem penetrar através das membranas celulares das bactérias fermentativa. Os produtos solúveis da fase de hidrólise são metabolizados dentro das células da bactéria fermentativa e são convertidos em vários compostos mais simples, que são então excretados pelas células (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; CHERNICHARO, 2007).

A acidogênese é realizada por um grupo grande e diverso de bactérias fermentativas, usualmente, do gênero *Clostridium*, que compreende espécies anaeróbias que formam esporos, capazes de sobreviver em ambientes muito adversos, e a família Bacteroidaceaea, organismos comumente encontrados nos tratos digestivos, que participam da degradação de açúcares e aminoácidos (CHERNICHARO, 2007).



Na etapa de acetogênese ocorre a conversão dos produtos gerados na fase anterior principalmente para acetato e hidrogênio. E a etapa final é a metanogênese, onde os produtos da acetogênese são utilizados como substrato para a produção de metano, dióxido de carbono e hidrogênio, com alto potencial energético. As arqueias metanogênicas como *Metanobacterium*, *Metanobrevibacter*, *Metanosarcina*, *Metanococcus*, *Metanomicrobium* e *Methanospirillum* são responsáveis pela produção de metano (CHERNICHARO, 2007).

A identificação desses estágios envolvidos nos processos metabólicos tem sido importante para os avanços em diversos estudos, e estudos recentes têm buscado o maior controle destas etapas. A separação da acidogênese e metanogênese tem sido avaliada em estudos recentes buscando o aumento da estabilidade do processo e maior produção de energia, que podem ser obtidos através do controle da fase de acidificação, que conseqüentemente impede a inibição da população metanogênicas. (FU et al., 2017)

### **3.4.2. Microbiologia da digestão anaeróbia**

A digestão anaeróbia é classificada como ecossistema complexo, e a elucidação deste ecossistema é importante para a melhor compreensão dos processos bioquímicos envolvidos na produção de biogás. Porém, a compreensão da função e das capacidades metabólicas das comunidades microbianas na digestão anaeróbica é limitada (ZAMANZADEH et al., 2016).

Na etapa hidrolítica, os micro-organismos dos filos Firmicutes e Actinobacteria são comumente encontrados pela habilidade em metabolizar ampla variedade de substratos como proteínas, lipídios, lignina, celulosa, açúcares, e aminoácidos, mediante a produção de celulases, lipases, proteases e outras enzimas extracelulares (GRESES et al., 2017; WANG et al., 2016).

Durante a acidogênese, alguns micro-organismos produtores de ácidos, como os do filo Bacteroidetes que corresponde a família Bacteroidaceae, estão envolvidos no processo de hidrólise e acidogênese (DIAS et al., 2016), algumas espécies fermentam a glicose e os produtos finais metabólicos são acetato, CO<sub>2</sub> e hidrogênio. Os micro-organismos da família Thermotogaceae estão envolvidos na fermentação

de carboidratos e peptídeos (HAO; WANG, 2015). A proporção entre as comunidades fermentativas e metanogênicas é um fator muito importante, uma vez que a baixa proporção dos micro-organismos metanogênicos pode provocar o acúmulo de ácidos (GUO et al., 2014).

Na fase metanogênica, as arqueias do gênero *Methanothermobacter* têm sido predominantes em condições termofílicas, enquanto que as *Methanosaeta* têm sido predominantes em condições mesofílicas (GUO et al., 2014). Em geral, a *Methanothermobacter* tem crescimento ótimo em temperatura de 65 °C e capacidade de crescer em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> como carbono e fonte de energia. A *Methanosaeta* pode estar presente em todos os reatores anaeróbios, preferindo condições mesofílicas, maiores alcalinidades e altas relações C:N.

A *Methanosarcina* cresce formando agregados e formando grânulos irregulares que podem resultar em maior tolerância a compostos iônicos tóxicos, produzindo metano a partir de acetato, metanol, monoacetilamina, dimetilamina, trimetilamina, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pelas rotas acetoclásticas e hidrogenotróficas (GUO et al., 2014).

Para maximizar a produção de metano é necessário entender as interações microbianas, os papéis das espécies e cada rota bioquímica, e então, promover condições ambientais favoráveis a um maior crescimento e atividade da biomassa presente. No entanto, poucos estudos têm avaliado a dinâmica microbiológica nos sistemas de digestão anaeróbia, principalmente, pela necessidade e dificuldade de utilização de técnicas moleculares. Na tabela 2, estão apresentadas as principais famílias e as características metabólicas dos principais micro-organismos (bactérias e arqueias) que atuam nos sistemas anaeróbios.

TABELA 2. Famílias de bactérias e arqueias em sistemas anaeróbios.

Famílias	Funções	Taxonomia (Filo, Classe)	Características metabólicas	Referências
Erysipelotrichaceae	Acidogêneses	Firmicutes, Erysipelotrichia	Algumas espécies fermentam glicose, os principais produtos finais metabólicos são o butirato, o lactato e o formiato.	(MAESSCHALCK et al., 2014)
Clostridiaceae	Acidogêneses	Firmicutes, Clostridia	Fermentam glicose; os produtos finais metabólicos são hidrogênio, butirato, acetato e lactato.	(CHENG et al., 2013; LIN et al., 2007)
Bacteroidaceae	Acidogêneses	Bacteroidetes, Bacteroidia	Algumas espécies fermentam a glicose, os produtos finais metabólicos são acetato, CO <sub>2</sub> e hidrogênio	(KHAN et al., 1980)
Veillonellaceae	Acidogêneses	Firmicutes, Negativicutes	Algumas espécies fermentam a glicose, os produtos finais metabólicos são acetato, propionato, isobutirato, butirato e isovalerato.	(CARLIER et al., 2002)
Synergistaceae	Acidogêneses	Synergistetes, Synergistia	Algumas espécies fermentam glicose e ácidos orgânicos, os produtos metabólicos finais são acetato, CO <sub>2</sub> e hidrogênio, co-cultura com as metanogênicas hidrogenotróficas	(HONDA; FUJITA; TONOUCI, 2013; MAVROMATIS et al., 2013)
Syntrophaceae	Acetogêneses	Proteobacteria, Deltaproteobacteria	Bactérias que utilizam Propionato e butirato, bactérias sintróficas por co-cultura com metanogênicas hidrogenotróficas.	(MOERTELMAIER et al., 2014; REN et al., 2014)
Syntrophomonadaceae	Acetogêneses	Firmicutes, Clostridia	Algumas espécies utilizam butirato; associação sintrófica com as metanogênicas hidrogenotróficas	(DJAO et al., 2010; SOUSA et al., 2007)
Thermotogaceae	Acidogêneses	Thermotogae, Thermotogae	Capaz de fermentar carboidratos e peptídeos	(HAO; WANG, 2015)
Porphyromonadaceae	Acidogêneses	Bacteroidetes Bacteroidia	Algumas espécies envolvidas na hidrólise e acidogênese	(HAHNKE et al., 2015)
Rikenellaceae	Acidogêneses	Bacteroidetes, Bacteroidia	Fermenta carboidratos, produz hidrogênio	(SU et al., 2014)
Ruminococcaceae	Acidogêneses	Firmicutes, Clostridia	Fermenta glicose; os produtos finais metabólicos são hidrogênio e AVT	(LIU et al., 2015)
Desulfovibrionaceae	Acetogêneses	Proteobacteria, Deltaproteobacteria	Algumas espécies utilizam lactato e piruvato; os principais produtos finais metabólicos são acetato, hidrogênio e CO <sub>2</sub>	(ZHAO et al., 2012)
Christensenellaceae	Acidogêneses	Firmicutes, Clostridia	Algumas espécies que fermentam glicose, principais produtos metabólicos são acetato e butirato.	(MOROTOMI; NAGAI; WATANABE, 2012)
Sphingobacteriaceae	Acidogêneses	Bacteroidetes, Sphingobacteriia	Algumas espécies que fermentam glicose, principais produtos finais metabólicos são AVT	(PANKRATOV et al., 2007)
Spirochaetaceae	Oxidantes de acetato	Spirochaetae, Spirochaetes	Os principais produtos finais metabólicos são hidrogênio e CO <sub>2</sub>	(LEE et al., 2013)
Anaerolineaceae	Acidogêneses	Chloroflexi, Anaerolineae	Algumas espécies que fermentam glicose, principais produtos metabólicos finais são AVT e hidrogênio	(YAMADA et al., 2006)
Methanosaetaceae	Metanogênicas	Euryarchaeota, Methanomicrobia	Metanogênicas acetoclásticas	(LIU; WHITMAN, 2008)
Methanobacteriaceae	Metanogênicas	Euryarchaeota, Methanobacteria	Metanogênicas Hidrogenotróficas	(LIU; WHITMAN, 2008)
Methanospirillaceae	Metanogênicas	Euryarchaeota, Methanomicrobia	Metanogênicas Hidrogenotróficas	(LIU; WHITMAN, 2008)

Fonte adaptada: (SI et al., 2016). AVT: ácidos voláteis totais.

### 3.4.3. Diversidade microbiana na digestão anaeróbia da vinhaça

De acordo com estudos recentes, a diversidade microbiana na digestão anaeróbia pode variar em função do tipo de substrato, tipo de reatores, das características operacionais, etc. (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; LIN et al., 2016; PAP et al., 2015).

Leite et al. (2015) avaliaram os efeitos do aumento da carga orgânica na dinâmica da comunidade metanogênica na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar. Os autores observaram uma grande mudança na abundância das metanogênicas acetoclásticas, com o aumento da COV sob condições estáveis de operação do reator. A sobrecarga do reator e a falha do processo foram indicadas pela tendência do predomínio de metanogênicas hidrogenotróficas com abundâncias crescentes das ordens Methanobacteriales e Methanomicrobiales e queda na abundância do gênero *Methanosarcina*.

Van Haandel et al. (2014) avaliaram a sobrecarga orgânica sistemática em reatores UASB para estimular a acumulação de *Methanosarcina* e, eventualmente, substituir *Methanosaeta*. Esperava-se que a manutenção de uma alta concentração de material orgânico resultasse no desenvolvimento de um lodo mais ativo, porque tal condição favorece o crescimento das *Methanosarcina* e estas têm uma capacidade de produção específica de metano muito maior que as *Metanosaeta* que normalmente predominam em sistemas de tratamento de águas residuárias. Uma investigação experimental de 180 dias, em escala piloto mostrou que as *Methanosarcina* não foram capazes de estabelecer-se como a população dominante sob as condições de sobrecarga nos reatores, provavelmente, devido à propensão reduzida para se incorporar nos grânulos de lodo.

España-Gamboa et al. (2012) destacaram os micro-organismos metanogênicos pertencentes as ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales, detectados por PCR durante a operação com COV ótima. Van Haandel et al. (2014) destacaram o crescimento favorável de *Methanosarcina* em reatores UASB operados em condições de sobrecarga. Assim como os estudos de España-Gamboa et al. (2012) e Van Haandel et al. (2014), outros trabalhos são interessantes, visando a compreensão das

comunidades microbianas presentes e a influência na eficiência e estabilidade dos processos anaeróbios.

### **3.5. Digestão anaeróbia da vinhaça**

Entre as alternativas para a utilização da vinhaça, o processo de digestão anaeróbia tem como vantagem: a produção de metano, que pode ser usado para produção de energia; baixo consumo de energia elétrica; baixa produção de lodo biológico a ser descartado; diminuição do potencial poluidor, principalmente em virtude da redução da carga orgânica da vinhaça; e efluente com mais qualidade para ser utilizado no processo de fertirrigação. Esta concepção, integrando a produção de etanol, a recuperação energética e o aproveitamento de subprodutos de valor agregado se insere no conceito de uma biorrefinaria adotado pelos recentes estudos (LEITE et al., 2015; MARIANO et al., 2013; MORAES et al., 2014).

A utilização da digestão anaeróbia para o tratamento da vinhaça proveniente da produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil é considerada interessante, tendo em vista que a quantidade de vinhaça gerada é muito expressiva. No entanto, a aplicação desta tecnologia ainda não é bem difundida no Brasil, apenas algumas indústrias possuem sistemas de tratamento anaeróbio da vinhaça. Destaca-se na literatura a Usina de São Martinho, localizada na região de Ribeirão preto – SP, com reator UASB de 5000m<sup>3</sup> (UASB) operado em condições termofílicas, o biogás produzido é aplicado para secar a levedura utilizada na fase de fermentação; no entanto, a eficiência do tratamento é normalmente modesta, pois a principal preocupação é apenas a produção adequada de biogás para secagem da levedura (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). Atualmente, verifica-se um aumento no tratamento anaeróbio da vinhaça nas indústrias com instalações de plantas piloto (DIAS et al., 2016).

Embora a digestão anaeróbia seja reconhecida como a melhor alternativa para o tratamento da vinhaça, ainda não é uma tecnologia bem estabelecida. No entanto, ainda são necessários estudos fundamentados na digestão anaeróbia da vinhaça visando a viabilidade dos sistemas por meio da otimização do projeto de reatores de alta taxa envolvendo a estabilidade operacional e sistemas cada vez mais compactos

e eficientes na conversão da matéria orgânica em biogás, permitindo no futuro sua aplicação em escala plena.

Souza et al. (1992) avaliaram o desempenho de reator UASB (1500 m<sup>3</sup>) operado sob condições termofílicas, os resultados obtidos foram expressivos, principalmente, em virtude das altas aplicações de COV (25 a 30 g DQO (L d)<sup>-1</sup>) e remoções de DQO (88%).

Alguns pesquisadores consideram que os processos anaeróbios mesofílicos são mais estáveis, enquanto os termofílicos têm maior eficiência na conversão da matéria orgânica a metano (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). Doll e Foresti (2010) destacaram que a estabilidade do reator mesofílico foi verificada não somente pelo desempenho na eficiência de remoção de DQO, como também pela alcalinidade a bicarbonato observada no efluente. Mas ainda, não existe um consenso sobre a faixa de temperatura ideal e as COV indicadas para a obtenção de boas produções de metano, conforme revisão de literatura realizada e descrita a seguir.

Van Haandel et al. (2014) avaliaram a conversão anaeróbia da vinhaça proveniente do processo de destilação da cachaça em quatro reatores UASB (23 L), com dois reatores (R1 e R2) operados sob condições de temperaturas mesofílicas (37 °C) e dois reatores (R3 e R4) operados sob condições termofílicas (54 °C). Os reatores UASB (R1, R2, R3 e R4) foram operados com TDH de 11 horas. Os reatores R1 e R3 foram operados em condições de sobrecarga, com a COV 50 % acima da capacidade, enquanto que os reatores R2 e R4 foram operados com COV na capacidade de tratamento. Os autores concluíram que as maiores COV foram alcançadas nos sistemas de tratamento anaeróbio sobre condições mesofílicas (70 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>) e que os resultados de produção de biogás revelaram que não existe vantagem na aplicação do tratamento anaeróbio da vinhaça sobre condições termofílicas.

Siqueira et al (2013) avaliaram um reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) utilizando como meio suporte partículas de poliestireno para o tratamento da vinhaça resultante da fermentação alcoólica de melão de cana-de-açúcar. O reator foi submetido a aumento graduais de carga orgânica volumétrica (COV) que variaram de 3,33 a 26,19 g DQO (L d)<sup>-1</sup>, com eficiências de remoção de DQO<sub>total</sub> que variaram de 51% a 70% e remoção máxima com uma COV de 13,9 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>. A produção

máxima de metano foi de 5,37 L de CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> para valores de COV de 25,3 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> com média de eficiência de remoção de DQO<sub>total</sub> de 51%.

Mota et al. (2013) avaliaram o tratamento da vinhaça através de um biorreator com membranas anaeróbio (BRMan) em dois estágios. O BRMan de duplo estágio apresentou resultados bastante satisfatórios de remoção de matéria orgânica, sendo que a remoção global de DQO do sistema foi de 96,9%. Os resultados indicaram que o efluente tratado pelo BRMan de duplo estágio apresentou qualidade bastante superior em relação a vinhaça bruta para a utilização na fertirrigação.

Existe uma complexidade dos fatores que interferem no tratamento anaeróbio da vinhaça, tais como: nutrientes, temperatura, carga aplicada e configuração do reator, fatores relacionados à biodegradabilidade da vinhaça, adaptação do inóculo e retenção de sólidos no reator, etc.; juntamente com as questões econômicas e ambientais na indústria sucroenergética. Portanto, ainda são necessários estudos na área de digestão anaeróbia de vinhaça, buscando alternativas tecnológicas com custos mais baixos e elevado desempenho, sendo assim, a utilização de reatores UASB em série e a utilização da torta de filtro no tratamento da vinhaça apresenta um potencial interessante para aumentar a aplicabilidade da tecnologia.

### **3.5.1. Utilização de reatores UASB**

Diversas configurações de reatores têm sido destacadas no tratamento anaeróbio da vinhaça, tais como, reator fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), reator leito fluidizado, leito fixo e reatores híbridos, entre outros. Dentre os reatores anaeróbios, os de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) merecem destaque, pois apresentam vantagens como a possibilidade de aplicação de altas cargas orgânicas volumétricas, menor volume de trabalho, não necessita de sistema de agitação ou tanque de sedimentação, a operação é contínua, e nestes sistemas são relatadas altas eficiências de remoção de material orgânico (LETTINGA, 1980).

O sucesso dos reatores UASB se deve ao dispositivo de separação de fases, sólido, líquido e gasoso, localizado na parte superior do reator. O principal objetivo deste dispositivo é a separação de gases contidos na mistura líquida, de tal forma que uma zona propícia à sedimentação seja criada no extremo superior do reator (LETTINGA, 1980). Em particular, os reatores UASB têm sido empregados no

processamento da vinhaça para redução da elevada carga orgânica e produção de biogás.

Em virtude das altas concentrações da DQO da vinhaça, é muito importante que o sistema anaeróbio tolere a aplicações de altas COV. Na Tabela 3, estão apresentados recentes estudos avaliando o aumento da COV utilizando diferentes tipos de vinhaça.

TABELA 3. Sistemas de tratamento anaeróbios utilizando reatores UASB e diferentes tipos de vinhaça.

Referência	Temp	Tipos de Reator	Tipos de Vinhaça	TDH	COV (g DQO (L d) <sup>-1</sup> )	DQO (%)	Produção Volumétrica de CH <sub>4</sub> *(L CH <sub>4</sub> (L d) <sup>-1</sup> )	Produção específica de CH <sub>4</sub> (L CH <sub>4</sub> (g DQO) <sup>-1</sup> )
Kaparaju et al. (2010)	55°C	UASB (0,33 L)	palha de trigo	2 d	2,3 a 41,2	76,8	8,3 (L/L substrato)	0,155
España-Gamboa et al. (2012)	30°C	UASB modificado (3 L)	cana-de-açúcar	6 a 15 d	7,3 a 22,2	69	-	0,263
Barros et al. (2016)	20 a 30 °C	UASB (21,5 L)	cana-de-açúcar	2,8 e 1,8 d	0,2 a 11,5	82	0,99*	0,185
Janke et al. (2016b)	40°C	UASB (1,5 e 1,3 L)	cana-de-açúcar	2,5 a 16,3	1,4 a 9,6		2,5*	0,239
Van-haadel et al (2014)	37°C	UASB (23 L)	cachaça	0,5 d	12 a 70	75	251 (g CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> )	-
Van-haadel et al (2014)	54°C	UASB (23 L)	Cachaça	0,5 d	12 a 36	56	156 (g CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> )	-

COV: Carga Orgânica Volumétrica, TDH: Tempo de Detenção Hidráulico; Temp: Temperatura, DQO: Demanda Química de Oxigênio.

Kaparaju et al. (2010) avaliaram um reator UASB no tratamento da vinhaça sob condições de temperatura termofílica com tempo de detenção hidráulico (TDH) de 2 dias. Os valores de produção de metano foram de até 0,155 L CH<sub>4</sub> (g DQOremovida)<sup>-1</sup> obtidos com COV de 17,1 g DQO (L d)<sup>-1</sup>. O aumento da COV para 41,2 g DQO (L d)<sup>-1</sup> resultou em baixos rendimentos de metano. Os resultados indicaram que a digestão anaeróbia termofílica da vinhaça em reatores UASB, para a produção de metano, é viável apenas para COV aplicadas de até 17,1 g DQO (L d)<sup>-1</sup>.

Dentre os diferentes tipos de vinhaça e considerando a grande quantidade produzida, deve-se dar atenção especial à digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar. Recentemente, vários estudos avaliaram a vinhaça de cana-de-açúcar em



sistemas de tratamento anaeróbio (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; JANKE et al., 2016a).

Barros et al. (2016) avaliaram a conversão anaeróbica de vinhaça de cana de açúcar em metano com aumento gradual da COV em dois reatores (UASB), R1 e R2, com volumes de 40,5 e 21,5 L. Os reatores UASB foram operados por 230 dias com um tempo de detecção hidráulica (HDT) de 2,8 d no R1 e de 2,8 e 1,8 d no R2. Os valores de OLR aplicados nos reatores foram 0,2 a 7,5 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no R1 e 0,2 a 11,5 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> em R2. A eficiência de remoção de DQOtotal variou de 49% a 82%, alcançando valores de produção volumétrica de metano de 0,8 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no R1 e 1,3 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no R2.

España-Gamboa et al. (2012) avaliaram a COV ideal para a operação do reator UASB modificado para tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar e concluíram que a COV ideal foi de 17,1 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>, com produção específica de metano de 0,263 L CH<sub>4</sub> (g DQOr)<sup>-1</sup> e concentração de metano no biogás de 84%.

Janke et al. (2016b) avaliaram os efeitos da suplementação de nitrogênio (ureia), fósforo (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e elementos traços, com a variação da COV e TDH, no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar, utilizando dois reatores UASB (1,5 L) operados paralelamente (R1 e R2). A adição de ureia (2 g L<sup>-1</sup>) melhorou a alcalinidade do reator, mas o processo entrou em colapso com COV de 6,1 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> e TDH de 3,6 dias. No entanto, ao suplementar a mesma quantidade de ureia em combinação com elementos traços, proporcionou-se alcalinidade suficiente para uma produção estável de biogás de 2,5 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> com COV de 9,3 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> e TDH de 2,5 dias.

### **3.5.2. Reatores em dois estágios**

A utilização de reatores anaeróbios em dois estágios ou em série no tratamento de águas residuárias pode levar ao aumento da eficiência da remoção da matéria orgânica. Segundo Fuess et al. (2017), a digestão anaeróbia em sistema de dois estágios é mais eficiente do que a digestão anaeróbia em sistema único.

Estas configurações permitem a seleção e o enriquecimento de grupos microbianos específicos em reatores separados; acomodação das variações das cargas orgânicas do afluente no primeiro reator, permitindo a aplicação de cargas

constantes no segundo reator; previne as sobrecargas orgânicas e ácidas e atenua o efeito inibitório dos compostos tóxicos; favorece a estabilidade e o controle do processo; e permite maior quantidade de produção de energia (CAMARILLO; RINCÓN, 2012; DEMIREL; SCHERER, 2011; HAN et al., 2016).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos para aumentar a viabilidade para a aplicação do tratamento anaeróbio da vinhaça, buscando aumentar a capacidade dos na conversão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar utilizando reatores em dois estágios (Tabela 4).

TABELA 4. Sistemas de tratamento anaeróbios em dois estágios no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar.

Referências	Tem p. (°C)	Tipos de Reatores	Tipos de Vinhaça	TDH	COV (g DQO (L d) <sup>-1</sup> )	DQO (%)	Produção Volumétrica de CH <sub>4</sub> *(L CH <sub>4</sub> (L d) <sup>-1</sup> )	Produção específica De CH <sub>4</sub> L CH <sub>4</sub> (g DQOr) <sup>-1</sup>
Fuess et al. (2017)	55 °C	ASTBR (L)	cana-de-açúcar	18 a 37 h	15 a 30	63	4,2	0,301
	55 °C	UASB convencional (L)	cana-de-açúcar	18 a 37 h	15 a 30	74	2,3	0,283
Ferraz Jr et al., (2016)	55 °C	UASB I	cana-de-açúcar	34, 42 e 56 h	25	62,8	2,1	0,256
	55 °C	UASB II	cana-de-açúcar	23, 29 e 39 h	25	65,7	2,8	0,316
Guariz (2013)	21 a 24 °C	UASB (R1) (12 L)	cana-de-açúcar	68 h	1,4 a 5,6	35 a 59	0,02 a 0,24	0,187
	21 a 24 °C	UASB (R2) (27 L)	cana-de-açúcar	155 h	0,5 a 4,00,	33 a 43	0,01 a 0,26	0,281
Faria (2014)	55 °C	UASB (R1)	cana-de-açúcar	16 h	20	36	0,20	-
	55 °C	UASB (R2)	cana-de-açúcar	7,5 h	35	27	0,32	-
Santana Junior (2013)	55 °C	UASB (R1) (13,7 L)	cana-de-açúcar	67,2 h	0,15 a 12,5	38	0,20	0,018 a 0,149
	55 °C	UASB (R2) (10,6 L)	cana-de-açúcar	48 h	0,33 a 11,3	48	0,36	0,06 a 0,35

COV: Carga Orgânica Volumétrica, TDH: Tempo de Detenção Hidráulico; Temp: Temperatura, DQO: Demanda Química de Oxigênio.

Fuess et al. (2017) avaliaram a digestão anaeróbica termofílica da vinhaça em duas fases utilizando uma nova configuração. A configuração experimental de uma

combinação formada por um único reator acidogênico (APBR) seguido por dois reatores metanogênicos operados em paralelo - ASTBR e reator UASB convencional. Para os reatores metanogênicos, foram aplicadas COV de 15 a 30 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. Os resultados destacaram a viabilidade da aplicação do ASTBR à vinhaça, indicando uma remoção DQOtotal superior a 80%. O ASTBR apresentou estabilidade com COV de até 30g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. A aplicação de condições similares ao reator UASB indicou perdas de desempenho severas, levando à acumulação de ácidos para cada aumento na COV.

Santana Junior (2013) avaliou a produção de metano a partir de vinhaça em reatores UASB termofílicos, instalados em série, com volumes de 13,7 (R1) e 10,6 L (R2) para com aumento gradual da COV. As cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no R1 foram crescentes de 0,15 a 12,50 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. As melhores eficiências de remoção de DQOtotal e DQOdiss foram de 55 % no R1 e 51% no R2. As maiores produções volumétricas de metano no R1 foram de 0,205 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> com a aplicação de (COV) de 7,5 a 12,5, e no R2 foram de 0,365 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no R2 com COV de 6,5 a 11,3 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>.

Guariz (2013) avaliou o desempenho de reatores UASB mesofílicos, em série, na conversão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar e do melaço com aumento gradual da COV de 1,4 a 5,6 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. Foram obtidas eficiências de remoção de DQO e SST acima de 75%, a manutenção da COV em valores 5,6 g DQO (L d)<sup>-1</sup> provocou deslocamento das maiores produções de metano do primeiro para o segundo reator UASB, com rendimento ainda alto, de 0,2 L CH<sub>4</sub> (g DQOremovida)<sup>-1</sup>, evidenciando a importância do uso de reatores anaeróbios em série para manter a estabilidade do sistema de tratamento.

Faria (2014) avaliou o desempenho de dois reatores UASB em série, R1 (12,1L) e R2 (5,6L) na faixa de temperatura termofílica utilizando a vinhaça diluída como substrato. Os reatores foram operados com TDH de 16 e 7,5 h, respectivamente e COV média de 20 e 35 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>, respectivamente. As maiores eficiências de remoção de DQOtotal foram observadas nos últimos 36 dias de operação com média de remoção de 36, 27, 53% no R1, R2, R1+R2, respectivamente. As maiores produções volumétricas foram de 1,1 LCH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no R1.

Ferraz Jr et al. (2016) avaliaram o desempenho de dois reatores termofílicos metanogênicos de manta de lodo de fluxo ascendente (UASB I e UASB II). O reator (UASB I) foi operado separadamente em estágio único, e o UASB II foi operado no segundo estágio do sistema composto por dois reatores anaeróbios (APBR e UASB II). As maiores COV aplicadas em ambos reatores foram de  $25 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ , e as maiores produções volumétricas de metano foram de  $2,1 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$  (UASB I) e no de  $2,8 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$  (UASB II), as maiores produções no UASB II indicaram que a separação de fase acidogênica colaborou para o aumento da conversão da matéria orgânica e produção de energia.

Tendo em vista os estudos apresentados, ainda são necessários avanços na área da digestão anaeróbia da vinhaça, buscando aumentar a capacidade da conversão anaeróbia, com aplicações de altas cargas orgânicas volumétricas, maiores produções de metano e melhor qualidade do efluente.

A utilização de reatores em série, a suplementação de nutrientes e alcalinidade, através da torta de filtro e recirculação do efluente, são estratégias interessantes, visando a obtenção de elevadas COV e produção de metano em condições de estabilidades. Além disso, a avaliação da diversidade, permitirá a melhor compreensão dos processos bioquímicos e das interações microbianas em elevada COV e produção de metano, para o avanço da digestão anaeróbia na utilização de resíduos com altas concentrações de material orgânico.

### **3.6. Processos de oxidação avançada (POA) e físico-químicos**

De forma geral, os sistemas biológicos tratam parte considerável da matéria orgânica. Contudo, esses sistemas possuem pouca eficiência na remoção dos compostos tóxicos e recalcitrantes, sendo necessário sistemas adicionais ou complementares com o objetivo de melhorar a biodegradabilidade ou enquadrar o efluente final nos limites de descarga exigidos. Nesse contexto, os processos de oxidação avançada e os físico-químicos mostram-se como alternativa bastante viável, podendo ser utilizados como pré-tratamento, diminuindo a toxicidade a montante do processo biológico convencional, ou como pós-tratamento, para oxidar e/ou remover os resíduos não degradados pelos processos biológicos.

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) são processos de oxidação que envolvem a geração de radicais hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), com um potencial de oxidação bastante elevado ( $E^0=2,8\text{V}$ ) e não seletivos aos compostos a degradar pelo que são aplicados na degradação de compostos recalcitrantes. Os POAs podem ser classificados como homogêneos (uma só fase), onde o catalisador é dissolvido no efluente a ser tratado, ou heterogêneos (mais de uma fase) em que o catalisador é suportado numa matriz porosa sólida. Embora exista uma variedade de processos de oxidação, optou-se neste trabalho por pormenorizar apenas a reação de Fenton, em fase homogênea, por ser alvo do nosso estudo.

Entre os processos físico-químicos tem-se a filtração, separação por membranas, adsorção, absorção, coagulação/floculação, entre outros. Na seção 3.6.2, está descrito, com maior detalhe, a coagulação/floculação por ter sido o processo selecionado para o tratamento da vinhaça.

### 3.6.1. Reação de Fenton

O mecanismo básico da reação de Fenton consiste na decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na presença de catalisador de  $\text{Fe}^{2+}$  (equação 1) em pH ácido, conforme mencionado anteriormente. Estes reagentes, quando adicionados a um sistema contendo um substrato orgânico (RH) em meio ácido, são oxidados e formam subprodutos (compostos intermediários) de acordo com a equação 2. A oxidação prossegue até a formação de dióxido de carbono e água (mineralização completa) de acordo com o descrito na equação 3.(WALLING, 1975):



A regeneração do  $\text{Fe}^{2+}$  ocorre através da reação do  $\text{Fe}^{3+}$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (equação 4) e é necessária para dar continuidade às reações anteriores, formando-se o radical  $\text{HO}_2\cdot$ , com menor potencial de oxidação do que o radical hidroxila. Assim, a decomposição do peróxido de hidrogênio é também catalisada pelos íons  $\text{Fe}^{3+}$ . Neste

processo, a velocidade inicial de remoção dos poluentes orgânicos pelo sistema  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$  é menor do que a do reagente  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ .



Neste processo, podem ocorrer paralelamente outras reações competitivas e indesejáveis (reações de “scavenging”) entre o radical e o excesso de oxidante e catalisador, descritas nas equações 5 e 6 (Walling, 1975):



As reações competitivas promovem um efeito inibitório para a degradação. Além disso, os radicais  $\text{HO}\cdot$  são suscetíveis de recombinarem-se com outros compostos, sendo consumidos, diminuindo a probabilidade da oxidação. Portanto, é importante determinar em cada caso a quantidade ótima de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de  $\text{Fe}^{2+}$  para evitar um excesso que poderia retardar a degradação (WALLING, 1975).

Outros fatores influenciam a eficiência da reação de Fenton, tais como, a temperatura e pH. A temperatura tem um efeito positivo até 50 °C, uma vez que aumenta a constante cinética da reação de acordo com a lei de Arrhenius (RODRIGUES; DEUS, 2013). Porém o efeito é negativo para temperatura superiores, devido à decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, não estando assim disponível para gerar radicais hidroxila. O pH ótimo da reação em geral é próximo de 3,0, na maioria dos casos é recomendado como pH de operação. Em pH muito ácido (abaixo de 2,0), o peróxido reage com o  $\text{H}^+$  originando o  $\text{H}_3\text{O}_2^+$  (MORAIS, 2005), e diminui a reatividade com o  $\text{Fe}^{2+}$ , reduzindo a eficiência da degradação (RODRIGUES; DEUS, 2013). Por outro lado, em pH maior que 4,0, verifica-se a precipitação do ferro na forma de hidróxidos o que diminui a concentração das espécies de livres para a reação de Fenton e verifica-se um aumento da velocidade de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio (SZPYRKOWICZ; JUZZOLINO; KAUL, 2001).

O processo de Fenton possui várias vantagens, é denominado como uma "tecnologia verde", porque utiliza reagentes inócuos para o meio ambiente, é altamente eficiente, com baixo custo de capital, aplicação simples, opera à temperatura ambiente e pressão atmosférica. Os agentes de oxidação possuem características de não seletividade, conforme mencionado anteriormente, ou seja, capacidade de oxidar vários poluentes ao mesmo tempo, a reação inicia-se instantaneamente, reduz a toxicidade e melhora da biodegradabilidade das águas residuais, permitindo a combinação com processos biológicos (ARSLAN; TUHKANEN, 1999; BIGDA, 1995; FLAHERTY; HUANG, 1992). Em contrapartida neste processo ocorre a geração de lamas contendo ferro que requer separação e eliminação e/ou reutilização (HSUEH et al., 2005).

### **3.6.2. Coagulação/floculação e Fenton**

De acordo com Gilpavas et al. (2017), o processo de coagulação/floculação para o tratamento de águas residuais têm sido amplamente estudados, considerados essenciais na redução dos sólidos suspensos, material orgânico e cor, para melhorar a eficiência do tratamento posterior. A coagulação/floculação realiza-se em duas etapas distintas e tem por objetivo remover os sólidos em suspensão e as partículas coloidais dissolvidas. Na primeira, designada coagulação, promove-se a formação de partículas com maiores dimensões através da desestabilização e aglomeração destas pela adição de produtos químicos e/ou polímeros. Na segunda, designada floculação, promove-se remoção dos flocos formados na primeira etapa por decantação ou filtração (CAÑIZARES et al., 2009).

A etapa de coagulação não é processo simples e envolve várias interações físico-químicas: compressão da camada dupla, adsorção e neutralização da carga, adsorção e formação de pontes entre partículas (relacionados com polímeros de alto peso molecular) e inclusão das partículas num precipitado metálico (ECKENFELDER, 2000). Contudo, normalmente, no tratamento de águas residuárias, a coagulação ocorre pelos mecanismos de neutralização de cargas e inclusão em precipitados de metal. Estes mecanismos são afetados por vários parâmetros, nomeadamente: o tipo

e a dose de coagulante, o pH, a velocidade de agitação e o tempo de contato (ALVES, 2007; METCALF; EDDY, 2003).

Na etapa de floculação promove-se a colisão das partículas desestabilizadas, na coagulação, e estas agregam-se em flocos de maior dimensão (ALVES, 2007). Este mecanismo pode ocorrer de duas formas diferentes: floculação pericínética ou floculação ortocínética (VIGNESWARAN; VISVANATHAN, 1995). Nesta etapa é necessário ter em conta o tipo e a dose do floculante, a velocidade de agitação e o tempo de contato.

As principais vantagens da coagulação/floculação são a aplicabilidade, o baixo custo de capital, os baixos tempos de contato e de residência e o uso de equipamentos relativamente simples (EASTON, 1995). Mas, por outro lado, coagulação/floculação é um processo de tratamento primário e, portanto, não degrada os compostos presentes nos efluentes, apenas os transfere para fase sólida (GENENA, 2009), gerando lodos contendo os compostos removidos. Além disso, devem-se considerar a necessidade de adição de reagentes químicos e polímeros, bem como alguns floculantes catiônicos que podem ser tóxicos aos peixes e a outros animais e, os custos operacionais consideráveis.

### **3.6.3. Tratamento da vinhaça por Coagulação/floculação, Fenton e combinação dos processos.**

O processo de coagulação/floculação foi reportado no tratamento da vinhaça. Nos estudos realizados, diferentes tipos de coagulantes têm sido testados (biopolímeros, cloreto de ferro e sulfato de ferro) para reduzir o potencial poluente da vinhaça, alcançando remoções máximas de DQO de 33%, 37% e 39%, para os biopolímeros, cloreto e sulfato de ferro, respetivamente (SAPLA, 2012). O cloreto de ferro é um dos coagulantes possíveis de utilização, tem como principais características alto teor de  $Fe^{3+}$  e a possibilidade de trabalhar numa faixa de pH de 3,5 a 6,5 e  $>8,5$ . Outra possibilidade de coagulante é o sulfato de ferro que, assim como o  $FeCl_3$ , possui alto teor de  $Fe^{3+}$  e trabalha em ampla faixa de pH (de 3,5 a 11) (SAPLA, 2012). No entanto, para a aplicação do processo anaeróbico subsequentes, o sulfato é transformado em sulfeto pelas bactérias redutoras de sulfato, essas bactérias



competem com as bactérias acetogênicas e com as arqueias metanogênicas pelos produtos da fermentação ácida, produzindo CO<sub>2</sub> e gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S), inibindo a produção de metano (CHERNICHARO, 2007).

Rodrigues et al. (2014) também utilizaram a coagulação/floculação para melhorar a qualidade final do efluente para o seu uso na fertirrigação e obtiveram os melhores desempenhos utilizando 1,6 g de FeCl<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> como coagulante em vinhaça previamente biodigerida, com 65% de remoção de DQO.

A aplicação de Fenton no tratamento da vinhaça e vinhaça biodigerida é alvo de estudo muito recente. Na Tabela 5, estão apresentados referidos trabalhos e pode-se observar altas eficiências do processo na remoção de cor e consideráveis remoções de material orgânico.

A combinação da coagulação/floculação com a oxidação de Fenton podem melhorar a eficiência e a viabilidade do processo, aumentando a remoção dos compostos orgânicos e diminuindo, consideravelmente, os custos operacionais (GILPAVAS; DOBROSZ-GÓMEZ; ANGEL GÓMEZ-GARCÍA, 2017; RODRIGUES et al., 2017). De acordo com estudos recentes, concentrações mais baixas de ferro e menor tempo de operação são necessárias para o tratamento de águas residuais utilizando a coagulação/floculação ao processo de Fenton e Foto-Fenton (GILPAVAS; DOBROSZ-GÓMEZ; ANGEL GÓMEZ-GARCÍA, 2017).

TABELA 5. Processos de Fenton aplicados à vinhaça.

Referência	Tipos de resíduos	DQO (mg L <sup>-1</sup> )	Cor (%)	DQO (%)	COT (%)
HADAVIFAR et al. (2010)	Vinhaça	40700		46,3	n.d.
JANGPUANGSEE et al. (2012).	Vinhaça	n.d.	93,0	n.d.	n.d.
AMAT et al., (2014)	Vinhaça	53000-59000	93,5	59,3	n.d.
GUERREIRO et al. (2016)	Vinhaça Biodigerida	6836	n.d.	69,2	51,6

n.d. – não determinado

Guerreiro et al. (2016) estudaram as melhores condições de operação para coagulação / floculação e oxidação de Fenton, aplicadas isoladamente ou combinadas com o tratamento com vinhaça de cana-de-açúcar, a fim de: i) melhorar a biodegradabilidade e diminuir a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida para recirculação em reatores anaeróbicos de alta taxa para aumentar a produção de biogás, e ii) maximizar a mineralização de compostos orgânicos e obter um efluente final que atenda aos valores da legislação para posterior descarga em corpos d'água, com o menor custo de tratamento. Se o objetivo principal é a redução máxima do material orgânico, a coagulação/floculação seguida pela oxidação de Fenton com adição gradual do peróxido durante a oxidação é a melhor estratégia; no entanto, se a vinhaça for recirculada de volta ao reator anaeróbio, é preferível adicionar o peróxido em uma única dose (uma vez no início da reação), pois, dessa forma, obteve-se um efluente mais biodegradável.

A combinação da coagulação/floculação com o Fenton no tratamento da vinhaça biodigerida apresenta um aumento da biodegradabilidade, conforme referido acima, e gera um efluente não tóxico (0,0% de inibição da *Vibrio fischeri*), mostrando efeitos promissores para a recirculação no reator anaeróbio (GUERREIRO et al., 2016), mas o efeito da recirculação na produção de biogás ainda necessita de estudos.

Diante deste contexto, os processos de coagulação/floculação, Fenton e a combinação de ambos foram aplicados no efluente (vinhaça biodigerida) com o objetivo de melhorar a biodegradabilidade do efluente e diminuir a toxicidade, visando a melhora da qualidade do efluente para a recirculação nos reatores anaeróbios.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local do experimento e instalações experimentais**

A pesquisa foi desenvolvida nas instalações experimentais do Laboratório de Saneamento Ambiental, do Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Figura 1), cujas coordenadas geográficas são: latitude de 21°15'22" S; 48°18'58" W e altitude de 575 m. O clima da região, segundo classificação de Koppen, é Cwa (subtropical úmido, seco no inverno e com chuvas no verão) e temperatura média anual de 21 °C.

A unidade experimental foi composta por dois sistemas de reatores UASB em série: sistema termofílico (TR1 e TR2), operando na faixa de temperatura (54 a 56 °C); e sistema mesofílico (MR1 e MR2) operando sob condições de temperatura ambiente. Os reatores foram construídos com tubos de PVC, com separadores de fases na forma de Y, com ângulo de 45° em relação à vertical (CAVALCANTI et al., 1999), adaptado por outros estudos (BRUNO; OLIVEIRA, 2008, 2013; VILLA-MONTOYA; FERRO; OLIVEIRA, 2016).

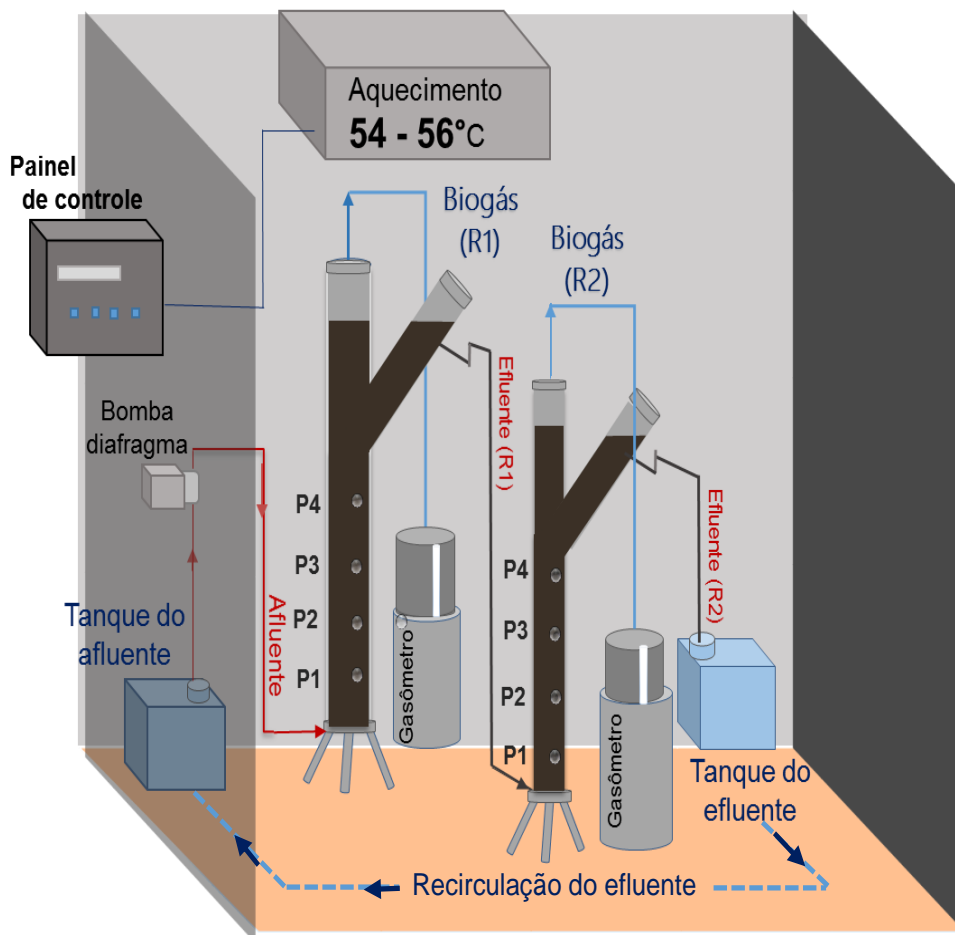
#### **4.1.1. Sistema termofílico**

O sistema termofílico (ilustrado na figura 2) foi constituído por dois reatores UASB termofílicos em série, com volumes de 12,1 L (TR1) e 5,6 L (TR2), dentro de uma câmara de aquecimento, tanque para armazenagem do afluente e do efluente, bomba de diafragma, e gasômetros de fibra de vidro.

No corpo dos reatores UASB, TR1 e TR2, foram instalados quatro registros para coleta de lodo no TR1 e no TR2. Esses registros foram denominados P1, P2, P3, P4 e foram distribuídos ao longo da altura dos reatores com distâncias de 25 cm entre cada ponto. A distribuição dos pontos de coleta de lodo teve por base uma espiral imaginária envolvendo o corpo do reator, permitindo que os pontos de amostragem, fossem instalados de forma a não coincidirem.

(A)

UASB R1  
 h: 1,5 m  
 $\phi$  0,1 m  
 Volume: 12,1 L  
 UASB R2  
 h: 1,2 m  
 $\phi$  0,075 m  
 Volume: 5,6 L  
 Pontos de  
 coletas do lodo:  
 P1, P2, P3 e P4.



(B)

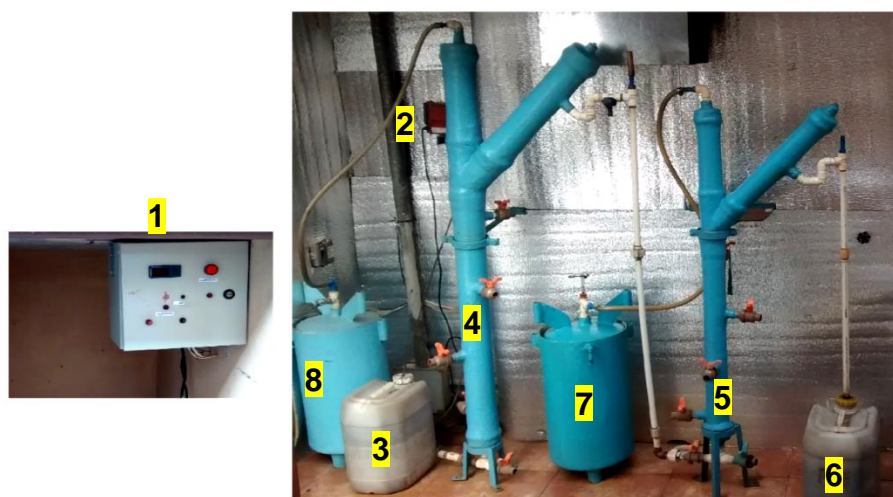


FIGURA 2. Representação esquemática (A) e fotos do sistema termofílico composto pelos reatores UASB em série (TR1 e TR2). 1- painel de controle de temperatura, 2- bomba diafragma, 3- tanque do afluente, 4- UASB (TR1), 5- UASB (TR2), 6- tanque do efluente, 7 e 8- gasômetros.

#### 4.1.2. Sistema mesofílico

O sistema mesofílico (Figura 3) foi constituído por dois reatores UASB mesofílicos em série em condições mesofílicas, denominados MR1 e MR2, com volumes de 214,2 L (R1) e 115,0 L (R2), tanque para armazenagem do afluente e do efluente, bomba helicoidal, e gasômetros, conforme ilustrado na Figura 1.

No corpo dos reatores UASB, MR1 e MR2, foram instalados oito registros para coleta de lodo no R1 e no R2. Esses registros foram denominados P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8 e distribuídos ao longo da altura dos reatores, a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 m, a partir da base do R1 e R2, respectivamente (Figura 3). A distribuição dos pontos de coleta de lodo teve por base uma espiral imaginária envolvendo o corpo do reator, permitindo que os pontos de amostragem fossem instalados de forma a não coincidirem.

#### 4.2. Afluente e lodo de inóculo utilizado

O afluente utilizado na alimentação dos reatores UASB em série (TR1 e TR2, MR1 e MR2) foi a vinhaça de cana-de-açúcar *in natura*, proveniente da destilação de etanol hidratado, coletada na saída da coluna de destilação. A vinhaça e a torta de filtro foram coletadas em uma indústria sucroenergética localizada na região de Ribeirão Preto – SP. A torta de filtro utilizada neste estudo foi coletada mensalmente na indústria na etapa de carregamento do caminhão para o transporte da torta de filtro para a área de compostagem (Tabela 6).

O sistema termofílico não precisou de inoculação, os reatores UASB em série (TR1 e TR2) encontravam-se em funcionamento e o lodo de inóculo estava adaptado com a vinhaça, e foi continuidade do trabalho realizado por Farias (2014). As características do lodo contido nos reatores no início do trabalho eram: ST de 49,7 g L<sup>-1</sup> e SV de 36,1g L<sup>-1</sup> no TR1, e ST de 42,4 g L<sup>-1</sup> e SV de 29,7 g L<sup>-1</sup> no TR2.

Para a partida do sistema mesofílico (MR1 e MR2), foi utilizado como inóculo lodo granulado de reator UASB termofílico coletado em uma usina sucroenergética da região de Ribeirão Preto com concentrações de sólidos totais (ST) de 41,1 g L<sup>-1</sup> e de sólidos voláteis (SV) de 20,4 g L<sup>-1</sup>. O volume de lodo colocado foi suficiente para preencher 30% do volume de cada reator.

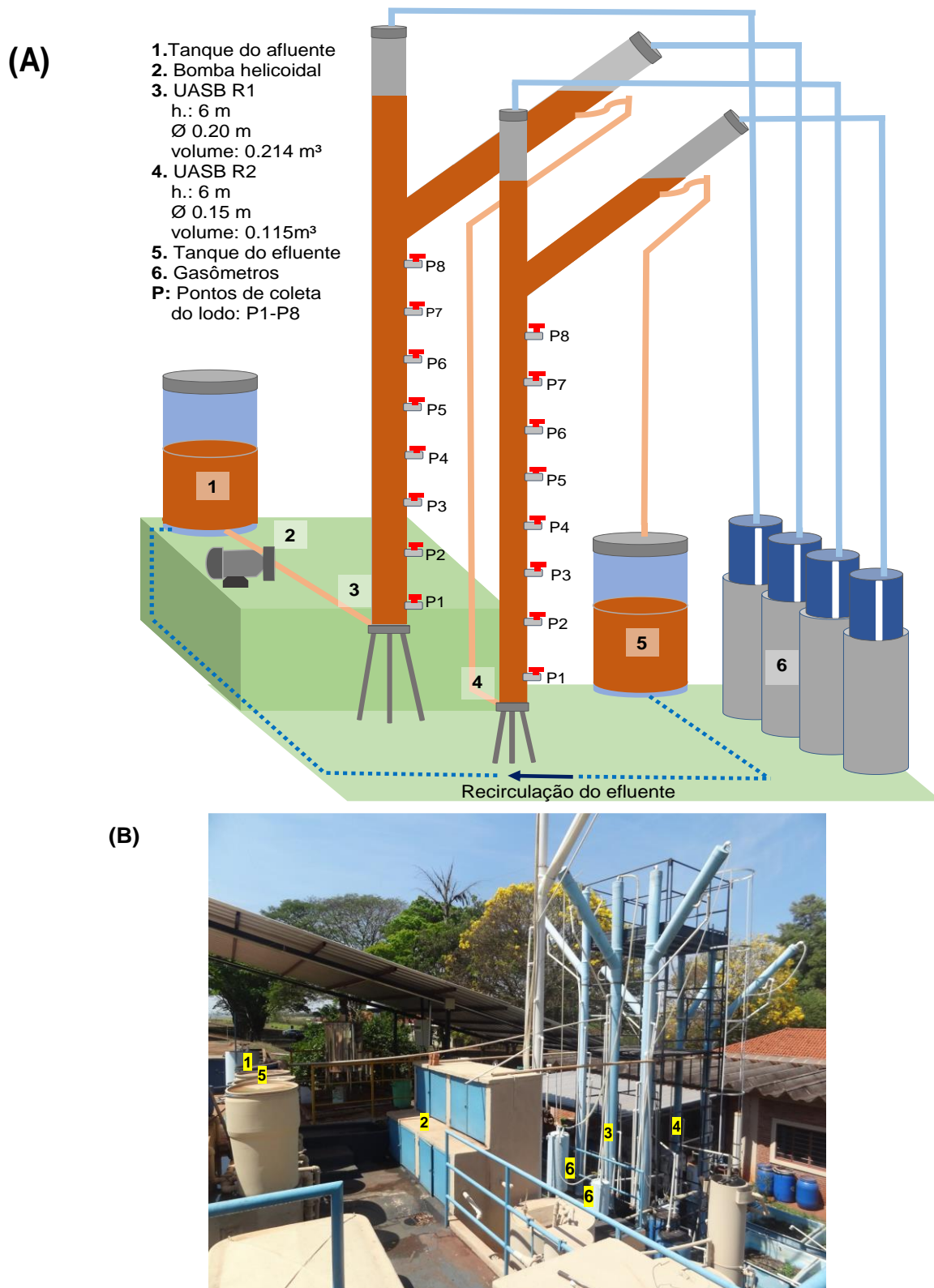


FIGURA 3. Representação esquemática (A) e foto do sistema mesofílico (B) com os reatores UASB em série (MR1 e MR2). 1- tanque do afluente, 2- abrigo das bombas helicoidais, 3- UASB (MR1), 4- UASB (MR2), 5- tanque do efluente e 6- gasômetros.

TABELA 6. Características da vinhaça e da torta de filtro.

Parâmetros	Vinhaça (mg L <sup>-1</sup> )	Torta de filtro (mg g <sup>-1</sup> ST)
pH	4,5	8,2
DQO	44500	20
NK	430	6,19
P <sub>total</sub>	26	9,04
K	149	0,050
Cu	5	0,125
Ca	16	0,002
Zn	2	0,042
Mg	14	0,125
Na	16	0,900
Mn	75	0,312
Fe	7	0,018

DQO: demanda química de oxigênio; KN Nitrogênio Kjeldahl; P<sub>total</sub>: Fósforo total; ST: Sólidos totais.

#### 4.2.1. Torta de filtro e adição no afluente

A torta de filtro coletada na indústria foi coletada úmida, no entanto, para a estocagem e adição na vinhaça, foi realizada a secagem da torta de filtro de forma natural, com simples exposição ao ar livre.

A adição da torta de filtro na vinhaça para reatores TR1 e TR2 (sistema termofílico) foi realizada após 250 dias de operação e para os reatores MR1 e MR2 (sistema mesofílico), após 100 dias de operação. Para isso, foi preparada uma solução com torta de filtro e vinhaça bruta (40 g/L) e a solução foi mantida em repouso por 24 h. Após este período, o substrato foi peneirado em malha de abertura de 2 mm e filtrado em tecido de algodão para separação das fibras presentes na torta de filtro e evitar entupimentos da bomba e tubulações. A quantidade de torta de filtro utilizada por litro de vinhaça teve como base a relação DQO:N:P de 350:5:1 recomendada para a digestão anaeróbia para tratamento de esgoto sanitário (CHERNICHARO, 2007).

### 4.3. Descrição da operação e acompanhamento dos sistemas de tratamento.

#### 4.3.1. Operação do sistema de tratamento termofílico

O sistema de tratamento termofílico com reatores UASB em série (TR1 e TR2) foi operado durante 800 dias (Figura 4). Os reatores foram operados entre abril de 2014 e dezembro de 2016 e ficaram inoperantes em dois períodos de entressafas, de novembro de 2014 a abril de 2015 e de dezembro de 2015 a fevereiro de 2016.

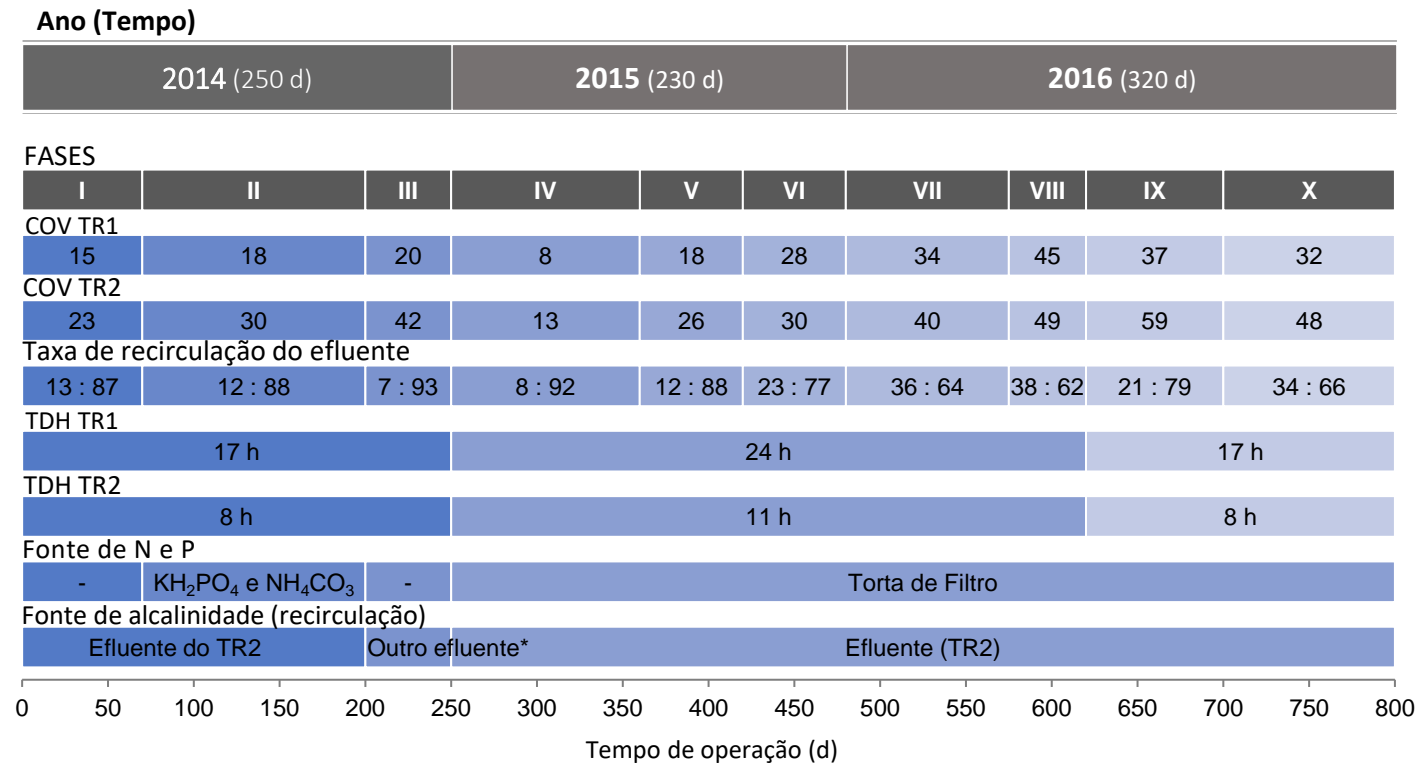


FIGURA 4. Diagrama esquemático do sistema termofílico com período e condições operacionais dos reatores UASB em série (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbico da vinhaça, carga orgânica volumétrica (COV) em g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, taxa de recirculação do efluente (vinhaça : efluente) em % vol., fontes de nutrientes para suplementação de N e P, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h) e fonte de alcalinidade. \*Recirculação do efluente proveniente de outro sistema de tratamento.



A operação do sistema de tratamento termofílico foi dividida em dez fases (I a X) com base nas principais condições operacionais (COV, HDT, fonte de N e P, e alcalinidade)

Durante todo o período de operação, foi realizado a recirculação do efluente do TR2 para aproveitamento da alcalinidade produzida nos reatores. Na fase II também foi utilizado como fonte de alcalinidade e de nitrogênio (N) o bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) e como fonte de fósforo o dihidrogenofosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Na fase III, em virtude de problemas de acidificação dos reatores UASB, foi utilizado outro efluente no processo de recirculação. Este efluente era proveniente de reatores anaeróbios horizontais de leito fixo tratando vinhaça e em condições de estabilidade. Nas fases de IV a X foram utilizados como fonte de nutrientes apenas a torta de filtro e a recirculação do efluente do TR2.

Os tempos de detenção hidráulica (TDH) foram de 17 h no TR1 e 8 h no TR2 nas fases iniciais (I, II e III). O TDH foi aumentado para 24 h no R1 e 11 h no R2 nas fases (IV, V, VI e VII). Nas fases finais (VIII, IX e X), o TDH foi similar ao aplicado nas fases iniciais (I, II e III). Estas mudanças do TDH foram necessárias para manter as COV crescentes de acordo com a DQO do afluente (mistura da vinhaça, do efluente do R2 e da torta de filtro).

#### **4.3.2. Operação do sistema de tratamento mesofílico**

O sistema de tratamento mesofílico com reatores UASB em série (MR1 e MR2) foi operado por 650 dias. Os reatores foram operados entre agosto de 2014 e dezembro de 2016 e ficaram inoperantes em dois períodos de entressafas, de novembro de 2014 a abril de 2015, e de dezembro de 2015 a fevereiro de 2016. Os reatores ficaram inoperantes em dois períodos de entressafas, de novembro de 2014 a abril de 2015 e de dezembro de 2015 a fevereiro de 2016.

As condições de operação dos reatores UASB estão ilustradas na Figura 5. Durante todo o período de operação foi realizado a recirculação do efluente do MR2 para aproveitamento da alcalinidade produzida nos reatores. Na fase I, foi utilizado como fonte de alcalinidade e N o bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) e como fonte de fósforo o dihidrogenofosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). A partir da fase II, foi utilizado a torta de filtro como fonte de nutrientes (N e P).

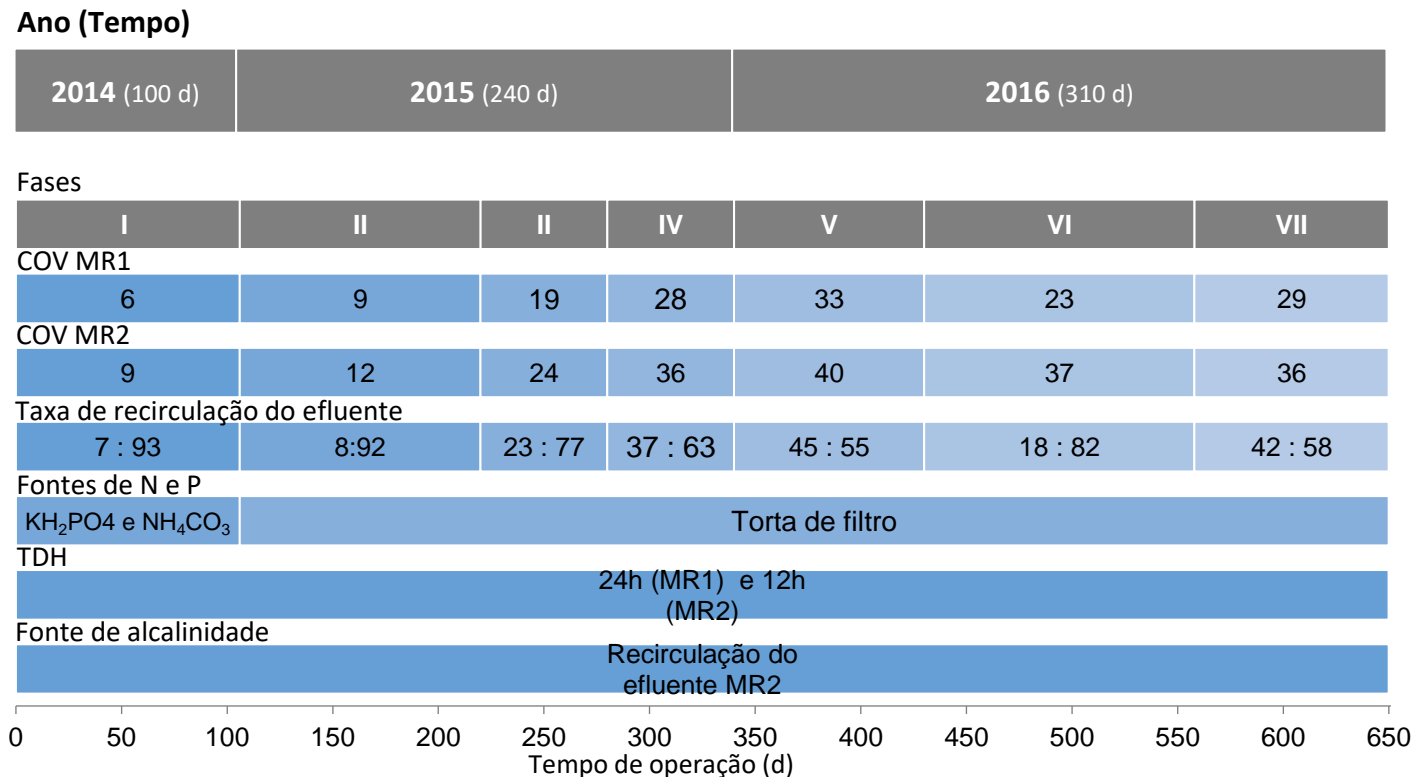


FIGURA 5. Diagrama esquemático do sistema mesofílico com período e condições operacionais dos reatores UASB em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça, carga orgânica volumétrica (COV) em g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, taxa de recirculação do efluente (vinhaça : efluente) em % vol., fontes de nutrientes para suplementação de N e P, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h) e fonte de alcalinidade.

Os reatores (MR1 e MR2) foram inicialmente operados utilizando vinhaça na safra de 2014, com COV inicial de 5,0 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 h (R1) e de 12 h (R2). A COV aplicada foi aumentada gradualmente, alcançando a COV máxima na safra de 2016, de 33 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR1 e de 40 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR2.

#### 4.4. Exames físicos e determinações de constituintes orgânicos e inorgânicos nos afluentes, efluentes, lodo e biogás.

Na Tabela 7 estão apresentados os exames físicos e as determinações químicas executadas nas amostras compostas dos afluentes e dos efluentes, no lodo e no biogás durante os ensaios, bem como as frequências e as fontes das metodologias.

TABELA 7. Exames e determinações, frequência e fontes das metodologias utilizadas.

EXAMES E DETERMINAÇÕES	FREQUÊNCIA	REFERÊNCIAS
<b>Afluente e efluentes</b>		
pH	Diariamente	APHA; AWWA; WPCF (1998)
Demanda química de oxigênio (DQOtotal)	Duas vezes \ semana	APHA; AWWA; WPCF (1998); (OLIVEIRA, 1997)
Alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI)	Diariamente	APHA; AWWA; WPCF (1998); JENKINS et al. (1983)
Ácidos voláteis totais (AVT)	Duas vezes \ semana	DILALLO e ALBERTSON (1961)
Ácidos orgânicos	Ver o item 4.4.1	VAN CLEEF et al., 2015
Nitrogênio total Kjeldahl (NTK)	Uma vez \ semana	APHA; AWWA; WPCF (1998)
Nitrogênio amoniacal	Duas vezes \ semana	APHA; AWWA; WPCF (1998) (Método Semi-Micro Kjeldahl)
Fósforo total	Uma vez \ semana	APHA; AWWA; WPCF (1998)
Fe, Cu, Zn, Mn, Ca, Mg, Na e K	Uma vez/semana	APHA; AWWA; WPCF (1998)
<b>Lodo</b>		
Sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV)	Duas vezes no ensaio	APHA; AWWA; WPCF (1998)
Biologia Molecular (ver os itens 4.5 e 4.6)		
<b>Biogás</b>		
Produção	Diariamente	OLIVEIRA (1997)
Composição	Semanalmente	APHA; AWWA; WPCF (1998)

#### 4.4.1. Quantificação dos ácidos orgânicos

Com as maiores COV aplicadas, no afluente e efluente dos reatores, foram realizadas a quantificação dos ácidos orgânicos: ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e valérico. No sistema de tratamento termofílico, as amostras foram coletadas no dia 336 do experimento com COV de 45 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> (Fase V). No sistema de tratamento mesofílico, as amostras foram coletadas nos dias 302, 380 e 482 com COV de 28, 33 e 23 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, respectivamente (Fases IV, V e VI).

As amostras para quantificação dos ácidos orgânicos foram preparadas e analisadas por cromatografia gasosa. Aproximadamente 2,0 mL de cada amostra bruta foram centrifugados (13.000 g; 15 min; 4 ° C; Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, USA) com ácido fórmico 98-100% (Merck KGaA). Após centrifugação, aproximadamente 1,2 mL de sobrenadante foi transferida para frascos cromatográficos. A concentração dos ácidos orgânicos foi determinada pela injeção de 1 µL de amostra em um cromatógrafo de gás (CG HP 7890A, Injector HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com uma coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 15 m 0,320 mm, 0,50 µm, J & W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA). Os fluxos dos gases foram de 1 mL/min para o gás de arraste (H<sub>2</sub>). A temperatura inicial para a chama da coluna foi de 60°C, mantida por 1 minuto, sendo então elevada para 200 °C a uma taxa de 5 °C/minuto, permanecendo por mais 25 minutos. A temperatura do injetor foi de 270 °C e a temperatura do detector foi de 300 °C. A razão de divisão da amostra foi de 1:100. A curva de calibração foi feita utilizando padrões cromatográficos (Chem Service, West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), ácido propiônico (99%; CAS 79-09-4), ácido isobutírico (99%; CAS 79-31-2), ácido butírico (98,7%; CAS 107-92-6), ácido isovalérico (99%; CAS 503-74-2) e ácido valérico (99%; CAS 109- 52-4) (VAN CLEEF et al., 2015).

#### 4.4.2. Análise estatística

Foram realizados delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dez tratamentos (Fases I a X) para o sistema termofílico e com sete tratamentos (Fases I

a VII) para o sistema mesofílico, com repetição no tempo. Foi aplicado teste F para análise de variância e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas através do teste de Tukey com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no software Assistat.

Para identificar os gêneros de bactérias e arqueias versus produção volumétrica de metano, nitrogênio de Kjeldahl (KN), fósforo total (Ptotal) e ferro; foi utilizado teste estatístico (g-test) com correção FDR. Foram utilizadas as OTUs que tiveram  $p < 5$  em pelo menos uma amostra

#### 4.5. Informações das amostras do DNA genômico dos micro-organismos

As amostras de DNA genômico sequenciadas no Ion Torrent foram coletadas a nos pontos de coleta do lodo localizadas nos reatores UASB em série dos sistemas termofílicos (TR1 e TR2) e mesofílicos (MR1 e MR2) (Figura 2 e 3). As amostras de lodo dos pontos de coleta de cada reator foram misturadas para formar duas amostras compostas, sendo uma do R1 e a outra do R2. O volume de lodo de cada ponto foi coletado, de modo a obter a mesma quantidade de sólidos voláteis (SV) de cada ponto.

No sistema termofílico (TR1 e TR2), as amostras foram coletadas aos 590 dias de operação, na fase VII, quando a COV no R1 ( $45 \text{ g DQO total (L d)}^{-1}$ ) e a produção de metano foram maiores. Os sólidos totais (ST) e voláteis (SV) do lodo da amostra composta foram  $38,1$  e  $23,9 \text{ g L}^{-1}$  (R1) e de  $36,1$  e  $21,7 \text{ g L}^{-1}$  (R2).

No sistema mesofílico (MR1 e MR2), as amostras foram coletadas aos 415 dias, na fase V, quando a COV ( $33 \text{ g DQO total (L d)}^{-1}$ ) e a produção de metano foram maiores. Os sólidos totais (ST) e voláteis (SV) do lodo da amostra composta foram  $56,1$  e  $26,8 \text{ g L}^{-1}$  (R1) e de  $40,7$  e  $23,8 \text{ g L}^{-1}$  (R2), respectivamente.

##### 4.5.1. Amplificação do gene 16S rRNA com a Ion Tag e sequenciamento

O gene 16S ribossomal RNA foi parcialmente amplificado (regiões V4-V5) a partir das amostras usando *primers* universais 515F (5'-TGTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 926R (5'-barcode-CCCCGYCAATTYMTT-3'), que foram desenhados com adaptadores e *barcodes* (vinte e duas sequências únicas para cada amostra). A

reação de PCR consistiu em 95°C por 3 min, seguindo para 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 90 s, 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 5 min. As reações de PCR foram realizadas usando 8µl de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) PCR kit (Kapa Biosystems, Boston, USA), 1µl de cada primer (10µM) e 50ng de DNA *template*. Os *amplicons* foram purificados em gel de agarose 2% e recuperados com Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit w/Zymo-Spin™ IC Columns (Zymo Research, Irvine, CA) conforme instruções do fabricante. A quantificação dos *amplicons* purificados foi realizada em Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, USA) e, após a mistura equimolar, foi realizado o sequenciamento *single-read* (1x400) em plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, USA) usando chip 318 v2, seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.5.2. Processamento dos dados brutos

Os dados brutos foram trimados para adaptadores/*barcodes*/*primers* usando os programas Scythe 0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) para a posição 3' das sequências e Cutadapt 1.7.1 (MARTIN, 2011) para a posição 5' das sequências. Em seguida, os dados foram filtrados para sequências que apresentassem qualidade PHRED<20 e sequências menores do que 300pb usando o programa Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). A determinação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) e análises de alfa- e beta-diversidade para Arquéias e Bactérias foram realizadas usando QIIME v. 1.9.0 (CAPORASO et al., 2011). As sequências quiméricas foram removidas usando o protocolo UPARSE incluso no programa USEARCH v. 1.1.1. A classificação taxonômica das UTOs foi realizada com o banco de dados Ribosomal Database Project (RDP II) *trainset* 14 usando mothur v. 1.25.0 (SCHLOSS et al., 2009). O alinhamento das UTOs foi realizado contra o banco de dados SILVA v. 119 (PRUESSE et al., 2007). A qualidade dos dados brutos e trimados foi avaliada usando o programa FastQC v. 0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

#### 4.6. Amostras para a PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), o DNA genômico do lodo foi coletado em três pontos de coleta do TR1 e MR1 e três pontos de coleta do TR2 e MR2. As amostras foram coletadas nos pontos de coletas distribuídos ao longo de cada reator. Este procedimento foi realizado com o intuito de verificar se há diferenças significativas na quantificação dos micro-organismos ao longo da altura da câmara de digestão dos reatores UASB.

No sistema termofílico, as amostras foram coletadas aos 590 dias. As três amostras para cada reator, foram distribuídas da seguinte forma: amostra 1 (P1), amostra 2 (P2), amostra 3 (P3+P4). Os ST e SV do lodo nos pontos do R1 foram de 113,0 e 73,3 g L<sup>-1</sup> (P1); 29,2 e 17,2 g L<sup>-1</sup> (P2); 30,5 e 18,9 g L<sup>-1</sup> (P3) e 34,8 e 19,9 g L<sup>-1</sup> (P4), respectivamente. No R2, os ST e SV foram de 107,2 e 75,1 g L<sup>-1</sup> (P1); 36,5 e 17,0 g L<sup>-1</sup> (P2); 31,2 e 20,3 g L<sup>-1</sup> (P3) e de 29,1 e de 15,0 g L<sup>-1</sup> (P4), respectivamente.

No sistema mesofílico, as amostras foram coletadas aos 415 dias. As amostras de cada reator foram coletadas da seguinte maneira: amostra 1 (P1+P2) amostra 2 (P3+P4+P5), amostra 3 (P6+P7+P8). Os ST e SV do lodo nos pontos do R1 foram de 151,5 e 96,9 g L<sup>-1</sup> (P1); 83,1 e 38,8 g L<sup>-1</sup> (P2); 48,9 e 8,1 g L<sup>-1</sup> (P3); 48,8 e 7,4 g L<sup>-1</sup> (P4); 27,9 e 15,5 g L<sup>-1</sup> (P5); 33,6 e 20,3 g L<sup>-1</sup> (P6); 22,5 e 11,8 g L<sup>-1</sup> (P7); 101,3 e 15,1 g L<sup>-1</sup> (P8), respectivamente. No R2, os ST e SV foram de 61,9 e 44,5 g L<sup>-1</sup> (P1); 55,4 e 28,0 g L<sup>-1</sup> (P2); 35,8 e 20,5 g L<sup>-1</sup> (P3); 38,7 e 25,0 g L<sup>-1</sup> (P4); 28,4 e 18,9 g L<sup>-1</sup> (P5); 21,9 e 11,0 g L<sup>-1</sup> (P6); 25,7 e 14,4 g L<sup>-1</sup> (P7); 57,7 e 27,9 g L<sup>-1</sup> (P8), respectivamente.

As extrações do DNA genômico de ambas as amostras de lodo descritas acima foram realizadas a partir de 0,37 mg de lodo por meio do *kit PowerSoil® DNA Isolation Kit* (MOBIO Laboratories, Inc), estocados a -20°C. A qualidade do DNA genômico foi analisada tanto pelo *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc.) quanto pelo gel de agarose a 1% com TAE 1x e quantificado pelo *Qubit® dsDNA HS Assay Kit 100 assays, 0.2–100 ng*, conforme as instruções do fabricante.

##### 4.6.1. qPCR: Quantificação absoluta

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada com as amostras de DNA genômico isoladas a partir do lodo coletado de quatro pontos diferentes de cada

reator termofílico (R1 e R2), e de 8 pontos diferentes para cada reator Mesofílico, conforme descrito no item 4.6. Os micro-organismos referentes aos domínios Archaea e Bacteria, as ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales, e duas famílias, Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae, pertencentes à ordem Methanosarcinales, foram quantificados por ampliações das regiões 16S rDNA, usando primers específicos (Song et al., 2010; Lee et al., 1996). Inicialmente, os primers tiveram sua especificidade confirmada por Silva TestPrime (<http://www.arb-silva.de/search/testprime/>). Estas regiões foram amplificadas por PCR convencional com iniciadores específicos e clonadas utilizando o pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega, Wisconsin, USA) e inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH10 $\beta$ . Os clones positivos foram selecionados entre as células DH10 $\beta$  transformadas. O sequenciamento do DNA foi realizado no CREBIO (Centro de Biologia Genômica e Recursos Biológicos) da FCAV / UNESP, (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. As análises foram realizadas utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), base de dados pública fornecida pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Um e-value inferior a -08 foi considerado aceitável. Os plasmídeos purificados contendo o inserto foram quantificados utilizando fluorometria.

As reações de qPCR foram conduzidas no aparelho *Applied Biosystems* 7500 Real-Time PCR. As reações incluíram 6,25  $\mu$ L de Power SYBR Green<sup>®</sup> MasterMix (Applied Biosystems), primers em diferentes concentrações dependendo do microrganismo, 10 ng de DNA metagenômico e água ultrapura para perfazer o volume da reação a 12,5  $\mu$ L. Todas as reações foram conduzidas em placas de 96 poços no aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System<sup>®</sup> (Applied Biosystems) com as seguintes definições: dois minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; E 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, um minuto em temperatura específica de anelamento e 30 segundos a 78°C. Após estas etapas, houve uma etapa com o aumento da temperatura (60 para 95°C) para obter a curva de dissociação dos produtos da reação.



O número de cópias de cada amostra foi determinado por diluição em série da curva padrão a partir do plasmídeo linearizado,  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^2$  (1:10). Para cada curva padrão, foi determinado se a eficiência foi próxima ou igual a 100%. O Ct foi determinado para as amostras e comparado com as curvas padrão para determinar o número de cópias em 10 ng de DNA metagenômico, considerando a massa original do material de partida, o rendimento de extração de DNA e a diluição do molde de PCR, o número de alvos do gene 16S rRNA foi determinado por grama (peso úmido), de acordo com Lunedo et al. (2014).

#### **4.7. Tratamento da vinhaça biodigerida por processo oxidativo avançado e combinação de processos**

A vinhaça biodigerida foi proveniente do tratamento anaeróbio, composto pelos reatores UASB termofílicos em série (R1 e R2), foi concentrada 14 vezes por evaporação e encaminhada para o LEPABE (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia) da Universidade do Porto, onde foi mantida sob refrigeração até ao momento da sua utilização, a partir do qual se procedeu à diluição de 14 vezes com água destilada antes de submeter aos ensaios.

##### **4.7.1. Processo Fenton**

A vinhaça biodigerida foi submetida ao processo Fenton tendo como base as condições otimizadas de pH e temperatura encontradas por Guerreiro et al. (2016) e avaliou-se o efeito da dose de ferro e peróxido de hidrogénio. Os ensaios oxidativos ocorreram em batelada (descontínuo, ou por partidas) num reator de vidro, com capacidade de 1 L, equipado com uma camisa de recirculação ligado a um banho termostático que permite estabilizar a temperatura no interior do reator, que foi medida através de um eletrodo combinado de pH/temperatura que permite medir estes dois parâmetros no efluente ao longo dos ensaios (Figura 6).

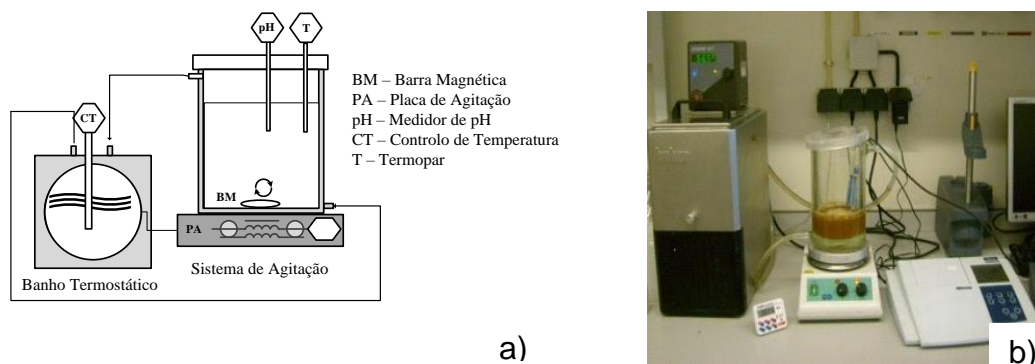


FIGURA 6. Diagrama esquemático (a) e fotografia (b) do reator de Fenton.

Para realizar os estudos de oxidação de Fenton, foi adicionado ao reator 150 mL de vinhaça biodigerida. Imediatamente após o efluente ter atingido a temperatura de 55 °C, o pH foi ajustado para o valor desejado de 5,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Posteriormente, foi adicionada a quantidade necessária de ferro (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) e de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v)). Iniciou-se a contagem do tempo de reação a partir da adição de peróxido de hidrogênio e foi estendido até 3 h.

De modo a promover a homogeneidade no interior do reator promoveu-se agitação constante (200 rpm). Para tal utilizou-se uma barra magnética e uma placa de agitação.

A temperatura e os valores de pH do meio foram registrados ao longo do tempo e, em intervalos previamente definidos (de 30 em 30 minutos) foram recolhidas amostras para avaliar o COT após se cessar a reação com a adição de excesso de sulfito de sódio (que reage instantaneamente com o peróxido de hidrogênio remanescente). No fim da reação (após 3 h), determinou-se imediatamente a concentração de peróxido de hidrogênio remanescente.

No ensaio com as condições ótimas, no final da reação, para determinar a DBO<sub>5</sub>, DQO, N, P, ST e SV, turbidez e a inibição para *Vibrio fischeri*, após eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual e precipitar o ferro através do aumento do pH até ~12 com NaOH 10 M, neutraliza-se, o sobrenadante, a pH ~7,0 com HCl 1N para a toxicidade conforme proposto na metodologia analítica e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado para os outros parâmetros.

#### 4.7.2. Processo de Coagulação/Floculação

Os ensaios de coagulação/floculação, foram realizados à escala laboratorial num Jar-Teste, como se demonstra no esquema da Figura 7.

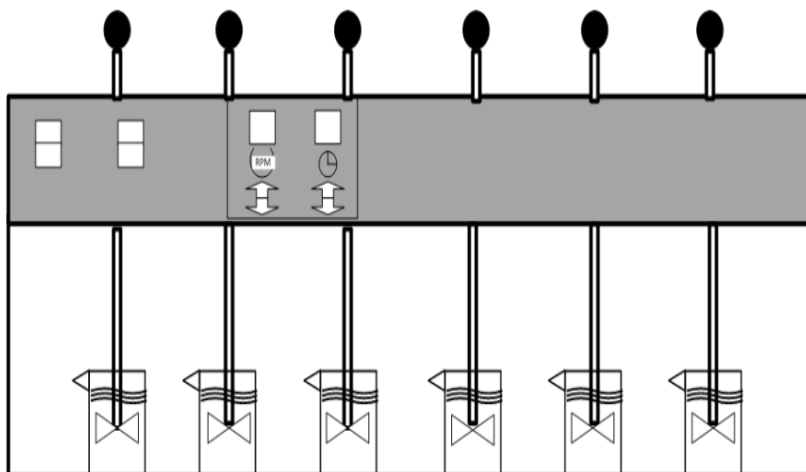


FIGURA 7. Esquema do Jar-Teste utilizado nos ensaios de coagulação/floculação, (RODRIGUES, 2013).

Todas as experiências de coagulação/floculação foram realizadas à temperatura ambiente (24-28 °C). Em cada béquer, adicionou-se 1 L de vinhaça biodigerida, ajustou-se o pH a 3,0 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M e, adicionou-se o coagulante (500 mg  $\text{Fe}^{3+}$ /L na forma de cloreto de ferro hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )). Depois reajustou-se o pH om NaOH (1M). Subsequentemente, o efluente foi a submetido a agitação rápida (150 rpm) durante 3 min e finalmente a agitação lenta (20 rpm) durante 15 min sem adição de floculantes, porque, de acordo com Rodrigues et al. (2013) não melhora a remoção de compostos orgânicos e, portanto, os custos são reduzidos. As condições de operação foram fixadas de acordo com as condições ótimas reportadas em outros estudos com a vinhaça biodigerida (GUERREIRO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017).

Após a coagulação/floculação, o efluente foi submetido a 20 h de sedimentação dos flocos e separação da fase líquida. Uma porção do sobrenadante foi coletada para medir a turbidez,  $\text{DBO}_5$ , DQO, COT e ferro dissolvido.

#### 4.7.3. Combinação dos processos de Coagulação/Floculação seguida de Fenton

A Figura 8 resume a estratégia adotada nesta seção, no processo Fenton parte do catalisador será o ferro dissolvido resultante da etapa preliminar de coagulação/floculação. Sendo assim, para avaliar o Fenton na etapa de integração dos processos (coagulação/floculação + Fenton), apenas se adicionou  $0,27 \text{ g L}^{-1}$  de ferro, sendo o total de catalisador em solução de  $0,83 \text{ gL}^{-1}$  (este valor foi calculado tendo em conta a razão mássica  $\text{Fe}^{3+}:\text{H}_2\text{O}_2$  ótimo para o tratamento da vinhaça biodigerida por Fenton – 0,08). As restantes variáveis foram fixas em:  $\text{pH} = 3,0$ ,  $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,3 \text{ g L}^{-1}$  (mantendo-se a razão mássica  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{DQO}$  igual ao encontrado na otimização da vinhaça por Fenton – 1,6)



FIGURA 8. Combinação dos Processos de Coagulação/Floculação e de Fenton.

#### 4.7.4. Métodos analíticos do tratamento da vinhaça biodigerida

O teste de toxicidade de inibição *Vibrio fischeri* foi realizado de acordo com a norma DIN/EN/ISO 11348-3 (Internacional Organization for Standardization, 2005). As bactérias foram colocadas em contato com a amostra para incubação a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após os tempos de contato de 5, 15 e 30 min, a bioluminescência foi medida em um Microtox® Analyzer (modelo 500).

Outros parâmetros foram medidos de acordo com APHA (1998): A turbidez foi avaliada pelo método 2130 B em turbidímetro (HI88703 da Hanna Instruments); a demanda biológica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>) foi medida de acordo com o método D 5210, utilizando um aparelho OxiTOP (Velp Científica); a demanda química de oxigênio (DQO) foi avaliada pelo método de refluxo fechado (Método 5220 D); a análise do carbono orgânico total (TOC) foi determinado por combustão catalítica próximas de 680 °C - método 5310 D, utilizando um analisador TC / TOC (aparelho Shimadzu 5000 A); o fósforo total foi quantificado por colorimetria pelo método do ácido ascórbico (Método 4500P e E), após digestão com persulfato de amônio; os sólidos suspensos totais (SST) e os sólidos suspensos voláteis (SSV) foram quantificados por análise gravimétrica e Método 2540 B e Método 2540 E, respectivamente; o nitrogênio total foi determinado por colorimetria (Método D992-71 de ASTM Standards (ASTM, 1973)) após a digestão anterior (Método 4500 - N C). Todas as determinações analíticas foram realizadas em duplicata.

#### **4.7.5. Testes Metanogênicos- Ensaios de biodegradabilidade**

Neste ensaio pretendeu-se determinar o potencial de produção de metano da vinhaça-de-cana de açúcar *in natura* diluída com: vinhaça biodigerida (sem tratamento antes de ser recirculada nos reatores, modo convencional), vinhaça biodigerida após o processo Fenton (estratégia I, citado no item 4.7.1) e vinhaça biodigerida após a combinação de coagulação/floculação com Fenton (estratégia I e II, citado no item 4.7.3).

Após os processos de Fenton e a sua combinação com a coagulação/floculação foi realizada uma caracterização físico-química dos efluentes, antes de utilizá-los nos testes metanogênicos. Os valores de pH foram corrigidos com NaOH (1 M) para 7,0 e corrigiu-se os teores de nutrientes com a adição de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e ureia de modo a que as concentrações de P e N atendessem a relação recomendada para a digestão anaeróbia de DQO:N:P de 350:5:1.

Definiu-se um volume de trabalho de 250 mL em cada frasco, onde foi colocado 37 mL de inóculo (SV=202 g L<sup>-1</sup>) e o restante foi composto por 128 mL do efluente a ser testado e 58 mL de vinhaça *in natura* (proporção volumétrica de 60% do efluente tratado a recircular e 40% da vinhaça *in natura* - mesma proporção que estava sendo

aplicada nos reatores UASB termofílicos em série no período de coleta da vinhaça biodigerida). O inóculo utilizado neste estudo foi o lodo proveniente de um reator anaeróbio tratando águas residuárias, Porto, Portugal. Após a coleta, o inóculo foi mantido em repouso por 24 h para sedimentar e após este período foi removido o sobrenadante (AMORIM, 2015).

Na Tabela 8, está apresentado a organização dos testes metanogênicos realizados nos reatores anaeróbios em duplicata. A estimativa de produção teórica de metano pode ser determinada de várias formas, neste estudo foi estimada tendo por base a DQO da mistura (efluente + substrato) adicionado aos ensaios/reatores, conforme descrito por Chernicharo (2007).

TABELA 8. Organização técnica dos testes de biodegradabilidade.

Parâmetros	V <sub>trabalho</sub> (mL)	V <sub>efluente</sub> (mL)	V <sub>substrato</sub> (mL)	V <sub>inóculo</sub> (mL)	DQO (mg L <sup>-1</sup> )	Prod <sub>máx teórica</sub> CH <sub>4</sub> (mL)
Vinhaça biodigerida	250	127,8	85,2	37,0	27383	2396
Após fenton	250	127,8	85,2	37,0	21827	1910
Após coagulação/floculação e Fenton	250	127,8	85,2	37,0	15504	1356

Estes testes consistem em medir a concentração de metano no biogás por meio de um sensor ótico BCP-CH<sub>4</sub> (BluSens, Alemanha) acoplado a um frasco de vidro onde ocorrerá a digestão anaeróbia das águas residuária (Figura 9). Neste sistema mede-se também o volume de biogás produzido através de fluxímetros - *MilliGascounter® MGC-1* (Ritter, Germany- figura 10). Para a aquisição dos dados, foram utilizadas duas caixas de conexão (BACCom – (Figura 10) aonde os fluxímetros e os medidores de metano estão conectados. Para a operação os dados e visualização dos resultados foi utilizado o software BACVis.

Os testes metanogênicos foram realizados à temperatura constante de ~35 °C e sob agitação a 100 rpm. Os reatores anaeróbios foram colocados em banho-maria com agitação.

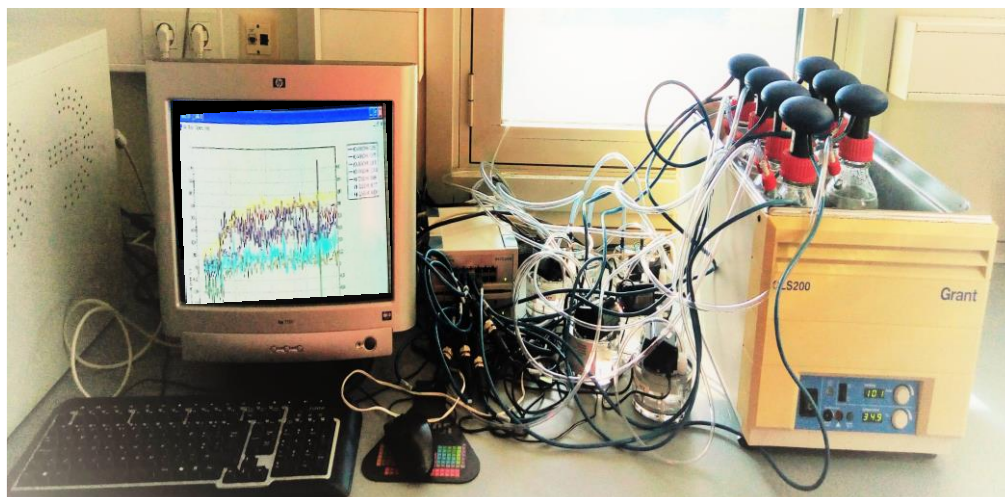


FIGURA 9. Fotografia do sistema em modo de funcionamento, composto por: Computador conectado as caixas de conexão (BACCom12) ligadas aos sensores (sensores óticos BCP-CH4) e aos medidores (MilliGascounter® MGC-1) de metano, os quais estão acoplados aos reatores banho termostático com agitação.



FIGURA 10. Fotografias de alguns elementos da instalação experimental utilizada: (a) sensores óticos BCP-CH4; (b) MilliGascounter® MGC-1; (c) caixa de conexão BACCom 12 (AMORIN, 2015).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 5. 1. Sistema termofílico composto pelos reatores UASB em série (TR1 e TR2)

#### 5.1.1. pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal (fases I, II e III)

Nos primeiros 245 dias de operação, fases I, II e III, os valores médios de COV aplicadas foram crescentes de 15, 18 e 20 g DQO (L d)<sup>-1</sup> no reator UASB (R1), respectivamente. Os valores médios de pH do afluente foram de 6,69 a 7,39 (Tabela 9), e estão dentro da faixa considerada ótima para a atividade dos micro-organismos metanogênicos.

Foi observado o aumento gradual da concentração de AVT com os acréscimos na COV (Tabela 9). Na fase I, as concentrações de AVT aumentaram de 1100 a 4350 mg L<sup>-1</sup> e foram similares no efluente de ambos os reatores (Figura 11). A contínua acumulação dos AVT no TR1 e TR2, pode ter ocorrido porque a população de arqueias metanogênicas ainda não eram suficientes ou não estavam aclimatadas às condições impostas, como altas COV, como também observado por Mota et al., (2013). Neste período também foram observadas deficiências de fósforo de aproximadamente 30%, conforme recomendação de 350: 5: 1 de DQO: N: P para processos biológicos. Em virtude das elevadas concentrações de AVT observadas no tratamento da vinhaça, substâncias alcalinizantes têm sido utilizadas como opção para preservar a biomassa microbiana, mantendo-se o pH próximo à neutralidade como o uso de bicarbonato, que é produto final da metanogênese (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; DOLL; FORESTI, 2010).

Portanto, após 60 dias de operação, na fase II, foi adicionado ao afluente o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para suplementação de P, e o NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, como alcalinizante e fonte de N. Com isso, o pH do afluente foram mantidos dentro da faixa considerada ótima, com valores próximos a 7,31. As concentrações de AT aumentaram significativamente para 6074 mg L<sup>-1</sup> no TR1 e para 6188 mg L<sup>-1</sup> no TR2, mas as concentrações de AP continuaram baixas e as concentrações de AVT continuaram elevadas, com valores de 5139 mg L<sup>-1</sup> no TR1 e de 5080 mg L<sup>-1</sup> no TR2.



TABELA 9. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e efluentes, das relações AVT/AT, AI/AP dos efluentes durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbico da vinhaça.

Parâmetros	FASES										C.V. (%)	TESTE F	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
Tempo de operação (dias)	1 a 70	71 a 200	201 a 250	251 a 360	361 a 420	421 a 480	481 a 570	570 a 620	621 a 700	701 a 800			
COV TR1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> )	15	18	20	8	18	28	34	45	37	32			
COV TR2 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> )	23	30	42	13	26	30	40	49	59	48			
N-am (mg L <sup>-1</sup> )	Afluente	109bc	272a	266a	23cd	141b	87cd	74d	59d	82cd	136b	22,4	144,0**
	TR1	125cd	294a	274a	104de	206b	127cd	103de	63e	88de	155c	23,5	99,3**
	TR2	137cd	304a	280a	99def	203b	133cde	117de	69f	89ef	160c	24,6	89,3**
AVT (mg L <sup>-1</sup> )	Afluente	2335ef	5221a	1713ef	1640f	3282cd	2309ef	2605de	4516ab	5169a	4064bc	24,1	64,5**
	TR1	2186b	5139a	4438a	1472c	2821b	2330b	2588b	4477a	5095a	4502a	19,7	93,3**
	TR2	2185de	5080a	4365bc	1456f	2681d	1728ef	2086de	3842c	4605ab	4046bc	19,4	109,6**
AVT/AT	TR1	0,59c	0,86a	0,88a	0,55c	0,57c	0,56c	0,58c	0,68abc	0,80ab	0,64bc	24,2	13,5**
	TR2	0,57bc	0,83a	0,86a	0,55c	0,53cd	0,38d	0,44cd	0,57bc	0,71ab	0,56c	23,5	24,5**
AI/AP	TR1	1,18b	3,79a	1,09bc	0,82bc	1,01bc	0,8bc	0,55c	0,83bc	1,28b	0,78bc	37,5	101,2**
	TR2	1,13b	3,59a	1,17b	0,84bc	0,96bc	0,55cd	0,42d	0,64bcd	1,09b	0,79bcd	34,6	128,4**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

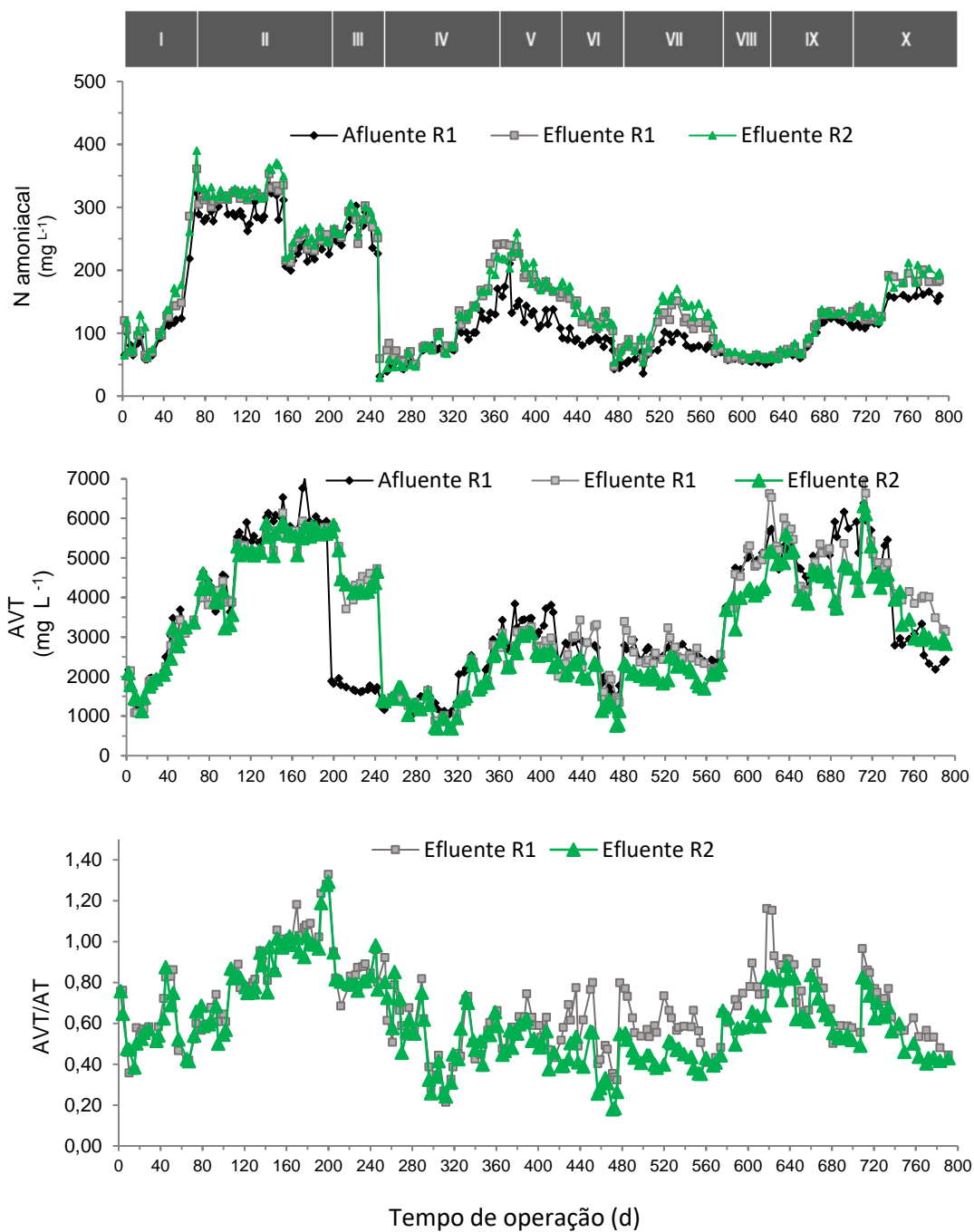


FIGURA 11. Nitrogênio amoniacal ( $N_{am}$ ), ácidos voláteis totais (TR2) dos afluentes e efluentes e das relações TR2/AT dos efluentes durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série TR1 e TR2 no tratamento anaeróbico da vinhaça.

Os valores médios de AVT/AT nos efluentes aumentaram para 0,86 e 0,83 no TR1 e TR2, respectivamente, assim como os valores de Al/AP (Tabela 10), e indicavam um desequilíbrio, o que poderia provocar inibição dos micro-organismos metanogênicos (ZHAO; VIRARAGHAVAN, 2004).

Em nova tentativa de reduzir os AVT, após 180 dias de operação (fase III), foi utilizado como fonte alcalinidade e nutrientes, o efluente de outro sistema anaeróbio tratando vinhaça, dispensando a utilização de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Com esta estratégia, ocorreu uma pequena redução nas concentrações de AVT (Figura 11) em relação a fase anterior (fase II), de 5139 para 4438  $\text{mg L}^{-1}$  no TR1 e 5080 para 4365  $\text{mg L}^{-1}$  no TR2. Porém, as concentrações de AT também diminuíram e as relações AVT/AT mantiveram valores similares aos da fase II, com valores médios de 0,88 no TR1 e 0,86 no TR2. Os valores de Al/AP tiveram redução acentuada, embora ainda permanecendo na faixa que indicava inibição da metanogênese. De acordo com Villamontoya et al. (2016) a estratégia de utilização de outro tipo de efluente no processo de recirculação pode ser interessante para a recuperação de sistemas anaeróbios após condições de acidificação.

Os maiores valores de nitrogênio amoniacal (N-am) ocorreram na fase II, com a adição de bicarbonato de amônio, e na fase III, com a utilização do efluente de outro sistema de tratamento anaeróbio. As concentrações médias de  $\text{N}_{\text{am}}$  nos reatores em série variaram de 109 a 266  $\text{mg L}^{-1}$  no afluente, de 125 a 274  $\text{mg L}^{-1}$  no efluente TR1 e de 137 a 280  $\text{mg L}^{-1}$  no efluente do TR2 (Tabela 10). Apesar dos altos valores de AVT neste período, os valores de N-am. não foram elevados para causar toxicidade a microbiota metanogênica, que de acordo com Hejnfelt e Angelidaki (2009), geralmente, ocorre dentro da faixa de 1500 a 3000  $\text{mg L}^{-1}$ . España-Gamboa et al. (2012) avaliando o tratamento anaeróbio da vinhaça em reator UASB reportaram concentrações de 160  $\text{mg L}^{-1}$  de N-am, próximas as observadas neste trabalho, e consideraram como benéfico para a digestão anaeróbia. As estratégias adotadas nas fases I, II e III, evitaram a falência do processo nos reatores UASB em dois estágios, porém, não apresentaram melhorias nos indicadores de estabilidade do processo.

TABELA 10. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI) no afluente e efluentes durante a operação do sistema termofílico composto pelos reatores UASB em série (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça.

Parâmetros	FASES										C.V. %	TEST F	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
<b>Tempo de operação (dias)</b>	1 a 70	71 a 200	201 a 250	251 a 360	361 a 420	421 a 480	481 a 570	570 a 620	621 a 700	701 a 800			
<b>COV TR1 (g DQO (L d)<sup>-1</sup>)</b>	15	18	20	8	18	28	34	45	37	32			
<b>COV TR2 (g DQO (L d)<sup>-1</sup>)</b>	23	30	42	13	26	30	40	49	59	48			
<b>pH</b>	<b>Afluente</b>	7,09 bc	6,69 d	7,39 ab	7,05 c	6,55 d	7,61a	7,43 a	7,70 a	7,61 a	7,58 a	3,5	55,8**
	<b>TR1</b>	7,71 c	6,71 d	7,74 c	7,97bc c	7,75 c	8,07abc	8,18 ab	8,44 a	7,93 bc	8,30 a	4,4	58,5**
	<b>TR2</b>	7,83 e	6,79 f	8,01d e	8,49 ab	8,19 cd	8,42bc	8,54 ab	8,78 a	8,64 ab	8,73 a	3,5	136,5**
<b>AT (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	3290 e	6144bc	4453 d	2268 f	3184 e	4202d	4202 d	5651 c	6404ab	6698 a	13,4	141,9**
	<b>TR1</b>	3724 f	6074bcd	5173 ce	2755 g	4946 e	4,307ef	4397 ef	6116 bc	6424 b	7174 a	15,1	76,6**
	<b>TR2</b>	3843 d	6188 b	5246 c	2667 e	5073 c	4657c	4708 c	6357 b	6445 b	7344 a	13,4	97,5**
<b>AP (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	1347fg	1681 ef	1927 ed	1079 g	1365 fg	2691 cd	2484 d	3184 ab	3015bc	3583 a	17,0	116,5**
	<b>TR1</b>	1713 e	1331 e	2483 cd	1584 e	2486 cd	2414 d	2837bcd	3327 b	3016bc	4035 a	19,6	78,2**
	<b>TR2</b>	1819 d	1410 d	2458 c	1517 d	2608 c	3005 bc	3324 b	3877 a	3276b	4108 a	18,0	102,7**
<b>AI (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Afluente</b>	1942 efg	4463ab	2527cde	1189 h	1818 efg	1511 fg	1736 fg	2573 cd	3459 b	3030bc	21,8	115,7**
	<b>TR1</b>	2023 efg	4743 a	2690cde	1171 h	2460 def	1893 fg	1559 gh	2789bcd	3408 b	3139bc	22,0	92,7**
	<b>TR2</b>	2025 de	4778 a	2789 bc	1151 f	2464 cd	1652 ef	1385 f	2480 cd	3168 b	3236b	19,7	129,6**

c.v. – coeficiente de variação; letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); ns - não significativo ( $p > 0,05$ ); p-probabilidade.

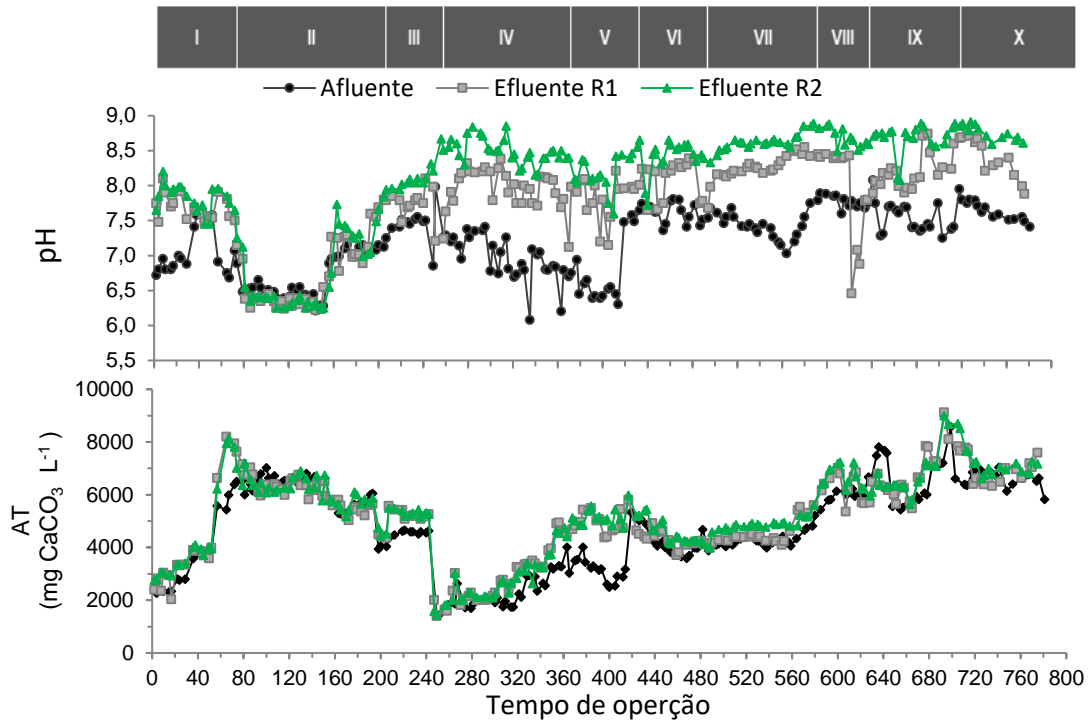


FIGURA 12. Valores de pH, alcalinidade total (AT) no afluente e efluentes dos reatores UASB termofílicos em série (TR1 e TR2) no tratamento da vinhaça.

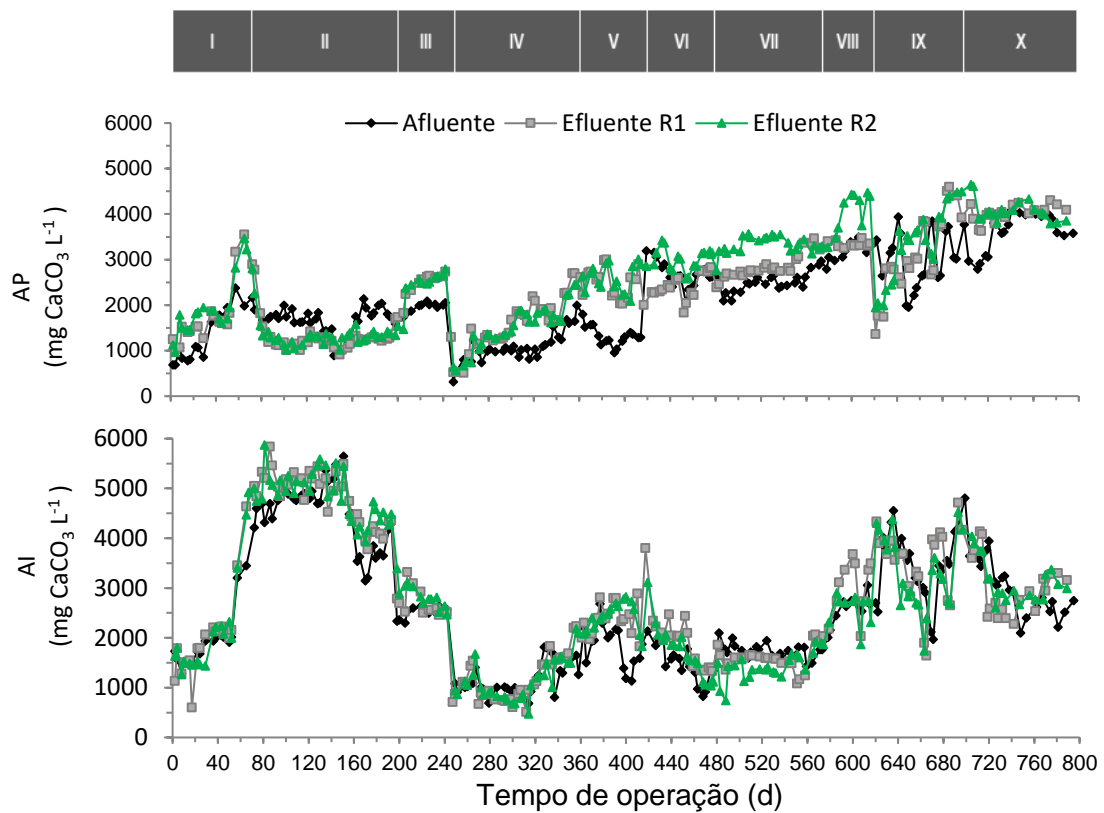


FIGURA 13. Valores de alcalinidade parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores UASB termofílicos em série (TR1 e TR2) tratamento da vinhaça.

### **5.1.2. pH, alcalinidades, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal (fases IV a fase X)**

Após 250 dias de operação (fase IV) foi utilizada uma nova estratégia, adição da torta de filtro para suplementação dos nutrientes e retomada com COV mais baixa, de 8 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> no TR1 e 13 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> no TR2. Após isso, o sistema apresentou melhoria na estabilidade e na capacidade de tamponamento, como demonstrado pelo aumento significativo nos valores de AP e também de AVT no efluente R2, de 1517 a 3877 mg L<sup>-1</sup> e de 1556 a 4605 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, a concentração de AVT foi menor no efluente R2 em comparação com o afluente, coerente com o consumo de AVT pelas arqueias metanogênicas.

Uma estratégia comumente utilizada para manter a estabilidade dos reatores anaeróbios no tratamento da vinhaça, é a aplicação de substâncias alcalinizantes (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; JANKE et al., 2016a). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a utilização da recirculação de efluentes, com o objetivo de manter o bicarbonato produzido a partir do metabolismo metanogênico, permitiu equilíbrio adequado entre pH, alcalinidade e AVT, sem necessidade de produtos químicos adicionais.

Além disso, as razões AVT/AT mais altas foram de 0,80 (TR1) e 0,71 (TR2) com COV de 37 e 59 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> no TR1 e TR2, respectivamente (Tabela 9). De acordo com Zhao e Viraraghavan (2004), as relações AVT/AT superiores a 0,8 podem indicar a inibição das arqueias metanogênicas. No entanto, isso não foi observado neste estudo, provavelmente, devido à adição de torta de filtro, que forneceu os nutrientes essenciais para o desempenho adequado da digestão anaeróbia, bem como o uso de taxa de recirculação do efluente TR2 mais elevada (vinhaça : efluente = 21 : 79 (% vol.)).

A relação Al/AP é outro indicador importante da estabilidade do processo, os valores de Al/AP inferiores a 0,3 são considerados ótimos para a digestão anaeróbia no tratamento de esgoto doméstico (Ripley et al., 1986). No entanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que, com o uso da vinhaça como substrato, as relações Al/AP superiores a 0,6 permitem estabilidade adequada ao processo, conforme indicado pelos valores de pH, AP e AVT/AT com COV acima de 45 e 59 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, para TR1 e TR2, respectivamente.

Após 560 dias de operação e COV de 45 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> (fase VIII), a relação AVT/AT voltou a aumentar para 0,68 e 0,57 no TR1 e TR2, atingindo 0,8 no TR1 e 0,71 no TR2 após 620 dias (fase IX). Embora o desempenho do sistema (TR1 + TR2) tenha diminuído bruscamente, o sistema não entrou em colapso porque a produção volumétrica de metano foi mantida, mesmo com valores inferiores, e o efluente apresentou capacidade de tamponamento, mantendo os valores de pH do afluente na faixa considerada ótima para os micro-organismos metanogênicos, por meio do processo de recirculação.

A partir da fase IV, foram observados decréscimos nos valores de N-am., e isso ocorreu em virtude da substituição do bicarbonato de amônio pela torta de filtro. Na fase VIII e IX foram observados os menores valores de N-am ( $p < 0,01$ ), no afluente e efluente dos reatores TR1 e TR2, e também os maiores valores de AVT. Os baixos valores de N-am nestas fases podem ter ocorrido em virtude da variação nas características da torta de filtro.

### **5.1.3. Ácidos graxos voláteis**

A quantificação de ácidos graxos voláteis (AGV), acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico, fornece informações importantes sobre as vias metabólicas envolvidas na produção de metano. Foram observadas proporções relativamente elevadas de ácido acético em ambos os reatores, aproximadamente, 69% e 72% no TR1 e no TR2, com COV de 45 e 49 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, respectivamente. Os AGV são formados a partir da digestão anaeróbia de carboidratos, proteínas e lipídeos; e uma alta proporção de ácido acético é desejável, pois este ácido é um dos principais precursores da metanogênese (SENTÜRK; INCE; ENGIN, 2010).

A relação entre propionato/acetato pode ser utilizada como indicação de desequilíbrio do processo, se a relação exceder 1,4 (Ahring et al., 1995). Neste trabalho, obtivemos proporções de propionato/acetato de 0,28 (R1) e 0,25 (R2) com as COV mais elevada (Figura 14). A proporção de propionato/acetato, provavelmente se manteve baixa em virtude da adição de torta de filtro, recirculação de efluentes e operação em dois estágios, que permitiram a geração de condições ambientais

adequadas para o consumo de propionato e a geração de ácido acético, mesmo com elevadas COV.

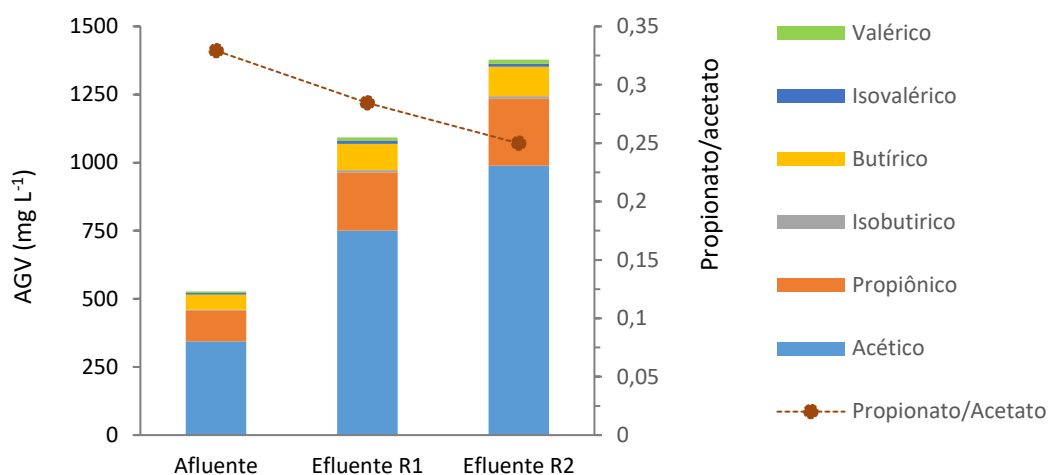


FIGURA 14. Valores das concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV) e da relação propionato/acetato no afluente e efluentes dos reatores UASB, TR1 e TR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça sobre condições termofílicas.

A oxidação do ácido propiônico é termodinamicamente desfavorável, e a degradação destes ácidos ocorre em virtude de muitas reações enzimáticas. e requer cooperação sintrófica entre bactérias redutoras de sulfato, bactérias produtoras de propionato e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (LUEDERS; POMMERENKE; FRIEDRICH, 2004). Na degradação dos AGV, o propionato deve ser primeiramente oxidado para acetato e hidrogênio como produtos intermediários, que são então convertidos posteriormente em metano pelas arqueias metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas, respectivamente.

A degradação do ácido propiônico em sistemas termofílicos é mais lenta do que a degradação de outros ácidos orgânicos encontrados nos processos anaeróbios. Fuess et al. (2017) tratando vinhaça em um reator UASB em condições termofílicas e COV de 20 a 25 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>, relataram que de 60 a 80% dos ácidos presentes no efluente foram compostos de ácido propiônico. Neste trabalho, os valores de ácido propiônico no efluente de TR1 e TR2 representam aproximadamente 19% dos ácidos orgânicos determinados, o que está abaixo dos valores descritos por Fuess et al. (2017), provavelmente, devido à adição de torta de filtro, que contribuiu com os nutrientes necessários para manter os baixos valores de ácido propiônico.



#### 5.1.4. Demanda química de Oxigênio (DQO) e produção de metano

Nos primeiros 250 dias de operação, nas fases I a III, sem a utilização da torta de filtro, os valores de eficiência de remoção de DQO<sub>total</sub> foram inferiores a 30 e 16% no TR1 e TR2, respectivamente (Tabela 11). Neste período inicial, sem a adição de torta de filtro no afluente, as maiores produções volumétricas foram de 0,75 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no TR1 e de 0,7 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no TR2, entre 40 e 70 dias. Após este período houve queda acentuada no desempenho dos reatores, com valores de produção volumétrica de metano próximos a zero, e esse comportamento pode ter ocorrido em virtude do acúmulo de AVT em ambos reatores. Neste período as relações AVT/AT ficaram acima de 0,8, considerada inibitória para os micro-organismos metanogênicos, justificando a baixa produção de metano e remoção de DQO.

A maior eficiência de remoção de DQO para o sistema (TR1+TR2) foi de 60%, obtida com os maiores valores de DQO no afluente, de 27819 a 32630 mg L<sup>-1</sup>, e COV no TR1 de 34 e 35 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> (Fases VI e VII) (Tabela 10). Os valores obtidos para remoção de DQO foram semelhantes aos obtidos por Ferraz Jr et al (2016), que obteve até 65%, na avaliação do desempenho de um sistema em dois estágios composto por reator APBR e reator UASB, no tratamento de vinhaça, com COV de 25 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>. No entanto, neste estudo, com a utilização da torta de filtro e recirculação de efluentes foi possível alcançar valores de COV elevados, mesmo com a utilização de substrato cuja composição é altamente variável durante o período experimental.

As concentrações de metano no biogás variaram de 49 e 65% no TR1 e de 49 a 70% no TR2. De acordo com Mazarelli et al. (2016) em condições ácidas ocorre elevadas concentrações de AVT, o ácido carbônico predomina e pode libera-se mais CO<sub>2</sub> no biogás, o que pode ter contribuído para as menores concentrações de metano no biogás do TR1. As maiores concentrações de metano no biogás ocorreram no TR2, indicando alta atividade hidrolítica e acidogênica em TR1, com as maiores concentrações de AVT (Figura 13) e atividade metanogênica superior no TR2.

TABELA 11. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da carga orgânica volumétrica (COV), DQOtotal no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQOtotal durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série TR1 e TR2 no tratamento anaeróbio da vinhaça.

Parâmetros	FASES										C.V.	Teste F
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Tempo de operação (dias)	1 a 70	71 a 200	201 a 250	251 a 360	361 a 420	421 a 480	481 a 570	571 a 620	621 a 700	700 a 800		
<b>Carga orgânica volumétrica (g DQO (L d)<sup>-1</sup>)</b>												
TR1	15 f	18 e	20 e	8 g	18 e	28 d	34 c	45 a	37 b	32c	9,8	484**
TR2	23 e	30d	42 bc	13 f	26 de	30 d	40 c	49 b	59 a	48b	15,7	151**
<b>DQOtotal (mg L<sup>-1</sup>)</b>												
Afluente	11601 f	13931e	15189 e	8016 g	18468 d	27819 c	32630 a	31532 ab	26191 c	30680b	13,9	467,9**
TR1	8058 f	10586 e	14770 c	6238 f	11904 de	13998 cd	17509 b	16127 bc	19493 a	21160a	15	134,7**
TR2	6680 d	9811c	14340 b	5577d	10821 c	11218 c	13753 b	13631 b	17881 a	18260a	15,0	137,0**
<b>Eficiência de remoção de DQOtotal (%)</b>												
TR1	30 bc	24 c	3 d	29 bc	35 b	50 a	46 a	49 a	25 c	30bc	28,0	36,8**
TR2	16 abc	9 de	3 e	11 cd	10 cde	20 ab	22 a	16 abcd	8 de	14bcd	53,5	12,1**
TR1+TR2	41 b	30 d	6 e	29 d	41 bc	60 a	58 a	57 a	31 cd	40bc	24,2	50,0**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade.

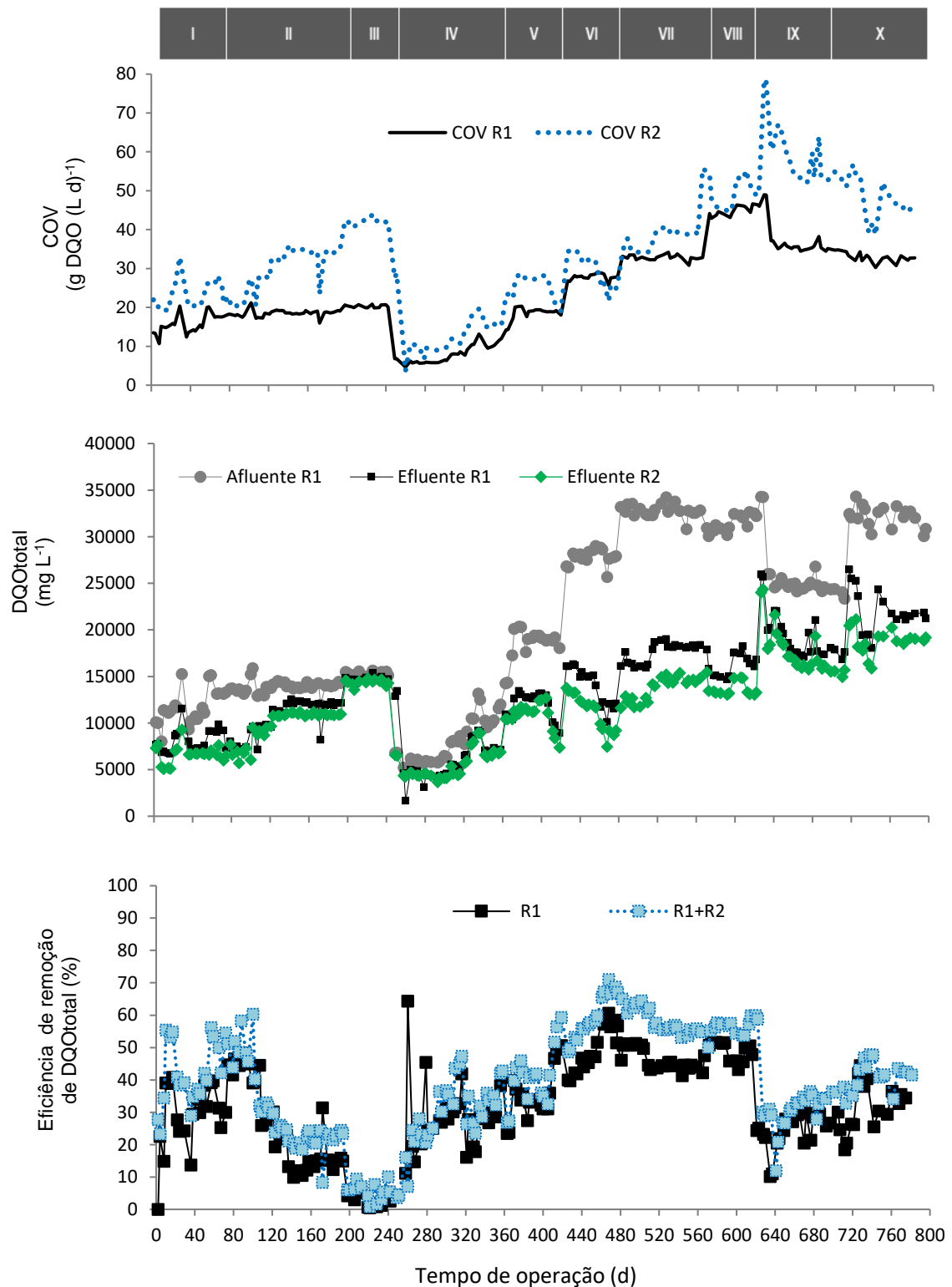


FIGURA 15. Valores de carga orgânica volumétrica (COV), DQOtotal no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO no tratamento anaeróbio da vinhaça nos reatores termofílicos em série.

As maiores produções volumétricas de metano foram observadas na fase VIII, com valores de 4,10 e 1,45 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup>, para o TR1 e TR2, respectivamente. A temperatura pode influenciar as reações bioquímicas por meio do aumento das taxas de reação, o que permitiria o uso de tempos de detenção hidráulicos (TDH), mais curtos, aumentando a degradação dos sólidos orgânicos e a produção de biogás (SENTÜRK; INCE; ENGIN, 2010), como observado neste estudo, com a operação dos reatores a 55 °C.

Após 620 dias de operação, a produção volumétrica de metano diminuiu acentuadamente (Figura 16), e os valores médios de AVT/AT aumentaram (Tabela 10). Embora o desempenho do sistema (TR1 + TR2) tenha diminuído abruptamente, o sistema não entrou em colapso porque a produção volumétrica de metano foi mantida, mesmo que em valores mais baixos e o efluente apresentou capacidade tampão, mantendo os valores de pH do afluente na faixa considerada ótima para o micro-organismos metanogênicos através da recirculação de efluentes.

Os valores médios da produção específica de metano variaram de 0,17 a 0,24 L CH<sub>4</sub> (g DQO removida)<sup>-1</sup> no R1 e de 0,09 a 0,25 L CH<sub>4</sub> (g DQO removida)<sup>-1</sup> no R2 (Tabela 11). España-Gamboa et al. (2012), avaliando a produção de metano por tratamento com vinhaça usando um reator UASB modificado, observaram a COV ótima de 17 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> com produção específica de metano de 0,263 L CH<sub>4</sub> (g DQO adicionada)<sup>-1</sup>, e o sistema entrou em colapso com COV de 22 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>. Van Haandel et al. (2014) observaram uma queda brusca no desempenho do reator, que não pôde ser recuperado. Portanto, os resultados obtidos neste estudo destacam a importância da aplicação da torta de filtro, pois seu uso permitiu estabilidade operacional, mesmo com a aplicação de COV elevada.

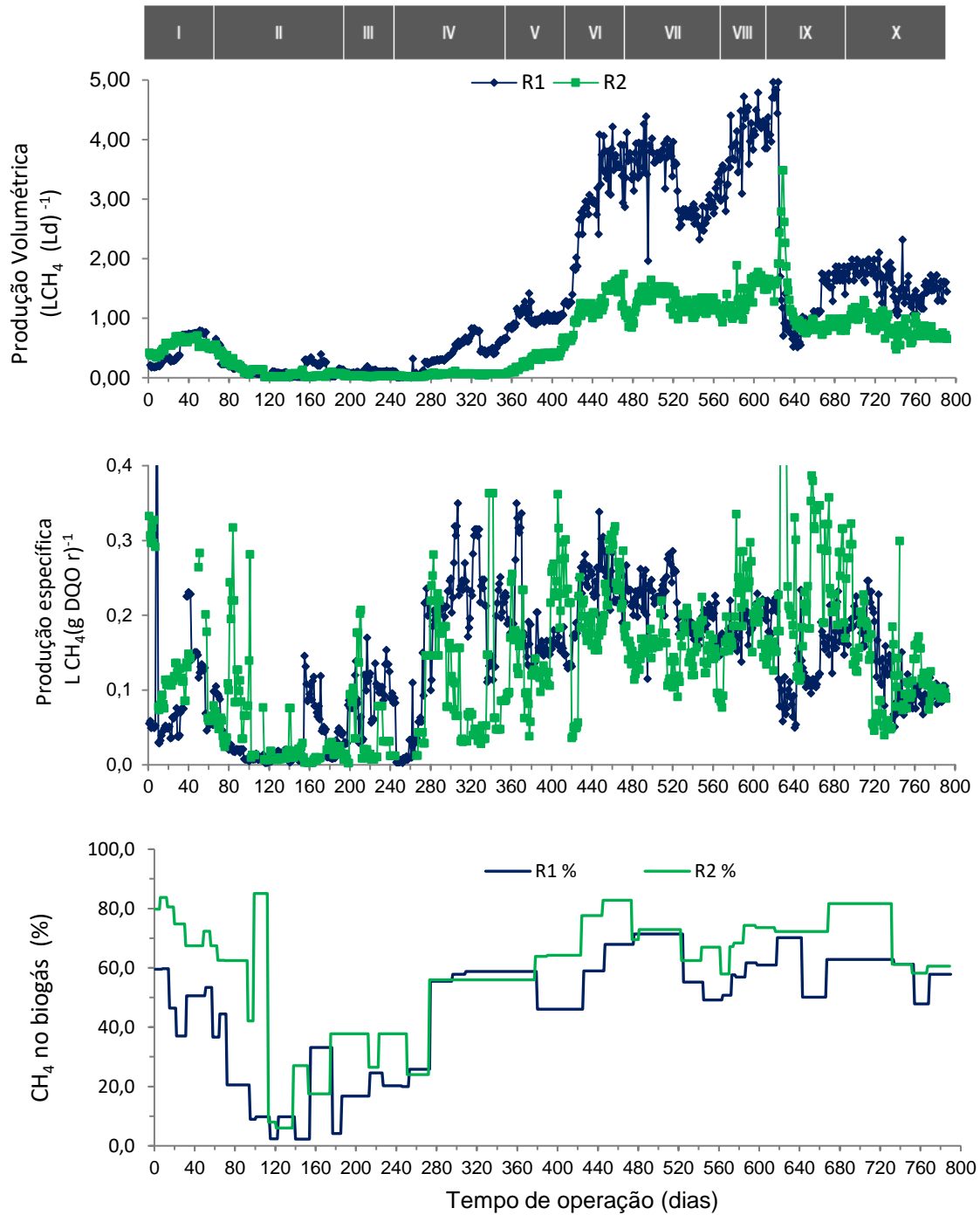


FIGURA 16. Produção volumétrica de metano, produção específica de metano e concentração de metano no biogás nos reatores UASB em séries no TR1 e TR2 no tratamento anaeróbio termofílico da vinhaça.

TABELA 12. Produção volumétrica de metano, concentração de metano no biogás e produção específica de metano nos reatores UASB em séries no TR1 e TR2, durante as fases I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X no tratamento anaeróbio termofílico da vinhaça.

<b>FASES</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>	<b>C.V.</b>	<b>Teste F</b>
COV TR1	15	18	20	8	18	28	34	45	37	32		
COV TR2	23	30	42	13	26	30	40	49	59	48		
<b>Produção volumétrica de metano (L CH<sub>4</sub> (Ld<sup>-1</sup>))</b>												
TR1	0,50 e	0,12 f	0,10 f	0,43 e	1,19 d	3,32 b	3,27 b	4,10 a	1,61 c	1,56 c	33,3	652,3**
TR2	0,54 e	0,09 f	0,03 f	0,06 f	0,44 e	1,15b c	1,27 b	1,45 a	1,15 c	0,84 d	36,1	434,9**
TR1+TR2	0,54	0,12	0,08	0,31	0,96	2,77	2,74	3,39	1,57	1,4	-	-
<b>Concentração de metano no biogás (%)</b>												
TR1	47,8 c	15,0 e	20,8 d	51,3 c	49,5 c	65,2 <sup>a</sup>	60,9 ab	60,3 ab	61,4 ab	58,7 b	18,2	361,0**
TR2	72,5 ab	36,6 e	35,2 e	49,4 d	62,6 c	79,5a	67,8 bc	72,7 ab	75,5 a	67,9 bc	20,6	133,9**
<b>Produção específica de metano (L CH<sub>4</sub> (g DQOremovida)<sup>-1</sup>)</b>												
TR1	0,09 e	0,03 f	0,08 e	0,18 c	0,17 c	0,24 a	0,20 b	0,19 bc	0,14 d	0,12 d	40,7	111,8**
TR2	0,13 cd	0,04 e	0,05 e	0,11 d	0,16 c	0,21 b	0,15c	0,21 b	0,26 a	0,11d	52,9	69,7**
TR1+TR2	0,10 eg	0,03 h	0,12 de	0,12 def	0,1 efg	0,16 ab	0,14 cd	0,18 a	0,15 bc	0,11 efg	36,3	88,5**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

### 5.1.5. Macronutrientes e micronutrientes

O crescimento e a atividade do consórcio microbiano em reatores anaeróbios dependem fortemente de fatores ambientais, como a disponibilidade de macro e micronutrientes. Os macronutrientes, tais como nitrogênio, fósforo e potássio são necessários para a atividade de muitos microrganismos (Speece, 1996). A quantidade de nutrientes recomendada tem como base a concentração da matéria orgânica do substrato, e Chernicharo (2007) recomenda proporção mínima DQO:N:P de 350:5:1.

Com a utilização da torta de filtro, foi observada a disponibilidade adequada de nutrientes no afluente do sistema para a digestão anaeróbia da vinhaça. Esta condição foi favorecida pela incorporação da torta de filtro no substrato, em quantidades suficientes para garantir uma relação DQO: N: P de 350: 5: 1 (Tabela 12). Com o aumento gradual da COV, as concentrações de NK e P-total no afluente aumentaram de 174 para 483 mg L<sup>-1</sup> e 45 para 192 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os valores de eficiência de remoção de NTK e P-total nos reatores em série (R1 + R2) variaram de 14 a 30% e de 53 a 73%, respectivamente. De acordo com Oliveira et al. (1997), um dos possíveis mecanismos para maior remoção de nitrogênio e fósforo é a formação de estrovita (NH<sub>4</sub>MgPO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O) e vivianita (Fe<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O), que precipitam e são imobilizados na manta de lodo. Não foram observadas remoções de potássio (K) (Tabela 12).

Em estudos recentes, Janke et al. (2016a), utilizando fosfato na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, induziram a acumulação de AVT, possivelmente, em virtude da inibição da metanogênese pelo potássio. Neste trabalho, com o uso de torta de filtro para suplementação, principalmente, de nitrogênio e fósforo, diminuiu-se os efeitos de possíveis cargas de choque e impediu a flotação de grânulos nos reatores UASB. Esta condição possibilitou o consumo de AVT e a alta produção de metano (Figura 16).

Com o aumento gradual da COV, as concentrações de Fe, Zn e Mn aumentaram, mas o aumento da concentração de Fe foi mais acentuado. De acordo com Singh et al. (1999), Fe, Mn e Zn estão entre os elementos traços necessários para a síntese de vários micro-organismos anaeróbios, pois esses elementos são cofatores enzimáticos para várias enzimas.

TABELA 13. Concentrações (mg L<sup>-1</sup>) e eficiência de remoção (%) de macro nutrientes NTK, P-total e K no afluente e efluente dos reatores UASB termofílicos em série (TR1 e TR2), durante as fases I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X no tratamento anaeróbio da vinhaça.

Parâmetros	FASES										C.V.	Test F
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
COV TR1	15	18	20	8	18	28	34	45	37	32		
COV TR2	23	30	42	13	26	30	40	49	59	48		
<b>UASB TR1: relação DQO :N :P (350:5:1)</b>												
DQO:N	6,1b	23,4a	17,2a	8,3b	7,5b	5,7b	5,2b	4,8b	6,6b	5,5b	39,7	26,5**
DQO P	0,7b	0,9b	0,6a	2,0a	2,1a	1,9 <sup>a</sup>	1,9a	2,1a	2,6a	2,6a	28,2	14,3**
<b>Nitrogênio (NTK)</b>												
Afluente	179d	1006a	751b	174d	411c	452c	483c	435c	479c	483c	19,2	60,8**
TR1	176de	873a	619b	162e	337cde	311cde	402bc	356cde	367cd	360cd	27,1	34,1**
TR2	144d	910a	577b	129d	291cd	279cd	383bc	337bcd	357bc	329cd	28,1	43,3**
Eficiência (TR1+TR2)	15a	17a	23a	32a	32a	38 <sup>a</sup>	20a	22a	25a	31a	38,1	3,7**
<b>Fósforo Total (P<sub>total</sub>)</b>												
Afluente	20d	36d	31d	45d	118c	153bc	181ab	192ab	190ab	192a	18,6	109,5**
TR1	16d	36cd	19d	26d	56bc	57abc	72ab	81ab	86a	85a	32,2	20,7**
TR2	14d	35cd	14d	21d	51bc	64abc	68ab	93a	74ab	82ab	37,3	17,5**
Eficiência (TR1+TR2)	44a	48a	61a	71a	60a	64a	63a	60a	57a	57a	24,2	1,7ns
<b>Potássio (K)</b>												
Afluente	8	42	31	27	77	75	49	115	91	137	-	-
TR1	22	41	37	28	61	82	51	110	111	131	-	-
TR2	32	69	48	21	85	95	46	115	107	127	-	-

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).



TABELA 14. Valores médios e coeficiente de variação (em %) dos macronutrientes e micronutrientes (mg L<sup>-1</sup>) do afluente e efluente dos reatores UASB em série termofílicos (TR1 e TR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça.

Parâmetros	FASES																				
	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X		
COV (TR1)	16		18		20		8		18		28		32		45		37		32		
	c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		c.v.		
Ca	Afluente	4,6	33	7,0	72	7,1	42	5,1	31	7,0	26	10,0	19	5,9	21	6,8	33	5,89	60	8,4	45
	TR1	5,5	12	6,7	65	6,2	35	4,9	28	6,4	20	10,3	17	6,5	30	6,1	29	5,10	43	8,3	60
	TR2	1,2	22	4,3	51	6,0	48	3,7	46	6,7	27	9,9	17	6,8	28	4,2	13	4,9	35	7,9	54
Mg	Afluente	15,0	91	32,3	32	21,6	88	4,4	38	6,0	10	10,2	27	9,0	23	15,4	30	15,3	39	27,3	32
	TR1	23,6	98	26,9	77	16,3	108	4,3	37	4,9	23	10,9	31	9,0	34	14,6	18	16,6	20	26,6	44
	TR2	27,9	78	30,2	71	16,9	107	3,2	32	10,8	12	12,1	31	9,5	9	14	16	16,7	23	28,1	28
Fe	Afluente	4,4	57	6,8	93	4,1	63	11,6	50	42,8	81	48	58	50,3	40	25,5	30	25,5	30	30,5	47
	TR1	8,4	45	4,8	36	2,9	65	6,1	69	14,3	26	29	45	33,0	41	25,7	29	25,7	29	24,5	18
	TR2	6,3	62	7,5	94	5,72	74	4	78	16,3	19	32	32	33,2	57	18,3	21	18,3	21	25,2	18
Mn	Afluente	3,8	41	3,6	43	2,6	60	4,1	31	6,4	17	7,1	17	4,5	25	5,2	32	5,7	49	5,1	45
	TR1	4,1	23	3,4	26	2,7	47	4,0	27	4,2	10	6,6	10	4,1	36	4,8	35	5,2	22	4,9	31
	TR2	3,8	36	2,5	56	3,1	43	2,2	45	4,4	18	6,6	18	4,1	29	3,4	18	5,2	19	5,6	47
Zn	Afluente	0,5	71	1,9	82	1,7	93	1,2	104	3,9	6	6,0	25	11,4	88	10,4	29	82,5	115	7,7	61,2
	TR1	0,8	91	0,8	83	1,0	100	1,1	113	3,9	4	4,7	12	7,5	47	7,5	13	38,8	95	7,5	71,1
	TR2	1,2	115	1,6	111	0,8	84	1,6	111	5,9	3	5,0	19	6,8	37	7,3	18	41,0	89	9,2	116,9
Cu	Afluente	3,8	0	4,3	34	4,4	59	3,2	36	0,3	54	2,2	68	3,6	12	3,2	30	4,2	42	8,9	60
	TR1	4,1	15	3,9	43	5,2	75	3,6	27	0,1	29	1,9	65	3,3	20	3,0	47	4,7	17	10,2	61
	TR2	3,5	14	3,3	40	4,5	86	3,7	40	0,1	40	1,9	64	3,2	31	2,7	32	4,7	17	9,3	80

COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

De acordo com Schmidt et al. (2014), a deficiência de elementos traços causa diminuição do desempenho e aumento das concentrações de AVT, e os autores observaram que a depleção de Fe tem influência nos micro-organismos metanogênicos. Yamada et al. (2015) demonstraram que a suplementação de partículas de óxido de ferro (magnetite e ferridrite) acelerou o processo de degradação metanogênica do acetato e do propionato realizado pelas comunidades microbianas termofílicas. Neste estudo, as concentrações de Fe mais baixas ocorreram após 620 dias de operação. Coincidentemente neste período, observaram-se as maiores concentrações de AVT e menor desempenho do processo, indicando que a acumulação na concentração de AVT pode ter ocorrido em virtude da baixa quantidade de Fé disponível no afluente.

A composição química da torta de filtro é uma função da variedade e maturação da cana-de-açúcar, tipo de solo, processo de clarificação do caldo e vários outros fatores (PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013). Desse modo, as características da torta-de-filtro variam durante a safra da cana-de-açúcar. Assim, para obter baixas concentrações de AVT, operação estável e maior produção de metano em reatores anaeróbios tratando vinhaça com a suplementação da torta-de-filtro, deve-se monitorar as suas características químicas periodicamente.

#### **5.1.6. Caracterização do lodo termofílico**

Os valores de sólidos voláteis (SV) no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2 aumentaram com o aumento gradual de COV (Tabela 15 e Figura 17), indicando que houve crescimento no lodo dos reatores. As razões SV/ST foram inferiores a 0,7 nos pontos de coleta para o lodo no P2, P3 e P4, no TR1 e TR2, exceto em P1 de R1 e R2, que apresentaram valores acima de 0,7 (Tabela 16). De acordo com a legislação brasileira, o lodo de esgoto ou produto derivado é considerado estável para uso agrícola se a relação  $SV/ST < 0,70$  (CONAMA, 2006), o que evita altas concentrações de matéria orgânica no solo e atividade microbiana (VILLA-MONTOYA; FERRO; OLIVEIRA, 2016). Com base nesta resolução, foi observado o lodo estabilizado, principalmente nos pontos de coleta superiores, P2, P3 e P4. Assim, quando necessário, o descarte de lodo deve ser realizado nas partes superiores dos reatores, a partir do P2 ( $SV/ST < 0,7$ ). Assim mantem-se nos reatores o lodo com relações

SV/ST superiores a 0,7, o que indica uma maior quantidade de material orgânico e, conseqüentemente, maior atividade.

TABELA 15. Concentrações de sólidos totais (ST), voláteis (SV), fixos (SF) e relação SV e ST, nos 4 pontos de coletas de lodo do reator UASB (TR1) no tratamento termofílico da vinhaça.

UASB TR1		FASES				C.V.	Test F
		I a III	IV a V	VI a VIII	IV a X		
P1	ST	75,4 ab	71,4 b	109,7 b	99,9 ab	22,8	4,1*
	SV	60,6 ab	42,9 b	69,8 a	64,7 a	16,5	8,8**
	SF	14,8 a	28,5 a	39,9 a	35,3 a	41,7	2,5ns
	SV/ST	0,80 a	0,63 a	0,64 a	0,65 a	13,1	3,0ns
P2	ST	48, a	21,8 b	28,7 b	30,5 b	16,9	19,6**
	SV	35,0 a	12,4 b	16,5 b	16,0 b	13	67,8
	SF	13,3 a	9,4 a	12,2 a	14,5 a	25,6	2,8ns
	SV/ST	0,72 a	0,59 b	0,58 b	0,52 b	9,7	7,3**
P3	ST	42,3 a	22,9 b	30,1 ab	28,4 b	20,7	7,4**
	SV	29,3 a	13,1 b	18,6 b	16,5 b	20,1	13,6**
	SF	13,0 a	9,8 a	11,5 a	11,9 a	27,5	0,9ns
	SV/ST	0,69 a	0,59 a	0,62 a	0,57 a	10,5	2,4ns
P4	ST	31,6 ab	22,7 b	34,6 a	35,9 a	18,3	6,7**
	SV	19,7 a	12,9 b	20,6 a	21,5 a	16,2	10,6**
	SF	11,8 a	9,8 a	14,0 a	14,4 a	25,3	2,6ns
	SV/ST	0,62 a	0,58 a	0,59 a	0,60 a	9,6	0,3ns

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \* - Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); ns - não significativo ( $p > 0,05$ ); p-probabilidade

TABELA 16. Concentrações de sólidos totais (ST), voláteis (SV), fixos (SF) e relação SV e ST, nos 4 pontos de coletas de lodo do reator UASB (TR2) no tratamento termofílico da vinhaça.

UASB TR2		FASES				C.V.	Test F
		I a III	IV a V	VI a VIII	IV a X		
P1	ST	73,0 a	79,2 a	102,2 a	108,0 a	27,6	1,9**
	SV	56,6 a	53,8 a	70,6 a	67,7 a	28,9	1,0ns
	SF	16,4 b	25,4 ab	31,6 ab	40,3 a	35,6	3,5*
	SV/ST	0,78 a	0,68 ab	0,69 ab	0,63 b	9,23	3,2ns
P2	ST	28,4 a	27,2 a	34,1 a	38,7 a	46,8	0,6ns
	SV	18,1 a	13,6 a	15,9 a	19,8 a	35,7	1,1ns
	SF	10,3 a	13,6 a	18,2 a	18,9 a	60,6	0,7ns
	SV/ST	0,64 a	0,55 ab	0,47 b	0,51 ab	13,5	3,5*
P3	ST	30,5 a	24,5 a	33,0 a	33,9 a	26,9	1,6ns
	SV	18,1 a	14,1 a	21,7 a	18,8 a	24,1	3,0ns
	SF	12,4 a	10,4 a	11,2 a	15,1 a	37,6	1,0ns
	SV/ST	0,60 a	0,58 a	0,66 a	0,56 a	12,5	1,3ns
P4	ST	25,9 a	19,6 a	29,4 a	27,3 a	29,0	2,0ns
	SV	15,4 a	10,3 a	14,5 a	15,2 a	25,6	2,8ns
	SF	10,4 a	9,3 a	15,0 a	12,2 a	35,7	1,7ns
	SV/ST	0,60 a	0,56 a	0,49 a	0,55 a	13,6	1,2ns

c.v.: coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \* - Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); ns - não significativo ( $p > 0,05$ ); p-probabilidade

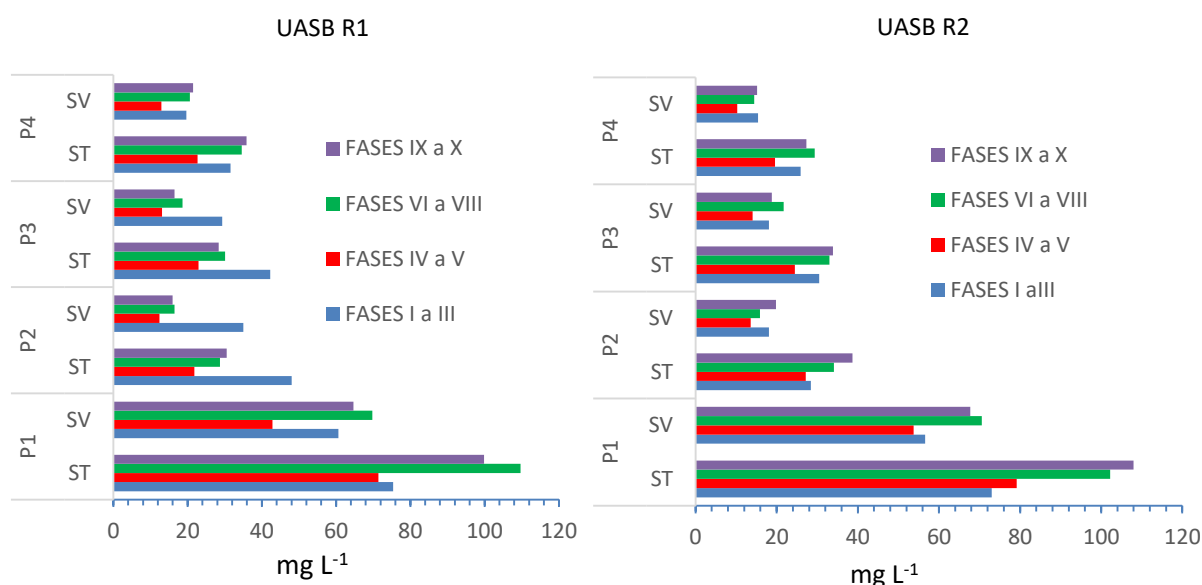


FIGURA 17. Concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), nos pontos de coletas de lodo dos reatores UASB em série TR1 e TR2 no tratamento termofílico da vinhaça.

### 5.1.7. Diversidade microbiana nos reatores anaeróbios termofílicos

A diversidade de bactérias e de arqueias no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2 foi analisada aos 590 dias de operação (Fase VIII)

A análise da diversidade de arqueias e bactérias no reator identificou 11 diferentes filos. Entre os filos de arqueias mais de 96,0% (TR1) e 99,7% (TR2) pertenciam ao filo Euryarchaeota e, nos filos de bactérias 58,0% (TR1) e 23,4% (TR2) pertenciam ao filo Thermotogae, seguidos por Firmicutes e Bacteroidetes (Figura 18).

O filo Thermotogae, encontrado em ambos os reatores, especialmente no TR1, é de grande interesse do ponto de vista biotecnológico, devido à estabilidade a altas temperaturas e à capacidade de utilizar vários carboidratos complexos, como celulose e xilanas, para produção de hidrogênio (GUPTA; BHANDARI, 2011). As maiores abundâncias do filo de Thermotogae no TR1 podem ter ocorrido em virtude das características da vinhaça, que podem conter compostos fenólicos como ácidos tânico e húmico, carotenoides, clorofila, antocianinas, betalaínas, riboflavinas, quinonas, caramelos (KASTER et al., 2011).

O filo Firmicutes foi oposto de Thermotogae, com a maior porcentagem no TR2. Esses micro-organismos são facultativos e são conhecidos por produzir celulasas,

lipases, proteases e outras enzimas extracelulares (YIN et al., 2016), bem como vários ácidos orgânicos (ácidos C3, C4), como propiônico, butírico e seus derivados (VENKATA MOHAN et al., 2011). O filo Firmicutes inclui muitas bactérias na classe Clostridia que são responsáveis pela quebra do material orgânico complexo (WIRTH et al., 2012), que, provavelmente, estão presentes nos reatores TR1 e TR2 devido às características da vinhaça.

O filo Bacteroidetes, o terceiro mais abundante, é composto por bactérias que estão envolvidas nas etapas de hidrólise e acidogênese da digestão anaeróbia (Dias et al., 2016) e é importante na degradação de polímeros complexos (Jabari et al., 2016). Os filios Thermotogae, Firmicutes e Bacteroidetes são principalmente responsáveis pela degradação de compostos orgânicos complexos, de modo que a presença desses filios nos reatores TR1 e TR2 indicam que micro-organismos capazes de degradar estes compostos estavam presentes na digestão anaeróbia da vinhaça, contribuindo para a estabilidade do sistema com alta produção de metano.

O filo Nitrospirae representa vários metabolismos e muitos gêneros são aeróbios, incluindo nitrificantes e redutores de sulfato (GARRITY et al., 2001). No TR1 e TR2, respectivamente 14,30% e 26,50% deste filo foram designados como não identificados. O uso de micro-organismos não classificados é um artifício usado para agrupar sequências que possuem características bacterianas, mas não se encaixam em um filo conhecido. Isso mostra que muitas bactérias presentes em condições termofílicas ainda são desconhecidas e podem ser exploradas como potencial genético e metabólico.

No filo Nitrospirae, encontra-se o gênero *Thermodesulfovibrio* que reduz o sulfato. Esses micro-organismos são termófilos, acidodófilos, anaeróbios abrigatórios e oxidam o material orgânico para acetato e utilizam sulfato e tiosulfato como aceptores de elétrons para o crescimento, mas também podem usar sulfito e nitrito (GARRITY et al., 2001).

Os gêneros identificados dentro o filo Proteobacteria apresentaram abundância baixa, inferior a 1%. Na classe Deltaproteobacteria, encontra-se o gênero *Desulfovibrio*; é mesofílico, anaeróbio e com capacidade de reduzir sulfato a sulfeto, e incapaz de oxidar acetato (DIAS, 2015).

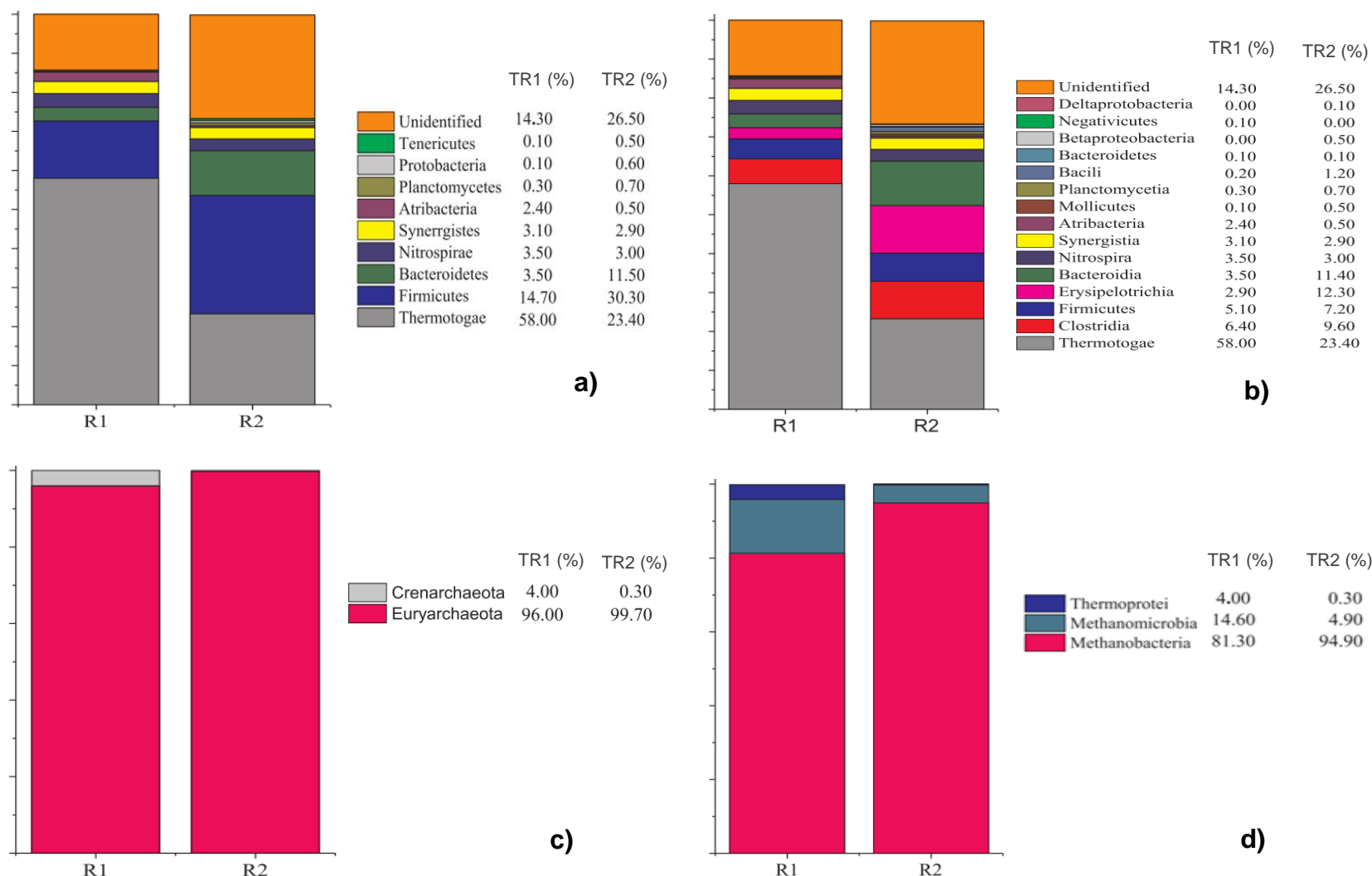


FIGURA 18. Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (a) e classes (b) das bacterianas e afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (c) e classes (d) das arqueias encontrados nas amostras de lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2. Normalizado pelo tamanho da menor amostra (37.074 seqüências).

TABELA 17. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das bactérias identificadas no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	TR1	TR2
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>Fervidobacterium</i>	12,13%	3,02%
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales			45,85%	20,40%
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermacetogenium</i>	3,35%	3,81%
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Syntrophaceticus</i>	1,23%	0,73%
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermodesulfobiaceae	<i>Coprothermobacter</i>	0,10%	0,95%
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Clostridium_III</i>	0,01%	0,01%
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae		0,64%	2,82%
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	<i>Clostridium_sensu_stricto</i>	14,00%	0,13%
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae_Sedis_III	<i>Tepidanaerobacter</i>	0,11%	0,01%
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			0,65%	1,09%
Firmicutes	Clostridia				0,16%	0,06%
Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae		2,88%	12,35%
Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales			0,14%	0,03%
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0,24%	1,14%
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Trichococcus</i>	0,00%	0,03%
Firmicutes					5,06%	7,18%
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Petrimonas</i>	3,35%	11,32%
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides</i>	0,07%	0,06%
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Proteiniphilum</i>	0,02%	0,02%
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Acetomicrobium</i>	0,02%	0,01%
Bacteroidetes					0,09%	0,05%
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Thermodesulfovibrio</i>	3,54%	3,01%
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Anaerobaculum</i>	3,12%	2,90%
Atribacteria					2,40%	0,49%
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae		0,26%	0,74%
Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>	0,09%	0,53%
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae		0,03%	0,46%
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Pusillimonas</i>	0,01%	0,06%
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae		0,00%	0,01%
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	0,01%	0,06%
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	<i>Brooklawnia</i>	0,00%	0,01%
Verrucomicrobia					0,00%	1,00%
Outros (<0.01%)					14,30%	26,50%

O gênero *Fervidobacterium* pode oxidar as hemiceluloses presentes no afluente (PANDIT et al., 2016) e foram encontradas abundâncias relativas de 13,58 e 0,60% no TR1 e TR2, respectivamente. As maiores abundâncias no TR1 podem ter ocorrido devido às maiores concentrações de hemicelulose, provavelmente provenientes da torta de filtro. A grande abundância observada do gênero *Fervidobacterium* no TR1 tem uma alta correlação com a produção volumétrica de metano, NK, P-total e Fe (teste estatístico (g-test)). Outro gênero abundante foi *Petrimonas*, micro-organismos que podem ser encontrados em condições alcalinas com pH de 8 a 9. São bactérias fermentativas, que produzem, principalmente, o ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, precursores da metanogênese (MASPOLIM et al., 2015). A maior abundância deste micro-organismo no TR2 pode estar relacionada ao pH mais alcalino. Em relação às arqueias, dois filos foram encontrados, Euryarchaeota - dominante em ambos os reatores - e Crenarchaeota. No filo Euryarchaeota, a classe mais dominante foi a Methanobacteria (Tabela 18).

Em relação as arqueias, o gênero *Methanothermobacter*, cuja abundância relativa foi de aproximadamente 80,5% no TR1 e 90% no TR2, mostrou dominância em ambos os reatores. De modo geral, os arqueias deste gênero possuem temperatura de crescimento ideal perto de 65 °C e a capacidade de crescer em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> como carbono e fonte de energia, NH<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio e H<sub>2</sub>S ou sulfito, mas não sulfato como fontes de enxofre. O *Methanothermobacter* requer Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, e/ou WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, e possivelmente Ca<sup>2+</sup> para crescimento (GUPTA; BHANDARI, 2011). Esses micro-organismos possuem arquitetura genômica e potencial de codificação responsável pela redução de CO<sub>2</sub> a metano (metanogênese de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>). Além disso, podem ser facilmente cultivados (KASTER et al., 2011).

Os gêneros *Methanobacterium* e *Methanosarcina* foram predominantes entre as arqueias metanogênicas durante a degradação de propionato a partir de amostras de solo de cultivo de arroz por inundação (LUEDERS; POMMERENKE; FRIEDRICH, 2004). Speece (2008) mencionou a adição de Fe<sup>2+</sup> em um reator anaeróbico mesofílico com concentrações de propionato de 1000 mg L<sup>-1</sup> permitiu a redução da concentração de propionato para 100 mg L<sup>-1</sup>. Neste trabalho, as ordens de Methanobacteriales e Methanosarcinales dominaram a comunidade metanogênica e o gênero *Methanothermobacter*, *Methanosarcina* e *Methanoculleus* apresentaram maior



abundância relativa, 81,3, 7,4 e 7,1% no TR1 e de 94,7; 1,9 e 2,7% no TR2, respectivamente, quando as proporções de propionato/acetato foram baixas, 0,28 no R1 e 0,25 no R2. A partir destes resultados, é possível observar que os nutrientes, principalmente Fe, aumentou a atividade microbiana específica ou a concentração de biomassa, de pelo menos um grupo de bactérias ou de arqueias metanogênicas envolvidas na degradação de propionato, e permitiram operação estável e mais eficiência da digestão anaeróbia termofílica da vinhaça com aceleração de degradação de acetato e propionato para produção de metano.

TABELA 18. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das arqueias identificadas no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	TR1	TR2
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanothermobacter</i>	81,31%	94,86%
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	0,03%	0,00%
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	7,44%	1,94%
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	0,01%	0,10%
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	7,13%	2,66%
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	0,04%	0,18%
Crenarchaeota	Thermoprotei				4,04%	0,27%

Assim, pode-se sugerir que a torta de filtro utilizada neste estudo criou as melhores condições para o domínio de *Methanothermobacter*. E, também, que estes micro-organismos são candidatos no consórcio da metanogênese no tratamento da vinhaça acompanhada à torta de filtro. A grande abundância do gênero *Methanothermobacter* tem alta correlação com a produção volumétrica de metano, NK, Ptotal e Fe em TR1 e TR2.

Os micro-organismos metanogênicos hidrogenotróficos do gênero *Methanoculleus* e os metanogênicos acetoclásticos e hidrogenotróficos do gênero *Methanosarcina* que apresentaram alta abundância relativa em TR1, são considerados como produtores de metano robustos e efetivos, que ocorrem em processos de digestão anaeróbia de alto desempenho. Em um estudo conduzido por Wintsche et al. (2016), a abundância relativa da transcrição *mcrA* de *Methanosarcina* sp. foi correlacionada positivamente com as concentrações dos elementos traços -

cobalto, manganês, molibdênio, níquel e tungstênio. Em contraste, o *Methanoculleus* pode lidar melhor com a limitação das concentrações de elementos traços (WINTSCHE et al., 2016). Assim, pode-se afirmar que as condições físico-químicas no TR1 promoveram o desenvolvimento desses micro-organismos. A distribuição das arqueias entre hidrogenotróficas e acetoclásticas no lodo dos reatores UASB TR1 e TR2, como observado neste trabalho, permitiu a alta produção de metano a partir do ácido acético, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> produzidos.

A classe *Thermoprotei* apresentou abundância, de 4,04% no TR1 e de 0,27% no TR2. *Thermoprotei* é destacado por formar biofilmes em diferentes ambientes e foi encontrado em altas proporções reatores de membranas alimentado com substrato sintético, composta de glicose e extrato de carne, e as proporções de *Thermoprotei* foram mais altas no biofilme do que no lodo (LUO et al., 2014).

#### **5.1.8. PCR tempo real- quantificação absoluta (qPCR)**

Entre as diversas comunidades microbianas identificadas, selecionamos alguns micro-organismos para determinar a concentração do gene rDNA 16S em cada ponto dos reatores UASB em série (TR1 e TR2). Os domínios Bacteria e Archaea, as ordens *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, bem como as famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetacea* foram quantificadas.

A quantificação dos micro-organismos indicou um equilíbrio entre Archaea e Bactérias, com  $1,20 \times 10^9$  a  $3,96 \times 10^9$  cópias/g SV no TR1 e  $1,19 \times 10^9$  a  $4,17 \times 10^9$  cópias/g SV no TR2 e  $7,39 \times 10^9$  a  $1,99 \times 10^{10}$  cópias/g SV no TR1 e  $1,04 \times 10^{10}$  a  $3,74 \times 10^{10}$  cópias/g SV no TR2, respectivamente (Figura 19). Em um experimento conduzido por Duda et al. (2015), um equilíbrio entre bactérias e arqueias também foi observado, mas em reatores anaeróbios horizontais de alta taxa em série para o tratamento de águas residuárias de suinocultura. Para que ocorra estabilidade a nos reatores anaeróbios, as concentrações de arqueias devem ser próximas as de bactérias. Assim, as arqueias podem usar eficientemente os substratos produzidos pelas bactérias, uma vez que os micro-organismos metanogênicos possuem taxas de crescimento e de utilização do substrato inferiores as bactérias.

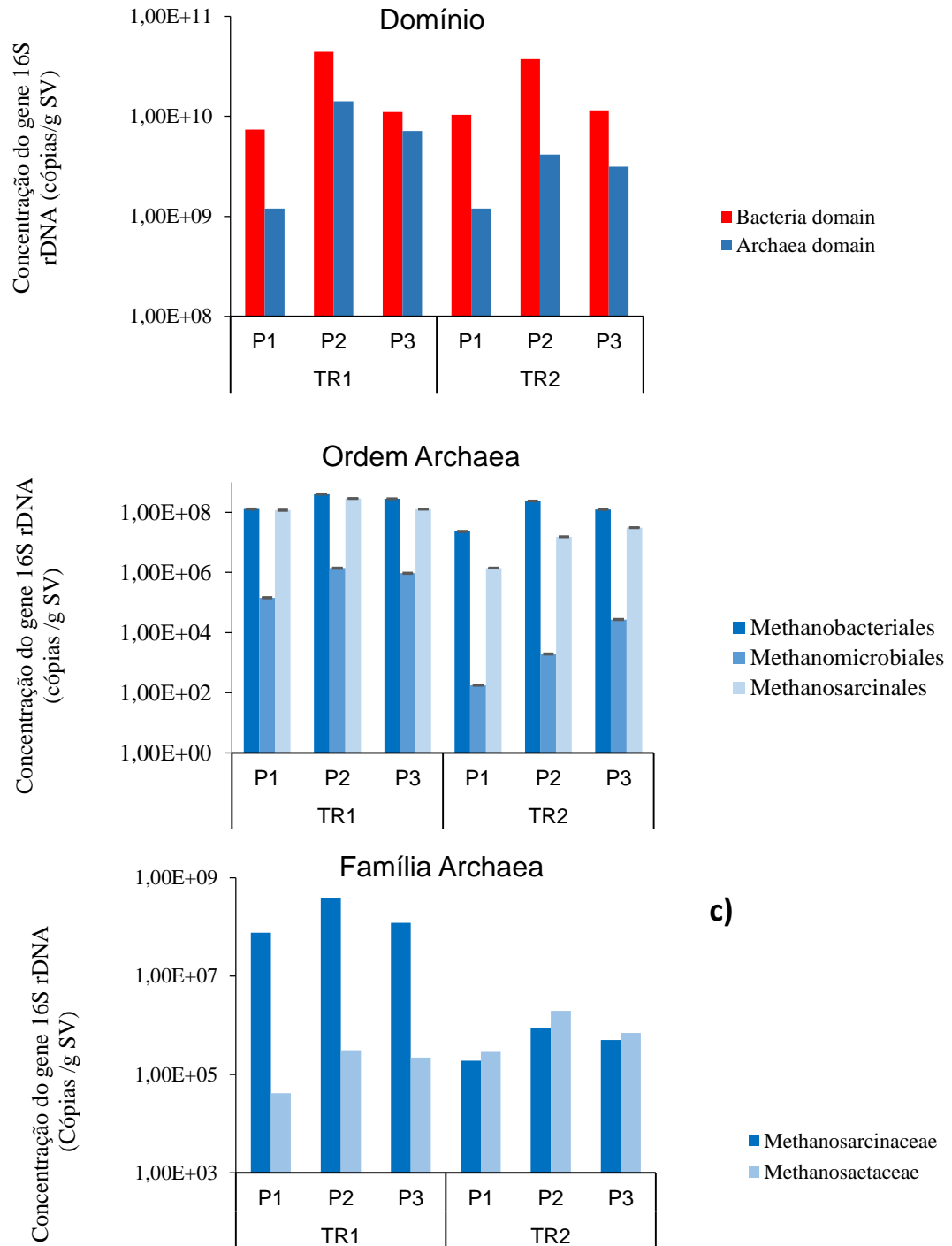


FIGURA 19. Quantificação absoluta dos micro-organismos, utilizando qPCR, dos domínios Bactéria e Arquéias, três ordens e duas famílias do domínio das arqueias, presentes no lodo dos reatores UASB, TR1 e TR2 nos pontos P1, P2 e P3. SV: sólidos voláteis.

O desequilíbrio na proporção de bactérias e arqueias pode afetar todo o sistema, levando a uma redução na quantidade de metano produzido (AKUZAWA, M., HORI, T., HARUTA, 2011). Este efeito não ocorreu nos reatores UASB utilizando vinhaça com a suplementação adequado de torta de filtro, que mantiveram baixas concentrações de AVT e altos níveis de produção de metano em virtude das quantidades similares de bactérias e arqueias.

Em relação às ordens de Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales, as concentrações de Methanobacteriales e Methanosarcinales foram maiores, e todas mantiveram-se em equilíbrio nos pontos do TR1, mas aumentaram de P1 para P3 no TR2. Assim, pode se sugerir que o uso do hidrogênio gerado ocorre em todas as partes do reator R1 e, principalmente, nas partes superior do reator TR2. As maiores concentrações de arqueias hidrogenotróficas no lodo dos reatores (TR1 e TR2) favoreceram a transferência eficiente de hidrogênio para a produção de metano, mantendo, conseqüentemente, baixa pressão de hidrogênio, permitindo o equilíbrio das reações.

As Methanosarcinaceae apresentaram concentração ligeiramente maior no TR1, quando comparado ao TR2. No entanto, Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae apresentaram um padrão de concentração semelhante no TR2 (Figura19). No trabalho de Duda et al. (2015), as quantidades absolutas de ambas as famílias foram semelhantes nos quatro reatores. Mas neste trabalho, o aumento da concentração de Methanosarcinaceae no R1 pode ter ocorrido devido às maiores concentrações de AVT e do consumo de outros compostos além do acetato.

## **5.2. Reatores UASB mesofílicos em série (MR1 e MR2)**

### **5.2.1. Variações de temperatura durante a operação do sistema mesofílico**

Os valores médios da temperatura diária média durante as fases de operação dos reatores MR1 e MR2 variaram de 19,9 a 24,2 °C, indicando que os reatores UASB foram operados na faixa mesofílica. Os valores médios de temperatura máxima, média e mínima estão apresentados na figura 20 e tabela 19.

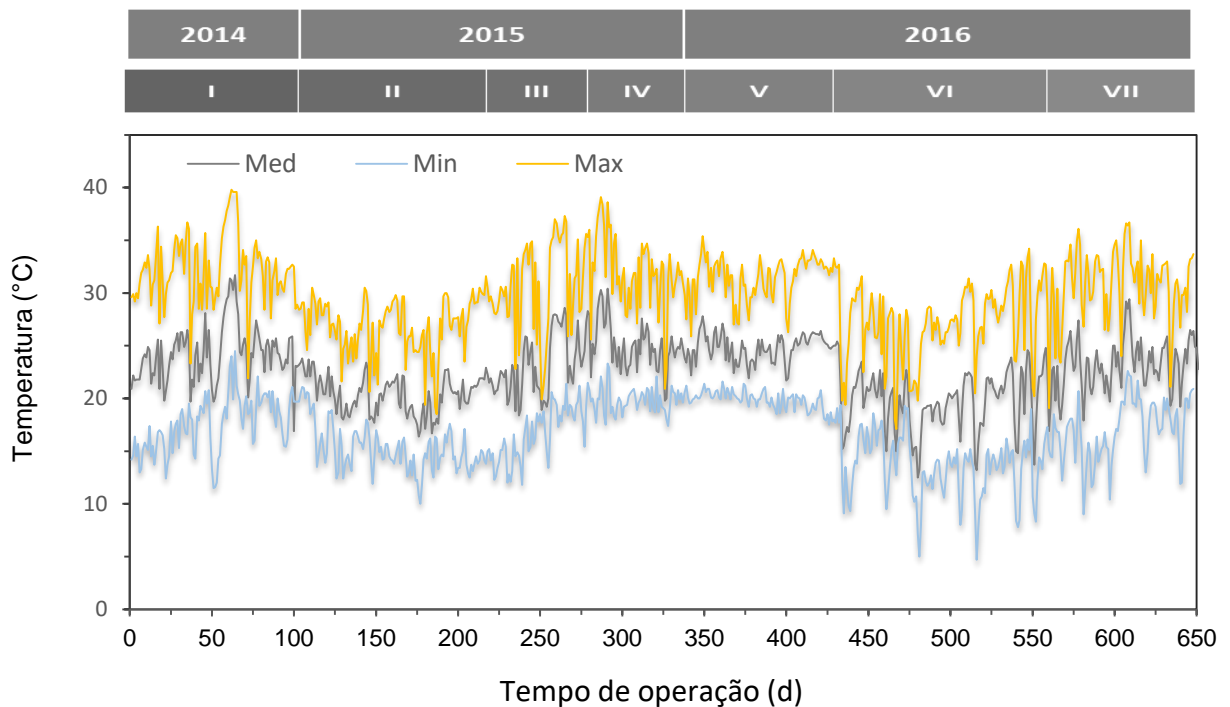


FIGURA 20. Valores médios da temperatura do ar mínima (Min) e média (Med) durante o período de operação dos reatores UASB mesofílicos em série MR1 e MR2 no tratamento anaeróbico da vinhaça

A temperatura é um parâmetro físico muito relevante para o processo de digestão anaeróbia. Embora seja possível o tratamento anaeróbico sob as três faixas de temperatura: psicrófila (4 a 15 °C), mesófila (20 a 40°C) e termófila (45 a 50°C), a temperatura pode promover o aumento ou declínio na atividade e nas taxas de crescimento dos micro-organismos metanogênicos (RIZVI et al., 2014).

Os maiores valores de temperaturas do ar foram observados na fase I, alcançando valores diários máximos de até 39,8 °C, e os menores valores de temperaturas foram observados nas fases II e VI nos meses de maio a agosto, estação de inverno, com valores médios de 14,8 e 13,7°C (Tabela 18), embora muito próximos, os valores mínimos diários de temperatura tiveram diferença significativa ( $p < 0,01$ ), chegando a alcançar valores próximo de 10 °C na fase II.

TABELA 19. Valores médios e coeficiente de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a operação dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento mesofílico da vinhaça, nas fases I, II, III, IV, V, VI e VII, durante 650 dias de operação.

FASES	I	II	III	IV	V	VI	VII	C.V.	Teste F
COV - MR1	6	9	19	28	33	23	29		
COV - MR2	9	12	24	36	40	37	36		
Máxima	31,9 a	26,9 b	31,2 a	31,6 a	31,6 a	27,3 b	31,0 a	11,0	47,3**
Mínima	17,7 b	14,8 c	17,2 b	19,8 a	19,9 a	13,7 d	17,3 b	14,2	95,2**
Média	24,2 abc	20,3 d	23,6 bc	24,8 ab	24,9 a	19,9 d	23,4 c	10,4	83,2**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \* - Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); ns - não significativo ( $p > 0,05$ ); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

### 5.2.2. pH, alcalinidade e ácidos voláteis

O sistema mesofílico composto pelos reatores UASB em série (MR1 e MR2) no tratamento da vinhaça apresentou estabilidade operacional ao longo da operação dos reatores, como aumento gradual da COV, com valores máximos de 33 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR1 e 40 DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR2. O aumento gradual da COV em sistemas anaeróbios tratando vinhaça foi relatado na literatura (Barros et al., 2016; España-Gamboa et al., 2012; Janke et al., 2016) e isto é importante para a adaptação do lodo de inóculo e estabelecimento da microbiota adequada para a degradação da vinhaça.

Em virtude dos aspectos econômicos, as novas estratégias buscando a redução dos alcalinizantes são importantes (FUSS et al., 2017). Neste trabalho, a alcalinidade foi mantida apenas com a recirculação do efluente do MR2. A capacidade de tamponamento aumentou ao longo da operação dos reatores nos reatores UASB, que pode ser observado através do aumento na AP de 1631 a 4927 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 20) e com consumo satisfatório dos AVT mantendo o pH dentro da faixa considerada ótima, com pH do efluente maiores que os do afluente, variando entre 7,0 e 7,9 no R1 e 7,0 e 8,1 no R2 (Tabela 19).

Os valores de pH, PA e AVT proporcionaram condições adequadas para as arqueias metanogênicas. Os valores de pH e AP foram maiores no segundo reator (MR2) e os valores de AVT, no MR2, foram menores do que no MR1. O uso do

segundo estágio contribuiu para o equilíbrio do sistema em virtude do aumento no consumo de AVT e na produção de alcalinidade bicarbonato pelas arqueias metanogênicas. As maiores concentrações de AP e metano no biogás foram observadas no R2, de 4927 mg L<sup>-1</sup>.

Na fase VI, foram observados os maiores valores da relação AVT/ AT, de 0,85 no R1 e 0,80 no R2, em virtude do aumento das concentrações de AVT devido a queda da temperatura. Foram observados os menores valores de pH, que no início da fase VI foram próximos de 6,0 no MR1 e MR2 (Figura 21). De acordo com Zhao e Viraraghavan (2004), a relação AVT/AT são indicadores importantes da estabilidade do processo e valores acima de 0,8 pode indicar a inibição das arqueias metanogênicas. No entanto, neste estudo, durante a fase mais crítica (fase VI), a utilização de uma taxa de recirculação do efluente mais alta (vinhaça : efluente = 23 : 77 (% vol.)) e de COV mais baixa 23 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR1 (Tabela 20) permitiu a manutenção do pH na faixa ótima e a produção de metano foi mantida em valores mais baixos.

A relação AI/AP é outro indicador importante da estabilidade do processo, e valores de AI/AP abaixo de 0,3 são considerados ótimos para a digestão anaeróbia no tratamento de esgoto sanitário (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986). Contudo, a partir dos resultados observados neste estudo, com a utilização da vinhaça como substrato, foi observada uma estabilidade adequada do processo, mesmo com relação AI/AP de 0,7 (MR1) e 0,4 (MR2), indicada a partir da análise de outros parâmetros pH, AP e AVT/AT.

As concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) no MR1 e no MR2, mesmo com a aplicação de elevadas COV, mantiveram-se estáveis e abaixo de 341 e 344 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Fase I). Os maiores valores foram reportados na fase I - com a utilização do bicarbonato de amônio. Com a utilização da torta de filtro, a partir da fase II, os valores foram inferiores a 228 mg L<sup>-1</sup> no MR1 e 247 mg L<sup>-1</sup> no MR2. O N-am é importante para estabilidade, visto que é nutriente essencial para digestão microbiana, e além disso, é um fator importante para melhora da alcalinidade. As concentrações de N-am reportadas neste trabalho foram próximas das concentrações observadas por España-gamboa et al. (2012), e são consideradas benéficas para a digestão anaeróbia.

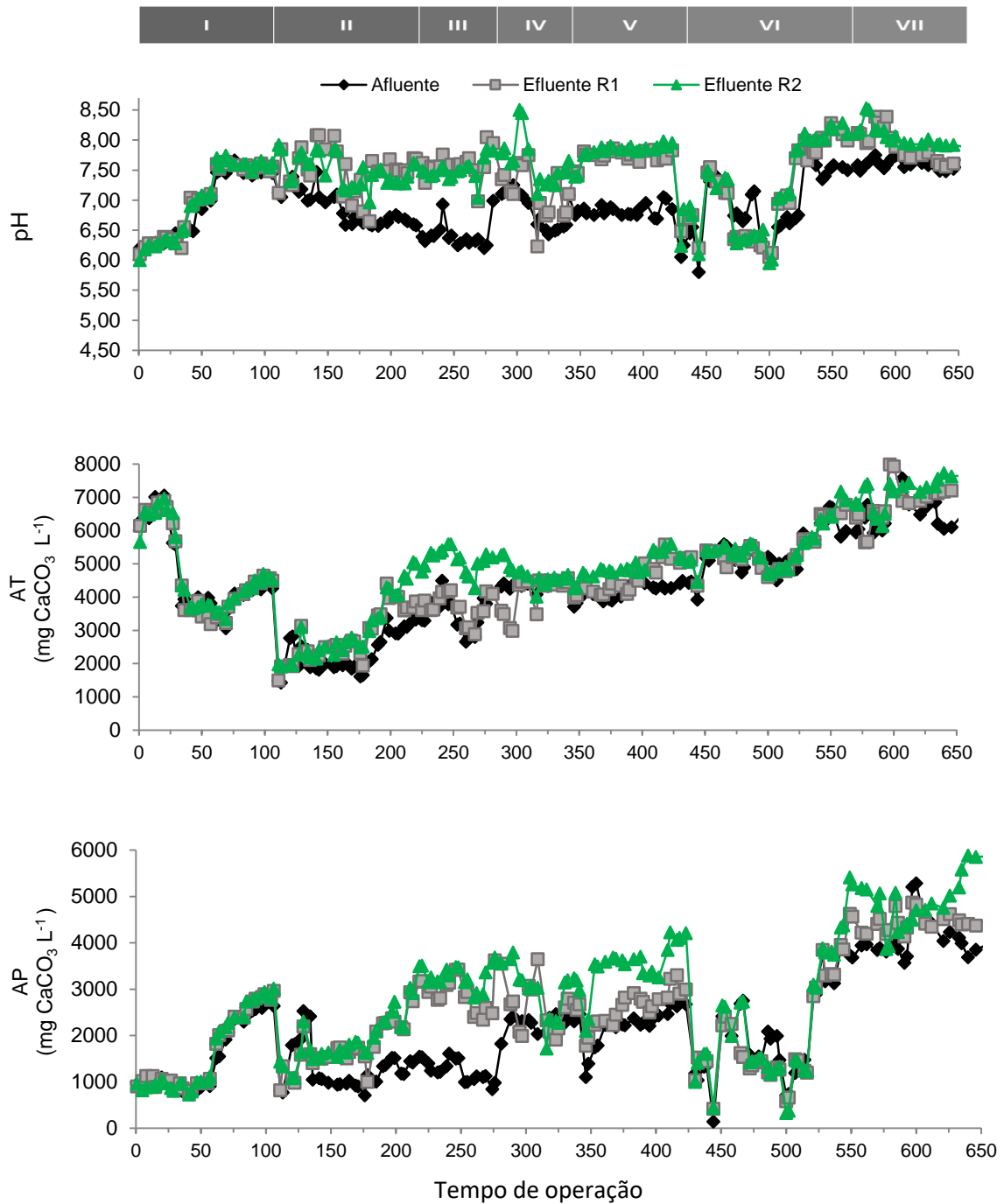


FIGURA 21. Valores de pH, alcalinidade total (AT) parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores UASB mesofílicos em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio da vinhaça.



TABELA 20. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI), no afluente e efluente dos reatores UASB mesofílico em série, MR1 e MR2 no tratamento da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V. (%)	TESTE F
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
Tempo de operação (dias)	1 a110	111 a 220	221 a 280	281 a 340	341 a 430	431 a 560	560 a 650		
COV MR1	6	9	19	28	33	23	29		
COV MR2	9	12	24	36	40	37	36		
Proporção (% vol.) vinhaça : efluente	13:87	12:88	7:93	8:92	12:88	23:77	36:64		
<b>pH</b>									
Afluente	6,9 b	6,9b	6,4 c	6,8 bc	6,9 b	6,9 b	7,6 a	5,5	15,9**
MR1	7,0 d	7,5 bc	7,6 abc	7,1 cd	7,7 ab	7,1 d	7,9 a	6,4	13,6**
MR2	7,0 e	7,5b cd	7,5 bc	7,6 ab	7,8 ab	7,1 ce	8,1 a	6,3	15,6**
<b>Alcalinidade total (AT) (mg L<sup>-1</sup>)</b>									
Afluente	4660 c	2331 e	3512 d	4377c	4164 cd	5264 b	6570 a	16,4	87,6**
MR1	4678 c	2841 e	3710 d	4060 cd	4501 c	5352 b	6833 a	16,6	68,8**
MR2	4754 c	3038 d	5104 bc	4679 c	4897 bc	5431 b	7146 a	15,2	67,3**
<b>Alcalinidade parcial (AP) (mg L<sup>-1</sup>)</b>									
Afluente	1522 c	1285 c	1240 c	2306 b	2222 b	2169 b	4079 a	31,7	49,6**
MR1	1627 d	1856 d	2934 b	2555 bc	2619 bc	2113cd	4454 a	30,2	37,7**
MR2	1631 e	1989 de	3267 b	2958 bc	3505 b	2337 cd	4927 a	31,4	39,5**
<b>Alcalinidade Intermediária (AI)(mg L<sup>-1</sup>)</b>									
Afluente	3138 a	1181 c	2273 b	2071 b	1941 b	3095 a	2491 ab	33,8	22,4**
MR1	3085 ab	1112 d	1910 c	2090 c	1882 c	3239 a	2379 bc	36,9	22,9**
MR2	3123 a	1049 c	1837 bc	1721 bc	1392 bc	3095 a	2219 b	42,1	22,9**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

TABELA 21. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e efluentes, das relações AVT/AT, AI/AP dos efluentes durante a operação dos reatores UASB termofílicos em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V. (%)	TESTE F
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
<b>Tempo de operação (dias)</b>	1 a 110	111 a 220	221 a 280	281 a 340	341 a 430	431 a 560	560 a 650		
<b>COV R1</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>19</b>	<b>28</b>	<b>33</b>	<b>23</b>	<b>29</b>		
<b>COV R2</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>37</b>	<b>36</b>		
<b>N-am (mg L<sup>-1</sup>)</b>									
Afluente	326 a	86 cd	125 bc	99 cd	79 d	113 cd	163 b	30,5	103,3**
MR1	341 a	107 e	228 b	157 cd	107 e	119 de	181 bc	28,3	81,9**
MR2	344 a	120 d	247 b	170 c	115 d	123 d	186 c	27,1	78,7**
<b>AVT (mg L<sup>-1</sup>)</b>									
Afluente	2180 c	1673 d	3240 b	2176 cd	3177 b	4704 a	2916 b	19,8	93,4**
MR1	2006 cd	1439 d	2595 bc	2659 bc	2932 b	4378 a	2806 b	28,9	44,1**
MR2	1935 b	1334 c	2156 b	1664 bc	1229 c	4202 a	2123 b	34,3	54,2**
<b>AVT/AT</b>									
MR1	0,44d	0,51 cd	0,71 ab	0,68 abc	0,66 bc	0,85 a	0,41 d	31,4	19,4**
MR2	0,42bc	0,45 b	0,43 bc	0,36 bcd	0,25 d	0,80 a	0,30 cd	35,7	34,9**
<b>AI/AP</b>									
MR1	2,76a	0,61 b	0,66 b	0,86 b	0,74 b	2,39 a	0,53 b	91,5	15,2**
MR2	2,95a	0,53 b	0,57 b	0,63 b	0,42 b	2,58 a	0,47 b	124,5	11,6**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

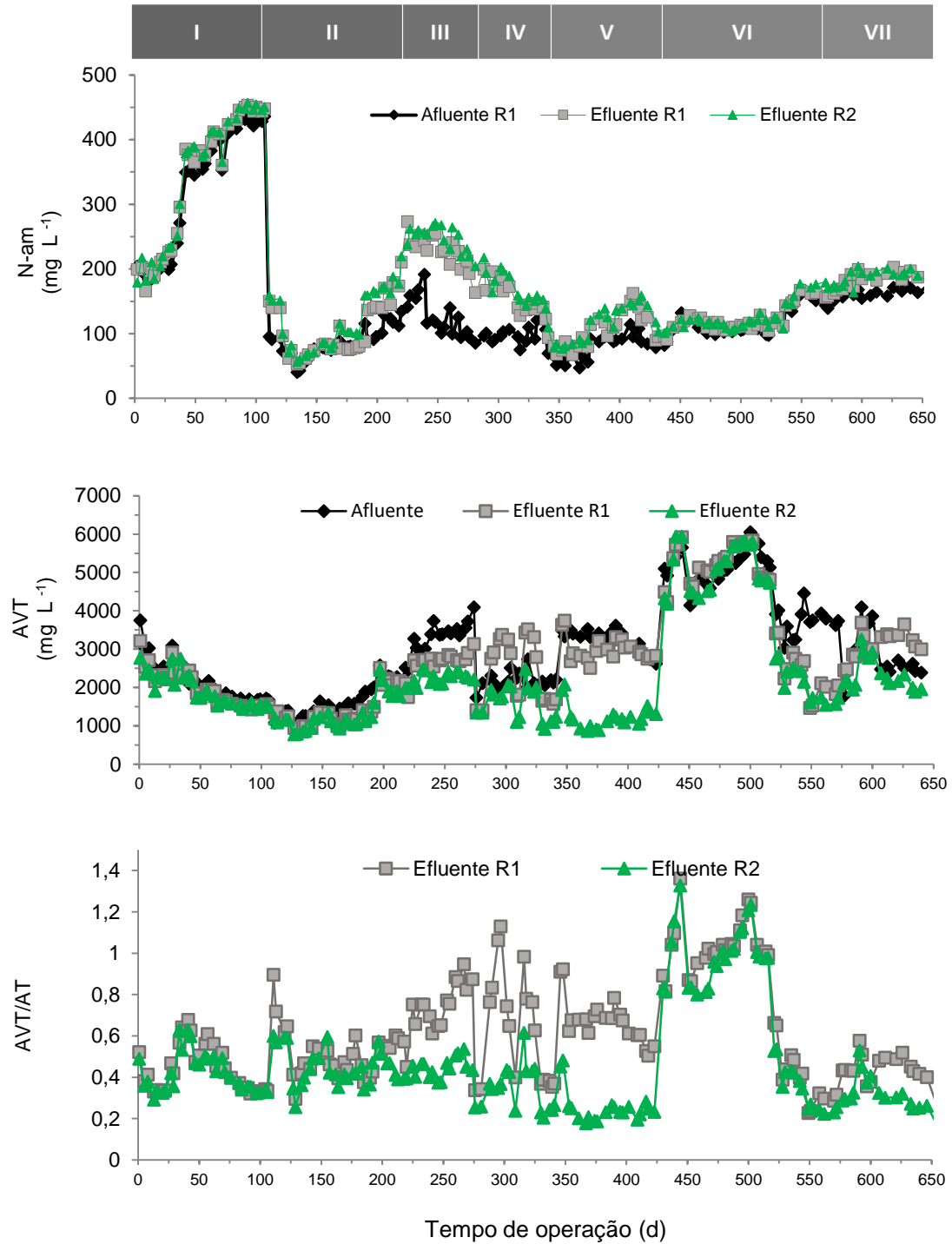


FIGURA 22. Nitrogênio amoniacal ( $N_{am}$ ) e ácidos voláteis totais dos afluentes e relações AVT/AT dos efluentes durante a operação dos reatores UASB mesofílicos em série, MR1 e MR2 no tratamento anaeróbico da vinhaça.

### 5.2.3. Ácidos graxos voláteis

A determinação dos ácidos graxos voláteis (AGV) - acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico (Figura 23) foram realizadas nas fases V, VI e VII, com as maiores COV. A produção de ácidos orgânicos por meio da fermentação acidogênica em reatores anaeróbios pode ser influenciada por diversos fatores, como a natureza e a concentração do substrato, tempo de detenção hidráulica (HRT), carga orgânica volumétrica (COV), temperatura e pH. (BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES; VEIGA, 2017).

Altas proporções de ácido acético foram observadas em ambos os reatores, de 53% a 63% no MR1 e 50% a 58% em MR2, e proporções de ácido propiônico relativamente baixas de 18% a 21% no MR1 e 19% a 22% no MR2. A relação entre propionato/acetato pode ser utilizada como indicadores, cujo índice abaixo de 1,4 indica um equilíbrio do processo (AHRING; SANDBERG; ANGELIDAKI, 1995). Neste trabalho, foram obtidas relações abaixo de 0,44 (R1) e 0,38 (R2) com as COV mais elevadas, indicando equilíbrio aceitável de ácidos nos reatores.

Os elementos traços têm sido destacados como essenciais, a exigência de elementos traços tem sido extremamente baixa, porém a deficiência pode fazer com que as enzimas e coenzimas necessárias para o metabolismo não sejam devidamente sintetizadas (THANH et al., 2016). Segundo Schmidt et al. (2014), a deficiência de Fe e Ni durante a digestão anaeróbia da vinhaça pode resultar em uma rápida acumulação de ácidos voláteis e influenciar a atividade dos micro-organismos metanogênicos e das bactérias que oxidam o propionato. Espinosa et al. (1995), avaliando o aumento da COV de 5,0 até 21,5 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> em um reator UASB utilizando vinhaça de melaço, observaram que a adição de Fe (100 mg L<sup>-1</sup>), Ni (15 mg L<sup>-1</sup>), Co (10 mg L<sup>-1</sup>) e Mo (0,2 mg L<sup>-1</sup>) reduziu o nível de ácido acético e ácido propiônico. Neste estudo, o equilíbrio nas concentrações de ácidos foi devido à adição de torta de filtro, que contribuiu com os nutrientes necessários para manter baixos valores de ácido propiônico.

As maiores concentrações de AGV foram observadas na fase VI devido à queda da temperatura e as maiores concentrações foram de ácido acético. A temperatura influencia consideravelmente o crescimento e a sobrevivência de micro-organismos. Embora o tratamento anaeróbico seja possível nas faixas de temperatura

(psicrofílica, mesofílica e termofílica), a baixa temperatura geralmente leva a uma diminuição da taxa máxima de crescimento específico e da atividade metanogênicas (RIZVI et al., 2014).

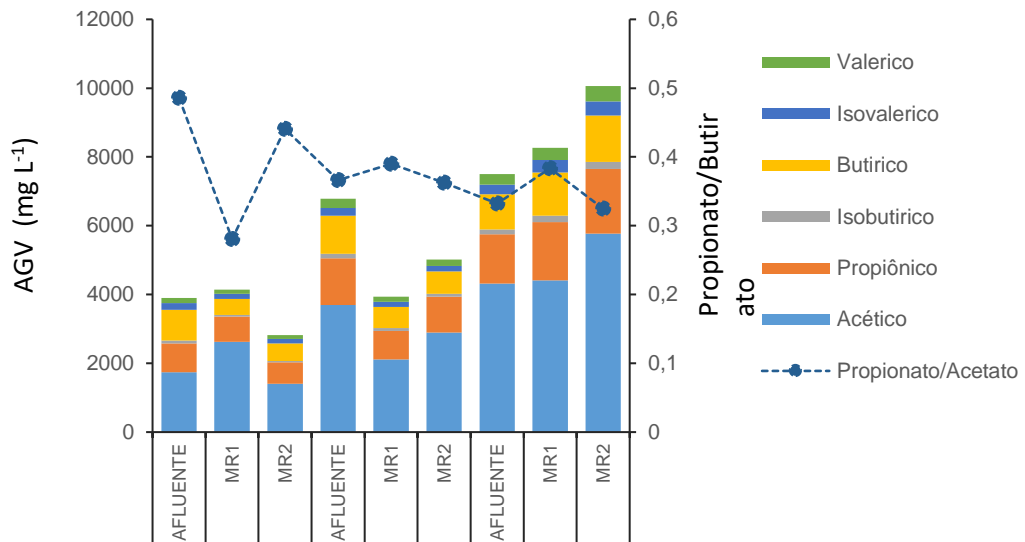


FIGURA 23. Valores das concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV) e da relação propionato/acetato no afluente e efluentes dos reatores UASB, MR1 e MR2 no tratamento anaeróbico da vinhaça sobre condições mesofílicas.

#### 5.2.4. Produção de metano e demanda química de oxigênio total

A produção de metano e a eficiência de remoção de DQO aumentaram com o aumento da COV em ambos os reatores. O melhor desempenho do processo ocorreu durante a fase V, com COV e temperatura mais elevadas, com média de aproximadamente 24,9 °C e mínima de 19,9 °C. A produção volumétrica de metano (VMP) média foi de 2,1 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no MR1 e 1,2 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no MR2, com eficiência de remoção de DQO de 40% no MR1 e 66% em MR2; correspondendo à produção específica de metano de 0,20 e 0,26 L CH<sub>4</sub> (g DQO removida)<sup>-1</sup> no MR1 e MR2, respectivamente (Tabelas 22 e 23).

TABELA 22. Produção volumétrica de metano, concentração de metano no biogás e produção específica de metano nos reatores UASB em séries no R1 e R2, no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V. (%)	TESTE F
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
Período (dias)	1 a 110	111 a 220	221 a 280	281 a 340	341 a 430	431 a 560	560 a 650		
COV R1	6	9	19	28	33	23	29		
COV R	9	12	24	36	40	37	36		
Valores médios de temperatura (°C)									
Média	24,2abc	20,3 d	23,6 bc	24,8 ab	24,9 a	19,9 d	23,4c	10,4	83,2**
Mínima	17,7b	14,8 c	17,2 b	19,8 a	19,9 a	13,7d	17,3 b	14,2	95,2**
Produção Volumétrica de metano (LCH <sub>4</sub> (L d) <sup>-1</sup> )									
R1	0,10 g	0,42 f	1,14 d	1,90 b	2,12 a	0,80 e	1,49 c	28,5	622,2**
R2	0,05 e	0,12 e	0,43 d	1,34 a	1,22 b	0,41 d	0,83 c	34,5	618,4**
R1+R2	0,08 f	0,31 e	0,89 c	1,70 a	1,80 a	0,66 d	1,26 b	27,4	730,9**
Produção específica de metano (LCH <sub>4</sub> (g DQOremovida) <sup>-1</sup> )									
R1	0,07 d	0,16 bc	0,18 ab	0,20 a	0,16 bc	0,17 bc	0,15 c	40,3	43,1**
R2	0,11 e	0,17 de	0,26 ab	0,29 a	0,19 bcd	0,25 abc	0,16 de	87,7	11,9**
R1+R2	0,07 e	0,13 cd	0,17 ab	0,19 a	0,14 bcd	0,16 bc	0,12 d	44,6	38,4**
Concentração de metano no biogás (%)									
R1	44,8 e	58,6 c	53,2 d	64,3 b	64,8 b	69,3 a	62,5 b	10,5	183,8**
R2	58,1 c	63,6 b	57,2 c	72,1a	74,9 a	73,0 a	70,9 a	13,1	61,4**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

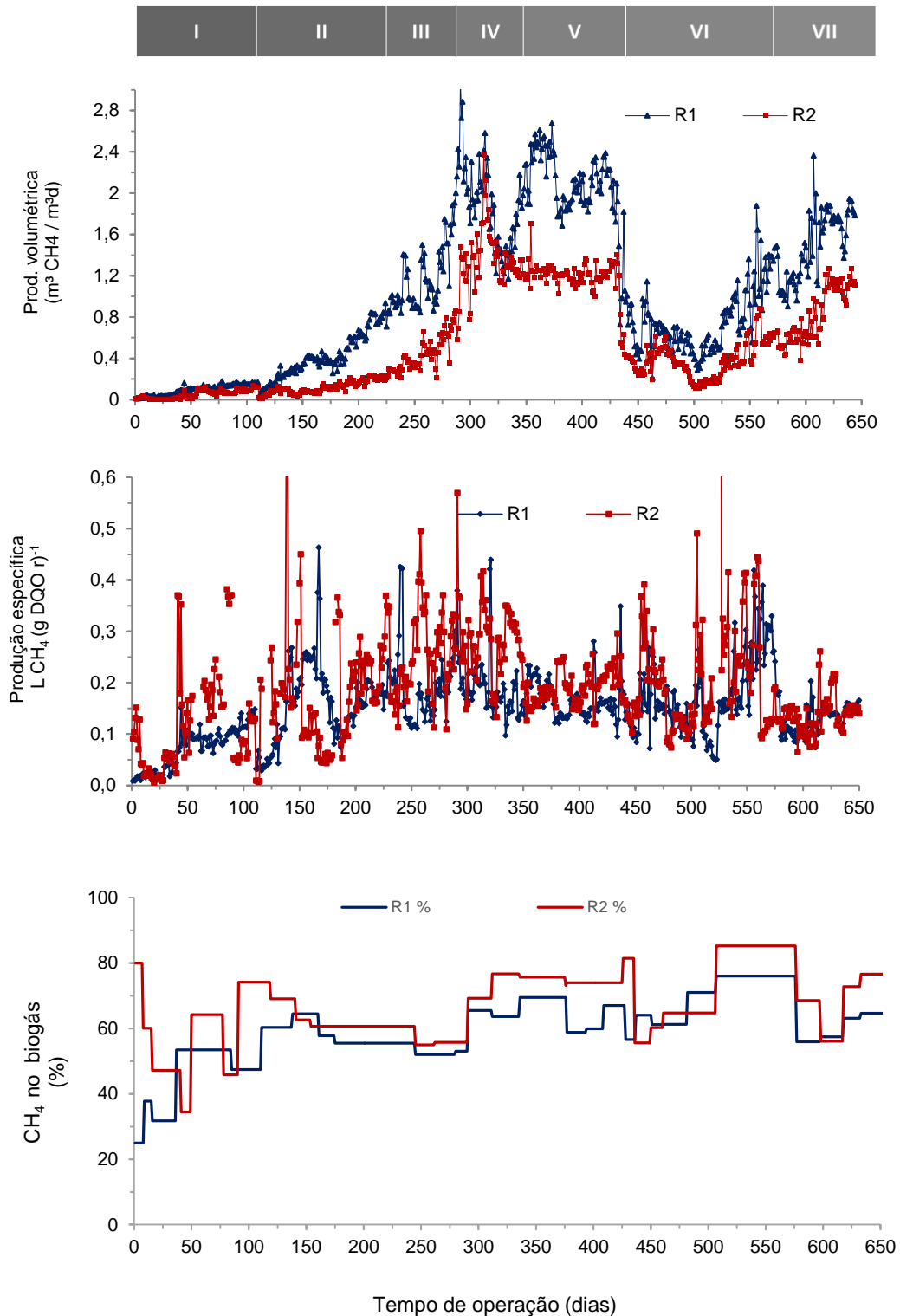


FIGURA 24. Produção volumétrica de metano, produção específica de metano e concentração de metano no biogás nos reatores UASB em séries no R1 e R2 no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.

TABELA 23. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da carga orgânica volumétrica (COV), proporção da vinhaça e efluente MR2 (% vol.), DQOtotal no afluente (mg L<sup>-1</sup>) e efluente e eficiência de remoção de DQOtotal (%) durante a operação dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V. (%)	TESTE F
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
<b>Tempo de operação (dias)</b>	1 a 110	111 a 220	221 a 280	281 a 340	341 a 430	431 a 560	560 a 650		
<b>COV MR1</b>	6	9	19	28	33	23	29		
<b>COV MR2</b>	9	12	24	36	40	37	36		
<b>Proporção (% vol.) Vinhaça:efluente R2</b>	7:93	8:92	23:77	37:63	45:55	18:82	42:58		
<b>DQO</b>									
Afluente	6188 f	9234 e	18787 d	27748 b	32786 a	23432 c	29345 b	12,9	417,0**
MR1	4715 d	6166 c	11946 b	18164 a	19801 a	18622 a	18147 a	13,6	335,2**
MR2	4202 e	5710 d	10299 c	13478 b	13071 b	16756 a	12123 b	15,7	217,1**
<b>Eficiência de remoção de DQO</b>									
MR1	24 c	33 b	36 ab	35 ab	40 a	20 c	38 ab	20,9	34,6**
MR2	11 c	9 c	14 c	26 b	34 a	13 c	33 ab	39,2	46,1**
MR1+MR2	32 ef	38 de	45 cd	51 bc	60 a	28 f	58 ab	18,6	64,5**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>.



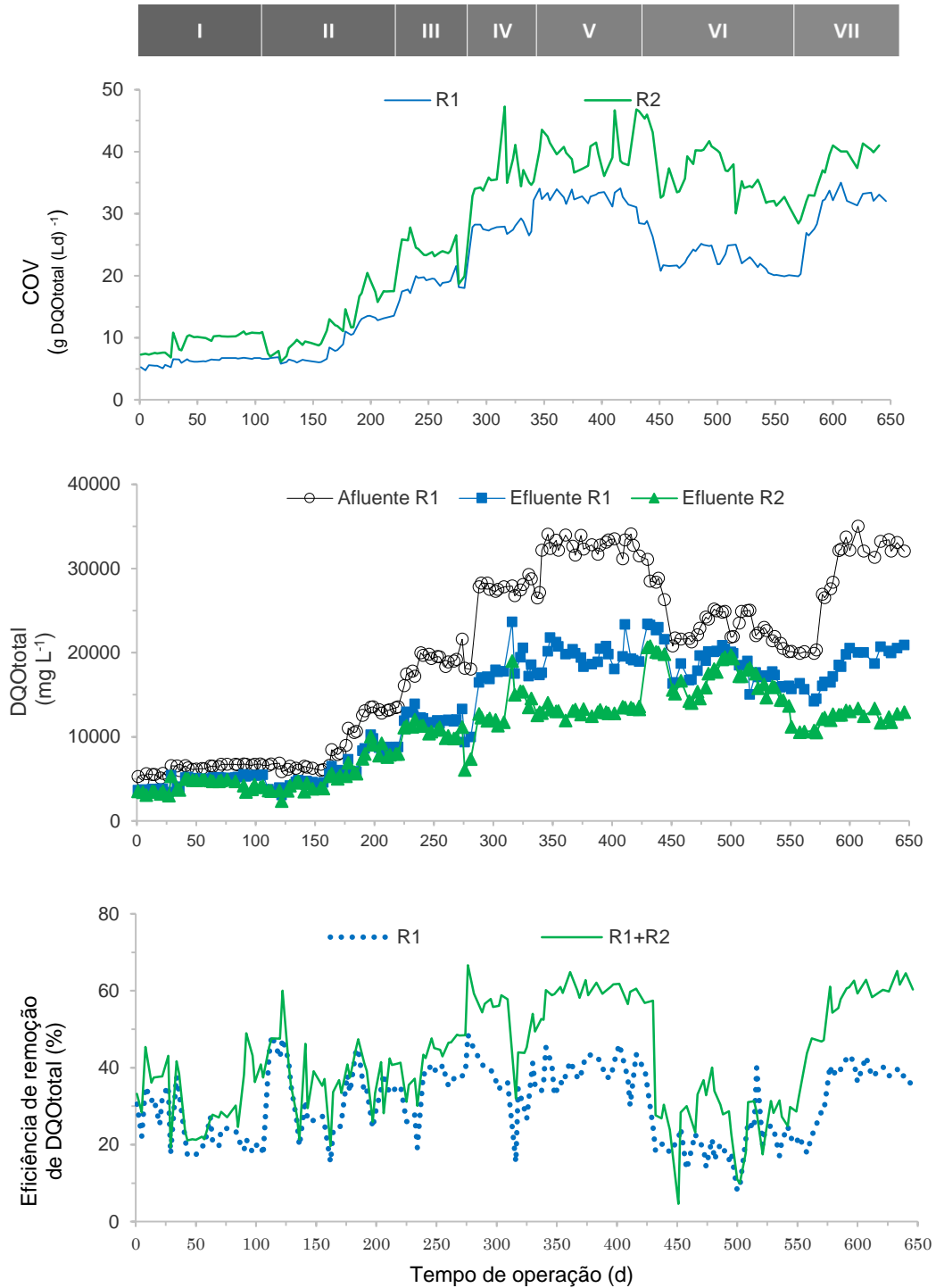


FIGURA 25. Valores de carga orgânica volumétrica (COV), DQOtotal no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQOtotal durante a operação dos reatores UASB mesofílicos em série, MR1 e MR2 no tratamento anaeróbio da vinhaça.

Neste estudo, foram obtidos COV e produção volumétrica de metano superiores a outros estudos, tratando vinhaça em reator UASB em condições mesofílicas (Barros et al., 2016; España-Gamboa et al., 2012; Janke et al., 2016). No entanto, isto foi possível devido as condições satisfatórias para a conversão anaeróbia da vinhaça em metano, em virtude da utilização da torta de filtro, recirculação do efluente e da configuração dos reatores UASB em série (MR1+MR2). Segundo Camarillo e Rincón (2012), os reatores em série podem prevenir sobrecargas orgânicas e ácidas, atenuar o efeito inibitório de compostos tóxicos, promovendo a estabilidade e o controle do processo (DEMIREL; SCHERER, 2011), permitindo aplicação de COV elevadas, maior produção de energia e enriquecimento de micro-organismos específicos em reatores separados (ZHONG; STEVENS; HANSEN, 2015).

Meng et al. (2017) avaliando o desempenho em dois sistemas mesofílicos (35 °C) compostos por reatores de leito-fixo (um sistema de estágio único e um sistema de dois estágios) concluíram que o sistema de dois estágios teve maior eficiência de remoção de DQO. A DQO remanescente no efluente após tratamento em sistema anaeróbio com dois estágios foi duas vezes menor do que após o tratamento em sistema anaeróbio com estágio único.

#### **5.2.4.1. Efeito da variação da temperatura**

Os valores médios da temperatura diária, máximo, médio e mínimo foram monitorados e a produção de metano foram correlacionados nas fases V, VI e VII (Tabela 22). Foi observado uma correlação positiva moderada entre produção de metano e temperatura média, com coeficiente de Pearson de 0,70 no MR1 e 0,63 no MR2, e forte correlação com a temperatura mínima, coeficiente de Pearson de 0,73 no MR1 e 0,73 no MR2 (Figura 26)

Após 430 dias (Fase VI), quando a temperatura diminuiu bruscamente, a produção volumétrica também diminuiu acentuadamente em ambos os reatores, de 2,12 para 0,80 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no MR1 e de 1,22 para 0,41 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> no MR2. Durante a fase VI, estação de inverno, a temperatura se manteve baixa, com valores médios de 19,9 ° C para a temperatura diária média e 13,7 ° C para temperatura diária mínima.

Após 560 dias (início da fase VII), o sistema apresentou uma recuperação progressiva com o aumento da temperatura, e conseguiu readquirir o bom desempenho, que pode ser observado através dos valores de produção de metano e remoção de DQO (próximos aos maiores obtidos) alcançados no final da operação (Figura 25).

O efeito da variação da temperatura em reatores UASB mesofílicos tratando esgoto doméstico têm sido reportados na literatura, com valores de temperaturas de 17, 20, 25, 30 e 38 ° C (RIZVI et al., 2014) e de 35 e 15 ° C (DOLEJS et al., 2017). De acordo com Rizvi et al. (2014), o aumento da temperatura melhorou o desempenho dos reatores UASB alcançando a maior eficiência de remoção de DQO de 82% com temperatura de 38 °C, e o menor desempenho do sistema anaeróbio foi observado com a temperatura de 17°C.

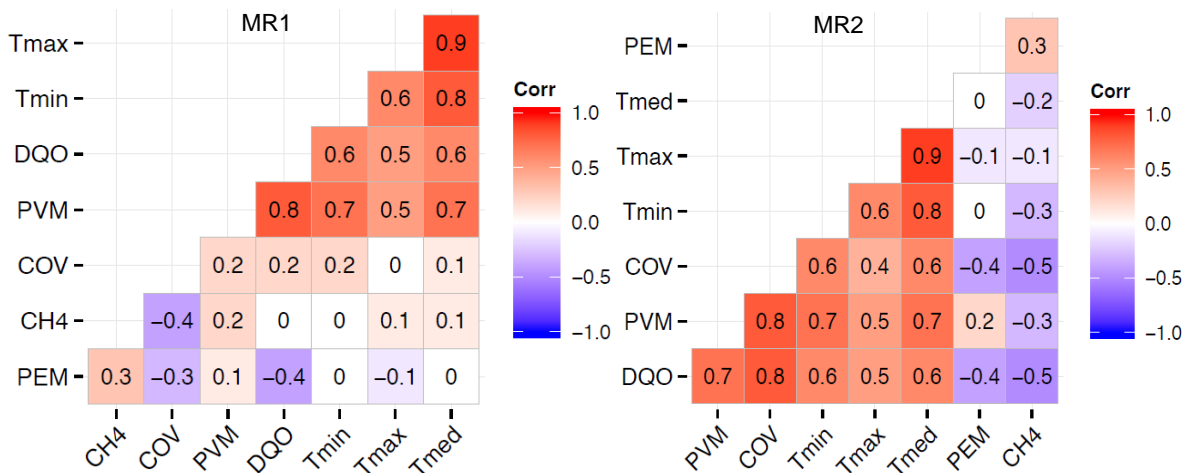


FIGURA 26. Matriz de correlação de algumas variáveis críticas relacionadas à produção de metano e remoção de DQO e seu respectivo coeficiente de Pearson durante as fases IV a VII, período entre 280 a 650 dias. As correlações com  $p > 0,01$ , (representadas pelos quadrados brancos) são consideradas não significativas. Tmax: temperatura máxima; Tmin: temperatura mínima; Tmed: temperatura média; DQO: demanda química de oxigênio; PVM: Produção volumétrica de metano; COV: carga orgânica volumétrica; CH4: concentração metano no biogás; PEM: produção específica de metano.

### 5.2.5. Macronutrientes e micronutrientes

A suplementação de nitrogênio e fósforo tem sido observada no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar, estudos recentes recorreram-se ao uso compostos químicos como a ureia e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; JANKE et al., 2016a). No entanto, neste estudo a suplementação destes nutrientes através de compostos químicos foi realizada apenas durante a fase I.

Na fase I, os valores de NK e P-total no afluente foram de  $503 \text{ mg L}^{-1}$  e  $42 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. A partir da fase II, com a utilização da torta de filtro, os valores de NK e P-total no afluente variaram de  $208 \text{ mg L}^{-1}$  a  $497 \text{ mg L}^{-1}$  e de 18 a  $71 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. As eficiências de remoção de NK e P-total nos reatores em série (MR1 +MR2) variaram de 11 a 31% e de 16 a 51%. As relações DQO:N:P no afluente variaram de 350:5,2:2,1 a 350:8,8:3. Portanto, esses valores estão em quantidades suficientes para que sejam atendidas as necessidades dos microrganismos na fermentação metanogênicas.

Segundo Ma et al. (2009) a suplementação de macro e micronutrientes estimula o desempenho dos reatores anaeróbio, em termos de maiores COV aplicadas, melhor qualidade do efluente e maiores taxas de produção de biogás. Barros (2013) avaliou a conversão anaeróbia da vinhaça (proveniente da mesma indústria) em reatores UASB sob condições mesofílicas alcançou a com COV máxima de  $11,5 \text{ g DQOtotal (L d)}^{-1}$ , com concentrações máximas de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu no afluente de 11,8; 14,9; 4,4; 2,7; 1,06 e  $0,22 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente. Neste estudo, as concentrações médias de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu no afluente do MR1 e no efluente do MR2 foram de até 11,1; 11,2; 48,4; 8,1; 42,5 e  $11,8 \text{ mg L}^{-1}$  e de 10,6; 10,9; 34,4; 9,1; 29,0 e  $8,4 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 24).

TABELA 24. Concentrações (mg L<sup>-1</sup>) e eficiência de remoção (%) de macro nutrientes NK, P-total e K e eficiência de remoção (%), no afluente e efluente dos reatores UASB em série (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							c.v.	Teste F
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
COV MR1	6	9	19	28	33	23	29		
COV MR2	9	12	24	36	40	37	36		
<b>Relação DQO :N e DQO:P</b>									
350:N (Afluente)	27,3 a	8,8b	7,4bc	6,1bc	5,2c	6,9bc	5,7bc	24,6	114,7**
350:P (Afluente)	2,4	3,4	2,1	2,3	2,1	2,6	2,1	44,1	2,0ns
<b>Nitrogênio (NK)</b>									
Afluente	503 a	208 c	393 b	448ab	481 ab	456 ab	497 a	15,4	26,6**
MR1	482 a	167 c	324 b	367b	387 b	385 b	389 b	17,9	22,8**
MR2	460 a	145 c	331 b	328b	370 ab	345 b	340 b	21,9	18,7**
Eficiência	11 b	32 b	15 ab	27ab	23 ab	24 ab	31 a	52,5	4,2**
<b>Fósforo Total (P<sub>total</sub>)</b>									
Afluente	42 c	79 bc	110 b	166 a	199 a	173 a	183 a	22,9	43,4**
MR1	50 d	60 cd	104 bc	148 ab	159 a	129 ab	97 bc	34,0	15,8**
MR2	47 c	50 c	113 ab	137 a	151 a	116 ab	90 b	29,9	21,6**
Eficiência	33 abc	44 ab	16 c	21 c	25 bc	36 abc	51 a	40,6	5,7**
<b>Potássio (K)</b>									
Afluente	10	23	71	68	50	63	128	-	-
MR1	8	23	77	62	55	60	116	-	-
MR2	11	25	71	77	56	63	126	-	-

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

TABELA 25. Valores médios dos macronutrientes e micronutrientes (mg L<sup>-1</sup>) e coeficiente de variação (em %) do afluente e efluente dos reatores UASB em série mesofílicos (MR1 e MR2) no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES														
	I		II		III		IV		V		VI		VII		
<b>COV MR1</b>	<b>6</b>		<b>9</b>		<b>19</b>		<b>28</b>		<b>33</b>		<b>23</b>				
<b>COV MR2</b>	<b>9</b>		<b>12</b>		<b>24</b>		<b>36</b>		<b>40</b>		<b>37</b>				
		<b>c.v.</b>		<b>c.v.</b>		<b>c.v.</b>		<b>c.v.</b>		<b>c.v.</b>		<b>c.v.</b>		<b>c.v.</b>	
<b>Ca</b>	<b>Afluente</b>	3,6	55	5,8	31	10,4	32	11,1	19	8,8	24	7,8	52	10,5	40
	<b>MR1</b>	4,5	55	5,8	26	11,4	14	10,9	5	8,0	29	8,1	41	11,4	50
	<b>MR2</b>	5,6	46	5,0	19	10,5	14	10,6	15	7,1	23	7,0	65	8,8	18
<b>Mg</b>	<b>Afluente</b>	4,4	61	4,3	35	6,7	13	9,0	53	10,7	13	11,2	28	27	30
	<b>MR1</b>	4,7	36	4,2	36	6,2	7	9,6	28	10,1	19	11,2	16	23	42
	<b>MR2</b>	5,4	46	4,4	35	6,1	4	10,9	40	8,9	17	10,3	43	26	23
<b>Fe</b>	<b>Afluente</b>	5,2	62	12,8	58	31,5	21	26,5	34	48,4	33	34,8	29	35,4	31
	<b>MR1</b>	5,5	52	8,0	68	19,4	11	39,4	27	35,0	29	33,8	33	33,1	36
	<b>MR2</b>	4,0	63	6,5	85	18,3	14	33,1	45	29,4	21	27,5	47	34,4	12
<b>Mn</b>	<b>Afluente</b>	2,7	159	5,1	32	7,7	7	8,1	41	6,7	55	8,1	32	5,9	25
	<b>MR1</b>	2,1	70	4,7	32	6,0	16	6,2	49	4,9	24	7,6	26	6,9	46
	<b>MR2</b>	3,5	10	4,3	24	5,4	12	9,1	24	5,0	25	7,1	45	5,1	29
<b>Zn</b>	<b>Afluente</b>	0,9	77	40,7	125	3,6	2	9,0	23	8,1	49	42,5	86	8,0	70
	<b>MR1</b>	1,0	114	38,2	122	3,6	2	5,0	22	8,1	52	30,0	133	7,7	51
	<b>MR2</b>	1,5	108	39,2	110	3,5	1	5,2	24	6,7	34	29,0	132	7,2	56
<b>Cu</b>	<b>Afluente</b>	0,1	101	4,7	45	11,8	65	2,5	21	3,6	59	4,3	46	4,3	48
	<b>MR1</b>	0,1	147	3,9	42	6,7	37	2,1	35	3,1	30	4,4	25	4,4	36
	<b>MR2</b>	0,1	219	3,9	27	7,1	35	3,4	35	3,2	21	4,2	31	4,1	39

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

Em relação a outros estudos utilizando vinhaça (BARROS, 2013; SANTANA JR, 2013), neste estudo foram obtidos maiores valores de micronutrientes, indicando que a utilização da torta de filtro aumentou as concentrações, principalmente, de Fe, Mn e Zn, porém o aumento das concentrações de Fe foi o mais acentuado. De acordo com Singh et al. (1999), Fe, Mn e Zn estão entre os oligoelementos necessários para a síntese de vários micro-organismos anaeróbios, uma vez que esses elementos são cofatores enzimáticos para várias enzimas.

#### **5.2.6. Sólidos totais e sólidos voláteis**

Os valores de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) nos lodos dos reatores UASB, MR1 e MR2, aumentaram com o aumento gradual da COV (Figuras 27 e 28 ), indicando que houve crescimento na manta de lodo dos reatores. No MR1, as maiores concentrações de SV foram de 188,5 g L<sup>-1</sup> no (P1), e de 31,9 g L<sup>-1</sup> (P2)

Ao longo da altura do reator MR1, as maiores concentrações de SV foram observadas nos pontos inferiores (P1 e P2), com valores de 92,1 g L<sup>-1</sup> e 32,9 g L<sup>-1</sup>, na Fase V. As menores concentrações foram nos pontos P3 e P4, pontos intermediários de coleta de lodo. No MR2, os maiores valores de SV foram observados no ponto inferior P1 (33,0 g L<sup>-1</sup>) e no ponto superior P8 (36,1 mg L<sup>-1</sup>).

De acordo com a Legislação Brasileira, o lodo de esgoto ou produto derivado é considerado estável para uso agrícola se SV / ST inferiores a 0,70 (Resolução N°- 375 do CONAMA, 2005) (Tabela 27). Isso evita altas concentrações de matéria orgânica no solo e atividade microbiana (VILLA-MONTOYA; FERRO; DE OLIVEIRA, 2016). Com base nessa resolução, o lodo de todos os pontos dos reatores MR1 e MR2 é considerado estável. Porém, caso haja necessidade de descarte, deve ser efetuado a partir dos pontos com menores relações SV/ST, mantendo nos reatores a maior quantidade de material orgânico e de micro-organismos, resultando em maior atividade (OLIVEIRA, 1997).

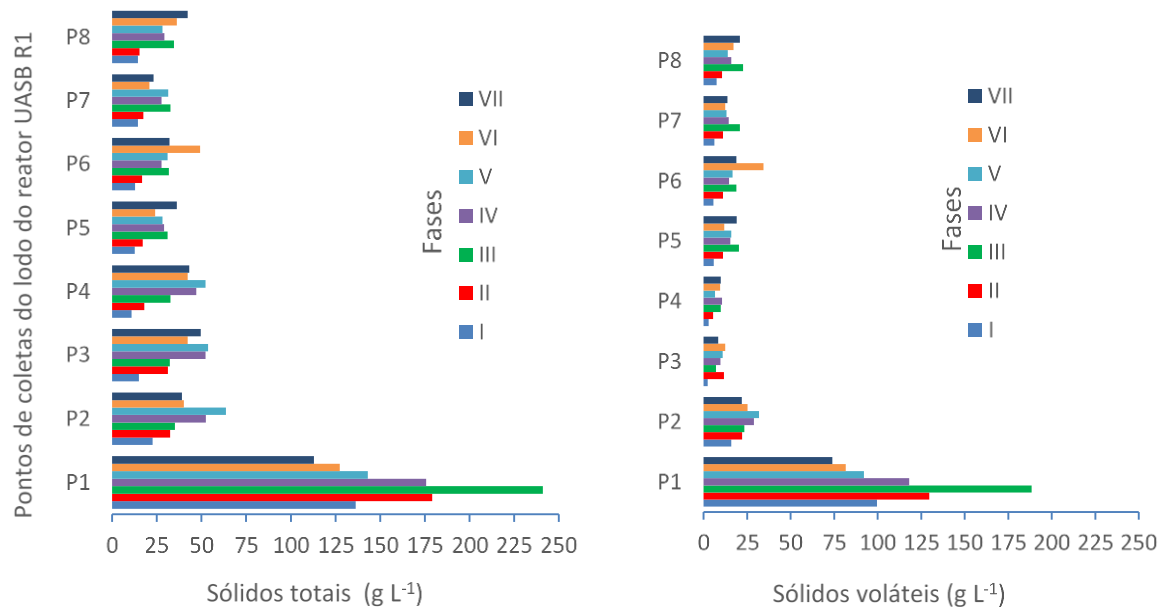


FIGURA 27. Concentrações de sólidos totais (ST) e de sólidos voláteis (SV), nos 8 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4 P5 P6, P7 e P8 dos reatores UASB em série, MR1, no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.

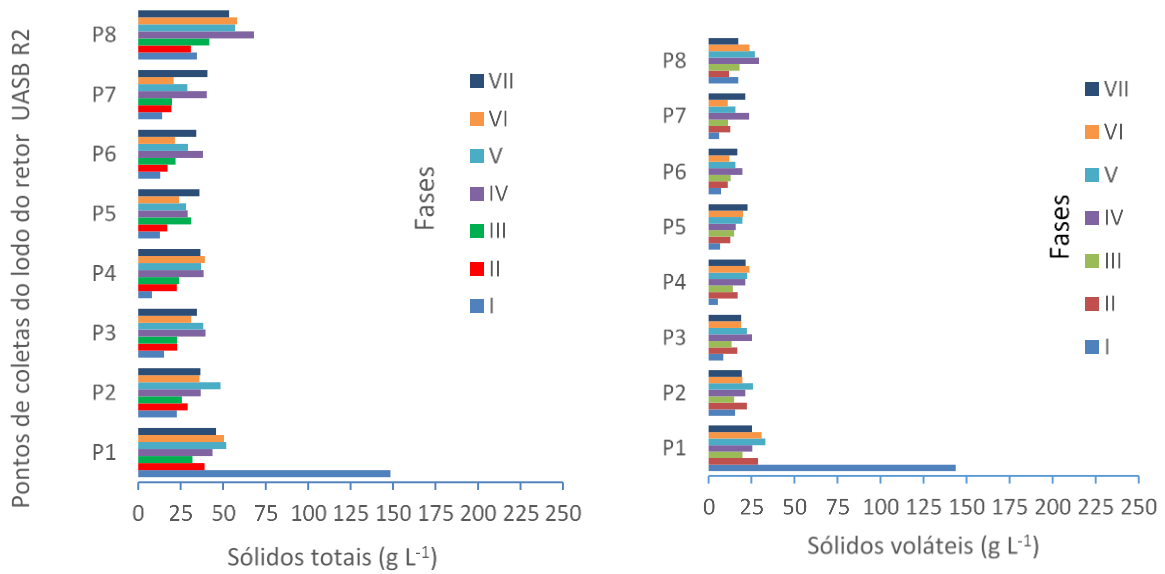


FIGURA 28. Concentrações de sólidos totais (ST) e de sólidos voláteis (SV), nos 8 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4 P5 P6, P7 e P8 dos reatores UASB em série, MR2, no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.



TABELA 26. Concentrações de sólidos totais (g L<sup>-1</sup>)(ST), voláteis (SV), fixos (SF) e reação SV e ST, nos 8 pontos de coletas de lodo do reator UASB MR1 no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V.	Teste F	
	I	II	III	IV	V	VI	VII			
COV MR1	6	9	19	28	33	23	29			
P1	ST	136,3 ab	179,2 ab	241,0 a	175,8 ab	143,1 ab	127,3 b	113,0 b	23,0	3,7*
	SV	99,7 ab	129,7 ab	188,5 a	118,2 ab	92,1 b	81,7 b	74, b	24,5	4,3**
	SF	36,6	49,5	52,4	57,6	50,0	45,5	39,0	24,5	1,1 <sup>ns</sup>
P2	ST	22,7 b	32,5 ab	35,2 ab	52,4 ab	63,6 a	40,2 ab	39,1 ab	34,1	3,1*
	SV	15,9	22,2	23,4	28,9	31,9	25,3	21,9	34,3	1,3 <sup>ns</sup>
	SF	6,8 b	10,2 b	11,8 b	23,5 ab	31,7 a	14,9	17,2 ab	39,4	5,7**
P3	ST	14,9 b	31,2 ab	32,2 ab	52,3 ab	53,7 a	42,2 ab	49,6 ab	33,3	3,5*
	SV	2,3	11,7	7,1	9,7	10,9	12,4	8,4	69,1	0,92 <sup>ns</sup>
	SF	12,6 c	19,5 bc	25,1 abc	42,6 ab	42,9 a	29,8 abc	41,1 ab	29,2	5,9**
P4	ST	10,9 d	18,0 d	32,7 bc	47,1 ab	52,2 a	42,3 ab	43,2 ab	16,4	24,4**
	SV	3,0	5,5	9,8	10,6	6,5	9,6	9,8	41,1	2,5 <sup>ns</sup>
	SF	7,8 d	12,5 cd	22,9 bc	36,5 ab	45,7 a	32,7 b	33,4 ab	17,6	26,8**
P5	ST	12,7 f	17,1 cef	31,1 ab	29,0 abc	28,1 abcd	24,0 bcde	36,2a	17,2	11,3**
	SV	5,8 c	11,2 bc	20,3 a	15,4 abc	16,0 ab	11,9 abc	19,0 ab	22,5	7,3**
	SF	6,8 c	5,9c	10,8 bc	13,6 ab	12,1 b	12,1 b	17,1a	17,3	13,6**
P6	ST	12,8 b	16,8 b	31,8 ab	27,6 ab	31,0 ab	49,2 a	32,1 ab	25,6	9,3**
	SV	5,7 b	11,2 b	18,9 ab	14,6 b	16,7 b	34,5 a	18,8 ab	38,0	6,5**
	SF	7,1 bc	5,6 c	12,9 ab	13,0 ab	14,3 a	14,7 a	13,2 a	19,4	9,8**
P7	ST	14,4	17,4	32,7	27,6	31,4	20,9	23,2	33,2	2,4 <sup>ns</sup>
	SV	6,2 b	110,1 b	20,8 a	14,4 ab	13,2 ab	12,5 ab	13,8 ab	23,6	5,2**
	SF	8,2	6,4	11,4	13,2	18,3	8,5	9,4	57,3	1,6 <sup>ns</sup>
P8	ST	14,4 b	15,4 b	34,5 a	29,3 ab	28,2 ab	36,2 a	42,3 a	21,3	10,2**
	SV	7,5 b	10,6 b	22,7 a	15,9 ab	14,0 ab	17,3 ab	20,8 a	25,9	5,4 **
	SF	6,9 bc	4,9 c	11,9 abc	13,4 abc	14,2 ab	19,0 a	21,5 a	25,3	11,4**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

TABELA 27. Concentrações de sólidos totais (g L<sup>-1</sup>)(ST), voláteis (SV), fixos (SF), nos 8 pontos de coletas de lodo do reator UASB MR2 no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V.	Teste F	
	I	II	III	IV	V	VI	VII			
COV MR1	6	9	19	28	33	23	29			
P1	ST	148,5 a	39,0 b	31,9 b	43,8 b	51,7 b	50,4 b	45,8 b	19,5	35,9**
	SV	143,7 a	28,8 b	19,8 b	25,5 b	33,0 b	30,9 b	25,3 b	23,0	56,7**
	SF	4,8 c	10,1 c	12,1 bc	18,2 ab	18,7 ab	19,5 a	20,6 a	16,6	18,2**
P2	ST	22,7 b	29,0 b	25,7 b	36,8 ab	48,4 a	36,0 ab	36,6 ab	19,0	5,9**
	SV	15,4	22,4	14,9	21,4	25,9	19,8	19,3	22,8	2,1ns
	SF	7,3 c	6,5 c	10,8 bc	15,4 abc	22,5 a	16,1 ab	17,3 ab	23,9	10,9**
P3	ST	15,1 d	22,8 cd	22,9 acd	39,5 a	38,2 ab	31,2 abc	34,6 abc	17,5	9,4**
	SV	8,7 c	16,7 ab	13,5 bc	25,2 a	22,3 ab	18,9 ab	19,0 ab	17,1	8,8**
	SF	6,4 b	6,2 b	9,5 ab	14,3 ab	15,8 a	12,3 ab	15,6	25,3	6,8**
P4	ST	8,0 c	22,6 b	24,0 b	38,4 a	37,0 a	39,3 a	36,5 a	10,9	40,2**
	SV	5,5 c	16,9 ab	14,1 bc	21,4 ab	22,6 ab	23,8 a	21,5 ab	16,5	14,1**
	SF	2,9 d	5,8 cd	9,9 bc	17,0 a	14,4 ab	15,5 a	15,0 a	14,7	34,6**
P5	ST	12,7 f	17,1 cef	31,1 ab	29,0 abc	28,1 abcd	24,0bcde	36,1 a	17,2	11,3**
	SV	6,7 b	12,6 b	14,9 ab	15,8 ab	19,8 a	20,1 a	22,7 a	18,4	10,5**
	SF	4,2 c	5,0 c	9,6 bc	12,9 abc	13,6 ab	13,3 ab	19,5 a	28,3	9,5**
P6	ST	13,0 d	17,3 cd	21,9 abcd	38,0 a	29,2 abc	21,6 bcd	34,1 ab	21,6	8,4**
	SV	7,4 b	11,3 ab	12,8 ab	19,8 a	15,7 a	12,1 ab	16,7 a	23,4	4,6**
	SF	5,6 c	6,0 c	9,2 bc	18,2 a	13,6 bc	9,5 bc	17,4 a	24,2	10,8**
P7	ST	14,0 d	19,5 cd	19,8 cd	40,4 ab	28,8 bc	20,8 cd	40,7 a	16,6	17,4**
	SV	6,2 c	12,7 bc	11,4 bc	23,6 a	15,7 ab	11,2 bc	21,4 a	21,9	10,3**
	SF	7,9 d	6,7 d	8,5 d	16,9 ab	13,1 bc	9,6 cd	19,3 a	24,2	10,8
P8	ST	34,5 bc	30,9 c	41,9 abc	68,1 a	57,1 ab	58,2 ab	53,5 abc	21,3	5,3**
	SV	17,2 a	19,0 a	23,9 a	38,7 a	30,2 a	34,4 a	36,1 a	25,6	4,2*
	SF	17,4 ab	11,9 b	18,0 ab	29,4 a	26,9 a	23,8 a	17,3 ab	20,3	7,0**

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); \* - Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p>0,05); p-probabilidade. COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

TABELA 28. Valores médios da relação sólidos voláteis e totais (SV/ST) e coeficiente de variação (em %) nos pontos de coletas de lodo dos reatores UASB (MR1 e MR2) no tratamento mesofílico da vinhaça.

Parâmetros	FASES							C.V.	Teste F
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
<b>COV MR1</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>19</b>	<b>28</b>	<b>33</b>	<b>23</b>	<b>29</b>		
<b>COV MR2</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>37</b>	<b>36</b>		
<b>UASB MR1 SV/ST</b>									
P1	0,78	0,72	0,76	0,67	0,64	0,34	0,66	9,3	2,5ns
P2	0,68 a	0,67 a	0,67 a	0,55 bc	0,51 c	0,63 ab	0,56 bc	8,2	6,3**
P3	0,15	0,32	0,23	0,19	0,20	0,28	0,17	42,3	1,4ns
P4	0,30	0,30	0,29	0,23	0,12	0,21	0,22	47,3	1,2 ns
P5	0,46 c	0,65 a	0,65 ab	0,53 abc	0,57 abc	0,49 bc	0,52 abc	10,2	5,2**
P6	0,45 b	0,65 a	0,60 ab	0,53 ab	0,54 ab	0,68 a	0,59 ab	11,9	4,4**
P7	0,43 d	0,62 ab	0,63 a	0,52 abcd	0,46 acd	0,60 abc	0,59abcd	11,7	5,2**
P8	0,51	0,68	0,65	0,53	0,54	0,47	0,49	16,0	3,0
<b>UASB MR2 SV/ST</b>									
P1	0,97 a	0,73 b	0,62 bc	0,58 c	0,63 bc	0,61 c	0,55 c	6,4	31,8
P2	0,66 ab	0,76 a	0,58 b	0,58 b	0,54 b	0,55 b	0,53 b	9,6	7,9**
P3	0,55	0,73	0,59	0,64	0,58	0,62	0,55	12,1	2,5ns
P4	0,68	0,73	0,59	0,56	0,61	0,61	0,59	11,9	2,1ns
P5	0,61	0,71	0,61	0,55	0,60	0,60	0,53	11,8	2,0ns
P6	0,56 ab	0,64 a	0,59 ab	0,52 ab	0,53 ab	0,56 ab	0,49 b	8,7	3,6*
P7	0,44 b	0,63 a	0,57 a	0,58 a	0,54 ab	0,54 ab	0,53 ab	7,9	6,4**
P8	0,50 b	0,61 ab	0,58 ab	0,57 ab	0,51 b	0,59 ab	0,68 a	10,0	3,6*

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%. \*\* - Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \* - Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); ns - não significativo ( $p > 0,05$ ); p-probabilidade. COV: Carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>).

### 5.2.7. Diversidade microbiana nos reatores UASB mesofílicos - Ion Torrent

Os resultados da análise da comunidade microbiana no lodo dos reatores UASB mesofílicos, MR1 e MR2, revelaram que os filos mais abundantes foram o Bacteroidetes e o Chloroflexi, com abundância relativa de 41,5% no MR1 e 57,5% no MR2; e de 31,5% no MR1 e 19,7 no MR2, respectivamente; seguidos por Firmicutes, Synergistes e Proteobacteria (Figura 29).

O filo Bacteroidetes, encontrado em maior abundância, é composto por bactérias envolvidas na hidrólise e acidogênese (DIAS et al., 2016), importante na degradação de polímeros complexos (JABARI et al., 2016), produz propionato e acetato como produtos da fermentação (DESVIGNES et al., 2009). Aproximadamente, 91,9 % do filo Bacteroidetes encontrado ainda não foram classificadas nos bancos de dados, a única classe identificada foi a Bacteroidia (8,1%) (Tabela 29), indicando a importância de mais estudos nesta área.

O filo Chloroflexi, segundo mais abundante, tem sido destacado em alguns sistemas de digestão anaeróbia desempenhando importante papel funcional em processos anaeróbios, o qual está envolvido na degradação de carboidratos (SI et al., 2016; SUNDBERG et al., 2013). Além disso, segundo Zamanzadeh et al. (2016) e Greses et al. (2017) as bactérias do filo Chloroflexi predominam em sistemas anaeróbios com baixas concentrações de amônia ( $284 \text{ mg L}^{-1}$ ), valores próximos aos obtidos neste estudo. Explorando o filo Chloroflexi foi encontrado apenas a ordem Anaerolineae, cuja afiliação taxonômica foi observada até o nível de família (Anaerolineaceae). De acordo com recentes estudos as afiliações taxonômicas dentro desse filo ainda não estão claras. St-Pierre e Wright (2014) avaliando a filo Chloroflexi observaram a afiliação taxonômica até o nível de família (Anaerolineaceae) e em avaliação da distância genética entre as espécies, os autores concluíram que a sequência observada, provavelmente, pertence a um novo gênero da família Chloroflexi.

O filo Firmicutes, com proporções similares nos reatores MR1 e MR2 (Figura 29) são micro-organismos facultativos e conhecidos pela produção de celulasas, lipases, roteases e outras enzimas celulares (YIN et al., 2016); e vários ácidos orgânicos (ácidos C3, C4), tais como: ácido propiônico, ácido butírico e seus derivados

(VENKATA MOHAN et al., 2011). Neste filo incluem-se as bactérias das classes Clostridia e Bacili (Figura 29), responsáveis pela quebra de compostos orgânicos complexos (WIRTH et al., 2012) e, provavelmente, estão presentes nos reatores MR1 e MR2, em virtude das características da vinhaça. A classe Clostridia e Bacili observadas foram de 54,9 % no MR1 e 68,0% no MR2, e 41,7% no MR1 e 27,9% no MR2, respectivamente, cujos principais gêneros foram *Sedimentibacter* e *Syntrophomonas* (classe Clostridia), e *Trichococcus* (classe bacilli).

Os membros do filo Synergistetes são comumente observados nos processos de digestão anaeróbia (Figura 29). Assim como no estudo de Fu et al. (2017), a única família de bactéria encontrada desse filo foi a Synergistaceae (9,05% no MR1 e 6,53% no MR2). Esses organismos participam da fermentação da glicose e ácidos orgânicos para produzir acetato, CO<sub>2</sub> e hidrogênio quando são co-cultivados com as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (Si et al., 2016).

A abundância de Spirochaetes observada neste estudo foram 0,62% no MR1 e de 0,12% no MR2. Spirochaetaceae, frequentemente encontrada em reatores anaeróbios pertence à classe Spirochaetes; de acordo com Karakashev et al. (2006) e Lee et al. (2015) é classificada como bactéria oxidante de acetato sintrófico Karakashev et al. (2006) observaram que os reatores nos quais exibiam menores produção de metano apresentavam maior oxidação de acetato síntrófico. De acordo Si et al. (2016) e LEE et al., (2013) a alcalinidade está correlacionada negativamente com a abundância de Spirochaetes e a reação de oxidação de acetato sintrófico é difícil de ocorrer nas condições padrão e pH 7,0 devido aos aspectos termodinâmicos desfavoráveis ( $\Delta G^\circ = +105 \text{ KJ}$ ), e estas bactérias correlacionam positivamente com as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Em relação às arqueias, o filo com maior representatividade foi a Euryarchaeota, com 95,7% no MR1 e 97,0% no MR2 (Figura 30). Entre as classes de arqueias identificadas, a mais abundantes foi a Methanomicrobia, correspondendo a 94,9% no MR1 e 96,8% no MR2. O filo Euryarchaeota apresentou a maior parte das arqueias, cujos gêneros foram: *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanofollis*, *Methanocorpusculum* e *Methanobacterium*; entre os quais o mais abundante foi o *Methanosaeta*, correspondendo a 89,9% no MR1 e 95,2 no MR2. A *Methanosaeta* são arqueias metanogênicas acetoclásticas e a elevada abundância pode indicar que a

via acetoclástica é o caminho mais importante para a produção de metano (GRESES et al., 2017).

As outras classes identificadas foram a Methanobacteria, Thermoprotei e Pacearchaeota\_Incertae\_Sedis\_AR13, que juntas correspondem a 4,9% no MR1 e 3,1 no MR2 (Figura 30 e Tabela 29).

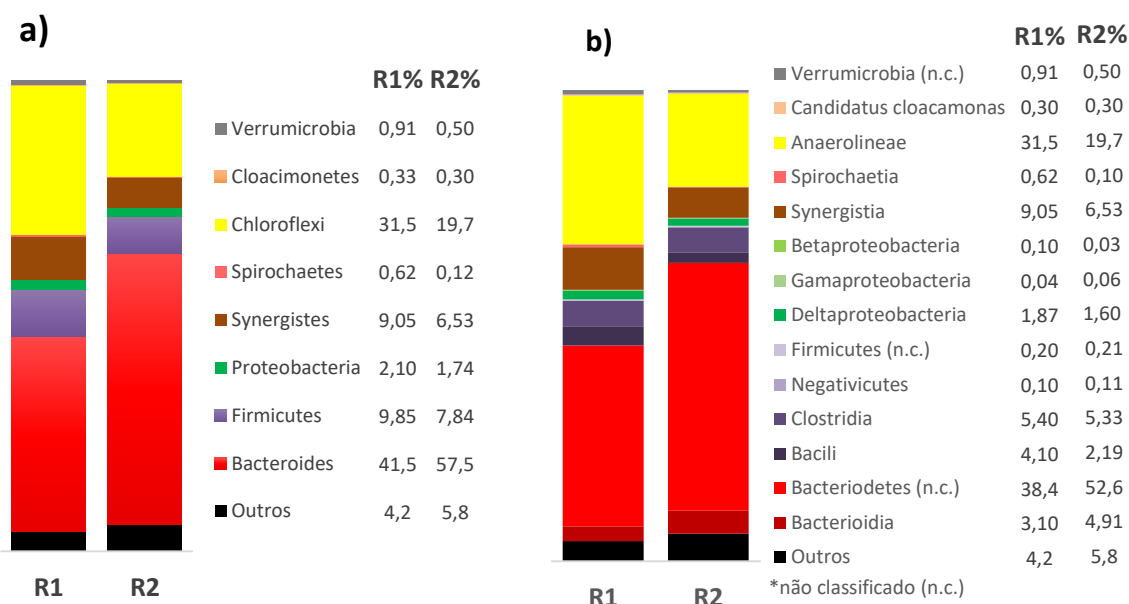


FIGURA 29. Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (a) e classes (b) das bacterianas e afiliações taxonômicas encontrados nas amostras de lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2. Normalizado pelo tamanho da menor amostra (37.074 seqüências). Outros: <0,01 %.

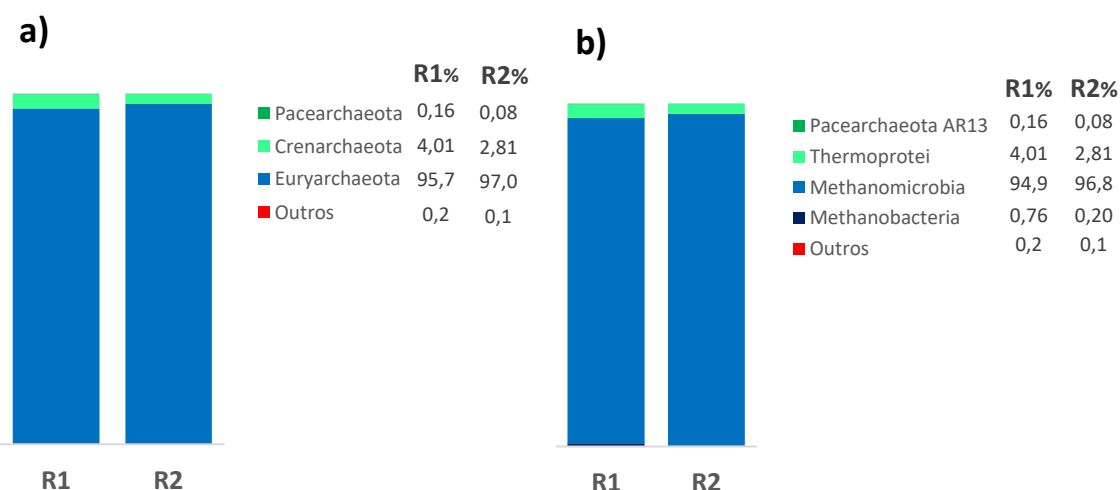


FIGURA 30. Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos (a) e classes (b) das arqueias e afiliações taxonômicas encontrados nas amostras de lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2. Normalizado pelo tamanho da menor amostra (37.074 seqüências). Outros: <0,01%.

TABELA 29. Abundância relativa dos filios, classes, ordem, família e gêneros das bactérias identificadas no lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2, no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça com as maiores COV aplicadas.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	R1%	R2%
Bacteroidetes					38,42	52,62
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides</i>	2,54	4,06
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Petrimonas</i>	0,28	0,70
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Proteiniphilum</i>	0,05	0,02
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae		0,21	0,12
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales			0,01	0,00
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae		31,52	19,71
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae_Sedis_XI	<i>Sedimentibacter</i>	2,78	2,90
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i>	2,38	1,97
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae		0,01	0,02
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Clostridium_XIVa</i>	0,09	0,19
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Parasporobacterium</i>	0,02	0,02
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae		0,01	0,01
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae		0,05	0,05
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Gracilibacteraceae	<i>Gracilibacter</i>	0,01	0,12
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII	<i>Anaerovorax</i>	0,01	0,01
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales			0,04	0,04
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Trichococcus</i>	4,11	2,18
Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae		0,10	0,08
Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales			0,03	0,03
Firmicutes					0,20	0,21
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Aminobacterium</i>	0,01	0,01
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Anaerobaculum</i>	0,00	0,01
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae		9,04	6,52
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	1,10	0,26
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfomicrobiaceae	<i>Desulfomicrobium</i>	0,02	0,03
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Smithella</i>	0,72	1,12
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Syntrophus</i>	0,03	0,23
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophorhabdus	Syntrophorhabdus		0,01	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae		0,08	0,02
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga</i>	0,01	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>	0,05	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	0,04	0,06
Verrucomicrobia					0,91	0,50
Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	0,62	0,12
Cloacimonetes	Candidatus_Cloacamonas				0,33	0,30
Candidatus_Saccharibacteria					0,04	0,06
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	<i>Brooklawnia</i>	0,04	0,03
Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae		0,00	0,01
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae		0,02	0,06
Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales			0,00	0,02
Atribacteria					0,02	0,02
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae		0,01	0,01
Parcubacteria					0,01	0,01
Outros (<0,01%)					3,99	5,49

TABELA 30. Abundância relativa dos filos, classes, ordem, família e gêneros das arqueias identificadas no lodo dos reatores UASB, MR1 e MR2, no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	R1%	R2%
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	89,9	95,2
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	1,11	0,56
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanofollis</i>	1,83	0,44
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	1,24	0,43
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	0,85	0,21
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	0,51	0,07
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae		0,25	0,13
Crenarchaeota	Thermoprotei				4,01	2,81
Pacearchaeota	Pacearchaeota_Incertae_Sedis_AR13				0,16	0,09
Outros					0,17	0,08

Outros: <0,01%

### 5.2.8. PCR tempo real- quantificação absoluta (qPCR)

Entre os domínios Bacteria e Archaea, três ordens das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetocláticas (Methanobacteriales, Methanomicrobiales e methanosarcinales) e duas famílias do domínio de Archaea acetoclásticas (Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae) tiveram seu DNAr 16S quantificado através de qPCR em tempo real (Figura 31)

Na quantificação dos domínios Bacteria e Archaea, o domínio Bacteria apresentou uma ligeira superioridade em relação ao domínio Archaea. Além disso, as quantidades desses micro-organismos foram maiores na parte superior dos reatores, apresentando uma leve diminuição gradual da parte superior (P3) até a base do reator (P1) no MR2. As quantidades de bactérias foram de  $1 \times 10^{10}$  a  $7 \times 10^{10}$  cópias/gSV no MR1 e  $1 \times 10^{10}$  a  $2 \times 10^{10}$  cópias/gSV no MR2; e arqueias foram de  $2 \times 10^9$  a  $8 \times 10^9$  cópias/gSV no MR1;  $1 \times 10^9$  a  $6 \times 10^{10}$  cópias/gSV no MR2. Sendo assim, é possível estabilidade do reator anaeróbio com concentrações de arqueias metanogênicas próximas às de bactérias, porque as arqueias têm taxas de crescimento mais baixas e utilizam o substrato de forma menos eficiente que as bactérias.



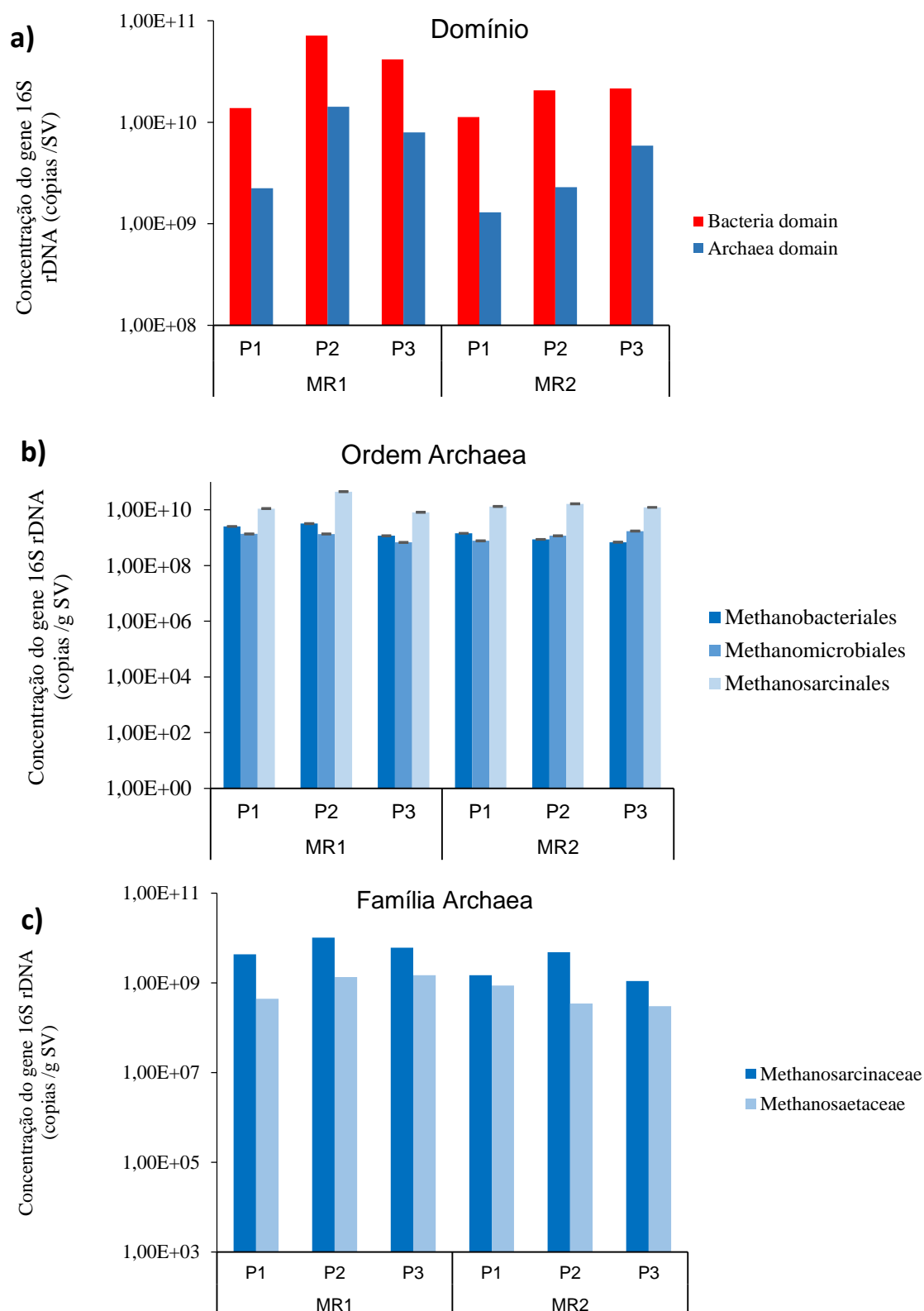


FIGURA 31. Quantificação absoluta dos micro-organismos, utilizando qPCR, dos domínios Bactéria e Arquéias, três ordens e duas famílias das arquéias, presentes no lodo dos reatores UASB (MR1 e MR2) nos pontos de coletas P1, P2 e P3. SV: sólidos voláteis.

Em relação as ordens das arqueias, as concentrações das arqueias Methanobacteriales e Methanomicrobiales foram bem próximas em todos os pontos de ambos reatores. As Methanobacteriales variaram de  $1 \times 10^9$  a  $3 \times 10^9$  cópias/g SV no MR1 e  $7 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  cópias/gSV no MR2; e as Methanomicrobiales variaram de  $7 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  no MR1 e  $8 \times 10^8$  a  $2 \times 10^9$  cópias/g SV no MR2. Estes valores indicam que a utilização do hidrogênio gerado pode ocorrer na altura dos reatores. As arqueias hidrogenotróficas no lodo do MR1 e MR2, favorecem a transferência eficiente do hidrogênio e a produção de metano e conseqüentemente mantém a baixa pressão de hidrogênio, permitindo o equilíbrio das reações.

As concentrações das Methanosarcinales foram superiores as concentrações das Methanobacteriales e Methanomicrobiales em ambos reatores,  $8 \times 10^9$  a  $4 \times 10^9$  cópias/gSV no MR1 e  $1 \times 10^9$  a  $2 \times 10^9$  cópias/gSV no MR2. As Methanosarcinales correspondem as principais famílias das acetogênicas que utilizam acetato para formar metano, Methanosarcinaceae e Methanosaetacea. A taxa de crescimento desses micro-organismos está associada a concentração de acetato, no qual methanosarcina predomina em concentrações elevadas. A produção e disponibilidade de acetato, verificada neste estudo, proporcionaram condições favoráveis para o crescimento e manutenção dos grupos de arqueias metanogênicas.

Além disso, as concentrações desses micro-organismos foram equilibradas nos pontos dos reatores reatores MR1 e MR2, apresentando uma leve superioridade na concentração da Methanosarcinaceae ( $6 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  cópias /g SV no MR1;  $1 \times 10^9$  a  $4 \times 10^9$  cópias /g SV no R2) em relação a Methanosaetacea ( $4 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  cópias /g SV no R1;  $3 \times 10^8$  a  $8 \times 10^8$  cópias /g SV no MR2). O equilíbrio das arqueias em ambos reatores pode justificar a capacidade do reator MR1 e do MR2 na conversão anaeróbia do material orgânico da vinhaça a metano.

### **5.3. Comparação dos reatores UASB termofílicos (TR1 e TR2) com os reatores mesofílicos (MR1 e MR2)**

Os sistemas termofílico (TR1 e TR2) e mesofílico (MR1 e MR2) foram comparados a partir da utilização simultânea da torta de filtro em ambos os sistemas, levando em conta as condições aplicadas: COV, TDH e recirculação do efluente. A eficiência dos sistemas de tratamento foi monitorada utilizando diferentes parâmetros

e a composição microbiana foi verificada com as COV aplicadas nos reatores, cujos resultados revelaram dinâmica microbiana distinta nos dois sistemas.

### 5.3.1. Diversidade das bactérias nos reatores termofílicos e mesofílicos.

A Tabela 31 apresenta os índices de riqueza Chao1 e diversidade Shannon, além do número de UTOs de gêneros bacterianos observadas em cada amostra. Segundo o índice de riqueza Chao1, MR1 e TR2 poderiam apresentar pelo menos o dobro de novas UTOs além destas que descrevemos em nosso estudo. Isto significa que, dentre as 1.935 UTOs do MR1 e 1.875 do TR2 (Tabela 31), existem muitas identificações de gêneros bacterianos raros, os quais não puderam ser representados em nossa amostragem. No entanto, ressalta-se que segundo a avaliação da qualidade da profundidade de sequenciamento, obteve-se bons índices de cobertura (Tabela 31), denotando não haver prováveis problemas amostrais que pudessem prejudicar a representação das comunidades microbianas nos reatores avaliados.

TABELA 31. Índices calculados para avaliação da riqueza e diversidade de bactérias nos reatores mesofílicos em série (MR1 e MR2), e termofílicos em série (TR1 e TR2).

	Chao1	Cobertura dados	Shannon	UTOs observadas
MR1	4124	0,9824	6,37	1935
MR2	2659	0,9878	6,11	1533
TR1	2017	0,9907	5,60	1193
TR2	3053	0,9854	6,57	1875

Entre os sistemas mesofílicos e termofílicos, a maior diversidade das comunidades bacterianas foi observada no MR1 e no TR2 (Tabela 31 e 32). Guo et al (2014) avaliaram as características microbianas entre reatores anaeróbios termofílicos e mesofílicos, os autores observaram nos sistemas mesofílico elevados índices de Shannon, Chao1 e cobertura, que juntos justificam a mais alta diversidade nos reatores mesofílicos.

Bacteroidetes, Firmicutes e Synergistetes foram os principais Filos comuns que apareceram em todos reatores. Thermotogae, seguido de Firmicutes foram os Filos dominantes para o sistema termofílico (TR1 e TR2) e Bacteroidetes seguido de Cloroflexi foram para o sistema mesofílico (MR1 e MR2). O Cloroflexi foi encontrado

apenas no sistema mesofílico e o Thermotogae no sistema termofílico. Alguns outros filos aparecem em ambos os sistemas em menores abundâncias, tais como: Synergistetes, Atribacteria, Proteobacteria, Synergistetes, Atribacteria e protobacteria, porém podem ter desempenhado papel importante no processo. Para o melhor entendimento sobre a dinâmica das comunidades bacterianas, é necessário explorar os dados de sequenciamento em subníveis, a abundância relativa ao nível de gênero em cada reator foi calculada.

TABELA 32. Composições taxonômicas dos Filos das comunidades bacterianas para as sequências obtidas sistema termofílico (TR1 e TR2) e mesofílico (MR1 e MR2).

Filo	Termofílico		Mesofílico	
	TR1 %	TR2 %	MR1 %	MR2 %
Thermotogae	58,98	23,42	0,02	0,08
Chloroflexi	0	0	31,52	19,71
Firmicutes	14,71	30,34	9,85	7,84
Bacteroidetes	3,54	11,47	41,51	57,53
Nitrospirae	3,54	3,01	0	0
Synergistetes	3,12	2,9	9,05	6,53
Atribacteria	2,4	0,49	0,02	0,03
Planctomycetes	0,26	0,74	0,01	0,01
Tenericutes	0,09	0,53	0	0
Proteobacteria	0,05	0,06	2,07	1,74
Spirochaetes	0	0	0,62	0,12
Cloacimonetes	0	0	0,33	0,3
Candidatus_Saccharibacteria	0	0	0,04	0,06
Actinobacteria	0	0,01	0,04	0,04
Parcubacteria	0	0	0,01	0,01
Verrumicrobia	0	0,01	0,91	0,5
Outros	14,3	26,5	3,99	5,49

Maior abundância relativa corresponde a cores mais intensas, vermelho (termofílico), azul (mesofílico). Outros (<0,01%).

O Thermotogae foi o filo dominante no sistema em condição termofílica (58,98% no TR1 e 23,42% no TR2), apresentando em baixíssimas proporções em condições mesofílicas (0,02% no MR1 e 0,08% no MR2), a maioria das sequências deste filo ainda não foram classificadas. Entre as sequências classificadas, apenas o gênero *Fervidobacterium* foi encontrado nos reatores termofílicos, atribuído na oxidação das hemiceluloses (PANDIT et al., 2016); também observado por outros estudos, avaliando a digestão aneróbia termofílica e mesofílica (GUO et al., 2014).

Os Bacteroidetes apareceram em menores proporções nos reatores termofílicos (3,5% no TR1 e 11,5% no TR2) e com grandes proporções nos reatores mesofílicos (41,5% no MR1 e 57,5% no MR2), nos quais a maioria dos genes encontrados ainda não foram classificados. Os gêneros encontrados foram *Petrimonas*, *Parabacteroides* e *Proteiniphilum*. De acordo com Guo et al. (2014), a *Petrimonas* está entre as bactérias que fermentam os açúcares para produzir acetato e proprionato

O filo Chloroflexi tem sido destacado entre os filos mais abundante em condições mesofílicas e em menores abundâncias em condições termofílicas (GUO et al., 2014; ST-PIERRE; WRIGHT, 2014) GUO et al., 2014), como observado neste estudo. O Firmicutes mostrou-se abundante nos dois sistemas (termofílico e mesofílico), porém foi encontrado em maiores proporções no sistema termofílico; e as bactérias pertencentes à classe Clostridia foram as mais abundantes nos dois sistemas de tratamento, apresentando diversidade distinta em nível de gênero em cada condição de temperatura.

### 5.3.2. Diversidade das arqueias nos sistemas termofílicos e mesofílicos.

Os índices de diversidade foram avaliados para a comunidade das arqueias, incluindo o índice de riqueza de Chao e o índice de diversidade de Shannon (Tabela 33). Comparativamente, a diversidade das arqueias foi muito menor do que a da comunidade bacteriana, devido à baixa diversidade filogenética inerente as arqueias (GUO et al., 2014). Os índices indicaram maior diversidade de arqueias em condições mesofílicas do que em condições termofílicas.

TABELA 33. Índices calculados para avaliação da riqueza e diversidade de arqueias nos reatores mesofílicos em série (MR1 e MR2), e termofílicos em série (TR1 e TR2).

	Chao1	Cobertura dados	Shannon	UTOs observadas
MR1	559	0,9967	2,65	373
MR2	426	0,9982	2,19	302
TR1	322	0,9958	2,66	190
TR2	208	0,9952	2,10	121

No sistema mesofílico, a *Methanosaeta* foi a arqueia dominante, enquanto que *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* dominaram no sistema termofílico, indicando

que a principal via de produção de metano nos reatores termofílicos foi a via hidrogenotrófica, e a principal via nos reatores mesofílicos foi a via acetoclástica (Figura 32).

A predominância de *Methanosaeta* tem sido avaliada em vários estudos, em diferentes condições de temperatura e diferentes tipos e concentrações de substratos (GUO et al., 2014; VAN HAANDEL et al., 2014). A predominância da *Methanosaeta* favorece sobre a *Methanosarcina* em processos com baixa concentração de acetato a longo prazo (GUO et al., 2014). Geralmente, a *Methanosarcina* tem maior taxa de crescimento e menor afinidade ao acetato, o que favorece a multiplicação de *Methanosaeta*.

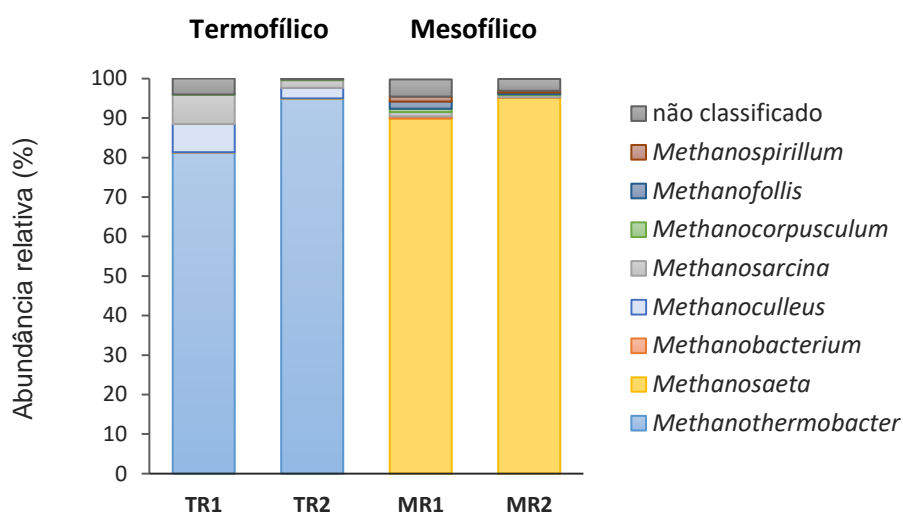


FIGURA 32. Composições taxonômicas das arqueias metanogênicas ao nível do gênero dos reatores UASB em série termofílicos (TR1 e TR2) e mesofílicos (MR1 e MR2).

*Methanothermobacter* possui crescimento ótimo em temperaturas próximas a 65 ° C. Esses organismos utilizam para o crescimento o H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e energia, NH<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio e H<sub>2</sub>S ou sulfito, mas não sulfato como fontes de enxofre (GUPTA; BHANDARI, 2011).

A *Methanosarcina* é conhecida como um membro versátil das arqueias metanogênicas, está entre os principais gêneros nos sistemas termofílicos e mesofílicos, e têm sido frequentemente destacadas como dominantes. É classificada como metanogênica acetoclástica e hidrogenotrófica, devido a capacidade de produzir metano a partir de acetato, metanol, monoacetilamina, dimetilamina, trimetilamina, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pelas vias acetoclásticas e hidrogenotróficas. A flexibilidade no metabolismo

e as características morfológicas especiais da *Methanosarcina* permitem superar outras arqueias durante a fase de aclimação em ambos os reatores (GUO et al., 2014).

A *Methanomicrobia*, classe dominante no sistema mesofílico, tem sido dominante em outros estudos em condições mesofílicas (MARTÍNEZ; ROMERO; PEROTTI, 2014). Os gêneros correspondentes a classe *Methanomicrobia* são *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanofollis*, *Methanospirillum* e *Methanocorpusculum*.

### **5.3.3. PCR tempo real - quantificação dos micro-organismos, condições termofílicas e mesofílicas**

Os Domínios Bacteria e Archaea, as ordens *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, como também as famílias *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetacea* foram quantificadas nos pontos de coletas do lodo dos reatores termofílicos em série (TR1 e TR2) e mesofílicos em série (MR1 e MR2), com as maiores COV aplicadas nos reatores (Figura 33).

Nos reatores mesofílicos em série (MR1 e MR2) foram observadas maiores quantidades da ordem *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* em relação aos reatores sob condições termofílicas em série (TR1 e TR2). Além disso houve um maior equilíbrio entre estes micro-organismos em cada parte do reator, principalmente os da ordem *Methanobacteriales*, que esteve em menor proporção nos reatores termofílicos. As maiores concentrações destes micro-organismos no lodo dos reatores favorecem a transferência eficiente do hidrogênio e a produção de metano e conseqüentemente mantém a baixa pressão de hidrogênio, permitindo o equilíbrio das reações.

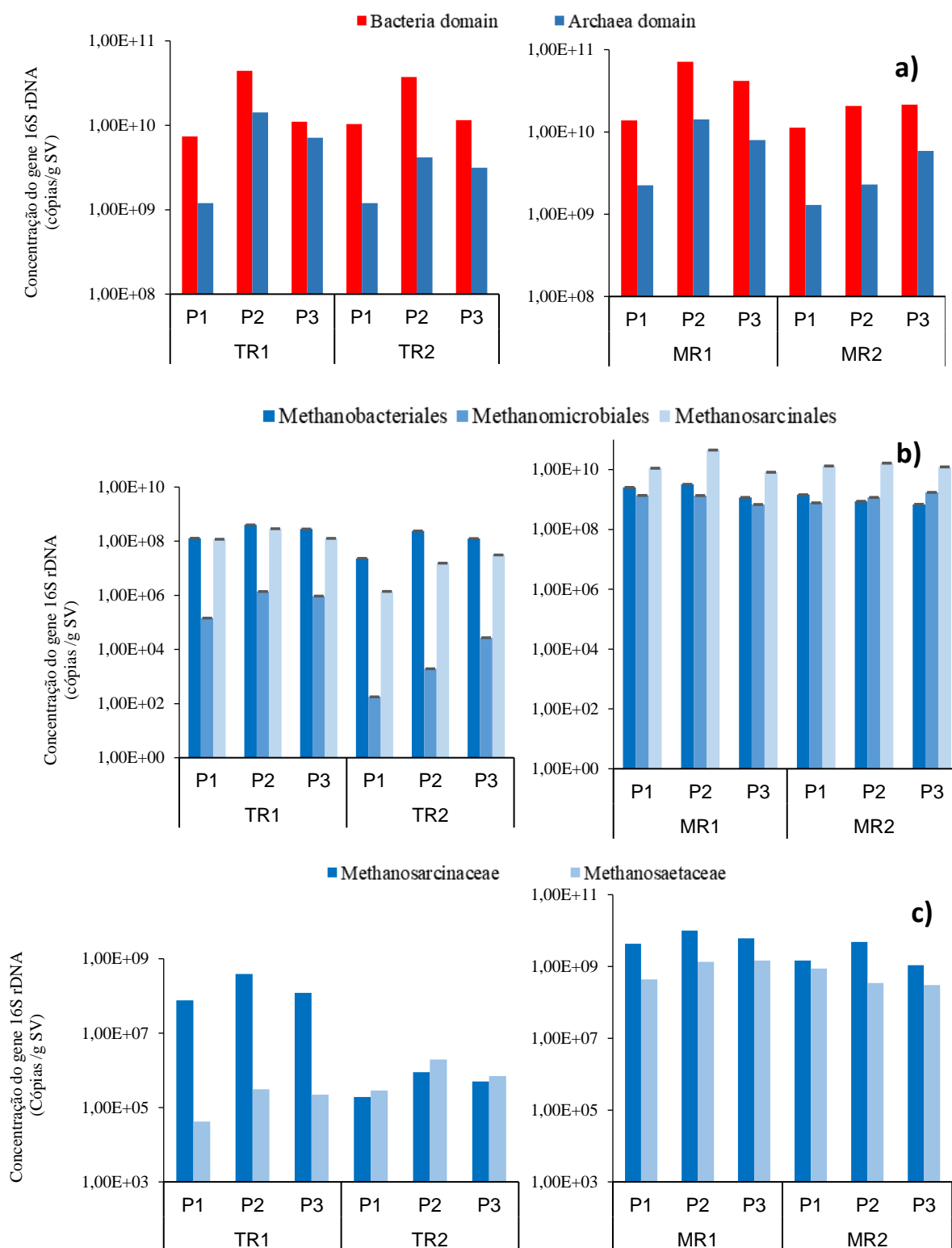


FIGURA 33. Quantificação absoluta dos micro-organismos, utilizando qPCR, dos domínios Bactéria e Arquéias (a), três ordens (b), duas famílias das arqueias (c), presentes no lodo dos reatores UASB termofílicos (TR1 e TR2) e mesofílicos (MR1 e MR2) tratando vinhaça. SV: sólidos voláteis.



### 5.3.4. Desempenho dos sistemas sob condições mesofílicas e termofílicas

Em ampla revisão bibliográfica sobre o tratamento anaeróbio de vinhaça em condições mesofílicas e termofílicas, Wilkie et al (2000) observaram que em sistemas termofílicos a remoção de DQO tem sido menor do que em sistemas mesofílicos. Além disso, os autores observaram que os sistemas termofílicos permitem maiores aplicações de COV, cujos valores médios foram de 23,5 e 12,2 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>, respectivamente.

Neste estudo, as maiores aplicações de COV e com condições de estabilidades foram permitidas nos reatores termofílicos (45 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no TR1 e de 49 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no TR2). Porém, no sistema mesofílico as aplicações de COV também foram elevadas (33 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR1 e de 40g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> no MR2). O sistema termofílico apresentou melhor desempenho, principalmente no primeiro reator (TR1), considerando-se a produção de metano (Tabela 34).

TABELA 34. Comparação dos principais parâmetros entre os reatores UASB em série dos sistemas mesofílicos (MR1 e MR2) e termofílicos (TR1 e TR2) em série no tratamento anaeróbio da vinhaça com as maiores COV aplicadas.

PARÂMETROS	unidades	TERMOFÍLICO		MESOFÍLICO	
		TR1	TR2	MR1	MR2
COV	(g DQO (L d) <sup>-1</sup> )	45	49	33	40
pH	-	8,4 ±0,1	8,8 ±0,1	7,8 ±0,2	7,8 ±0,2
Ácidos voláteis totais	(mg L <sup>-1</sup> )	4477 ±1030	3842 ±763	2932 ±412	1229 ±307
Alcalinidade parcial	(mg L <sup>-1</sup> )	3327 ±74,2	3877 ±504,3	2619 ±376	3505 ±512
AVT/AT		0,68 ±0,15	0,57 ±0,08	0,66 ±0,12	0,25 ±0,07
'Nitrogênio amoniacal	(mg L <sup>-1</sup> )	63,8 ±9,3	69,5 ±14,3	107,2 ±27,1	115,0 ±28,1
DQO	(mg L <sup>-1</sup> )	16127 ±1251	13631 ±874	1980 ±1326	13071 ±450
DQOremovida	(%)	48,7 ±2,9	15,7 ±3,8	39,5 ±4,1	33,7 ±4,4
Produção volumétrica de metano	L CH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	4,1 ±0,4	1,45 ±0,2	2,12 ±0,26	1,22 ±0,09
CH <sub>4</sub> no biogás	(%)	60,3 ±1,4	72,7 ±1,7	64,8 ±4,7	74,9 ±1,7
Produção específica de metano	L CH <sub>4</sub> (gDQOremovida) <sup>-1</sup>	0,21 ±0,02	0,18 ±0,02	0,16 ±0,03	0,19 ±0,04

COV: carga orgânica volumétrica; DQO: demanda Química de oxigênio

Na comparação (TR1 e MR1), tendo como base as maiores COV, em condições termofílicas foram obtidas as maiores eficiências de remoção de DQO total, de até 50% no TR1 e 40% no MR1. Por outro lado, comparando o TR2 com MR2, em condições mesofílicas foram obtidas maiores eficiência de remoção de DQO total, de até 34% no MR2 e 16% no TR2. Sendo assim, o sistema em série em condições termofílicas apresentou elevado desempenho no reator do primeiro estágio (TR1). Enquanto que o sistema em série em condições mesofílica (MR1 e MR2) obteve um desempenho mais distribuído, com participação mais efetiva do segundo estágio na remoção do material orgânico.

Outros aspectos importantes a serem considerados em sistemas termofílicos são as propriedades físico-químicas do meio de reação que dependem da temperatura. A solubilidade dos gases diminui com o aumento da temperatura; consequentemente, haverá menores concentrações de metano no efluente, bem como de  $H_2$ ,  $NH_3$  e  $H_2S$ , que exercem um efeito negativo (muitas vezes tóxicos) sobre o processo de digestão anaeróbia (VAN LIER, 1993). Em relação as condições ambientais apresentadas (Tabela 34), o sistema anaeróbio mesofílico apresentou concentrações de AVT e Nam inferiores ao sistema termofílico, bem como melhores condições de estabilidade indicada pela relação AVT/AT, principalmente no MR2.

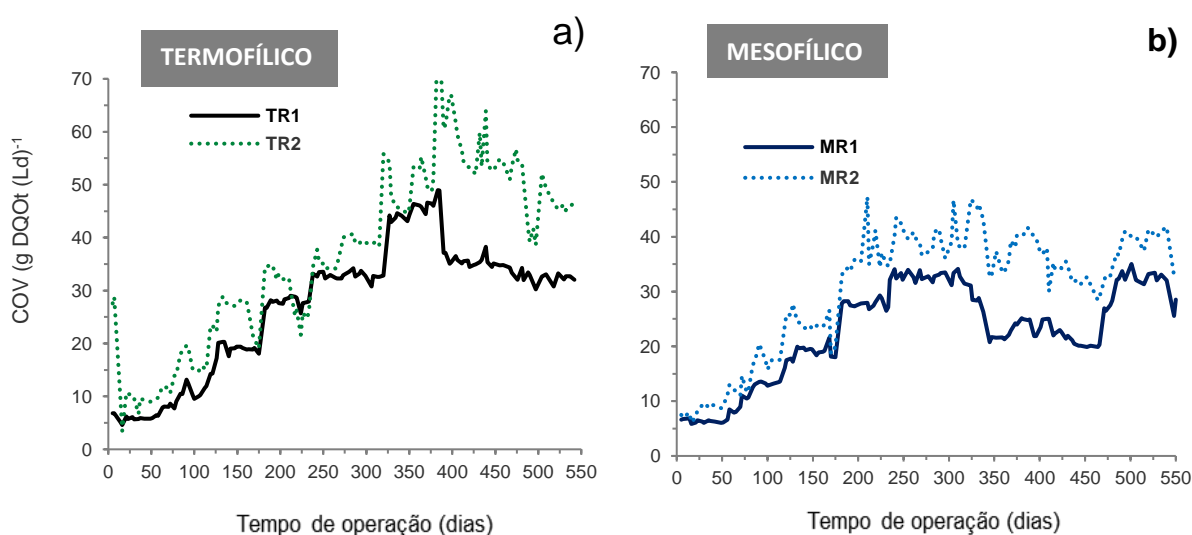


FIGURA 34. Aumento gradual da carga orgânica volumétrica (COV) nos reatores UASB em série sob condições termofílicas (TR1 e TR2) (a) e mesofílicas (MR1 e MR2) (b).

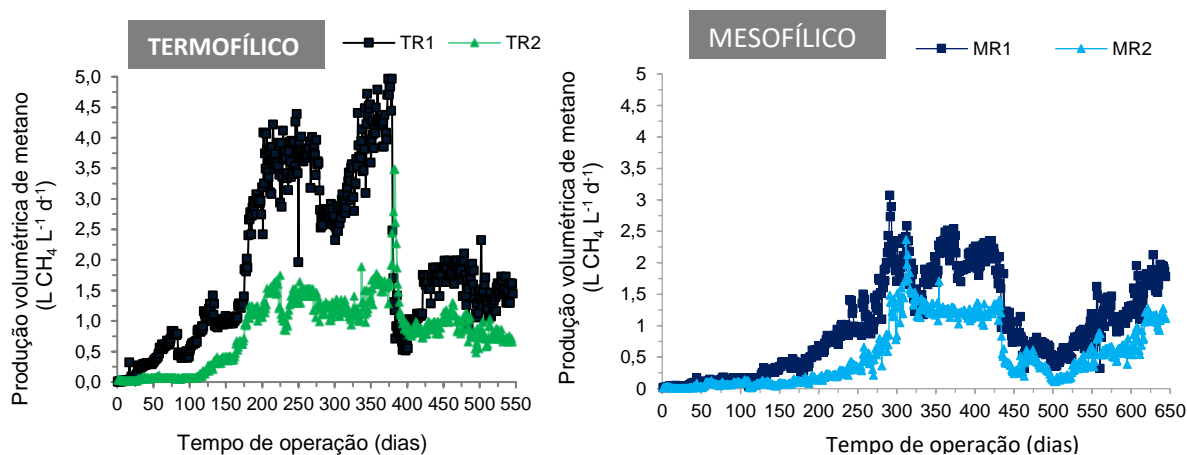


FIGURA 35. Produção volumétrica de metano nos reatores UASB em série, sob condições termofílicas (TR1 e TR2) e mesofílicas (MR1 e MR2).

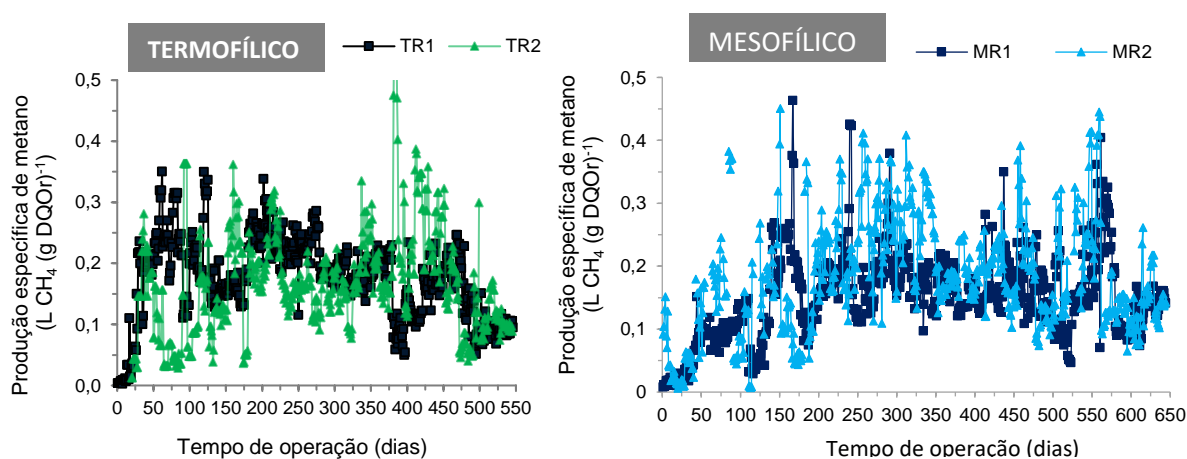


FIGURA 36. Produção volumétrica de metano nos reatores UASB em série, sob condições termofílicas (TR1 e TR2) e mesofílicas (MR1 e MR2).

#### 5.4. Tratamento físico-químico e de oxidação avançada e testes anaeróbios da vinhaça biodigerida.

##### 5.4.1. Caracterização do efluente

A vinhaça biodigerida (proveniente do tratamento anaeróbio da saída dos reatores termofílicos (TR1 e TR2)) submetida ao processo de Fenton e à combinação da coagulação/floculação com o Fenton apresentou altos níveis de matéria orgânica – que pode ser observada em termos de (DQO, COT e DBO<sub>5</sub>), ST, SV, turbidez, baixa biodegradabilidade (DBO<sub>5</sub>/DQO <0,4) e alguma toxicidade para *Vibrio fischeri* (ver Tabela 35). De acordo com Rodrigues et al. (2017) tais características reforça a

importância de um pós-tratamento apropriado, para recirculação em reatores anaeróbicos e / ou descarga nos corpos d'água.

TABELA 35. Características da vinhaça biodigerida.

Parâmetros	Vinhaça biodigerida
pH	9,36
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	16390
DBO <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	3195
COT (mg L <sup>-1</sup> )	5508
DBO <sub>5</sub> :DQO	0,19
ST (g L <sup>-1</sup> )	22,5
SV (g L <sup>-1</sup> )	6,9
Nitrogênio total (mg L <sup>-1</sup> )	3,5
Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )	10,2
Turbidez (NTU)	1200
Inibição <i>Vibrio Fischeri</i> 5 min (%)	44,9
Inibição <i>Vibrio Fischeri</i> 15 min (%)	48,5
Inibição <i>Vibrio Fischeri</i> 30 min (%)	49,9

#### 5.4.2 Fenton

A oxidação de Fenton foi aplicada diretamente ao efluente bruto (vinhaça biodigerida) para melhorar biodegradabilidade e reduzir toxicidade, permitindo a recirculação no reator anaeróbio de alta taxa. Os valores de pH e de temperatura adotados neste estudo foram fixados em 5,0 e 55°C, respectivamente, tendo como base estudos anteriores de processo Fenton em vinhaça biodigerida (GUERREIRO et al., 2016). Portanto, neste estudo foi avaliado o efeito e otimizados a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do catalizador Fe<sup>3+</sup>.

##### 5.4.2.1. Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

É importante estabelecer as melhores doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a aplicar no processo Fenton, pois estas têm impacto significativo não apenas na eficiência do tratamento, mas também no custo global do processo de tratamento. Para avaliar o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram realizados quatro ensaios variando de 18,0 a 35,0 g L<sup>-1</sup>, correspondendo de 0,5 a 2,0 vezes a quantidade estequiométrica (9,0 g L<sup>-1</sup>) face à DQO da vinhaça

biodigerida ( $16390 \text{ mg L}^{-1}$ ). Nestas experiências a concentração de ferro foi fixada em  $1,45 \text{ g L}^{-1}$ , valor ótimo encontrado por Guerreiro et al. (2016).

Os resultados da remoção de COT e os valores de pH ao longo do tempo estão apresentados na Figura 37. Pode-se observar que, para todas as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  testadas, o aumento da remoção de COT é mais acentuado nos primeiros 60min, continuando a aumentar ligeiramente até os 120 minutos e, sendo praticamente constantes para o tempo de reação superior. Evolução temporal semelhante é observada nos valores de pH, que diminuem consideravelmente a partir de  $t = 0$  (adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) até 60 min, e então a variação é atenuada até os 120 min. e constante aos 150 minutos. A diminuição acentuada do pH para  $t < 0$  é devido à adição do sal de ferro e a acidificação do meio ao longo do tempo de reação é, geralmente, atribuída à formação de compostos intermediários, nomeadamente ácidos carboxílicos.

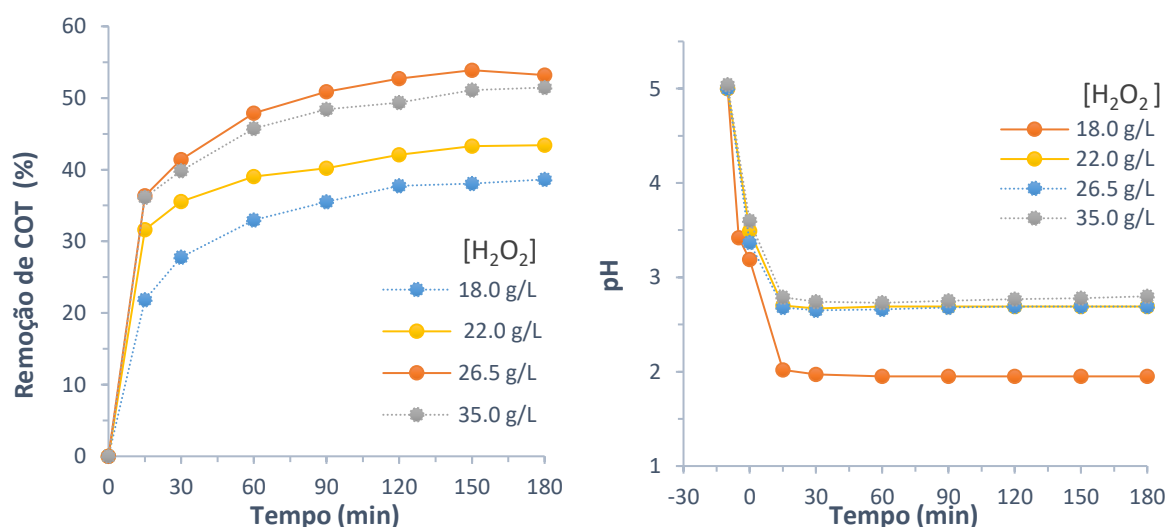


FIGURA 37. Efeito da dosagem de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na remoção do COT (a) e valores de pH durante a reação e remoção de TOC (b) ( $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5,0$ ;  $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $\text{Fe}^{3+} = 1,45 \text{ g L}^{-1}$ ).

Deve-se notar que a remoção do COT aumenta com a dose de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até  $26,5 \text{ g L}^{-1}$ , atingindo  $68,5\%$  de remoção (após 3 h de oxidação). Em doses mais elevadas, as remoções finais diminuem (Figura 37). Para a dose ótima verificou-se o maior decaimento de pH o que indica que a reação formando mais ácidos carboxílicos, que são os últimos compostos intermediários a formarem-se, de difícil oxidação, consequentemente, indicando que a reação está sendo mais eficiente. O

aparecimento de uma dose ótima de oxidante é devido a reação de “scavenging” do radical hidroxila pelo excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Equação 4).

No que se refere à concentração do peróxido de hidrogênio residual, verificou-se que para todos os ensaios todo o oxidante adicionado foi consumido, ou seja a percentagem de consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi de 100%.

#### 5.4.2.2. Efeito da dose de $\text{Fe}^{3+}$

A eficiência de oxidação foi testada variando a dose de ferro na gama de 1.45 a 2,9  $\text{g L}^{-1}$  (o que corresponde à variação da razão mássica de  $\text{Fe}^{3+}:\text{H}_2\text{O}_2$  de 1:18 a 1:9). As restantes variáveis foram fixadas nos seguintes valores:  $\text{H}_2\text{O}_2 = 26,5 \text{ g L}^{-1}$  (valor ótimo encontrado na seção anterior),  $\text{pH}_{\text{inicial}} = 5,0$  e  $T = 55^\circ\text{C}$ .

Na Figura 38, verificou-se novamente aumento acentuado da remoção de COT nos primeiros 60 min, após este período o aumento foi menos proeminente e após 120 min manteve-se constante. No que se refere ao progresso do pH, um perfil temporal semelhante ao comparado com o COT foi observado, diminuindo significativamente até 60 min, depois desacelerando e ficando quase estável após 120 min. Este decaimento foi devido à formação de ácidos orgânicos conforme mencionado anteriormente. A maior queda do pH corresponde à maior quantidade de catalisador usada,  $[\text{Fe}^{3+}] = 2,9 \text{ g L}^{-1}$ , devido ao fato de se adicionar mais cloreto de ferro, que promove um maior decaimento do pH da solução antes de se iniciar a reação (Figura 38), porém não corresponde a maior remoção de material orgânico, que foi alcançada para a dose de 2,2  $\text{g L}^{-1}$ . O aparecimento da dose de  $\text{Fe}^{3+}$  ótima é devido ao fenómeno de “scavenging” do radical por excesso de íon férrico (Equação 6), diminuindo assim a concentração de radicais disponíveis e limitando a oxidação de compostos orgânicos.

Novamente, observou-se um consumo total de oxidante para todas as doses de ferro testadas.

Guerreiro et al (2016) obtiveram remoções de COT de 63,2% quando tratou a vinhaça biodigerida, que é próximo ao observado neste estudo (70,6%) com uma dose menor de  $\text{Fe}^{3+}$  (1,45  $\text{mg L}^{-1}$ ). Contudo, a vinhaça biodigerida usada nos estudos de Guerreiro et al (2016) tinha uma carga orgânica consideravelmente inferior ( $\text{DQO} = 6836 \text{ mg L}^{-1}$ ) à utilizada neste estudo ( $\text{DQO} = 16390 \text{ mg L}^{-1}$ ).

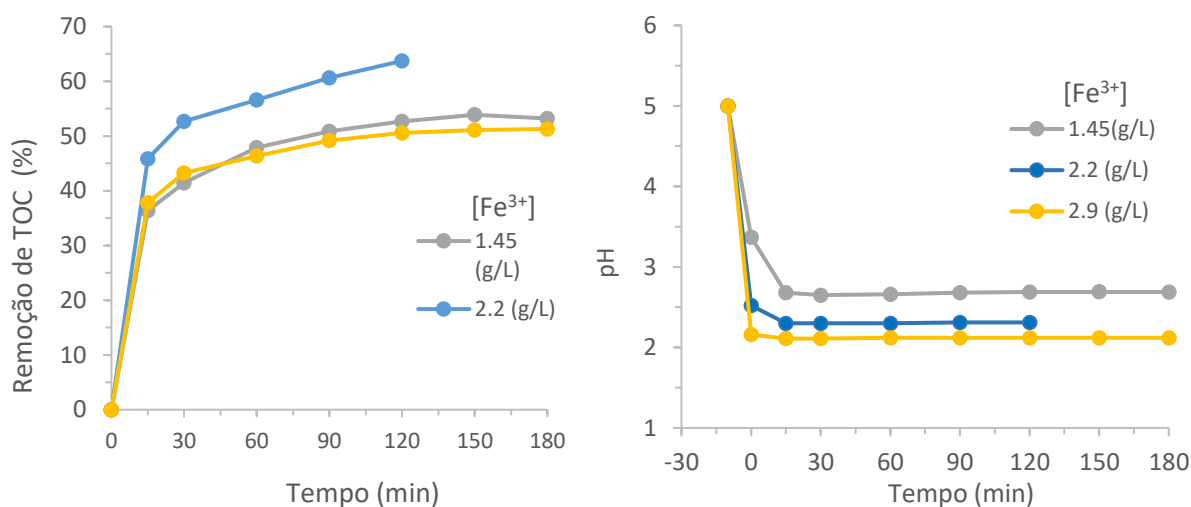


FIGURA 38. Efeito da dosagem de Fe<sup>3+</sup> na remoção do COT (a) e valores de pH durante a reação e remoção de TOC (b) (pH<sub>inicial</sub> = 5,0; T = 55 °C e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 26,5 g L<sup>-1</sup>).

No ensaio com as condições ótimas (pH<sub>inicial</sub> = 5,0, T = 55 °C [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 26,5 g L<sup>-1</sup> e [Fe<sup>3+</sup>] = 2,2 g L<sup>-1</sup>) avaliou-se também a DQO, DBO, toxicidade, nutrientes turbidez e teores de sólidos totais e voláteis. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 36 e pode-se observar elevadas eficiências de remoção (acima de 70%) com exceção da DBO que alcançou remoção de 42,4%. Também se gerou efluente mais biodegradável (atendendo que a razão DBO:DQO aumentou para 0,4) e não tóxico (com inibições de *Vibrio fischeri* de 0,0%).

TABELA 36. Características da vinhaça biodigerida após reação de Fenton e respectivas remoções.

Parâmetros	Vinhaça Biodigerida após Fenton	Remoção
pH	7,10	-
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	4826,2	70,6
DBO <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	1841,0	42,4
COT (mg L <sup>-1</sup> )	1734,0	68,5
DBO <sub>5</sub> :DQO	0,4	-
ST (g L <sup>-1</sup> )	4,4	80,6
SV (g L <sup>-1</sup> )	1,1	83,7
Nitrogênio total (mg L <sup>-1</sup> )	1,0	72,0
Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )	2,9	71,5
Turbidez (NTU)	6,3	99,5
Inibição <i>Vibrio Fischeri</i> 5 min (%)	0,0	100
Inibição <i>Vibrio Fischeri</i> 15 min (%)	0,0	100
Inibição <i>Vibrio Fischeri</i> 30 min (%)	0,0	100

### 5.4.3. Coagulação/floculação seguida de reação de Fenton

O processo de coagulação/floculação antes do processo de Fenton visa reduzir a carga orgânica da vinhaça biodigerida, com isso diminui a quantidade de reagentes requerida no processo seguinte e reduz os custos do tratamento (GUERREIRO et al., 2016). O efluente foi previamente tratado por coagulação/floculação com as condições ótimas ( $[\text{Fe}^{3+}] = 500 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 3,0$ ) reportadas por Guerreiro et al. (2016) e Rodrigues et al. (2017) e obtiveram-se remoções de 25,2 a 47,1% para a carga orgânica, superiores a 80% para os sólidos, 93,6% para a turbidez, ~59,0% para o nitrogênio e 18,9% o fósforo (ver Tabela 36).

A vinhaça resultante da coagulação/floculação foi submetida a oxidação de Fenton. Neste último processo de tratamento utilizou-se um de  $\text{pH} 3,0$ , uma temperatura de  $55^\circ\text{C}$ , uma dose de íon de ferro adicionado de  $0,56 \text{ g L}^{-1}$  (no total  $0,83 \text{ g L}^{-1}$ , atendendo que  $0,27 \text{ g L}^{-1}$  resultam da coagulação/floculação – este valor total considerado teve como base a razão mássica  $\text{Fe}^{3+}:\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,08 obtida no tratamento da vinhaça biodigerida por Fenton conforme mencionado anteriormente) e uma  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10,3 \text{ g L}^{-1}$  (de modo a manter a razão mássica  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{DQO}$  (1,6) igual a ótima obtido para a vinhaça tratada por Fenton, como referido na seção 4.11.3).

Na Tabela 37 estão apresentados os resultados após o processo Fenton, tendo este processo aumentado a biodegradabilidade do efluente ( $\text{DBO}_5:\text{DQO}$  de 0,4) e ausência de inibição de *Vibrio fischeri*. Os valores de remoção de COT, DQO,  $\text{DBO}_5$ , N, P, ST e SV e turbidez foram de 50,5, 64,3, 42,9, 2,4, 13,0, 27,4, 44,1 e 95,4%, respectivamente.

A combinação dos dois processos (coagulação/floculação seguida da reação de Fenton) atingiu eficiência de remoção globais de 73,4% para o COT, 81,1% para a DQO, 57,3% para  $\text{aDBO}_5$ , 59,9% para o nitrogênio, 29,5% para o fósforo, 86,0 e 91,1% para os ST e SV, respectivamente e 99,7% para a turbidez. Esta estratégia gerou um efluente não tóxico e melhorou consideravelmente a biodegradabilidade (de 0,19 a 0,44 antes e depois do tratamento, respectivamente). As eficiências obtidas com a combinação de processos foram ligeiramente maiores às alcançadas no tratamento da vinhaça biodigerida pela oxidação de Fenton por si só; além disso, com utilização da combinação (coagulação/floculação com oxidação de Fenton), menos



peróxido de hidrogênio foi necessário (diminuindo de 26,5 para 10,3 g L<sup>-1</sup>), o que reduz o custo de adição de produtos químicos.

TABELA 37. Características da vinhaça biodigerida e após os processos de coagulação/floculação e respectivas eficiências (as eficiências de remoção parcial são mostradas entre parênteses).

Parâmetros	Após Coagulação e Floculação	Após Fenton	Eficiência global do tratamento
pH	3,1	7,1	
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	8668 (47,1)	3093 (64,3)	81,1
DBO <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	2390 (25,2)	1364 (42,9)	57,3
COT (mg L <sup>-1</sup> )	2957 (46,3)	1465 (50,5)	73,4
DBO <sub>5</sub> :DQO	0,28 (-)	0,44 (-)	
ST (g L <sup>-1</sup> )	4,3 (80,7)	3,1 (27,4)	86,0
SV (g L <sup>-1</sup> )	1,1 (84,0)	0,6 (44,6)	91,1
Nitrogênio total (mg L <sup>-1</sup> )	1,4 (58,9)	1,4 (2,4)	59,9
Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )	8,3 (18,9)	7,2 (13,0)	29,5
Turbidez (NTU)	77,0 (93,6)	3,6 (95,3)	99,7
Inibição Vibrio Fischeri 5 min (%)	0,5 (-)	0,0 (-)	-
Inibição Vibrio Fischeri 15 min (%)	7,1 (-)	0,0 (-)	-
Inibição Vibrio Fischeri 30 min (%)	8,6 (-)	0,0 (-)	-

#### 5.4.4. Testes de biodegradabilidade

Na Figura 37, estão apresentados os valores médios de DQO, COT e pH obtidos em cada teste no início (t = 0) e no final (t = 15 dias), foram utilizados 3 ensaios, cada um avaliando um tipo de efluente a ser utilizado na diluição da vinhaça: (I) vinhaça biodigerida, (II)-vinhaça biodigerida tratada com Fenton e (III)-vinhaça biodigerida tratada com coagulação/floculação + Fenton.

As concentrações de COT, no início do ensaio dos testes metanogênicos, foram de 8394 mg L<sup>-1</sup>, 6371 mg L<sup>-1</sup> e 6125 mg L<sup>-1</sup> para os ensaios (I), (II) e (III), respectivamente e, após 15 dias de testes os valores diminuíram para 2689 mg L<sup>-1</sup>, 1890 mg L<sup>-1</sup> e 1126 mg L<sup>-1</sup>.

Os valores de produção de biogás e concentração de biogás não foram obtidos devido a falha nos sensores de obtenção dos dados. Porém, a avaliação do material orgânico inicial e removido foi realizada. O teste com maior eficiência foi com a vinhaça

biodigerida tratada com coagulação/floculação + Fenton (III), alcançando remoção de COT de 81,6 % e 82,0% para a DQO<sub>total</sub>, indicando melhor biodegradabilidade.

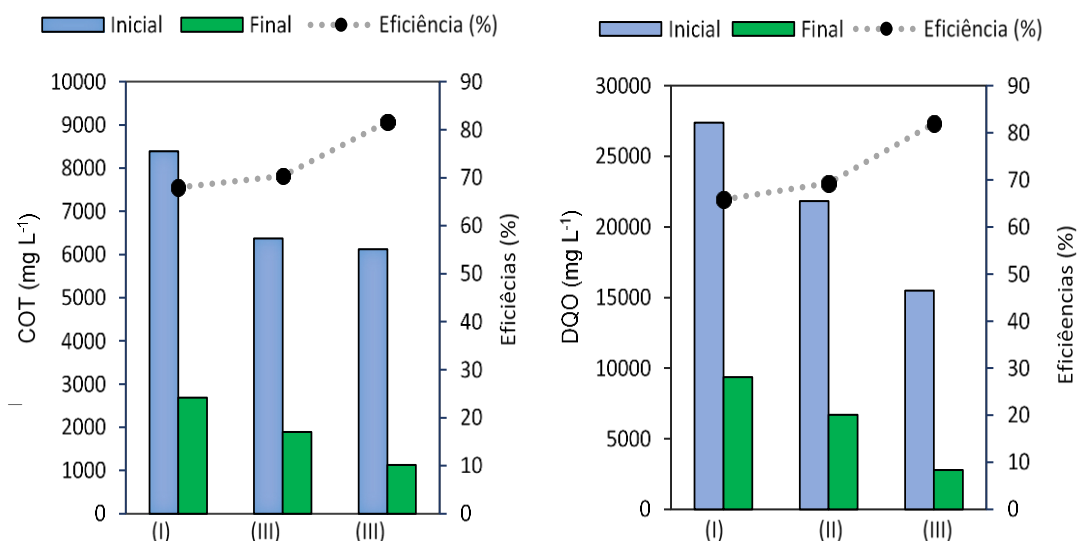


FIGURA 39. Valores médio de DQO e COT obtidos em cada teste no início (t = 0) e no final (t = 15 dias) avaliando a diluição de 3 tipos de efluentes com a vinhaça bruta: (I) vinhaça biodigerida, (II) vinhaça biodigerida tratada com Fenton e (III) vinhaça biodigerida tratada com coagulação/floculação + Fenton.

## 6. CONCLUSÃO

A digestão anaeróbia termofílica em reatores UASB em série com suplementação de torta de filtro e recirculação de efluentes contribuiu para o aumento da conversão anaeróbia da vinhaça, com elevadas produções de metano em condições de estabilidade. No sistema termofílico foram observadas elevadas produções volumétricas de metano com altas COV aplicadas ( $45 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$  no TR1 e  $49 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$  no TR2).

Os três filos bacterianos mais abundantes, no sistema termofílico, foram Thermotogae, Firmicutes e Bacteroidetes. As arqueias metanogênicas mais abundantes foram Methanobacteriales e Methanosarcinales, e *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* foram os gêneros dominantes no sistema termofílico, indicando que a principal via de produção de metano foi a hidrogenotrófica.

No sistema mesofílico, composto pelos reatores UASB em série (MR1 e MR2) com suplementação de torta de filtro e recirculação de efluentes, também foram observadas elevadas produções de metano em condições de estabilidade. O melhor desempenho do processo foi observado com aplicações de COV de  $33 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$  no MR1 e  $40 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$  no MR2, resultando em elevada produção volumétrica de metano.

Os filos bacterianos mais abundantes, no sistema mesofílico, foram o Bacteroidetes e o Chloroflexi. As arqueias *Methanosaeta* foram mais abundantes no sistema mesofílico, cuja principal via de produção de metano foi a acetoclástica.

A configuração dos reatores em série e a recirculação do efluente, nos sistemas termofílicos e mesofílicos, contribuíram para o aumento da conversão anaeróbia da vinhaça a metano e para a estabilidade do processo, e as maiores concentrações de metano no biogás ocorreram no MR2 e TR2 - segundo estágios dos sistemas mesofílicos e termofílicos.

No tratamento químico da vinhaça biodigerida, a combinação dos dois processos (coagulação/floculação seguida da reação de Fenton) atingiu eficiência de remoção global de COT = 73,4%, DQO = 81,1%, DBO<sub>5</sub> = 57,3%, N = 59,9%, P = 29,5%, ST = 86,0% e SSV = 91,1%. Esta estratégia gerou um efluente não tóxico e melhorou consideravelmente a biodegradabilidade (de 0,19 a 0,44 antes e depois do tratamento,

respectivamente); a turbidez foi substancialmente reduzida (de 1200 a 3,6 NTU – 99,7% de redução). As eficiências obtidas com a combinação de processos foram ligeiramente maiores às alcançadas no tratamento da vinhaça biodigerida com apenas a oxidação de Fenton; além disso, com utilização da combinação (coagulação/floculação com oxidação de Fenton), menos peróxido de hidrogênio foi necessário (diminuindo de 26,5 para 10,3 g L<sup>-1</sup>), o que reduz o custo de produtos químicos.

O teste metanogênico com maior eficiência foi com a vinhaça biodigerida tratada com coagulação/floculação + Fenton (III), com remoção de COT de 81,6 % e 82,0% para a DQO<sub>total</sub>, indicando que a recirculação nos reatores anaeróbios pode resultar em melhor desempenho e maior produção de biogás.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRING, B. K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 43, p. 559, 1995.
- AKUZAWA, M., HORI, T., HARUTA, S. ET AL. Distinctive Responses of Metabolically Active Microbiota to Acidification in a Thermophilic Anaerobic Digester. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 595, 2011.
- ALMEIDA JÚNIOR, A. B. et al. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 1004–1013, 2011.
- ALPHENAAR, P. A. et al. Phosphorus Requirement in High-Rate Anaerobic Wastewater Treatment. v. 27, n. 5, p. 749–756, 1993.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, C. **Tratamento de Águas de Abastecimento**. 2ª Edição ed. Porto: Publindústria, 2007.
- AMAT, S. et al. **Decolorization and COD reduction of wastewater from ethanol production by Fenton oxidation**. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. **Anais...**Chiang Rai, Thailand.: 2014
- AMORIM, H. A. **Digestão Anaeróbia de resíduos gerados na FEUP: Relva e Glicerol Helder**. [s.l.] 2015. 89 f. Dissertação para obtenção (Engenharia do Ambiente), Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto., 2015.
- ARIMI, M. M. et al. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 34–43, Feb. 2014.
- ARSLAN, I.; TUHKANEN, T. Oxidative treatment of simulated dyehouse effluent by uv and near-uv light assisted Fenton's reagent. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2767–2783, 1999.
- BARROS, V. G. DE. **Conversão anaeróbia de vinhaça e melão em reatores uasb inoculados com lodo granulado**. [s.l.] 2013. 69 f. Dissertação( Mestre em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterináriasde Jaboticabal, SP, 2013.
- BARROS, V. G. DE; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. DE. Biomethane production from vinasse in UASB reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 1–12, 2016.

BERMÚDEZ-PENABAD, N.; KENNES, C.; VEIGA, M. C. Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids. **Waste Management**, v. 68, p. 96–110, 2017.

BIGDA, R. J. Consider Fenton's Chemistry for Waster water Treatment. **Chemical Engineering and Processing**, v. 91, p. 62–66, 1995.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. DE. Tratamento anaeróbio de águas residuárias do beneficiamento de café por via úmida em reatores UASB em dois estágios. **Engenharia Agrícola**, v. 28, n. 2, p. 364–377, 2008.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. DE. Performance of Uasb Reactors in Two Stages Followed By Post-Treatment With Activated Sludge in Wastewater Batch of Wet-Processed Coffee. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 4, p. 808–819, 2013.

CAMARILLO, R.; RINCÓN, J. Effect of inhibitory compounds on the two-phase anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. **Chemical Engineering Journal**, v. 193-194, p. 68–76, Jun. 2012.

CAÑIZARES, P. et al. The pH as a key parameter in the choice between coagulation and electrocoagulation for the treatment of wastewaters. **Journal of hazardous materials**, v. 163, p. 158–164, 2009.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2011.

CARLIER, J. et al. novel member of the family Veillonellaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 983–986, 2002.

CAVALCANTI, P. F. F. et al. Excess sludge discharge frequency for UASB reactors. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 211–219, 1999.

CHENG, H. et al. Metabolic flux network analysis of fermentative hydrogen production : Using Clostridium tyrobutyricum as an example. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 233–239, 2013.

CHERNICHARO, C. A. DE L. **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico em águas residuárias**. 2. ed ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG; 2007., 2007.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste management (New York, N.Y.)**, v. 33, n. 12, p. 2752–61, Dec. 2013.

DE LEMOS CHERNICHARO, C. A. Anaerobic Reactors. **Water Intelligence Online**, v. 6, 1 Jan. 2007.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 992–998, 2011.

DEMIREL, B.; YENIGÜN, O. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1201–1208, 2006.

DESVIGNES, V. et al. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **International Society for Microbial Ecology**, v. 3, p. 700–714, 2009.

DIAS, M. F. **Análise da comunidade microbiana em sistema de tratamento de biogás com elevadas concentrações de sulfeto**. [s.l.] 2015. 75 f. Dissertação (Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, MG, 2015.

DIAS, M. F. et al. Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. **Bioresource technology**, v. 205, p. 58–66, 2016.

DJAO, O. D. N. et al. Complete genome sequence of Syntrophothermus. **Standards in Genomic Sciences**, v. 3, p. 267–275, 2010.

DOHRMANN, A. B. et al. Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1991–2004, 2011.

DOLEJS, P. et al. Journal of Water Process Engineering Effect of psychrophilic temperature shocks on a gas-lift anaerobic membrane bioreactor ( GI-AnMBR ) treating synthetic domestic wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 16, p. 108–114, 2017.

DOLL, M. M. R.; FORESTI, E. Effect of the sodium bicarbonate in the treatment of vinasse in AnSBBR operated at 55 and 35 degrees C. **Engenharia Sanitaria E Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 275–282, 2010.

DUDA, R. M. et al. balanced microbiota efficiently produces methane in a novel high-rate horizontal anaerobic reactor for the treatment of swine wastewater. **Bioresource technology**, v. 197, p. 152–160, 2015.

EASTON, J. R. **The dye maker's view, in Colour in Dyehouse Effluent**. Oxford: Society of Dyers and Colourists, The Alden Press, 1995.

ECKENFELDER, W. W. J. **Industrial water pollution control**. 3ª Ed ed. Singapore: McGraw-Hill, 2000.

ESPAÑA-GAMBOA, E. I. et al. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 82, 2012.

EYKELBOSH, A. J. et al. Biochar from sugarcane filtercake reduces soil CO<sub>2</sub> emissions relative to raw residue and improves water retention and nutrient availability in a highly-weathered tropical soil. **PLo ONEs**, v. 9, n. 6, 2014.

FARIA, A. A. A. **Fermentação metanogênica mesofílica de melaço e termofílica de vinhaça em reatores UASB**. [s.l.] 2014. 59 F. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2014.

FERRAZ JR, A. D. N. A. et al. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245–252, 2016.

FU, S. et al. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017.

GARRITY, G. M. et al. Phylum BVIII. Nitrospirae phy. nov. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. [s.l.: s.n.]. v. 1p. 457–460.

GENENA, A. K. **Tratamento de efluente agroindustrial contendo compostos persistentes por meio dos processos de coagulação-floculação, fenton, foto-fenton, foto-peroxidação e ozonização**. [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GEORGE, P. A. O. et al. Residue from sugarcane juice filtration (filter cake): Energy use at the sugar factory. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 4, p. 407–413, 2010.

GILPAVAS, E.; DOBROSZ-GÓMEZ, I.; ANGEL GÓMEZ-GARCÍA, M. Coagulation-flocculation sequential with Fenton or Photo-Fenton processes as an alternative for the industrial textile wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 191, p. 189–197, 2017.

GRESES, S. et al. Microbial community characterization during anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. under mesophilic and thermophilic conditions. **Algal Research**, v. 27, p. 121–130, 2017.

GUARIZ, C. S. L. **Desempenho de reatores uasb em série no tratamento de águas residuárias de atividades agropecuárias**. [s.l.] 2013. 158 p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal., 2013.

GUERREIRO, L. F. et al. Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation / flocculation and Fenton's oxidation. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 237–248, 2016a.

GUERREIRO, L. F. et al. Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 237–248, 1 Oct. 2016b.



GUO, X. et al. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 420–428, Jan. 2014.

GUPTA, R. S.; BHANDARI, V. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Thermotogae and its subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, p. 1–34, 2011.

HADAVIFAR, M. et al. Fenton and photo-Fenton treatment of distillery effluent and optimization of treatment conditions with response surface methodology. **JAsia-Pac. J. Chem. Eng.**, v. 5, n. June 2009, p. 454–464, 2010.

HAHNKE, S. et al. Complete genome sequence of the novel Porphyromonadaceae bacterium strain ING2-E5B isolated from a mesophilic lab-scale biogas reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 34–36, 2015.

HAN, Y. et al. Residue levels of five grain-storage-use insecticides during the production process of sorghum distilled spirits. **Food Chemistry**, v. 206, p. 12–17, Sep. 2016.

HAO, J.; WANG, H. Volatile fatty acids productions by mesophilic and thermophilic sludge fermentation : Biological responses to fermentation temperature. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 367–373, 2015.

HEJNFELT, A.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 8, p. 1046–1054, 2009.

HONDA, T.; FUJITA, T.; TONOUCI, A. Aminivibrio pyruvatiphilus gen. nov., sp. nov., an anaerobic , amino-acid-degrading bacterium from soil of a Japanese rice field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2013, p. 3679–3686, 2013.

HSUEH, C. L. et al. Degradation of azo dyes using low iron concentration of Fenton and Fenton-like system. **Chemosphere**, v. 58, p. 1409–1414, 2005.

JABARI, L. et al. Bacterial ecology of abattoir wastewater treated by an anaerobic digester. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47, n. 1, p. 73–84, Jan. 2016.

JANGPUANGSEE, R. et al. **Decolorization of Sugarcane Molasses Vinasse by Hydrogen Peroxide with Heat**. 4th Internacional Engineering Conference. **Anais...**japão: 2012

JANKE, L. et al. Optimization of hydrolysis and volatile fatty acids production from sugarcane filter cake: Effects of urea supplementation and sodium hydroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 235–244, 2015.

JANKE, L. et al. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 10–20, 2016a.

JANKE, L. et al. Comparison of start-up strategies and process performance during semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane filter cake co-digested with bagasse. **Waste Management**, v. 48, p. 199–208, 2016b.

KAPARAJU, P.; SERRANO, M.; ANGELIDAKI, I. Optimization of biogas production from wheat straw stillage in UASB reactor. **Applied Energy**, v. 87, n. 12, p. 3779–3783, 2010.

KARAKASHEV, D. et al. Acetate Oxidation Is the Dominant Methanogenic Pathway from Acetate in the Absence of Methanosaetaceae. v. 72, n. 7, p. 5138–5141, 2006.

KASTER, A. et al. More Than 200 Genes Required for Methane Formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> and Energy Conservation Are Present in Methanothermobacter marburgensis and Methanothermobacter thermautotrophicus. **Archaea**, v. 2011, n. 1, p. 23, 2011.

KHAN, A. W. et al. Degradation of cellulose by a newly isolated mesophilic anaerobe, Bacteroidaceae family. **FEMS Microbiology Letters**, v. 7, n. 1, p. 47–50, 1980.

KOUGIAS, P. G. et al. Anaerobe A novel archaeal species belonging to Methanoculleus genus identified via de-novo assembly and metagenomic binning process in biogas reactors. **Anaerobe**, v. 46, p. 23–32, 2017.

LAIME, E. M. O. et al. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça : uma revisão Technological possibilities for the disposal of vinasse : a review. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, p. 16–29, 2011.

LEE, D. H.; ZO, Y. G.; KIM, S. J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3112–3120, 1996.

LEE, S. et al. Distribution and abundance of Spirochaetes in full-scale anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 25–32, 2013.

LEE, S. et al. Evidence of syntrophic acetate oxidation by Spirochaetes during anaerobic methane production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 543–549, 2015.

LEITE, A. F. et al. Improved monitoring of semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane waste: Effects of increasing organic loading rate on methanogenic community dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23210–23226, 2015.

LEME, R. M.; SEABRA, J. E. A. Technical-economic assessment of different biogas upgrading routes from vinasse anaerobic digestion in the Brazilian bioethanol industry. **Energy**, 2016.

LI, Y. et al. Bioresource Technology Enhancement of anaerobic methanogenesis at a short hydraulic retention time via bioelectrochemical enrichment of hydrogenotrophic methanogens. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 505–511, 2016.

LIER, J. B. VAN. Limitations of thermophilic anaerobic wastewater treatment and the consequences for process design. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, n. 1, p. 1–14, 1996.

LIN, P. et al. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium* : Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 1728–1735, 2007.

LIN, Q. et al. Bioresource Technology Temperature affects microbial abundance , activity and interactions in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 228–236, 2016.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171–189, 2008.

LIU, Z. et al. Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 152–159, 2015.

LUEDERS, T.; POMMERENKE, B.; FRIEDRICH, M. W. Stable-Isotope Probing of Microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits : Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5778–5786, 2004.

LUNEDO, R. et al. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize- or sorghum-fed broiler chickens using real-time PCR. **British poultry science**, v. 55, n. 6, p. 795–803, Jan. 2014.

LUO, J. et al. ScienceDirect Characterization of the archaeal community fouling a membrane bioreactor. **JES**, v. 29, p. 115–123, 2014.

MA, J. et al. Maximum removal rate of propionic acid as a sole carbon source in UASB reactors and the importance of the macro- and micro-nutrients stimulation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3477–3482, 2009.

MAESSCHALCK, C. DE et al. Isolated from the chicken caecum , and reclassification of *Streptococcus pleomorphus* ( Barnes et al . 1977 ), *Eubacterium bifforme* ( Eggerth 1935 ) and *Eubacterium cylindroides* ( Cato et al . 1974 ) as *Faecalicoccus pleomorphus* comb . nov ., *Holdemanella* b. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3877–3884, 2014.

MAKUL, N.; SUA-IAM, G. Characteristics and utilization of sugarcane filter cake waste in the production of lightweight foamed concrete. **Journal of Cleaner Production**, v. 126, p. 118–133, 2016.

MARIANO, A. P. et al. Butanol production in a first-generation Brazilian sugarcane biorefinery: technical aspects and economics of greenfield projects. **Bioresource technology**, v. 135, p. 316–23, May 2013.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, p. 10–12, 2011.

MARTÍNEZ, M. A.; ROMERO, H.; PEROTTI, N. I. Two amplicon sequencing strategies revealed different facets of the prokaryotic community associated with the anaerobic treatment of vinasses from ethanol distilleries. **Bioresource technology**, v. 153, p. 388–92, Feb. 2014.

MASPOLIM, Y. et al. The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. **Bioresource technology**, v. 190, p. 289–298, 2015.

MAVROMATIS, K. et al. Complete genome sequence of the moderate thermophile *Anaerobaculum mobile* type strain (NGAT). **Standards in Genomic Sciences**, v. 8, p. 47–57, 2013.

MAZARELI, R. C. DA S. et al. Anaerobic co-digestion of vegetable waste and swine wastewater in high-rate horizontal reactors with fixed bed. **Waste Management**, v. 52, p. 112–121, 2016.

MENG, X. et al. Methane production and characteristics of the microbial community in a two-stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1050–1059, 2017.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse**. 2<sup>a</sup> Ed. ed. New York: McGraw – Hill, 2003.

MOERTELMAIER, C. et al. Fatty acid metabolism and population dynamics in a wet biowaste digester during re-start after revision. **Bioresource technology**, v. 166, p. 479–484, 2014.

MORAES, B. S. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825–835, Jan. 2014.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, Apr. 2015.

MORAIS, L. C. D. P. **Avaliação da tratabilidade de efluentes da indústria de curtumes por oxidação química e biológica**. [s.l.] 2005. 257 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2005.

MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; WATANABE, Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 144–149, 2012.

MOTA, V. T.; SANTOS, F. S.; AMARAL, M. C. S. Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: assessment on biological activity and filtration performance. **Bioresource technology**, v. 146, p. 494–503, Oct. 2013.

OLIVEIRA, R. A. DE. **Efeito da concentração de sólidos suspensos do afluente no desempenho e características do lodo de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo tratando águas residuárias de suinocultura.** [s.l.] 1997. 359 f. (vol. I e II). Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997., 1997.

ORTEGÓN, G. P. et al. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **The Science of the total environment**, v. 539, p. 410–9, 1 Jan. 2016.

PALIWAL, V.; PURANIK, S.; PUROHIT, H. J. Integrated perspective for effective bioremediation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 903–924, 2012.

PANDIT, P. D. et al. Mining of hemicellulose and lignin degrading genes from differentially enriched methane producing microbial community. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 923–930, 2016.

PANKRATOV, T. A. et al. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan- and laminarin-degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic Sphagnum peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2007, p. 2349–2354, 2007.

PAP, B. et al. Bioresource Technology Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 375–380, 2015.

PARNAUDEAU, V. et al. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource technology**, v. 99, p. 1553–1562, Apr. 2008.

PRADO, R. D. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, 2013.

PRUESSE, E. et al. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

REN, J. et al. Performance and microbial community dynamics in a two-phase anaerobic co-digestion system using cassava dregs and pig manure. **Bioresource technology**, v. 155, p. 342–351, 2014.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. **Journal - Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, 1 May 1986.

RIZVI, H. et al. Start-up of UASB reactors treating municipal wastewater and effect of temperature/sludge age and hydraulic retention time (HRT) on its performance. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 780–786, 2014.

RODRIGUES, C. S. D. et al. Combination of chemical coagulation , photo-Fenton oxidation and biodegradation for the treatment of vinasse from sugar cane ethanol distillery. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 3634–3644, 2017.

RODRIGUES, C. S.; DEUS. **Textile Dyeing Dy ing Wastewater Treatment by Single and Integrated Processes of Coagulation , Chemical Oxidation and Biological Degradation**. [s.l.] 2013. 295 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ambiente) - Faculdade de Engenharia e Universidade do Porto, Portugal, 2013.

RODRIGUES, I. J. et al. Coagulation–flocculation of anaerobically treated sugarcane stillage. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 22-24, p. 4111–4121, 3 Jul. 2014.

SANTANA JR, A. E. **Produção de metano e melão em reatores UASB termofílicos, em dois estágios**. [s.l.] 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal., 2013.

SAPLA, R. B. **Tatamento físico químico da vinhaça de destilaria de etanol com biopolímero à base de cálcio**. [s.l.] 2012. f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Programa de Engenharia Hidráulica e Saneament) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHMIDT, T. et al. Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage - Optimization of metal dosing. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 80–85, 2014.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 2011.

SENTÜRK, E.; INCE, M.; ENGIN, G. O. Treatment efficiency and VFA composition of a thermophilic anaerobic contact reactor treating food industry wastewater. **Journal of hazardous materials**, v. 176, n. 1-3, p. 843–8, 15 Apr. 2010.

SEYBOTH, K.; SVERRISSON, F.; APPAVOU, F.; BROWN, A.; EPP, B.; LEIDREITER, A.; LINS, C.; MUSOLINO, E.; MURDOCK, H.E.; PETRICHENKO, K.; FARRELL, T.C.; KRADER, T.T.; TSAKIRIS, A.; SAWIN, J.L.; SKEEN, J.; SOVACOOOL, B., 2016. **Renewables Global Status Report**. Global Status Report, 2016

SI, B. et al. Towards biohythane production from biomass : Influence of operational stage on anaerobic fermentation and microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4429–4438, 2016.

SINGH, R. .; KUMAR, S.; OJHA, C. S. . Nutrient requirement for UASB process: a review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 1, p. 35–54, Feb. 1999.

SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S. G.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogas production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 48, n. 13, p. 1707–1716, 2013.

SONG, M.; SHIN, S. G.; HWANG, S. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S23–S28, Jan. 2010.

SOUSA, D. Z. et al. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 60, p. 252–265, 2007.

SOUZA, M. E.; FUZARO, G.; POLEGATO, A. R. Thermophilic Anaerobic Digestion of Vinasse in Pilot Plant UASB Reactor. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 7, p. 213–222, 1 Apr. 1992.

SPEECE, R. E. **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters**, *Archae Press*, Tennessee, USA, p.393. 1996.

ST-PIERRE, B.; WRIGHT, A. G. Comparative metagenomic analysis of bacterial populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 2709–2717, 2014.

SU, X. et al. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2986–2991, 2014.

SUNDBERG, C. et al. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. v. 85, n. October, p. 612–626, 2013.

SZPYRKOWICZ, L.; JUZZOLINO, C.; KAUL, S. N. A comparative study on oxidation of disperse dyes by electrochemical process, ozone, hypochlorite and fenton reagent. **Water Research**, v. 35, p. 2129–2136, 2001.

THANH, P. M. et al. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion : A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 2, p. 122–136, 2016.

UNICA. **UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE. AÇÚCAR. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2014/2015**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 20 feb. 2016.

UNICA. **União da Indústria de Cana de Açúcar. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2016/2017**. Disponível em: <[www.unica.com.br/unicadata](http://www.unica.com.br/unicadata)>. Acesso em: 2 feb. 2017.

VACCARI, G. et al. Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. **Journal of Cleaner Production**, v. 13, n. 5, p. 499–507, Apr. 2005.

VAN CLEEF, E. H. C. B. et al. Crude glycerin changes ruminal parameters, in vitro greenhouse gas profile, and bacterial fractions of beef cattle. **Livestock Science**, v. 178, p. 158–164, 2015.

VAN HAANDEL, A. et al. Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1751–1759, 2014.

VAN HAANDEL, A.; LETTINGA, G. **Anaerobic Sewage Treatment: A Practical Guide for Regions with a Hot Climate**. Chichester, UK: John Wiley and Sons, 1994.

VAN LIER, J. B. **Thermophilic Anaerobic Wastewater Treatment ; Temperature Aspects and Process Stability**. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1995.

VENKATA MOHAN, S. et al. Firmicutes with iron dependent hydrogenase drive hydrogen production in anaerobic bioreactor using distillery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8234–8242, 2011.

VIGNESWARAN, S.; VISVANATHAN, C. **Water Treatment Process - Simple Options**. Florida: CRC Press LLC, 1995.

VILLA-MONTOYA, A. C.; FERRO, M. I. T.; DE OLIVEIRA, R. A. Removal of phenols and methane production with coffee processing wastewater supplemented with phosphorous. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1–14, 2016.

VILLA-MONTOYA, A. C.; FERRO, M. I. T.; OLIVEIRA, R. A. DE. Removal of phenols and methane production with coffee processing wastewater supplemented with phosphorous. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2016.



WALLING, C. Fenton's reagent revisited. **Accounts of Chemical Research**, v. 8, n. 4, p. 125–131, 1 Apr. 1975.

WANG, C. et al. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost : new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–17, 2016.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63–102, Aug. 2000.

WINTSCHE, B. et al. Trace Elements Induce Predominance among Methanogenic Activity in Anaerobic Digestion. v. 7, n. December, p. 1–12, 2016.

WIRTH, R. et al. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 41, 2012.

YAMADA, C. et al. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 678–682, 2015.

YAMADA, T. et al. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2006, p. 1331–1340, 2006.

YIN, J. et al. Enhancement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste: Effect of redox potential and inoculum. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 996–1003, 2016.

ZAMANZADEH, M. et al. Anaerobic digestion of food waste e Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. **Water Research**, v. 96, p. 246–254, 2016.

ZHAO, C. et al. *Desulfobaculum xiamenensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Desulfovibrionaceae* isolated from marine mangrove sedimen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2012, p. 1570–1575, 2012.

ZHAO, H. W.; VIRARAGHAVAN, T. Analysis of the performance of an anaerobic digestion system at the Regina wastewater treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 3, p. 301–307, 2004.

ZHONG, J.; STEVENS, D. K.; HANSEN, C. L. Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 45, p. 15470–15476, 2015.

## 8. ANEXO A

Figura A1. Abundância de todos os gêneros principais versus produção volumétrica de metano (a e e), nitrogênio de Kjeldahl (KN) (b e f), fósforo total (Ptotal) (c e g) e ferro (Fe) (d e h) (com abundância relativa sobre  $p < 0,05$  em pelo menos uma amostra). A intensidade de cor (log 10) em cada painel indica a abundância absoluta do gênero em cada amostra. (a a d – bactérias; e a h - arqueias) (Sistema mesófilico).

