

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

**VINHAÇA EM REATORES ANAERÓBIOS
HORIZONTAIS DE ALTA TAXA, EM SÉRIE: EFEITO DO
AUMENTO GRADUAL DAS CARGAS ORGÂNICAS
VOLUMÉTRICAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E NAS
POPULAÇÕES MICROBIANAS**

Aureo Evangelista Santana Junior

Tecnólogo em Biocombustíveis

2018

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

**VINHAÇA EM REATORES ANAERÓBIOS
HORIZONTALS DE ALTA TAXA, EM SÉRIE: EFEITO DO
AUMENTO GRADUAL DAS CARGAS ORGÂNICAS
VOLUMÉTRICAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E NAS
POPULAÇÕES MICROBIANAS**

Doutorando: Aureo Evangelista Santana Junior

Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rose Maria Duda

**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.**

2018

S232v

Santana Junior, Aureo Evangelista

Vinhaça em reatores anaeróbios horizontais de alta taxa, em série: efeito do aumento gradual das cargas orgânicas volumétricas na produção de biogás e nas populações microbianas / Aureo Evangelista Santana Junior. -- Jaboticabal, 2018

92 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Roberto Alves de Oliveira

Coorientadora: Rose Maria Duda

1. Arquéias metanogênicas. 2. Bioenergia. 3. Metano. 4. Recirculação de efluente. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

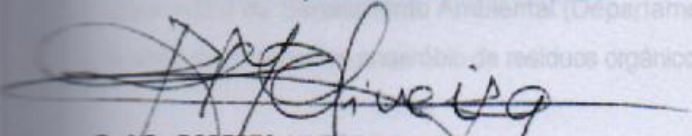
TÍTULO DA TESE: VINHAÇA EM REATORES ANAERÓBIOS HORIZONTAIS DE ALTA TAXA, EM SÉRIE: EFEITO DO AUMENTO GRADUAL DAS CARGAS ORGÂNICAS VOLUMÉTRICAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E NAS POPULAÇÕES MICROBIANAS

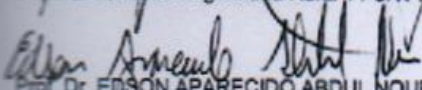
AUTOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA JUNIOR

ORIENTADOR: ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

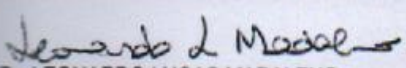
COORDINADORA: ROSE MARIA DUDA

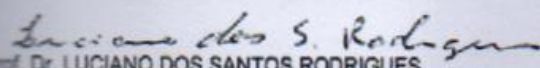
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. EDSON APARECIDO ABDUL NOUR
Departamento de Saneamento e Ambiente / Universidade Estadual de Campinas/SP


Prof. Dr. ARIOVALDO JOSÉ DA SILVA
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP / Campinas/SP


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


Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS RODRIGUES
Universidade Federal de Minas Gerais / Belo Horizonte/MG

Jaboticabal, 06 de agosto de 2018

Dados Curriculares do Autor

Aureo Evangelista Santana Junior – Filho de Aureo Evangelista Santana e Vanete Alves de Souza Santana, nascido em Jaboticabal, no Estado de São Paulo, no dia 24 de agosto de 1984. Graduado em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC) – SP, em julho de 2011. Em agosto de 2011 iniciou o curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, em nível de Mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal - SP no Laboratório de Saneamento Ambiental (Departamento de Engenharia Rural), onde defendeu sua dissertação de mestrado em dezembro de 2013. Em março de 2014, 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), atuando na área de tratamentos anaeróbio de resíduos orgânicos e produção de biogás.

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

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

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

*À Deus, nos momentos mais difíceis, em todas as etapas deste estudo.

*Ao Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira pela orientação, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação ao nível de Doutorado, pelos conselhos, pelas contribuições e pela dedicação à pesquisa.

*À Professora Dra. Rose Maria Duda, que foi uma coorientadora extraordinária, que desde a graduação me incentivou muito a ingressar nessa carreira, por acreditar em mim, fortificando-me frente aos problemas, pelas inúmeras contribuições, pela eterna paciência, convivência, conselhos, pela incansável e insubstituível ajuda.

*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.

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

*Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação pela disposição e ajuda sempre prestada, em especial à Márcia, Branca, Diego, Moyses e Nina pela simpatia e solicitude.

*Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da UNESP – FCAV, pelas disciplinas ministradas e pelo aprimoramento acadêmico.

*Aos Funcionários do Departamento de Engenharia Rural: Ailton, Davi, Luis Cláudio, Maranhão, Marquinho, Primo, Silvia e Tião pela amizade, convivência, conselhos e auxílios prestados.

*Aos amigos Valciney e Guilherme a qual eu tive o prazer de estudar junto na Graduação e no Mestrado, pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração. Também agradeço a Raissa, Eduardo, Alejandra, Luana, Leonardo, Daniele, Daiane, Luan, Wilmar, Kleber, Denis, Jorge, Renata, Amanda e Stella, sentirei muita saudade de vocês! Obrigado pela amizade, companheirismo, ajuda e por todos os bons momentos que passamos juntos.

*Aos Professores e amigos da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC) – SP, em especial à 1ª Turma de 2010 da qual tive o imenso prazer de fazer parte.

*Aos meus pais Aureo e Vanete, meus irmãos Lucas e André, meus sobrinhos Laura e André Junior e toda minha família, que a cada momento e vitória de minha vida, estiveram presentes, pelo apoio, por tudo que fizeram na vida para me proporcionar essa e outras tantas conquistas.

*À Destilaria Pitangueiras pelo fornecimento da vinhaça, tornando possível a realização do experimento.

*Muitíssimo obrigada a todos pela disposição e carinho para que este estudo fosse realizado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
RESUMO	iii
ABSTRAT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Vinhaça de cana - de - açúcar	6
3.2 Bioquímica da Digestão Anaeróbia	8
3.3 Digestão Anaeróbia da vinhaça	10
3.4 Reatores anaeróbios no tratamento de vinhaça	11
3.5 Reatores anaeróbios em dois estágios para tratamento de vinhaça	14
3.6 Reator anaeróbio horizontal com manta de lodo e leito fixo (RAHLF)	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Local	21
4.2 Instalações Experimentais	21
4.3 Substrato	23
4.4 Lodo de inóculo	24
4.5 Condições operacionais do sistema de Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo RAHLF (R1 - 4)	24
4.6 Exames físicos e determinações de constituintes orgânicos e inorgânicos nos afluentes, efluentes, lodo e biogás	26
4.7 Análise estatística	27
4.8 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

5.1	Variações de temperatura durante a operação do sistema de reatores RAHLF.....	29
5.2	pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal	30
5.3	Demanda química de Oxigênio (DQO) e Eficiência de remoção de DQO ...	38
5.4	Produção de metano.....	43
5.5	Macronutrientes e micronutrientes	47
5.6	Sólidos totais e sólidos voláteis.....	55
5.7	Quantificação da microbiota presente nos reatores da fase 5	58
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8	APÊNDICE.....	74
8.1	Partida dos reatores RAHLF com águas residuárias de suinocultura.....	74
8.2	pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal durante a partida dos reatores RAHLF.	74
8.3	Demanda química de oxigênio (DQO) e eficiência de remoção de DQO durante a partida do reatores RAHLF.	76
8.4	Produção de metano durante a partida dos reatores RAHLF.....	77
8.5	Macronutrientes durante a partida dos reatores RAHLF.	77

VINHAÇA EM REATORES ANAERÓBIOS HORIZONTAIS DE ALTA TAXA, EM SÉRIE: EFEITO DO AUMENTO GRADUAL DAS CARGAS ORGÂNICAS VOLUMÉTRICAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS E NAS POPULAÇÕES MICROBIANAS

RESUMO – A importância da recuperação de recursos da vinhaça de cana-de-açúcar para fins de produção de energia associado à sua destinação adequada é uma política pública atual para o setor sucroenergético. Os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) têm vantagens construtivas, econômicas, operacionais e de desempenho no tratamento de efluentes complexos, mas ainda não foram estudados com a vinhaça. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar quatro RAHLF, em série (R1, R2, R3 e R4) no tratamento da vinhaça, com carga orgânica volumétrica (COV) 5 até 45 g DQO_{total} (L d)⁻¹ no R1 e com o uso da recirculação do efluente do R4. Com os RAHLF em série ocorreu estabilidade e, após a primeira entressafra, a retomada do sistema de tratamento, com aumento gradual da COV até valores elevados, foi bem sucedida. A partida do sistema com COV elevada, na segunda entressafra, provocou acidificação dos reatores e com a manutenção da recirculação do efluente a alcalinidade e o pH foram novamente apropriados para a digestão anaeróbia, o sistema foi recuperado e alcançou estabilidade. As maiores remoções de DQO_{total} e produções de metano ocorreram no R1 e R2; no entanto, o R3 e R4 contribuíram para melhorar a estabilidade do sistema e atingir eficiência (60%) e conversão (0,24 L CH₄ (g DQO removida)⁻¹) mais altas sob COV elevada. As produções volumétricas de metano aumentaram com a COV e foram máximas com 20,0 g DQO_{total} (L d)⁻¹ no R1, alcançando valor de 1,07 L CH₄ (L d)⁻¹ no sistema e biogás com 60 a 80% de CH₄. Nestas condições verificaram-se concentrações similares de micro-organismos dos domínios Bacteria e Archaea (10⁸ a 10⁹ cópias do gene 16S rDNA/g SV) indicando situação favorável para o processo anaeróbio. Predominaram arqueias metanogênicas acetotróficas e mixotróficas da ordem Methanosarcinales (10⁷ a 10⁹ cópias do gene 16S rDNA/g SV) seguidas das hidrogenotróficas da ordem Methanomicrobiales (10⁴ a 10⁷ cópias do gene 16S rDNA/g SV) demonstrando que a produção de metano ocorreu por ambas as vias. Para realizar a metanogênese acetotrófica, as maiores concentrações de arqueias, no R1, R2 e R4, foram da família Methanosaetaceae (10⁷ cópias do gene 16S rDNA/g SV).

Palavras-chave: arqueias metanogênicas, bioenergia, digestão anaeróbia, metano, partida de reator anaeróbio, recirculação do efluente.

VINASSE IN HORIZONTAL ANAEROBIC REACTOR OF HIGH RATE, IN SERIES: EFFECT OF GRADUAL INCREASE OF ORGANIC LOADING RATE IN BIOGAS PRODUCTION AND MICROBIAL POPULATIONS

ABSTRACT - The recovery importance of sugarcane vinasse resources for energy production associated with the proper destination is a current public policy for the sucroenergetic sector. Horizontal anaerobic reactors with fixed bed (HARFB) have constructive, economic, operational and performance advantages in the complex effluents treatment, but have not yet been studied with vinasse. Thus, the aim of this work was to evaluate the performance of four HARFB in series (R1, R2, R3 and R4) in the vinasse treatment, with organic loading rate (OLR) gradual increase 5 up to 45 $\text{g}_{\text{total COD}} (\text{L d})^{-1}$ in R1 and effluent recirculation after R4 output. The HARFB in series showed stability and the resumption of the treatment system after first stopping offseason was successful with a gradual increase of OLR to high values. The restart of the system with high OLR, after second offseason stoping, caused acidification of the reactors and, with the effluent recirculation maintenance, alkalinity and pH were again appropriate for anaerobic digestion and the stability was recovered. The highest COD removals and methane productions occurred in R1 and R2; however, R3 and R4 contributed to improve system stability and achieve efficiency (60%) and conversion ($0.24 \text{ L CH}_4 (\text{g COD removed})^{-1}$) highest under high OLR. The volumetric methane production increased with OLR, reaching a value of $1.07 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$ in the system and biogas with 60 to 80% of CH_4 , under highest OLR of $20.0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ in R1. Under these conditions, similar concentrations of microorganisms of the Bacteria and Archaea domains (108 to 109 copies of the 16S rDNA / g VS gene) were found, which indicates a favorable situation for the anaerobic process. The methanogenic acetotrophic and mixotrophic archaeas were predominate - order Methanosarcinales (107 to 109 16S rDNA gene copies / g VS), followed by the hydrogenotrophic - order Methanomicrobiales (104 to 107 16S rDNA gene copies / g VS), demonstrating that the methane production occurred in both pathways. In order to perform acetotrophic methanogenesis, the highest concentrations of archaeas in R1, R2 and R4 were from the Methanosaetaceae family (107 16S rDNA gene copies / g VS).

Keywords: methanogenic archaea, bioenergy, anaerobic digestion, methane, anaerobic reactor start-up, effluent recirculation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI - Alcalinidade intermediária

AP - Alcalinidade parcial

AT - Alcalinidade total

AVT – Ácidos voláteis totais

AGV- Ácidos graxos voláteis

DQO - Demanda química de oxigênio

COV - Carga orgânica volumétrica

Nam - Nitrogênio amoniacal

NK - Nitrogênio Kjeldahl

Ptotal - Fósforo total

pH - Potencial hidrogeniônico

RAHLF - Reator anaeróbio horizontal de leito fixo

ST - Sólidos totais

SV - Sólidos voláteis

TDH - Tempo de detenção hidráulica

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores do volume total e útil, comprimento, tempo de detenção hidráulica (TDH) e velocidades de escoamento horizontal do líquido (velocidade) aplicados nos quatro reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4	23
TABELA 2. Taxa de recirculação do efluente (vinhaça : efluente) em % volume.....	24
TABELA 3. Condições operacionais do sistema de tratamento composto por quatro reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4, nas fases I - VIII.	25
TABELA 4. Exames e determinações, frequência e fontes das metodologias utilizadas para monitorização dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4, nas fases I - VIII.	26
TABELA 5. Valores médios e coeficiente de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a operação dos reatores dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4.	Erro! Indicador não definido.
TABELA 6. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI), no afluente e efluente dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4 no tratamento da vinhaça. ..	33
TABELA 7. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e efluentes e das relações AI/AP dos efluentes, durante a operação dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4 no tratamento da vinhaça .	36
TABELA 8. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da DQO _{total} no afluente (mg L ⁻¹) e efluente, carga orgânica volumétrica (COV) e eficiência de remoção de DQO _{total} (%) durante a operação dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4, no tratamento de vinhaça.	40
TABELA 9. Características do biogás e produção específica de metano nos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4), instalados em série.....	46
TABELA 10. Concentrações (mg L ⁻¹) e eficiência de remoção (%) dos macro nutrientes NK, P - total e K no afluente e efluente dos reatores RAHLF em série (R1, R2, R3 e R4) no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.	48

TABELA 11. Valores médios de macro e micronutrientes, Ca, Fe e Zn, do afluente e efluentes dos reatores RAHLF, em série R1, R2, R3, R4.	51
TABELA 12. Valores médios de macro e micronutrientes, Mg, Cu e Mn do afluente e efluentes dos reatores RAHLF em série (R1, R2, R3 e R4).....	52
TABELA 13. Valores de macro e micronutrientes analisados nos efluentes dos reatores UASB nas fases I - VIII e os valores calculados.	54
TABELA 14. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI), no afluente e efluente dos reatores RAHLF mesofílico em série, R1, R2, R3 e R4.	75
TABELA 15. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da DQO _{total} no afluente e efluente (mg L^{-1}), carga orgânica volumétrica (COV) ($\text{g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$) e eficiência de remoção de DQO _{total} (%) durante a partida dos reatores RAHLF em série, R1,	76
TABELA 16. Concentrações (mg L^{-1}) e eficiência de remoção (%) de macro nutrientes NK, P- total, no afluente e efluente dos reatores RAHLF em série (R1, R2, R3 e R4) durante a partida dos reatores RAHLF.	77

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Fluxograma simplificado e adaptado da produção de açúcar e etanol na indústria sucroenergética. Adaptado de Seabra (2008); Christofolletti et al., (2013).....5
- FIGURA 2. Representação esquemática do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RHALF), em série.....22
- FIGURA 3. Sistema de tratamento composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RHALF) – R1, R2, R3 e R4.....22
- FIGURA 4. Fotos dos anéis de eletroduto corrugado (conduíte) utilizados como meio suporte nos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4).....22
- FIGURA 5. Valores de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a operação dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4.30
- FIGURA 6. Valores de pH, alcalinidade total (AT) e parcial (AP) no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4, tratando vinhaça.32
- FIGURA 7. Nitrogênio amoniacal (Nam), ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e relações Al/AP dos efluentes durante a operação dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4 no tratamento da vinhaça.....35
- FIGURA 8. (A) - Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQOtotal) no sistema total e carga orgânica volumétrica (COV) e (B) Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQOtotal) nos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa39
- FIGURA 9. Produção volumétrica de metano nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), em série, R1, R2, R3 e R4, no tratamento de vinhaça. T: R1 + R2 + R3 + R4.44
- FIGURA 10. (A) Eficiência de remoção de Fósforo (B) Eficiência de remoção de Nitrogênio total kjeldahl nos reatores anaeróbios horizontais (RAHLF) de alta taxa. T: R1 + R2 + R3 + R4.50
- FIGURA 11. Relação de sólidos voláteis e totais (SV/ST), nos 6 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4, P5 e P6 dos reatores RAHLF em série, no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.56

FIGURA 12. Concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV), nos 6 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4, P5 e P6 dos reatores RAHLF em série, no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.....	57
FIGURA 13. Quantificação absoluta do gene 16S rDNA por qPCR dos principais micro-organismos da digestão anaeróbia.....	60
FIGURA 14. Representação esquemática da produção de metano, segundo os dados de qPCR.....	61
FIGURA 15. Valores de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a partida dos reatores RAHLF em série R1, R2, R3 e R4.....	74
FIGURA 16. (A)Valores de pH, (B)alcalinidade total (AT), (C) alcalinidade parcial (AP); no afluente e efluentes dos reatores RAHLF (D) relação Al/AP dos efluentes, (E) ácidos voláteis totais e (F) Nitrogênio amoniacal (Nam) dos afluentes e efluentes durante a partida dos reatores RAHLF.	75
FIGURA 17. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQOtotal) no sistema total e carga orgânica volumétrica (COV).....	76
FIGURA 18. Produção volumétrica de metano observadas nos reatores RAHLF, R1, R2, R3 e R4 e valores de metano observados no biogás. T: R1 + R2 + R3 + R4.....	77

1 INTRODUÇÃO

O esgotamento contínuo dos combustíveis fósseis e o exponencial aumento mundial da demanda de energia, tem estimulado a procura por fontes de energia renováveis (Khan et al., 2017). Nesse cenário, o Brasil se destaca em virtude da produção e uso do etanol de cana-de-açúcar (Moraes et al., 2015). A produção brasileira do biocombustível na safra 2017/18 foi de 27 bilhões de litros (Unica, 2017), e de acordo com a Aliança Global de Combustíveis Renováveis (GRFA) a produção mundial de etanol em 2017 foi de 98 bilhões de litros.

O principal subproduto do processo de produção de etanol é a vinhaça, também conhecida por vinhoto (Janke et al., 2016). Para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 12 L de vinhaça (Leme e Seabra, 2017) e a composição química depende das características do solo, variedade da cana, período da safra e processo industrial usado na produção de etanol (Arimi et al., 2014). Geralmente, a vinhaça tem elevada demanda química de oxigênio (DQO), de 25 a 65 g L⁻¹, pH próximo à 4,0 e temperaturas variáveis em torno de 80°C a 90°C (Wilkie et al., 2000). A vinhaça produzida no Brasil tem sido utilizada diretamente nos campos para substituir parcialmente os fertilizantes minerais, principalmente potássio, durante o cultivo da cana-de-açúcar (Janke et al., 2016), sendo aplicada no solo utilizando as especificações da Norma Técnica P 4.231\2015 (Cetesb, 2015).

Em virtude do grande volume de vinhaça gerada, juntamente com a preocupação em reaproveitar esse subproduto, tem se impulsionado estudos sobre tecnologias para o tratamento, visando oferecer soluções economicamente viáveis para a indústria e sustentáveis para o meio ambiente. Entre essas tecnologias destaca-se a digestão anaeróbia, em que o material orgânico da vinhaça pode ser convertido em metano, por meio da ação de micro-organismos anaeróbios. A vinhaça biodigerida, após o tratamento nos reatores anaeróbios, poderá ser utilizada com muito mais segurança na aplicação no solo, em virtude da redução do material orgânico e da baixa redução de nutrientes (Wilkie et al., 2000).

A aplicação da biodigestão representa um método eficiente para reduzir a carga orgânica poluidora e recuperar a bioenergia da vinhaça. (Fuess et al., 2018), assim integração da digestão anaeróbia para o tratamento da vinhaça diversificaria

os produtos das indústrias sucroenergéticas (Janke et al., 2016), mas de acordo com Leng et al., (2017) os grandes desafios globais para a produção de energia e proteção do meio ambiente, exigem que a digestão anaeróbia seja maximizada, melhorando a eficiência.

Uma alternativa para melhorar as condições ambientais para os micro-organismos e diminuir as limitações da digestão anaeróbia é a utilização de reatores anaeróbios em série de forma a permitir a estabilidade e a manutenção das condições ideais para cada grupo de micro-organismos envolvidos no processo.

Segundo Nasr et al., (2012) e Urbinati e Oliveira (2014) o tratamento anaeróbio com reatores em série, propicia a melhoria da eficiência do tratamento, maior produção de energia, aumenta a estabilidade e flexibilidade do sistema, permite a aplicação de altas cargas orgânicas e redução do tempo de detenção hidráulico (TDH). Entretanto, são pouco explorados, comparando-se com o processo anaeróbio unitário.

Visando também melhorar o resultado do processo anaeróbio, destaca-se o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), desenvolvido por Zaiat et al., (1994). Neste reator a estabilidade do processo anaeróbio no tratamento de águas residuárias ocorre a partir da retenção da biomassa ativa dentro do reator, por períodos maiores que o tempo de geração das arqueias metanogênicas. Esta nova configuração de reatores é capaz de manter alta concentração de biomassa aderida ao suporte, boas características hidrodinâmicas e tempo de detenção hidráulico relativamente curto para cargas orgânicas elevadas (Santos e Oliveira, 2011).

A utilização de biomassa imobilizada em material suporte tem muitas vantagens em relação à aplicação de células livres ou em suspensão, como a obtenção de concentrações celulares mais altas e elevados tempos de retenção celular, muito superiores ao que se pode obter em sistemas que não utilizam material suporte (Zaiat, 2003). Além disso, o RAHLF possui baixa complexidade estrutural e requer pequenas áreas para a sua instalação (Duda et al., 2015). Mas na literatura observam-se poucas informações sobre o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar utilizando reatores anaeróbios com biomassa imobilizada, pode-se citar como exemplo o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) utilizando como

meio suporte partículas de poliestireno (Siqueira et al., 2013) e reatores anaeróbios de leito empacotado (APBR) (Ferraz Jr. et al., 2014).

A sazonalidade também é citada como dificuldade para a produção de biogás a partir de subprodutos, como a vinhaça de cana-de-açúcar e de tequila (Jáuregui-Jáuregui et al., 2014). Esta sazonalidade exige, normalmente que os reatores anaeróbios fiquem sem receber afluente por longos períodos, na entressafra da cana-de-açúcar, que na região Sudeste do Brasil, vai de dezembro a abril. E nesta condição, de acordo com Hwang et al., (2010), pode induzir mudanças na dinâmica microbiana, principalmente, na fisiologia e na composição da comunidade, afetando o desempenho do processo anaeróbio e diminuindo a eficiência. De acordo com Damianovic et al., (2016), que avaliaram o desempenho a longo prazo (888 dias) de um reator RAHLF alimentado com águas residuais sintéticas, a capacidade dos reatores anaeróbios para suportar longos períodos sem alimentação torna a sua aplicação viável em processos sazonais.

O RAHLF, proposto neste trabalho, foi adaptado para coletar biogás e foram observados resultados promissores no tratamento de águas residuárias de suinocultura (Santos e Oliveira, 2011; Duda et al., 2015), águas residuárias do despolpamento de café por via úmida (Oliveira e Bruno, 2013) e co-digestão de águas residuárias de suinocultura e resíduos vegetais (Mazareli et al., 2016), o que motivou a utilização para a produção de biogás da vinhaça.

Portanto, neste trabalho avaliaram-se quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF – R1, R2, R3 e R4), em série, com carga orgânica volumétrica (COV) crescentes para o tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar e a retomada após a entressafra. A utilização de RAHLF em série para o tratamento da vinhaça com coleta de biogás é inédito na literatura. Assim, como acontece com outros efluentes complexos, a retomada dos reatores anaeróbios após a entressafra da cana-de-açúcar pode configurar-se como dificuldade e ainda é pouco estudada. Sendo assim, este estudo estabelece estratégias interessantes a fim de alcançar estabilidade com altos rendimentos de metano visando a implantação de sistemas em larga escala e a retomada após as entressafras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação do desempenho de quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), em série, para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, quanto a de remoção de matéria orgânica e nutrientes, e a produção de metano durante três safras consecutivas de cana-de-açúcar (2014 a 2016) e a retomada após as entressafras.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da recirculação do efluente no pH, alcalinidade e ácidos voláteis totais quanto a estabilidade dos reatores RAHLF, em série, com o aumento gradual da COV, de 5 a 45 g DQO (L d)⁻¹.
- Avaliar o efeito da utilização de reatores anaeróbios horizontais em série, para a manutenção da estabilidade na produção de biogás e qualidade da vinhaça biodigerida.
- Quantificar utilizando a qPCR (cópias do gene 16S rDNA/ g SV), do domínio bactéria e arqueia, das ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales e das famílias Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae no lodo dos RAHLF, no final da safra de 2015.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O crescimento do processo de industrialização da cana-de-açúcar resultou no aumento da geração de subprodutos com alto teor de material orgânico, como a vinhaça e o melaço. Esses subprodutos podem se tornar uma considerável fonte de energia para a produção de biogás.

A produção de cana-de-açúcar estimada para a safra 2018/2019 é de 626 milhões de toneladas, e a produção de etanol deverá ser de 26 bilhões de litros (Conab, 2018). De acordo com a Aliança Global de Combustíveis Renováveis (GRFA) a produção mundial de etanol em 2017, foi de 98 bilhões de litros. Na (Figura 1), está ilustrado um fluxograma esquemático simplificado do processo de produção do etanol e do açúcar, destacando a geração da vinhaça.

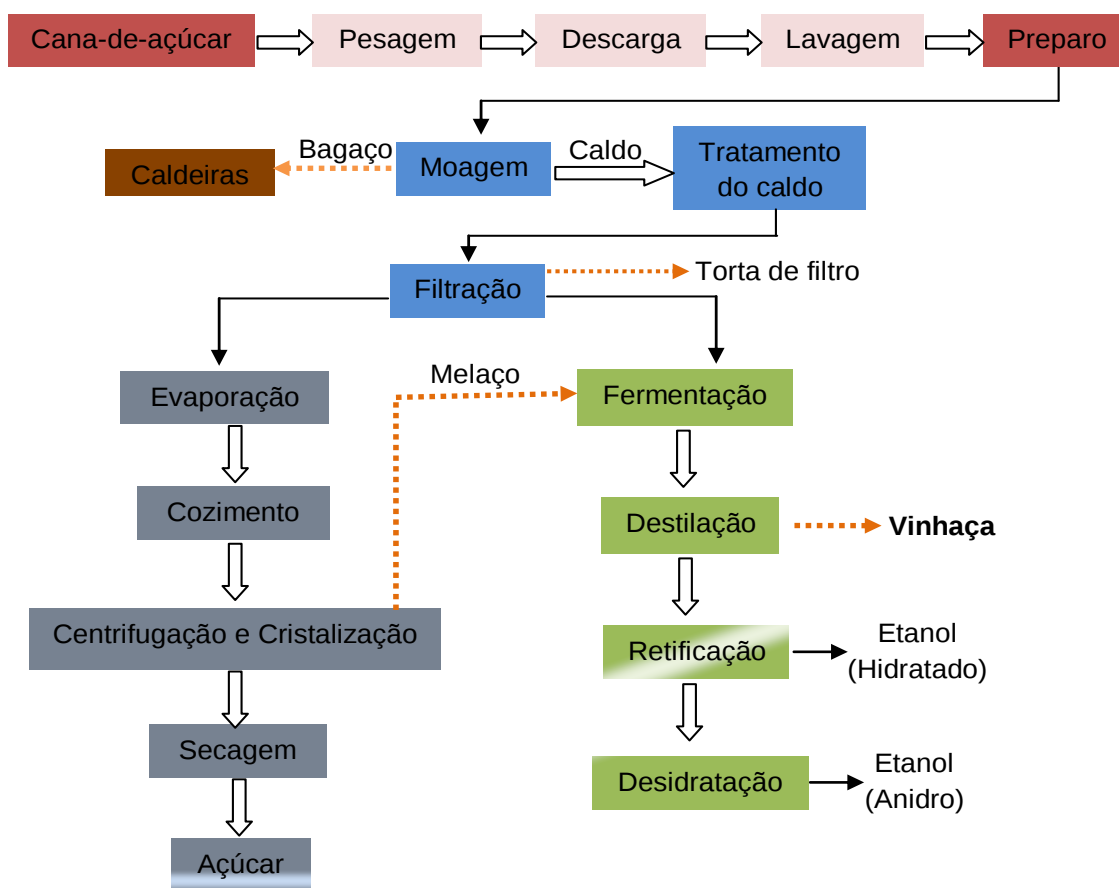


FIGURA 1. Fluxograma simplificado e adaptado da produção de açúcar e etanol na indústria sucroenergética. Adaptado de Seabra (2008); Christofletti et al., (2013).

O uso da vinhaça, subproduto da destilação do etanol, como fertilizante em solos cultivados com cana-de-açúcar é prática comum, sendo aplicada no solo utilizando as especificações da Norma Técnica P 4.231\2015 (Cetesb, 2015).

Mas, a digestão anaeróbia da vinhaça pode ser uma excelente alternativa para a indústria sucroenergética, pois pode resultar na produção de biogás, através da conversão da matéria orgânica presente na vinhaça em metano. Nas usinas, o potencial de energia da vinhaça tende a complementar a energia co-gerada através da combustão do bagaço, e a associação de ambos os processos (digestão anaeróbia + combustão) pode resultar em aumento da capacidade de recuperação de energia média superior a 95%. Assim, o potencial energético dos resíduos gerados no setor tende a compensar, basicamente, todo o consumo de energia dessa cadeia produtiva (Fuess et al., 2014).

3.1 Vinhaça de cana - de - açúcar

A vinhaça é proveniente da fabricação do etanol, composta por aproximadamente 93% de água e 7% de sólidos, dos quais 75% correspondem à matéria orgânica. Entre os elementos minerais presentes na fração sólida, cerca de 20% é K, nutriente determinante para a definição da dose a ser aplicada nos solos (Marques, 2006). Em média gera-se 12 L de vinhaça para cada litro de álcool etílico produzido. Porém sua produção pode variar, dependendo da matéria-prima utilizada e de vários aspectos operacionais do processo de produção do etanol, tais como: sistema usado no preparo do mosto; método de fermentação adotado; sistema de condução da fermentação alcoólica e espécie da levedura utilizada; aparelho utilizado na destilação e modo de destilação adotado (Wilkie et al., 2000). A composição da vinhaça também varia ao longo da época de colheita, principalmente devido à matéria-prima, como a moagem de variedades diferentes de cana-de-açúcar, com diferentes índices de maturação e cultivados em solos com diferentes níveis de fertilidade e ao processo industrial, com as variações do processo de fermentação e destilação. Assim, a vinhaça é considerada efluente complexo dentro do mesmo processo de produção, variando ao longo do tempo de operação (Moraes et al., 2015).

A vinhaça, na maioria, é destinada para fertirrigação nas lavouras de cana-de-açúcar como fonte de nitrogênio-fósforo-potássio (NPK), mas devido ao grande volume gerado, sua disposição nos canaviais envolve altos custos de transporte e não permite uma aplicação adequada, causando danos ao solo e às águas subterrâneas, devido ao alto teor de componentes orgânicos, baixo pH e elevada demanda química de oxigênio (DQO), pode tornar-se um rejeito de alto poder poluidor se não for administrado de maneira correta (Silva et al., 2014; Cortes-Rodríguez et al., 2018). Assim, tem-se notado preocupação no reaproveitamento desse resíduo, impulsionando estudos sobre tecnologias para o tratamento da vinhaça. Entre as possibilidades tecnológicas para o melhor aproveitamento da vinhaça, a digestão anaeróbia tem sido destacada; segundo Moraes et al. (2015), a digestão anaeróbia pode proporcionar vantagens ambientais e energéticas.

Do ponto de vista ambiental, a utilização da digestão anaeróbia reduz o teor de matéria orgânica da vinhaça, mantendo o teor de nutrientes inorgânicos no efluente que sai do processo de digestão anaeróbia (vinhaça biodigerida). Sendo assim, a vinhaça biodigerida pode ser utilizada como fertilizante na cultura da cana-de-açúcar, com menor carga poluente e mantendo a maioria dos nutrientes, como potássio, nitrogênio e fósforo, que são pouco removidos através do metabolismo assimilativo para manutenção celular (Li et al., 2010; Moraes et al., 2014; Moraes et al., 2015).

Do ponto de vista energético, a degradação de materiais orgânicos, resulta na produção de biogás, constituído essencialmente por 60 a 70% de metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2), uma fonte de energia alternativa bastante atraente em virtude do metano presente no biogás (Moraes et al., 2015).

De acordo com (López et al., 2018) as possibilidades de utilização do biogás dependem das necessidades de energia em um cenário produtivo específico: o biogás pode ser queimado diretamente em uma caldeira, pode ser transformado em eletricidade em um motor combinado de calor e energia, pode ser purificado para injeção na rede de gás natural ou pode ser usado no transporte, com essas aplicações, as indústrias sucroenergéticas podem melhorar o balanço energético através da produção de biometano e energia elétrica (Moraes et al., 2015).

(Fuess et al., 2018) apresentou em sua pesquisa uma caracterização composicional detalhada das frações orgânica e inorgânica da vinhaça de cana-de-açúcar, de uma biorrefinaria de grande porte (com capacidade de moagem de $9,3 \times 10^6$ toneladas de cana-de-açúcar (TC)) durante a safra 2014/2015, principalmente em 2014, caracterizadas ao longo de sete meses (maio a dezembro), e os dados composicionais foram utilizados para e estimar o potencial energético do biogás. De acordo com os autores, considerando dados da biorrefinaria de referência ($9,3 \times 10^6$ TC), a eletricidade recuperada do biogás (16.803 MWh para sistemas bifásicos) corresponderia 38,9% do excedente de termoeletricidade produzido a partir do bagaço na usina (300.000 MWh) no mesmo ano de (2014), revelando a aplicação da biodigestão como uma oportunidade direta para aumentar a rentabilidade da planta com vendas de bioenergia, em termos práticos, a eletricidade do biogás poderia fornecer populações de até 305 mil habitantes

durante a colheita. De acordo com Leme e Seabra (2017), que fizeram uma avaliação técnico-econômica de diferentes rotas de melhoramento de biogás a partir da digestão anaeróbia de vinhaça na sucroenergética, independentemente da tecnologia de modernização do biogás, os resultados indicam que a digestão anaeróbia da vinhaça é uma opção promissora para aproveitar o potencial energético da vinhaça e agregar valor à cadeia produtiva da cana-de-açúcar, também concluem que o custo unitário do biometano resultou na mesma faixa de preço que a de alguns combustíveis alternativos, como gás natural e óleo diesel.

3.2 Bioquímica da Digestão Anaeróbia

Uma boa maneira de controlar os efeitos nocivos provocados no meio ambiente pelo uso da vinhaça como fertilizante de canaviais é o processamento deste resíduo. O processo conhecido como digestão anaeróbia tem o poder de aliar a recuperação de energia, como por exemplo o hidrogênio e o metano, sem interferir na qualidade como biofertilizante (Ferraz Jr., 2013).

A digestão anaeróbia é processo complexo, no qual diferentes tipos de micro-organismos atuam simultaneamente na degradação da matéria orgânica. Esse processo é comumente encontrado na natureza, presente em sedimentos de água doce, zonas úmidas e tratos digestivos de animais, gerando o biogás. O biogás é composto principalmente por metano, dióxido de carbono e pequenas quantidades de hidrogênio, nitrogênio e sulfato de hidrogênio.

O processo de digestão anaeróbia tem sido mundialmente estudado, buscando tecnologia sustentável para a geração de biogás a partir de resíduos orgânicos, que é considerado como fonte de energia alternativa ao combustível fóssil (Freire e Cortez, 2000).

Nos últimos anos, por meio de isolamento e cultivo das espécies em condições de laboratório e análises bioquímicas, o processo de digestão anaeróbia foi intensamente investigado. Esses estudos identificaram etapas sequenciais, que podem ser divididos em quatro fases principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese; essas etapas são desencadeadas por consórcio de microrganismos que atuam de forma simbiótica, em que o produto de um grupo é substrato para o outro (Kougias et al., 2017; Chernicharo, 2007)

A hidrólise ocorre pela ação de bactérias fermentativas hidrolíticas. Estas

bactérias secretam para o meio exoenzimas responsáveis pela quebra dos carboidratos, proteínas e lipídeos em açúcares, aminoácidos e ácidos graxos de cadeia longa. A etapa da hidrólise pode ser mais lenta, limitando o processo como um todo da digestão anaeróbia, sendo que os principais fatores associados são: tempo de retenção, temperatura, pH, tamanho e distribuição das partículas (Faria, 2012).

Entretanto, a adição de alguns compostos químicos ao reator pode proporcionar maior rendimento na produção de metano, e isto poderá depender também da composição dos microrganismos que são ativos nesta fase (tipo de substrato contido no sistema). Dentre esses se destacam: - *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*: gêneros produtores de lipases para degradação de lipídeos à ácidos graxos; - *Bacteroides*, *Butyvirio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Peptococcus* e *Bacillus*: gêneros produtores de proteases para degradação de proteínas à aminoácidos; - *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Acetivibrio*, *Eubacterium*: gêneros produtores de amilases para degradação de polissacarídeos à açúcares menores (Soares et al., 2017).

Na segunda etapa, acidogênese, os substratos produzidos na hidrólise são utilizados como fonte de energia pelas bactérias fermentativas acidogênicas, “as quais excretam substâncias simples, como ácidos graxos voláteis de cadeia curta, alcoóis, ácido láctico, compostos minerais (CO_2 , H_2 , NH_3 , H_2S , entre outros), além de novas células bacterianas” (Abreu, 2007; Bohrz, 2010; citado em Soares et al., 2017). Uma pequena porcentagem (1%) destes microrganismos é facultativa, podem usar o oxigênio molecular contingente como aceptor de elétrons, removendo-o do sistema. Tais gêneros se destacam: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* (Soares et al., 2017).

Na terceira etapa, acetogênese, é o momento que ocorre o início da produção de gases pela digestão dos substratos da etapa anterior. Segundo Chernicharo (2007) os gêneros das archaeas acetogênicas encontrados são: *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*. A produção de CO_2 , hidrogênio e ácido acético são essenciais para a última etapa, metanogênese. A metanogênese ocorre pela junção do acetato

com o hidrogênio. A falta de um destes elementos pode comprometer a produção de CH_4 e CO_2 (Shubeita, 2016).

Sendo assim, as metanogênicas são divididas em dois grupos: acetoclásticas e hidrogenotróficas. As acetoclásticas utilizam o acetato como fonte de energia e carbono. Os gêneros mais encontrados são: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Chernicharo, 1997). No entanto, as hidrogenotróficas aproveitam o gás carbônico como fonte de carbono e são aceptoras de átomos de hidrogênio (fonte de energia). Os gêneros mais conhecidos são: *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum* (Bitar, 2003; Morris, 2011; citado em Soares, 2017).

Portanto, é fundamental que exista equilíbrio entre os microrganismos atuantes em cada uma das etapas da digestão anaeróbia associado a adequada operação dos reatores (condições ideais de pH, temperatura, nutrientes, tempo de retenção entre outros fatores), para atingir o sucesso no tratamento residual como também na produção do biogás, fonte de energia limpa e renovável.

3.3 Digestão Anaeróbia da vinhaça

O volume de vinhaça gerado na produção do etanol de cana-de-açúcar é muito alto. Portanto, a busca por tecnologias adequadas para promover a gestão, tratamento e recuperação desse resíduo é um fator determinante para o desenvolvimento ambientalmente sustentável de qualquer planta Pazuch et al., (2017), Em virtude do alto conteúdo orgânico, a vinhaça possui potencial energético significativo que pode ser aproveitado, através da digestão anaeróbia da vinhaça, que é uma alternativa eficaz para reduzir a carga poluente, resultando na redução da DQO de aproximadamente 75%. Além disso, o gás metano produzido no processo pode ser convertido em energia, o que pode contribuir para melhorar o equilíbrio energético na cadeia de produção do etanol e açúcar (Fuess et al., 2014).

O tratamento anaeróbio requer baixas concentrações de nutrientes, o que leva, dessa forma, a conservar os macro (N, P e K) e micro-nutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu e Mg), presentes na vinhaça, gerando efluentes ricos desses constituintes. Isto é vantagem, considerando a possibilidade de usar o efluente na fertirrigação no

próprio canavial, como normalmente se aplica a vinhaça bruta na maioria das destilarias. Além das vantagens que traz para o meio ambiente, o uso de biogás para geração de energia elétrica também auxilia no gerenciamento de resíduos Pazuch et al., (2017), no geral, a aplicação da biodigestão no tratamento da vinhaça proporciona importantes ganhos ambientais e energéticos (Fuess et al., 2018).

Assim, a utilização da tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça na indústria sucroenergética para geração de energia derivada de biogás é atraente.

No entanto, ainda existe uma complexidade dos fatores que interferem no tratamento anaeróbio da vinhaça; portanto, são necessários estudos na área de digestão anaeróbia de vinhaça, buscando alternativas tecnológicas com custos mais baixos e elevado desempenho para aumentar a aplicabilidade da tecnologia (Barros, 2017)

3.4 Reatores anaeróbios no tratamento de vinhaça

Diversas configurações de reatores têm sido destacadas no tratamento anaeróbio da vinhaça como o reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), reator de leito fluidizado, leito fixo, reatores híbridos, entre outros.

Siqueira et al., (2013) avaliaram um reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) utilizando como meio suporte partículas de poliestireno para o tratamento da vinhaça do melaço de cana-de-açúcar. O reator foi submetido a aumento de carga orgânica volumétrica (COV) que variaram de 3,33 a 26,19 g DQO (L d)⁻¹, alcançando eficiência máxima de remoção de DQO_{total} de 70% com uma COV de 13,9 g DQO_{total} (L d)⁻¹. A produção máxima de metano foi de 5,37 L CH₄ (L d)⁻¹ para valores de COV de 25,3 g DQO_{total} (L d)⁻¹ com média de eficiência de remoção de DQO_{total} de 51%.

Boncz et al., (2012) avaliaram o fornecimento de alcalinidade para regulação do pH por meio da dosagem de ureia durante a digestão anaeróbia da vinhaça, utilizando reatores UASB com volume de 0,92 L, sob condições mesofílicas. O reator UASB foi alimentado com vinhaça com concentração de 8 g L⁻¹ de DQO com TDH de 2 d. A partir dos resultados obtidos, os autores avaliaram que uma dosagem de 0,015 g_{urea} / g_{DQO}, complementado com dosagem de bicarbonato, em um sistema

contínuo, pode melhorar a eficiência da digestão anaeróbia da matéria orgânica presente na vinhaça. Entretanto, os mesmos relatam que devem ser tomados cuidados para evitar o excesso, pois, a toxicidade da amônia pode interferir na produção de metano; também relataram que a manutenção do pH do processo abaixo de 7,24, aproximadamente ($> 99\%$) do amoníaco será retido no efluente sob a forma de sais de amônio, que vão ser dispersas nos campos durante a fertirrigação.

Van Haandel et al., (2013) operaram quatro reatores UASB, dois termofílicos a 54°C e dois mesofílicos a 37°C , tratando vinhaça proveniente da produção de cachaça. Todos os reatores tinham volume de trabalho de 23 L, e as COVs máximas alcançadas pelos reatores UASB mesófilos foram de 40 a $50\text{ g DQO (L d)}^{-1}$. Os autores investigaram se a produção de metano poderia ser aumentada por meio de otimização da temperatura e da carga orgânica. Os autores observaram que o desempenho dos reatores termofílicos foram menores que dos reatores mesofílicos para o tratamento anaeróbio da vinhaça, e também foi observado que altas taxas de produção de metano dependem da capacidade em manter uma atividade metanogênica específica elevada no reator. Estas altas taxas de produção de metano abrem a possibilidade de atingir a produção de eletricidade acima de $2\text{ KW m}^{-3}/\text{reator}$, com perspectivas econômicas concomitantes.

Também se observam na literatura estudos que objetivam a produção de hidrogênio a partir da vinhaça como a pesquisa realizada por Ferraz Jr. et al., (2014), que avaliaram a influência da COV aplicada sobre a produção de hidrogênio por meio da variação do TDH. Os autores utilizaram quatro reatores anaeróbios de leito empacotado (APBR) operados em paralelo com volumes totais e líquidos de 3,5 e 2,3 L, respectivamente, em temperaturas termofílicas (55°C), utilizando como meio suporte polietileno de baixa densidade (LDP). As COVs aplicadas foram de 36,4 a $108,6\text{ g DQO (L d)}^{-1}$ e as variações dos TDHs de 8 a 24 h. Com base nos resultados, os autores concluíram que a condição operacional que permite a máxima produção e rendimento de hidrogênio foi com COV de $72,4\text{ g DQO (L d)}^{-1}$ e TDH de 12 h e também verificou que a COV teve forte influência sobre a seleção da população microbiana.

Lazaro et al., (2014) avaliaram as melhores condições para a produção de hidrogênio utilizando diferentes concentrações de vinhaça de cana de açúcar, de 2 a 12 g DQO L⁻¹, nas condições de temperaturas mesofílica (37° C) e termofílica (55° C). O experimento foi realizado utilizando-se de garrafas de vidro com volume útil de 1,2 L e 0,8 L. Os autores verificaram que o aumento na concentração de vinhaça, em testes a 37°C, não impactou significativamente o rendimento de hidrogênio, de 1,72 a 2,23 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{afluente}, mas teve efeito positivo sobre o potencial de produção de hidrogênio. Por outro lado, nos ensaios realizados a 55° C, o aumento na concentração do substrato provocou queda no rendimento de hidrogênio 2,31 a 0,44 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{afluente}. Sendo assim, o autor sugere que para selecionar as condições mais adequadas para esta tecnologia, a relação custo / benefício de resfriamento das águas residuais e uso de altas concentrações devem ser determinadas.

Dos Reis et al., (2015) avaliaram a produção de hidrogênio e metano da vinhaça de cana-de-açúcar em reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF), em temperatura mesofílica. A vinhaça foi adicionada numa proporção de 0% a 100% como fonte orgânica com TDH de 6, 4, 2 e 1 h. De acordo com os autores o CH₄ foi gerado após a vinhaça se tornar a única fonte de carbono e que é possível verificar a viabilidade da produção de biogás a partir da vinhaça de cana-de-açúcar utilizando reatores RALF.

Barros et al., (2016) avaliando a conversão anaeróbia da vinhaça em biometano utilizando dois reatores (UASB), R1 e R2, em temperatura mesofílica e TDH de 2,8 d (R1) e 2,8 – 1,8 d (R2), aplicando COV nos reatores de até 7,5 e 11,5g de DQO_{total} (L d)⁻¹ no R1 e R2. Os autores observaram eficiências de remoção de DQO em torno de 80% e valores médios de produção volumétrica de até 0,938 L CH₄ (L d)⁻¹ com COV de 11,5 g DQO_{total} (L d)⁻¹.

De acordo com Fuess et al., (2017a), experiências em larga escala com a digestão anaeróbia da vinhaça da cana-de-açúcar ainda são escassas no setor sucroenergéticos brasileiro. Portanto, vale a pena aprofundar a pesquisa sobre as opções a serem promovidas para o desenvolvimento da digestão anaeróbia da vinhaça e a indústria do biogás nas destilarias de etanol (Leme e Seabra, 2017).

Segundo (Barros, 2017) destaca-se na literatura a Usina de São Martinho, localizada na região de Ribeirão preto – SP, com reator UASB de 5000 m³ operado em condições termofílicas, o biogás produzido é aplicado para secar a levedura utilizada na fase de fermentação.

3.5 Reatores anaeróbios em dois estágios para tratamento de vinhaça

Outra estratégia para melhorar as condições ambientais para os micro-organismos e diminuir as limitações da digestão anaeróbia é a utilização de reatores anaeróbios em série de forma a permitir a estabilidade e a manutenção das condições ideais para cada grupo de micro-organismos envolvidos no processo. Esses reatores mostraram-se mais eficazes que os reatores convencionais, especialmente no tratamento de efluentes com altas COV e baixo pH, como a vinhaça (Fuess et al., 2017a). Digestores anaeróbios em série foram propostos para fornecer capacidade de tamponamento suficiente e ambiente diverso para diferentes populações microbianas, de modo que as reações de DA pudessem ser operadas de forma estável (Duda et al., 2015). Segundo Nasr et al. (2012) e Urbinati e Oliveira (2014), o tratamento anaeróbio em série propicia a melhoria da eficiência, maior produção de energia, aumenta a estabilidade e flexibilidade do sistema, permite a aplicação de altas cargas orgânicas e redução do tempo de retenção hidráulico (TDH).

Mota et al., (2013) avaliaram o desempenho de um biorreator anaeróbio de membrana submerso em dois estágios (2-SAnMBR) para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar. O sistema foi composto de um reator acidogênico seguido de um biorreator de membrana metanogênico, com volumes de 6,7 L e 24,0 L, respectivamente. Os reatores foram operados durante dois anos com uma COV de 2,5 g DQO (L d)⁻¹. Em seus estudos, os autores verificaram que os reatores atingiram estabilidade e eficácia, alcançando eficiências de remoção de DQO de aproximadamente 97% com teor de metano no biogás do reator metanogênico de 70%.

Tahti et al., (2013) operaram um reator em dois estágios para produção de hidrogênio e metano em condições de temperatura extrema termofílica (70°C).

Obtiveram no reator a acidogênico, operado com tempo de retenção hidráulica (TDH) de 5 horas e carga orgânica volumétrica (COV) de $25,1 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$, rendimento de hidrogênio de $0,73 \text{ mol / mol}$. O metano foi produzido na segunda fase do reator utilizando o efluente do reator de hidrogênio como substrato. O reator metanogênico foi operado com TDH de 13 h e COV de $7,8 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$, e obtiveram produção de metano de $117,5 \text{ ml / g DQO}_{\text{add}}$. Estes resultados provam que o hidrogênio e o metano podem ser produzidos em temperaturas termofílicas extremas.

Buitrón et al., (2014) também avaliaram a viabilidade de um sistema de fermentação em duas fases, composto por um reator SBR para a produção de hidrogênio, seguido de um reator UASB para a produção de metano, utilizando como substrato vinhaça de tequila. Segundo os autores o reator SBR atingiu produção específica de hidrogênio de $918 \text{ ml de H}_2 / \text{g SSV-d}$, na concentração de substrato de $16 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$ com TDH de 6 horas. A produção específica de metano no reator UASB foi de $0,257 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO removida})^{-1}$ com TDH de 24 horas e concentração de substrato de $1636 \text{ mg DQO L}^{-1}$, com eficiência de remoção na DQO de 75%.

Ferraz Jr. et al., (2016) avaliaram o desempenho de reatores operando continuamente tratando vinhaça de cana-de-açúcar, em sistemas de estágio único (UASB I) e em dois estágios (UASB II), com sistema APBR acidogênico e um reator UASB metanogênico, com TDHs de 34 e 23 h e COV de $25 \text{ gDQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$. Os autores observaram remoção de $\text{DQO}_{\text{total}}$ de 60% e 74% e produção específica de metano de $0,250$ e $0,316 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO total removida})^{-1}$ para o UASB I e UASB II. Segundo os autores, a produção de energia do sistema de dois estágios foi 25,7% maior do que o sistema de estágio único, indicando a necessidade da fase acidogênica para melhorar tanto a remoção de matéria orgânica quanto a extração de energia da vinhaça de cana-de-açúcar.

Santos et al. (2017) avaliaram a influência do tempo de detenção hidráulica TDH no desempenho do biorreator de membrana bifásica anaeróbio em dois estágios (2-SAnMBR) tratando vinhaça de cana-de-açúcar, com três diferentes TDHs (5,3; 4,2 e 3,1 dias), em temperatura mesofílica com COV de até $6,0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$. De acordo com os autores, as reduções na TDH não causaram perda no

desempenho, apresentando eficiência média de remoção de matéria orgânica com valores de 97%, com produção de biogás de $6,3 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$ de vinhaça tratada.

3.6 Reator anaeróbio horizontal com manta de lodo e leito fixo (RAHLF)

O tratamento de águas residuárias, que é relacionado aos consórcios microbianos, vem se desenvolvendo e aperfeiçoando, com intuito de melhorar o resultado final do processo (Kuczman et al., 2007). Seguindo essa tendência, uma nova configuração de reator anaeróbio foi desenvolvida em 1994 por Zaiat, que avaliou o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) e o desempenho no tratamento do efluente de indústria de papel reciclado e substrato sintético à base de glicose. As características hidrodinâmicas desta nova geração de reator indicaram que este poderia ser projetado e operado com a finalidade de se prevenir a inibição de atividade de micro-organismos pelo substrato e produtos intermediários (Galavoti, 2003).

O reator (RAHLF), prima pela adoção de artifícios que propiciam maior acúmulo de biomassa ativa (Lima et al., 2005), através da utilização de retenção de biomassa a partir da imobilização de micro-organismos anaeróbios, utilizando meio suporte, favorecendo assim o crescimento do biofilme aderido ao reator (Foresti et al., 1995). Os reatores com células imobilizadas apresentam menores volumes e podem dispensar o uso de decantadores de lodo, bombas de recirculação e leitos de secagem, resultando em substancial economia no processo (Zaiat, 1996).

A utilização de biomassa imobilizada traz muitas vantagens em relação à aplicação de células livres ou em suspensão como a obtenção de concentrações celulares mais altas, além dos altos tempos de retenção celular, muito superiores ao que se pode obter em sistemas com células não aderidas (Zaiat, 2003), resultando assim, em sistemas mais estáveis e controláveis. Como regra geral, a biomassa imobilizada como lodo granular ou aderida a partículas tem apresentado conformação bem estruturada que otimiza a conversão de substrato, e a degradação de produtos metabólicos (Galavoti, 2003).

Entretanto, a escolha do suporte adequado e do método de imobilização é de fundamental importância. Os suportes devem ser resistentes a degradação biológica

e as forças mecânicas, e os métodos de imobilização devem ser simples, para viabilizar operação em escala industrial, também o custo do material deve ser levado em consideração (Galavoti, 2003).

Muitos materiais apresentam, a princípio, potencial para serem utilizados em reatores com biomassa imobilizada tais como carvão e argila expandida (Lima de Oliveira et al., 2009), anéis de bambu (Duda, 2011; Santos, 2009; Oliveira e Bruno, 2013), anéis plásticos de eletroduto conjugado (Lima e Oliveira et al., 2009; Santos, 2009; Duda, 2011; Duda et al., 2015), espuma de poliuretano (Duarte et al., 2010; Damianovic et al., 2016; Fuess et al., 2017).

Fuess et al. (2017) avaliaram a aplicação de digestão anaeróbica com separação de fases formado por um reator APBR acidogênico e um reator ASTBR metanogênico, tratando vinhaça, utilizando como meio suporte para o ASTBR espuma de poliuretano e TDH de 20 h, e verificaram remoção de DQO_{total} superior a 80% na fase metanogênica, com COV de 30 gDQO_{total} (L d)⁻¹.

É importante considerar que os procedimentos de partida dos reatores RAHLF diferem dos procedimentos adotados para outros reatores anaeróbios, enquanto a maioria das configurações de reatores anaeróbios existentes necessita de cuidadosa operação para evitar sobrecargas hidráulicas e orgânicas durante este período. Os reatores RAHLF tem experimentado partidas sob taxas de carregamento constantes, consequentemente, o curto período de partida observado pressupõe a facilidade de aclimação e colonização da biomassa presente no leito fixo (Zaiat, 1997). Tal configuração de reator, apesar de relativamente recente, possui uma boa fundamentação para ser aplicado e existem trabalhos bem sucedidos para variados tipos de efluentes, fontes de carbono e cargas aplicadas.

Zaiat (1996) sugeriu a utilização do RAHLF no tratamento de outras águas residuárias mais complexas, contendo resíduos potencialmente tóxicos ou inibidores da atividade microbiana. Pensando nisso, Colin et al., (2007) utilizando um reator RAHLF, com varetas de bambu como meio suporte, tratando águas residuárias da produção de amido de mandioca, operando com COV de até 11,8 g DQO (L d)⁻¹ e um TDH de aproximadamente 9,5 h, alcançaram produção específica de biogás de 0,36 L (g DQO removida)⁻¹ com concentrações de metano de 69 a 81%.

Foresti et al., (1995) avaliaram o reator RAHLF para tratamento de águas residuárias provenientes da indústria de papel reciclado, o reator foi operado em temperatura média de 23°C, TDH de 9,2 horas e COV de 2,0 g DQO (L d)⁻¹. Os autores observaram que o reator teve um curto tempo de partida de apenas 10 dias que foram necessários para que a estabilidade operacional fosse atingida, obtendo eficiência de remoção de 82%.

Cattony et al., (2005) relataram a operação de um reator RAHLF em temperatura mesofílica de 30°C e TDH de 12 h para avaliar a remoção de tolueno e etanol em condições redutoras de sulfato, utilizando como meio suporte espuma de poliuretano e para promover um ambiente de redução de sulfato, soluções de sulfato ferroso e de sódio (91 e 550 mg / L, respectivamente),. Os autores obtiveram eficiência de remoção de DQO próximo de 90% com uma taxa de degradação máxima de 0,06 mg de tolueno / mg vss / d e redução do sulfato próximos de 99%.

Baraldi et al., (2008) avaliaram o tratamento anaeróbico de pentaclorofenol (PCP) utilizando metanol como fonte de carbono principal em reator RAHLF, que foi alimentado com substrato sintético onde as concentrações de PCP foram aumentadas de 2,0 a 13,0 mg / L, a uma taxa constante de COV de 1,15 g DQO (L d)⁻¹ em temperatura controlada de 30°C, TDH de 24 h e como meio suporte espuma de poliuretano. De acordo com os resultados, os autores observaram que o reator RAHLF mostrou taxas de remoção de 99% de PCP e 98% de matéria orgânica, os mesmos não observaram inibição do processo em resposta ao aumento da concentração de PCP e concluíram que a diversidade microbiana do biofilme é explicada pela combinação de condições operacionais controladas do processo anaeróbico, servindo como base para discussão do reator RAHLF como sistema potencial para a biorremediação em larga escala em áreas contaminadas com compostos clorados.

Duarte et al., (2010) avaliaram a eficiência de um reator RAHLF em temperatura controlada de 30°C e TDH de 12 h na remoção sulfonato alquilbenzeno linear (LAS), o reator foi alimentado com um co-substrato sintético composto de extrato de carne que apresentava DQO de 750 mg L⁻¹ e uma solução de LAS comercial (dodecilbenzenossulfonato de sódio), utilizando como meio suporte espuma de poliuretano. De acordo com os autores o balanço de massa mostrou que

a eficiência de remoção de LAS foi maior na ausência do co-substrato com eficiência de 40%, do que na presença do co-substrato com eficiência de 32%.

Damianovic et al., (2009) operaram dois reatores RAHLF de bancada que foram preenchidos com espuma de poliuretano contendo lodo anaeróbico para o tratamento de água residuária sintética e pentaclorofenol (PCP). As COVs aplicadas foram de 1,1 e 1,7 g DQO (L d)⁻¹, com TDH de 24 e 18 h, para os reatores R1 e R2, respectivamente. Segundo os autores, o desempenho dos reatores RAHLF não foi afetado pelo PCP nas concentrações estudadas, alcançando eficiências de remoção de DQO de 98%.

Santos e Oliveira (2011) tratando águas residuárias de suinocultura com um sistema de tratamento anaeróbico com quatro reatores horizontais em série, com manta de lodo e leito fixo utilizando como meios suporte anéis de bambu, plástico (eletroduto corrugado) e bucha (*Luffa cylindrica*), com TDH de 35 h, conseguiram obter, com estabilidade, altas eficiências de remoção de DQO_{total} acima de 96%, e produções volumétricas de metano 0,52 L CH₄ (L d)⁻¹, com COV 61 g DQO (L d)⁻¹.

Em outro estudo com RAHLF realizado por Borges et al., (2009), verificou-se a viabilidade do uso deste reator no tratamento das águas residuárias do pré-processamento dos frutos do cafeeiro, com COV média de 2,66 g DQO (L d)⁻¹, e obteve a produção teórica de metano equivalente a 13,3 L d⁻¹.

Oliveira e Bruno (2013) avaliaram em estudo a partida de três reatores anaeróbios horizontais com volume de 1,2 L instalados em série para o tratamento de águas residuárias do processamento de frutos do café por via úmida, o primeiro reator com manta de lodo (RAHML) e os outros dois reatores de leito fixo (RAHLF), que foram preenchidos com meios suporte de anéis de bambu e fibra de coco, respectivamente, foram aplicados COVs no R1 de 8,9 a 25,0 g DQO_{total} (L d)⁻¹ com TDH de 30 h para cada reator. Os autores verificaram que foi possível tratar essas águas residuais, alcançando eficiências na remoção de DQO_{total} em torno de 80%, produções volumétricas e específicas metano de 1,50 L CH₄ (L d)⁻¹ e 0,16 L (g DQO_{removido})⁻¹, respectivamente, em condição estável no sistema.

Duda et al., (2015) avaliaram a produção de metano e a microbiota do lodo de quatro reatores anaeróbios horizontais de alta taxa em série para o tratamento de efluentes de suinocultura, o sistema de tratamento foi composto por um reator

anaeróbio horizontal com manta de lodo (RAHML) e três reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF) utilizando como meio suporte eletroduto corrugado (conduíte) com TDHs de 12,0; 6,72; 3,60 e 1,68 h para R1- 4 em temperatura mesofílica, e obtiveram eficiências de remoção DQO de 68% com produção de metano volumétrico $1,03 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$.

Mazareli et al., (2016) avaliaram três reatores RAHLF em série para produção de metano e remoção de matéria orgânica no processo de co-digestão usando como afluente resíduos de vegetais e águas residuais de suínos em diferentes proporções com COV de até $11,0 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$ com TDH de 2,0; 4,5; e 6,5 d para o R1 - 3 respectivamente e utilizando como meio suporte anéis de bambu, em temperatura mesofílica, os autores obtiveram produção volumétrica de metano de $1,08 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$ com taxas de remoção de matéria orgânica de até 98%.

Damianovic et al. (2016) avaliaram o uso potencial do reator anaeróbio horizontal de biomassa imobilizada (RAHLF) para o tratamento de águas residuárias sintéticas, contendo altas concentrações de sulfato e matéria orgânica, utilizando como meio suporte cubos de espuma de poliuretano, em temperatura mesofílica e TDH de 12 h. De acordo com os autores o reator alcançou desempenho estável, com eficiência de remoção de sulfato próximos de 100% e eficiências menores de remoção de DQO próximas de 93%.

Sendo assim, com os estudos apresentados, ainda são necessários avanços na área da digestão anaeróbia da vinhaça, com a necessidade de novos estudos utilizando este tipo de reator e novos substratos, até o momento ainda não há informações disponíveis na literatura utilizando reatores RAHLF no tratamento de vinhaça da produção de etanol da cana-de-açúcar, para produção de biogás, com aplicações de altas cargas orgânicas volumétricas.

A utilização de reatores em série, com a suplementação de nitrogênio e alcalinidade, através da adição de ureia 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 microbiana permiti melhor compreensão das interações microbianas em elevada COV e

produção de metano, para o avanço da digestão anaeróbia da vinhaça e contribuir para ampliação do conhecimento sobre os reatores RAHLF,

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

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. As coordenadas geográficas do local 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 22,3 °C (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2018).

4.2 Instalações Experimentais

O sistema experimental consistiu em um reservatório de armazenamento do afluente com 500 L, quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RHALF – R1, R2, R3 e R4) em escala piloto, construídos com tubos de PVC (Figuras 2 e 3) instalados em série, de acordo com (Duda et al., 2015), e um reservatório para armazenamento do efluente do reator R4 com 150 L. O R1 foi alimentado com o afluente utilizando-se uma bomba, com intuito de propiciar a regularização das vazões no R1 e, conseqüentemente no R2, R3, R4. Para construir o leito fixo, os reatores foram totalmente preenchidos com anéis de eletroduto corrugado (conduíte) como meio suporte, com valores médios de 0,043 m de comprimento; 0,020 m de diâmetro externo; 0,019 m de diâmetro interno e área superficial específica de 135 m²/m³ e 87% de índice de vazios (Figura 4).

Os RHALF possuíam seis registros na parte inferior dos reatores para a coleta de lodo, localizados a 0,50 (P1); 1,50 (P2); 2,50 (P3); 3,50 (P4); 4,50 (P5) e 5,50 (P6) m, da entrada dos reatores (Figuras 2 e 3).

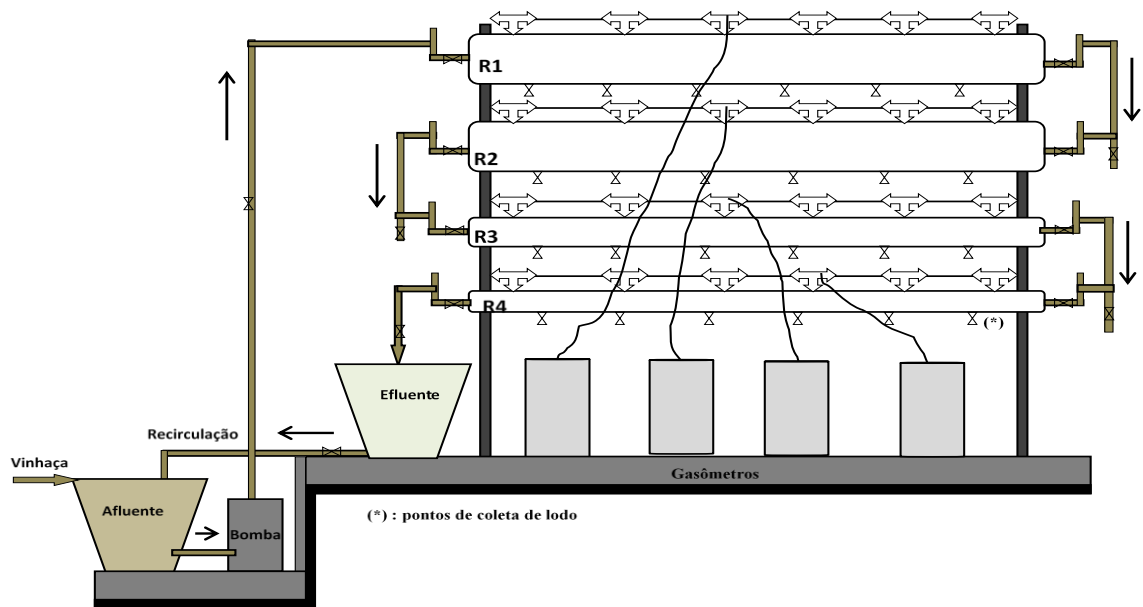


FIGURA 2. Representação esquemática do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RHALF), em série.



FIGURA 3. Sistema de tratamento composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RHALF) – R1, R2, R3 e R4.



FIGURA 4. Fotos dos anéis de eletroduto corrugado (conduíte) utilizados como meio suporte nos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4).

Foram acopladas quatro saídas de biogás equidistantes na parte superior dos reatores horizontais interligadas e acopladas a um gasômetro de fibra de vidro para armazenar o biogás produzido diariamente, para monitorar a produção.

Os RAHLF foram construídos com tubos de PVC de 6 m com diâmetros internos de 0,191, 0,191, 0,153 e 0,105 m para obter relações $L / D > 25$ e consequentemente reatores tipo plug-flow (Sauer et al., 2015). Os reatores RAHLF, R1 e R2 possuíam volume útil similares de 149 L e o R3 e R4, de 96 e 45 L, respectivamente (Tabela 1), essa configuração do sistema, permite TDHs menores nos reatores R3 e R4, mantendo elevadas concentrações de matéria orgânica em todo sistema.

TABELA 1. Valores do volume total e útil, comprimento, tempo de detenção hidráulica (TDH) e velocidades de escoamento horizontal do líquido (velocidade) aplicados nos quatro reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALLF), em série, R1, R2, R3 e R4.

Reatores	Diâmetro (m)	Comprimento (m)	Volume Total (L)	Volume útil (L)	TDH (d)	Velocidade (m d ⁻¹)
R1	0,191	6,0	172	149	1,23	4,9
R2	0,191	6,0	172	149	1,23	4,9
R3	0,153	6,0	110	96	0,79	7,6
R4	0,105	6,0	52	45	0,37	16,2

4.3 Substrato

O afluente utilizado para a alimentação dos reatores RHALLF, na partida, foi águas residuárias de suinocultura durante 93 dias. Após esse período, foi utilizada a vinhaça *in natura* de uma Usina Sucroenergética da região de Ribeirão Preto – SP, coletada semanalmente. A vinhaça foi obtida após as colunas de destilação do vinho e mantida resfriada, em temperatura ambiente.

Como a vinhaça *in natura* possui demanda química de oxigênio total (DQO_{total}) de aproximadamente 45 g L⁻¹, para obtenção das COV aplicadas e o aproveitamento da alcalinidade, realizou-se a recirculação do efluente do reator RHALLF (R4), as proporções utilizadas de vinhaça e recirculação estão descritas na (Tabela 2). As concentrações de nitrogênio Kjeldahl (NK) e fósforo total (P-total) encontradas na vinhaça *in natura* foram de 430 e 26 mg L⁻¹, respectivamente.

Portanto, não atenderam a quantidade mínima recomendada de DQO:N:P = 350:5:1 conforme recomendado por Chernicharo (2007). Consequentemente foi realizada a suplementação de nitrogênio, adicionando à vinhaça bruta uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), conforme recomendado por Souza et al., (1992).

TABELA 2. Taxa de recirculação do efluente (vinhaça : efluente) em % volume.

Fases	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Vinhaça:Efluente (R4)	10:90	20:80	24:76	22:78	20:80	65:45	66:44	77:33

4.4 Lodo de inóculo

O lodo utilizado como inóculo foi proveniente de reatores UASB, que foram utilizados para tratamento de águas residuárias de suinocultura, na faixa de temperatura mesofílica, com valores de sólidos totais (ST) de $45,6 \text{ g L}^{-1}$ e de sólidos voláteis (SV) de $30,4 \text{ g L}^{-1}$. O volume de lodo utilizado foi suficiente para preencher 30% do volume de cada reator.

4.5 Condições operacionais do sistema de Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo RAHLF (R1 - 4).

Foi realizada a partida do sistema utilizando águas residuárias de suinocultura. Foram realizadas oito fases experimentais (I - VIII) descritas na (Tabela 3) totalizando 580 dias de operação dos reatores. As COV aplicadas no R1 foram aumentadas gradualmente até a obtenção de aproximadamente $45 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{Ld})^{-1}$. Os reatores foram operados entre abril de 2014 e dezembro de 2016 e ficaram inoperantes em dois períodos de entressafras, de dezembro de 2014 a abril de 2015 (final da fase II) e de dezembro de 2015 a abril de 2016 (final da V). Na fase III e VI, a operação dos reatores RAHLF foram retomadas, com COV inferiores, para que houvesse uma adaptação dos micro-organismos ao substrato. Durante todo o período de operação, foi realizado a recirculação do efluente do R4 para aproveitamento da alcalinidade produzida nos reatores. Na fase VII, em virtude de

problemas com acidificação dos reatores RAHLF, foram testados alguns produtos para recuperação da alcalinidade normal do sistema.

Na primeira tentativa, foi utilizado o etanol durante 15 dias, na proporção de v/v de etanol/vinhaça de 5/100. Adicionado como fonte de enriquecimento para os micro-organismos. Após esse período foi adicionado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 12M durante 72 dias. Na última tentativa de recuperação do sistema foi testada a recirculação de outro efluente. Este efluente era proveniente de reatores UASB tratando vinhaça e em condições de estabilidade. Foi utilizado 100% do recirculado durante 5 dias e 30% do recirculado durante 15 dias, totalizando 20 dias com recirculação de efluentes de reatores UASB. Na fase VIII, após verificação de que o sistema estava com alcalinidade suficiente, foi retomada a recirculação do reator R4. As diminuições temporárias de COV entre as fases VII e VIII foram operadas em resposta ao acúmulo de AGV e a consequente diminuição na produção de biogás. A COV foi reduzida pela redução da concentração de vinhaça no afluente, mantendo o TDH constante.

TABELA 3. Condições operacionais do sistema de tratamento composto por quatro reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4, nas fases I - VIII.

Condições operacionais			
Período		COV no R1 (g DQO (L d) ⁻¹)	Tempo de operação (dias)
Partida	-	2,0 a 5,0	93
Abril a novembro de 2014	Fase I	5,0 a 7,0	72
	Fase II	7,0 a 10,0	69
Entressafra 120 (dias)			
Abril a novembro de 2015	Fase III	3,5 a 12,0	70
	Fase IV	12,0 a 17,0	70
	Fase V	17,0 a 26,0	66
Entressafra 120 (dias)			
Abril a novembro de 2016	Fase VI	11,0 a 33,0 33,0 a 45,0	70
	Fase VII	Redução para 28 Recuperação do sistema	107
	Fase VIII	28,0 a 30,0	57

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

Na Tabela 4 estão descritos os exames físicos e microbiológicos e as determinações químicas que foram realizadas nas amostras do afluente, efluente, lodo e biogás durante os ensaios, bem como as frequências de amostragem e as fontes das metodologias.

TABELA 4. Exames e determinações, frequência e fontes das metodologias utilizadas para monitorização dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4, nas fases I-VIII.

EXAMES E DETERMINAÇÕES	FREQUÊNCIA	REFERÊNCIAS
Afluente e efluentes		
pH	Duas vezes/semana	APHA; AWWA; WPCF (2005) (Método: 4500 H ⁺ B)
Demanda química de oxigênio (DQO _{total}).	Duas vezes \ semana	APHA; AWWA; WPCF (2005), (Método: 5220 – B); (16).
Alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI)	Duas vezes \ semana	APHA; AWWA; WPCF (2005), JENKINS et al. (1983)
Ácidos voláteis totais (AVT)	Duas vezes \ semana	DILALLO e ALBERTSON (1961)
Nitrogênio total Kjeldahl (NTK)	Uma vez \ semana	APHA; AWWA; WPCF (2005) (Método: 4500-N-C)
Nitrogênio amoniacal	Duas vezes \ semana	APHA; AWWA; WPCF (2005) (Método Semi-Micro Kjeldahl)
Fósforo total	Uma vez \ semana	APHA; AWWA; WPCF (2005) (Método: 4500-P-C)
K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Co e Ni	Uma vez \ semana	APHA; AWWA; WPCF (2005)
Lodo		
Sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV)	Mensalmente	APHA; AWWA; WPCF (2005) (Método 2540 – B e 2540 – E)
PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Item 4.8)		
Biogás		
Produção	Diariamente	SANTANA & OLIVEIRA (2005) (Método: Gasômetros)
Composição	Quinzenalmente	APHA; AWWA; WPCF (2005) (Método: cromatografia gasosa)

O volume de produção de biogás foi avaliado diariamente nos gasômetros, e a composição do biogás foi analisada quinzenalmente por cromatografia gasosa (Método 2720 – C), conforme descrito por Apha (2005). Os resultados da produção de metano foram corrigidos para a temperatura e pressão padrão (CNTP, 101,325 kPa, 273,15 K).

4.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), para os reatores anaeróbios horizontais (R1 – R4), com diferentes repetições no tempo para cada parâmetro avaliado. Os valores dos parâmetros determinados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, utilizando-se para a comparação das médias o Teste de Tukey a 5%.

Os resultados de DQO, SST, SSV, pH, nitrogênio total, amoniacal e orgânico, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês, sódio e zinco, alcalinidade, ácidos voláteis totais, produção e composição do biogás; eficiências de remoção de DQO, sólidos suspensos, e produções volumétrica e específica de metano foram tabulados e apresentados em gráficos em função do tempo de operação e do tempo de detenção hidráulico (TDH), e os valores médios e coeficientes de variação em tabelas, permitindo apresentar e discutir o efeito do TDH, da carga orgânica volumétrica (COV) no desempenho do sistema de tratamento.

4.8 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada com as amostras de DNA genômico isoladas a partir do lodo coletado, conforme descrito abaixo. Este procedimento foi realizado com o intuito de verificar se há diferenças significativas na quantificação dos micro-organismos da câmara de digestão dos reatores RAHLF.

As amostras de lodo foram coletadas ao longo dos reatores RHALF, aos 420 dias de operação, na fase V, quando a COV média foi de 20 g DQO total (L d)⁻¹ e foi observado os maiores valores de produções volumétricas de metano. Foi coletado 50 ml de lodo em cada um dos pontos de coleta dos reatores (R1 - 4), totalizando 300 ml de lodo coletado em cada um dos reatores. As amostras de cada reator

foram misturadas, formando quatro amostras compostas: R1, R2, R3 e R4. Os sólidos totais (ST) e voláteis (SV) do lodo foram de 23,1 e 13,1 g L⁻¹ (R1), 53,1 e 36,0 g L⁻¹ (R2), 46,5 e 31,3 g L⁻¹ (R3) e 37,1 e 23,7 g L⁻¹ (R4).

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 amplificações das regiões 16S rDNA, usando primers específicos (Song et al., 2010; Lee et al., 1996). Inicialmente, os primers tiveram a 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®-T Easy Vector System I (Promega, Wisconsin, USA) e inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH10β. Os clones positivos foram selecionados entre as células DH10β 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 µL de Power SYBR Green® 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 uL. Todas as reações foram conduzidas em placas de 96 poços no aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System® (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 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, 3×10^8 a 3×10^2 (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).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variações de temperatura durante a operação do sistema de reatores RAHLF

Os valores médios da temperatura durante as fases de operação dos reatores RAHLF variaram de 19,5 a 24,9 °C, e foram observadas nas fases VI e V, respectivamente (Tabela 5), indicando que os reatores RAHLF foram operados na faixa mesofílica. As variações das temperatura máxima, média e mínima estão apresentados na (Figura 5).

TABELA 5. Valores médios e coeficiente de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a operação dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4.

	Fases								c.v.	F
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
Máxima	32,0 a	31,9 a	26,6 c	30,8 ab	31,7 a	26,2 c	29,4 b	31,3 a	13,72	35,08**
Média	23,5 ab	24,7 a	20,1 d	23,2 b	24,9 a	19,5 d	21,2 c	24,1 ab	14,25	52,31**
Mínima	16,0 bc	18,8 a	14,8 cd	16,7 b	19,9 a	14,1 d	14,0 d	18,7 a	19,81	63,05**

A temperatura operacional é um fator importante na determinação do processo de degradação anaeróbia (Pap et al., 2015). Embora seja possível o tratamento anaeróbio 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 máxima do ar foram observados na fase I (Figura 5), alcançando valores diários de até 39,8 °C. Os menores valores de temperaturas foram observados nas fases VI e VII nos meses de junho e julho, estação de inverno, com valores mínimos de 5 e 4,7 °C (Figura 5).

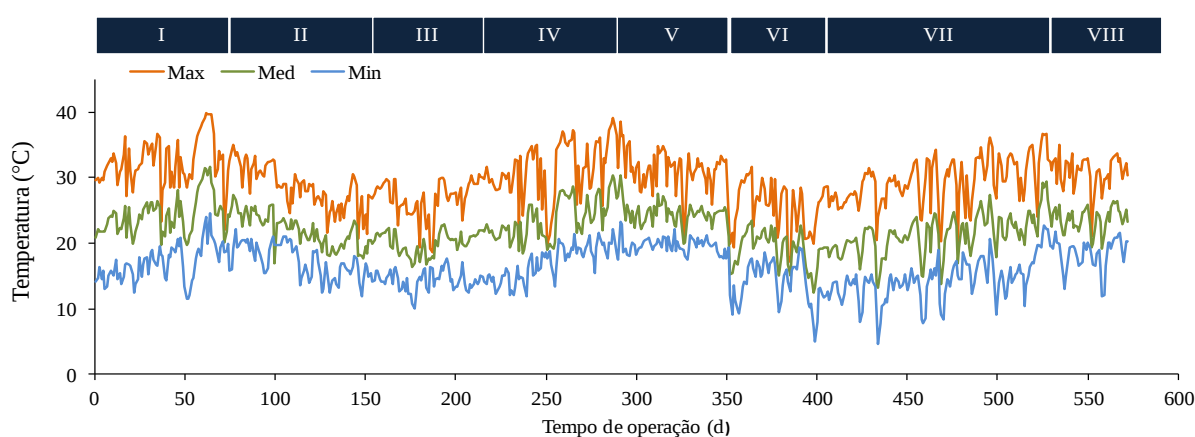


FIGURA 5. Valores de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a operação dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALLF), em série, R1, R2, R3 e R4.

5.2 pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal

A estabilidade do sistema de digestão depende de vários fatores de sensibilidade, como pH, ácidos graxos voláteis (AGV), nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) e alcalinidade (Liu et al., 2018). De acordo com (Hernandez-Martinez et al., 2014) durante a DA é crucial determinar, ao longo de todo o processo para favorecer a atividade metanogênica. Existe um intervalo de pH para cada micro-organismo, no qual as células são metabolicamente ativas (Singla et al., 2014). Neste estudo os valores médios do pH no afluente mantiveram-se próximos de 7,0

em todas as fases (Tabela 6). Na fase VII foi observado decréscimo do pH nos reatores RAHLF em virtude do acúmulo de ácidos voláteis totais (AVT) que não foram degradados pelos reatores. Mesmo assim os valores de pH ficaram acima de 6,0 (Figura 6), considerado ideal para as arqueias metanogênicas (Kongjan et al., 2013). Isto indica que o processo não foi afetado e nem inibido pelo pH.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os valores médios da alcalinidade parcial (AP) aumentaram do R1 - 4, com o aumento da COV até a fase V (Tabela 6). A alcalinidade geralmente aumenta a partir da metanogênese acetoclástica, da redução do sulfato, bem como do íon amônio em virtude da degradação de compostos nitrogenados (Feng et al., 2016). Os maiores valores de AP foram observados no efluente do reator R4 na fase IV e no início da fase VIII, de 6132 e 7097 mg CaCO₃ L⁻¹ (Tabela 6), indicando que houve produção e acúmulo de alcalinidade, proporcionando maior capacidade de tamponamento ao longo do conjunto de reatores. O uso de reatores em série contribuiu para o equilíbrio do sistema em virtude do aumento no consumo de AVT e na produção de alcalinidade bicarbonato pelas arqueias metanogênicas. Mazareli et al. (2016) demonstraram que os sistemas de tratamento RAHLF em série podem produzir alcalinidade suficiente e manter o pH apropriado para a conversão de AVT por micro-organismos acetogênicos e metanogênicos. Na fase VII foi observado uma diminuição da alcalinidade parcial em virtude do aumento dos AVT, sendo assim foi realizado testes durante está fase para recuperação da alcalinidade normal do sistema foi feito a adição de etanol utilizado como fonte de enriquecimento para os micro-organismos, pois mostra-se alternativa competitiva devido à facilidade de disponibilidade e baixo custo relativo. (Ribas, 2006) em seu estudo adicionou o etanol com intuito de desenvolver maior população metanogênica. De acordo com Kousi et al., (2011) que avaliou biorreator de redução de sulfato de leito fixo e fluxo ascendente, usando etanol como único doador de elétrons, segundo os autores o substrato carbono / energia é claramente uma variável influente devido ao efeito na taxa de crescimento e composição da cultura, bem como efeito potencial sobre a economia de um processo industrial em grande escala. Entretanto com esse teste não foi observado alteração na alcalinidade do sistema.

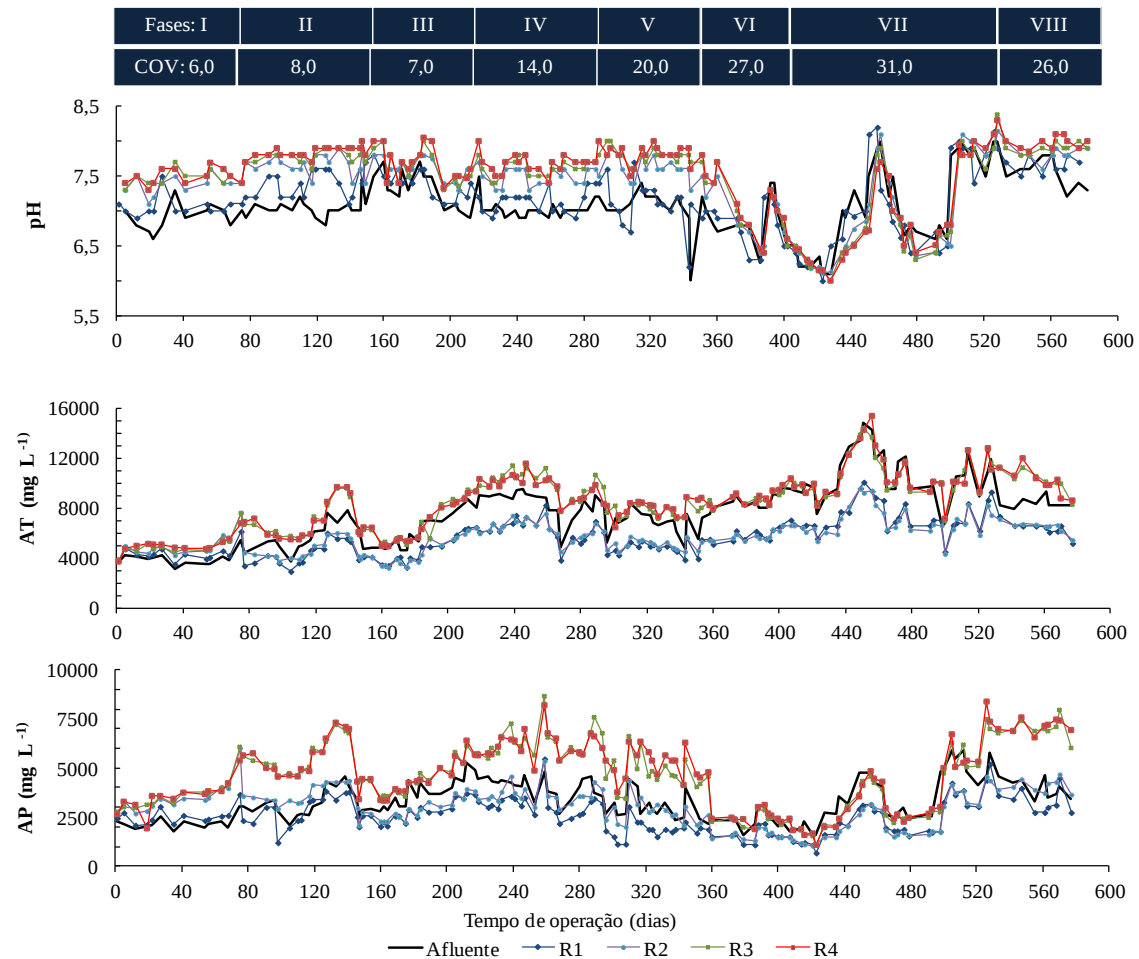


FIGURA 6. Valores de pH, alcalinidade total (AT) e parcial (AP) no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RHALF), em série, R1, R2, R3 e R4, tratando vinhaça.

Como não foi observado melhoria no sistema com adição do etanol, foi adicionado NaOH como fonte de alcalinizante. Reagentes ácidos e alcalinos são comumente usados para solubilizar polímeros, favorecendo a disponibilidade de compostos orgânicos para o ataque enzimático (Carrere et al., 2016). Segundo Sambusiti et al., (2013) demonstram em estudo que uma etapa de pré-tratamento alcalina, antes da digestão anaeróbia de forragem de sorgo ensilado, pode ter efeito benéfico no aumento da produção de metano, de 25%, e dando mais estabilidade ao processo de digestão anaeróbia. Foi observado aumento na alcalinidade, porém não foi suficiente, pois os AVT continuavam com valores acima de 7000 mg L⁻¹ (Tabela 7).

TABELA 6. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI), no afluente e efluente dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4 no tratamento da vinhaça.

Parâmetros	Reator	Fases								c.v.	F
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
pH	Afluente	6,9 bc	7,0 bc	7,3 ab	7,0 bc	7,1 bc	6,7 c	7,0 bc	7,6 a	5,7	7,33**
	R1	7,0 bcd	7,3 ab	7,4 ab	7,1 bcd	7,1 bc	6,7 d	6,9 cd	7,7 a	6,2	10,78**
	R2	7,4 b	7,6 ab	7,6 ab	7,5 ab	7,6 ab	6,9 c	6,9 c	7,8 a	6,5	16,49**
	R3	7,4 b	7,7 ab	7,6 ab	7,6 ab	7,7 ab	7,0 c	6,8 c	7,9 a	6,9	22,04**
	R4	7,7 b	7,8 ab	7,7 ab	7,6 ab	7,7 ab	7,0 c	6,9 c	8,0 a	7,0	24,45**
AT (mg L ⁻¹)	Afluente	3794 e	5689 d	5924 d	8960 b	7397 c	8001 bc	10502 a	8923 b	31,5	44,01**
	R1	4196 e	4476 de	4313 e	6589 ab	5354 cd	5633 bc	7236 a	6785 ab	26,1	26,74**
	R2	4693 cd	4881 cd	4249 d	6598 ab	5513 c	5635 bc	6961 a	6651 ab	22,6	22,96**
	R3	4768 d	7004 c	6333 c	10263 a	8557 b	8628 b	10483 a	10388 a	26,3	43,18**
	R4	4880 e	6974 d	6331 de	10123 ab	8473 c	8787 bc	10647 a	10378 a	26,4	42,46**
AP (mg L ⁻¹)	Afluente	2108 d	3209 bc	3449 b	4461 a	3388 b	2454 cd	3483 b	4189 ab	30,6	11,85**
	R1	2442 bcd	2919 bcd	2609 bcd	3323 bcd	2392 bcd	1680 bcd	2214 bcd	3528 bcd	34,1	10,41**
	R2	3287 abc	3850 ab	2761 cd	3721 ab	3235 bc	1826 e	2160 de	4065 a	33,2	25,19**
	R3	3410 cd	5632 ab	4252 c	6132 ab	5574 b	2974 d	3171 d	6869 a	36,6	33,61**
	R4	3399 c	5605 b	4213 c	6132 ab	5725 b	3199 c	3232 c	7097 a	35,8	35,81**
AI (mg L ⁻¹)	Afluente	1687 d	2480 d	2475 d	4500 bc	4010 c	5547 b	7019 a	4735 bc	49,7	39,33**
	R1	1753 d	1556 d	1703 d	3265 bc	2962 c	3953 b	5021 a	3256 bc	46,8	48,18**
	R2	1406 d	1031 d	1489 d	2877 c	2278 c	3809 b	4801 a	2586 c	55,2	62,46**
	R3	1358 e	1373 e	2081 de	4131 c	2984 cd	5653 b	7312 a	3519 c	62,4	72,64**
	R4	1481 ef	1369 f	2118 def	3991 c	2749 cde	5588 b	7414 a	3280 cd	64,7	66,50**

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.

Foi realizada a recirculação com efluente proveniente de reatores UASB em fase de estabilidade tratando vinhaça (Barros et al., 2017). Com essa medida, foi observado que ocorreu melhoria no sistema, com aumento da alcalinidade em todos os RAHLF, com os maiores valores observados no R4, de $8377 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 6), e queda nos valores dos AVT no R1 para 5250 mg L^{-1} (Figura 7).

Na fase VIII foi retomada a recirculação com efluente do reator RAHLF (R4), e verifica-se o restabelecimento do sistema, com aumento da alcalinidade gerada, com valores médios no R4 de $7097 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (Tabela 6) e aumento na produção volumétrica de metano (Figura 9). A recirculação do efluente do R4 para diluir a vinhaça do afluente, permitiu o ajuste do pH sem a necessidade de adicionar alcalinizantes comerciais, como também observado por Barros et al., (2016).

Os maiores valores médios da relação de alcalinidade intermediária (AI) / alcalinidade parcial (AP) foram observados na fase VII (Tabela 7). Isto ocorreu provavelmente, em virtude das maiores COVs aplicadas nesta fase acima de $40 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ (Figura 8 A) e o acúmulo dos AVT (Figura 7).

A relação AI/AP é ferramenta rápida e de baixo custo para o uso no monitoramento da digestão anaeróbia. Ripley et al. (1986) afirmam que valores da relação AI/AP superiores a 0,3 indicam a ocorrência de distúrbios no processo anaeróbio tratando esgoto sanitário. No entanto, de acordo com Barros et al. (2017) pode-se obter estabilidade no processo anaeróbio, utilizando vinhaça como substrato, com as relações AI/AP superiores a 0,6, com valores de COV acima de $45 \text{ g DQO} (\text{L d})^{-1}$. Neste estudo, na fase V, mesmo com valores da relação AI/AP acima de 1,4 no R1, foram observados valores inferiores nos reatores R2, R3 e R4 (Figura 7), indicando a importância da série de reatores na manutenção da estabilidade do sistema.

Mesmo com valores elevados de AVT no R1 até a Fase V, próximos a 6000 mg L^{-1} , o reator não entrou em colapso, provavelmente, em virtude das características de escoamento do tipo plug - flow, que favorece o processo de tratamento por etapas, que ocorre ao longo do comprimento do reator. O meio suporte também permite imobilizar a biomassa ativa, aumentando o tempo de retenção celular, favorecendo a população metanogênica, aumentando a resistência dos reatores a choques de carga orgânicas e presença de substâncias inibidoras

(Zaiat et al., 1997). Pode se observar que os AVT diminuíram até a fase V e também na fase VIII do R1 para o R4 (Tabela 7), indicando que houve consumo dos ácidos gerados e, novamente, demonstrando a importância dos reatores anaeróbios em série para a manutenção da estabilidade do sistema.

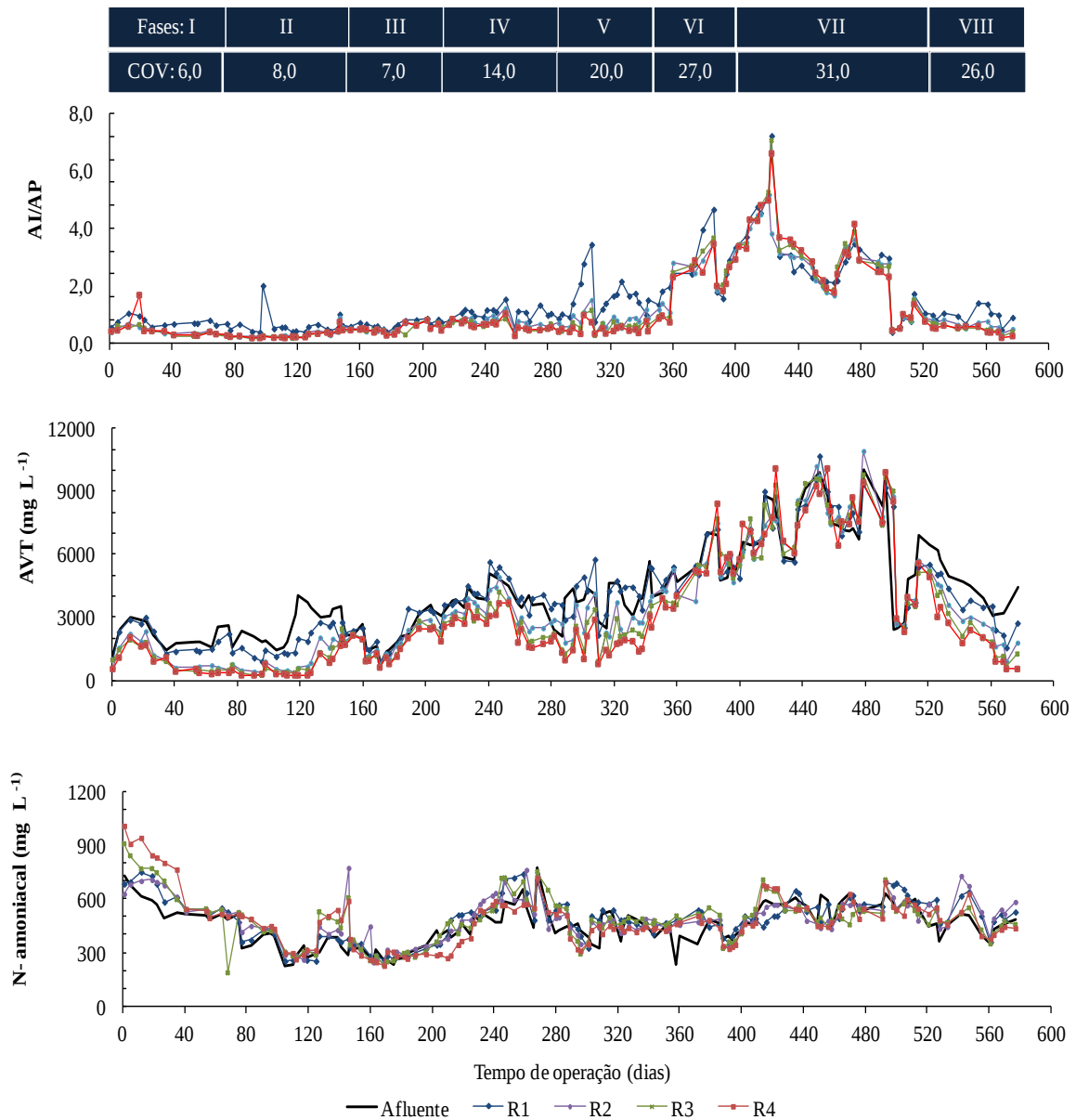


FIGURA 7. Nitrogênio amoniacoal (Nam), ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e relações AI/AP dos efluentes durante a operação dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4 no tratamento da vinhaça.

TABELA 7. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT) dos afluentes e efluentes e das relações AI/AP dos efluentes, durante a operação dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4 no tratamento da vinhaça

Parâmetros	Reator	Fases								c.v.	F
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
N-am (mg L ⁻¹)	Afluente	558 a	339 cd	309 d	469 b	476 b	407 bc	568 a	443 b	25,0	34,42**
	R1	615 a	346 d	308 d	545 ab	515 bc	452 c	564 ab	517 bc	25,4	34,72**
	R2	611 a	380 d	348 d	547 ab	484 bc	436 cd	539 ab	535 abc	24,3	17,35**
	R3	637 a	403 d	321 d	522 abc	504 bc	453 bc	548 ab	462 bc	27,2	14,42**
	R4	723 a	411 c	300 d	471 bc	463 c	423 c	553 b	469 bc	30,3	23,59**
AVT (mg L ⁻¹)	Afluente	2114 e	2557 de	2266 e	4117 bc	3661 cd	5400 b	7087 a	4465 bc	50,5	39,74**
	R1	1925 e	1736 e	2197 de	4332 bc	3940 c	5532 b	7180 a	3591 cd	55,0	49,18**
	R2	1161 e	805 e	1846 de	3704 bc	2684 cd	5166 b	7265 a	2915 cd	71,6	66,66**
	R3	997 de	592 e	1712 cde	3199 c	2139 cd	5090 b	7184 a	2449 cd	79,7	67,88**
	R4	910 de	465 e	1608 cde	3000 c	1772 cd	5096 b	7155 a	2075 cd	85,6	72,72**
AI/AP	R1	0,72 b	0,59 b	0,65 b	0,99 b	1,43 b	2,52 a	2,81 a	0,96 b	79,3	21,49**
	R2	0,43 b	0,26 b	0,54 b	0,78 b	0,75 b	2,28 a	2,68 a	0,64 b	93,8	40,59**
	R3	0,41 b	0,24 b	0,48 b	0,68 b	0,57 b	2,23 a	2,88 a	0,52 b	108,7	34,50**
	R4	0,49 c	0,24 c	0,50 c	0,65 c	0,50 c	2,08 b	2,85 a	0,47 c	109,7	34,43**

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.

A maior concentração média de AVT foi observada na fase VII, com valores superiores a 7000 mg L^{-1} (Tabela 7) e COV média no R1 acima de $30,0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$. Isso, provavelmente ocorreu em virtude da adição de etanol, que aumentou a quantidade de matéria orgânica do afluente, e aos ácidos produzidos na fase da hidrólise e acidogênese pelos micro-organismos e que não estão sendo convertidos na acetogênese e degradados na fase metanogênica. Segundo Zhang et al., (2016) o excesso de AVT pode ser produzido a partir de substratos facilmente hidrolisados. Outro fator que pode ter contribuído com esse acúmulo dos ácidos pode ser o choque de carga orgânica que ocorreu com o aumento de carga abrupta de $11,0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ no dia 452 para $33,0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ no dia 464 na Fase VI (Figura 8 A), não havendo tempo para adaptação dos micro-organismos a carga orgânica aplicada. Santos et al., (2014), operando dois reatores anaeróbios em condições termofílicas e utilizando como substrato vinhaça de cana-de-açúcar, observaram que o aumento da COV resulta no aumento da quantidade de compostos orgânicos, como os AVT, disponíveis para degradação microbiológica. Na fase VII, a alta concentração dos AVT levou ao decréscimo na alcalinidade do sistema e acúmulo de ácidos voláteis totais, os quais segundo Bouallagui et al., (2005) inibem a atividade metanogênica, como ficou evidenciado com a queda na produção volumétrica de metano (Figura 9).

A recirculação do efluente do reator R4 pode ter sido outro fator que teve influência no aumento de AVT, pois parte dos ácidos produzidos que não foram consumidos pelos micro-organismos retornaram ao processo. Porém, até a fase V e após a recuperação dos reatores na fase VIII, a recirculação mostrou-se benéfica para a melhoria da alcalinidade no sistema. De acordo com Barros et al. (2016), a utilização da recirculação de efluentes, com o objetivo de manter a alcalinidade produzido a partir do metabolismo metanogênico permite equilíbrio adequado entre pH, alcalinidade e AVT. Independentemente do tipo de agente alcalinizante, a recirculação de efluentes tende a ser a melhor abordagem para alcançar uma estratégia de alcalinização eficaz e de baixo custo em sistemas completos de tratamento de vinhaça (Fuess 2017b)

Neste estudo, foi observado valores de nitrogênio amoniacal (N-am) crescentes do afluente para o efluente do R4 (Figura 7), indicando que ocorreu a

amonificação. Segundo Yenigun e Demirel (2013), a amônia é produzida através da degradação biológica de matéria nitrogenada e proteínas disponíveis no substrato, sendo nutriente essencial para o crescimento microbiológico. Segundo Murto et al. (2004), concentrações adequadas de amônia no reator anaeróbio auxiliam o tamponamento em virtude da capacidade de formação de NH_4HCO_3 . Na fase I ocorreram os maiores acréscimos das concentrações de N-am. no afluente para o efluente do R4. Contudo, os valores de N-am. foram inferiores a 3000 mg L^{-1} , valores indicados por Hejnfelt E Angelidaki, (2009) que causam toxicidade aos micro-organismo. Portanto, não ocasionaram efeitos adversos na microbiota metanogênica, como observado pela produção de metano em todos os reatores RAHLF (Figura 9).

5.3 Demanda química de Oxigênio (DQO) e Eficiência de remoção de DQO

Os valores médios de $\text{DQO}_{\text{total}}$ no afluente foram de 7498 a 38317 mg L^{-1} , o que proporcionou COV médias crescentes no R1, de 6 a $31 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$, para os tratamentos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, respectivamente (Tabela 8). O aumento gradativo das COV permitiu a adaptação dos micro-organismos à vinhaça e a estabilidade na remoção de $\text{DQO}_{\text{total}}$ e na produção volumétrica de metano para o sistema (R1+R2+R3+R4) no final das fases II, V e VIII (Figuras 8A e 9), como também observado por Barros et al., (2017).

Ferraz Jr. et al., (2014) avaliou a influência da COV aplicada, por meio da variação do TDH, sobre a produção de hidrogênio, utilizando como substrato vinhaça. Os autores utilizaram quatro reatores anaeróbios de leito empacotado (APBR) operados em paralelo, com volumes totais e líquidos de 3,5 e 2,3 L, respectivamente, em temperaturas termofílicas (55°C), usando como meio suporte polietileno de baixa densidade (LDP). As COVs aplicadas foram de 36,4 a $108,6 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ e TDHs de 8 a 24 h. Com base nos resultados os autores concluíram que as condições operacionais que permitiram máxima produção e rendimento de hidrogênio foram com COV de $84 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ e TDH de 10 h e também verificaram que a COV teve forte influência sobre a seleção da população microbiana.

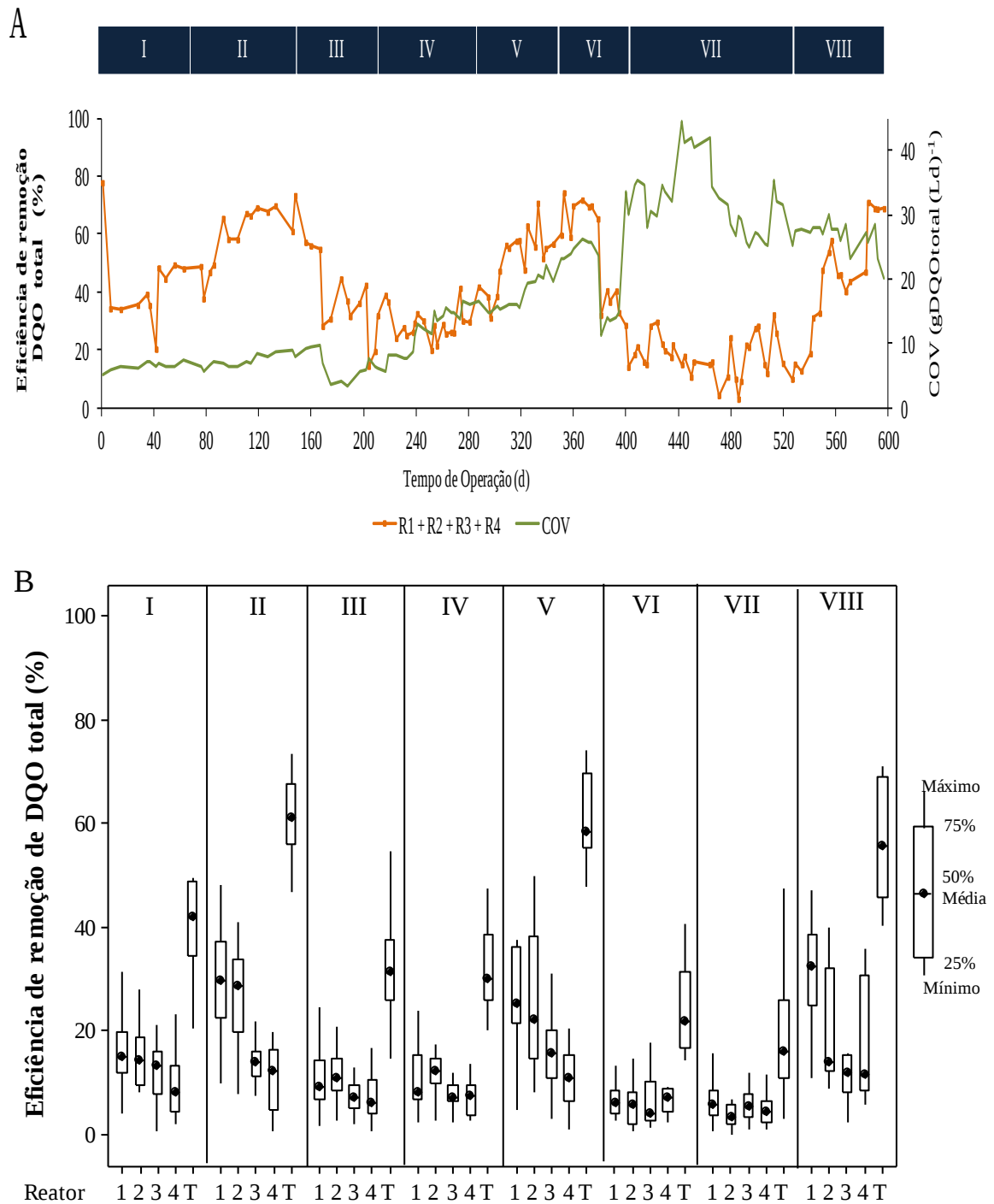


FIGURA 8. (A) - Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQOtotal) no sistema total e carga orgânica volumétrica (COV) e (B) Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQOtotal) nos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa

TABELA 8. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da DQO_{total} no afluente (mg L⁻¹) e efluente, carga orgânica volumétrica (COV) e eficiência de remoção de DQO_{total} (%) durante a operação dos reatores RAHLF em série, R1, R2, R3 e R4, no tratamento de vinhaça.

Parâmetros	Reator	Fases								c.v.	F
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
DQO total	Afluente	7948 d	9499 d	8507 d	17665 c	24450 b	33125 a	38317 a	32251 a	56,54	80,00**
	R1	6718 d	6683 d	7660 d	16355 c	18051 c	30687 b	36120 a	22452 c	62,23	87,27**
	R2	5587 e	4960 e	6825 e	14614 cd	13348 d	28895 b	34798 a	19284 c	69,73	92,33**
	R3	4964 e	4280 e	6328 e	13555 c	11426 cd	27336 b	33367 a	16989 c	73,75	86,74**
	R4	4569 de	3766 e	5947 e	12698 c	10132 cd	25394 b	31993 a	14657 c	76,91	81,04**
COV g DQO _{total} (L d) ⁻¹	R1	6 d	8 d	7 d	14 c	20 b	27 a	31 a	26 a	56,54	80,00**
	R2	5 d	5 d	6 d	13 c	15 c	25 b	29 a	18 c	62,23	87,27**
	R3	5 e	4 e	6 e	12 cd	11 d	23 b	28 a	16 c	69,73	92,33
	R4	6 e	5 e	8 de	17 c	14 cd	34 b	42 a	21 c	73,84	85,83**
Remoção DQO total (%)	R1	16 b	30 a	10 b	10 b	26 a	7 b	8 b	31 a	74,42	29,94**
	R2	15 b	27 a	11 bcd	12 bc	26 a	6 cd	4 d	20 ab	79,49	22,10**
	R3	12 abc	14 a	8 bcd	8 bcd	16 a	6 cd	5 d	12 ab	61,71	12,71**
	R4	9 bc	11 ab	7 bc	7 bc	11 ab	8 bc	5 c	17 a	72,55	7,81**
	(R1 + R2 + R3 + R4)	43 b	60 a	32 bc	32 bc	60 a	25 cd	19 d	57 a	49,18	50,15**

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.

Após a entressafra da cana-de-açúcar, no início da fase III e VI, foi observada diminuição abrupta da remoção de DQO_{total} , indicando dificuldade na retomada dos reatores RAHLF no tratamento da vinhaça. Na fase VII foi observada baixa remoção de DQO_{total} que também fica evidenciado no baixo consumo de AVT e baixa produção de biogás. De acordo com De Jonge et al., (2017) as interrupções e as sobrecargas orgânicas, podem ter consequências significativas para o desempenho do processo, em virtude da desestabilização das relações entre os diversos grupos de micro-organismos presentes nos reatores anaeróbios, o que pode ter afetado a microbiota dos reatores RAHLF no início das fases III e VI e na fase VII.

Amorim et al., (2005) avaliou o desempenho de reator anaeróbio horizontal de leito (RAHLF), submetido ao aumento progressivo de COV e aplicações de sobrecargas, usando como meio suporte espuma de poliuretano, utilizando como substrato esgoto sintético. O reator foi operado a temperatura de 30°C e TDH de 7 horas, a COV e sobrecarga máxima aplicada baseada no volume total do reator, foi de 6,8 e 18,8 g DQO_{total} (L d)⁻¹, respectivamente. Os autores observaram que ocorreu aumento na DQO e AVT nos efluentes e diminuição na porcentagem de metano no biogás devido as aplicações de sobrecargas. No entanto, o reator recuperou desempenho operacional depois de aproximadamente 17 h, para todas as condições testadas.

Duda et al. (2015), avaliaram sistema de tratamento composto um reator anaeróbio horizontal com manta de lodo (RAHML) e três reatores RAHLF instalados em série, tratando águas residuárias de suinocultura. Os autores obtiveram eficiências de remoção de DQO de 68%.

Em nossa pesquisa observou-se que as maiores remoções de DQO_{total} ocorreram no R1 e R2 (Figura 8 B). A ocorrência disto pode ter sido em virtude da maior disponibilidade de material orgânico de fácil degradação. No R3 e R4, as eficiências médias de remoção de DQO_{total} , foram inferiores a 20% em todas as fases, que podem ter ocorrido em virtude dos baixos TDHs e das altas COVs aplicadas, de até 42 g DQO_{total} (L d)⁻¹, no R4, na Fase VII. No entanto, o R3 e R4 contribuíram para a obtenção de eficiências de remoção de DQO_{total} superiores a 60% no final do período das fases II, V e VIII (Figura 8 B) para o sistema composto pelos reatores RAHLF (R1+R2+R3+R4). Isto indica que com os reatores RAHLF em

série, é possível obter boas remoções de DQO após um período de adaptação do lodo. O mesmo é observado por (Adames, 2017) que avaliou o desempenho de quatro reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF), R1, R2, R3 e R4, instalados em série para remoção de matéria orgânica, coliformes, nutrientes e produção de metano na co-digestão anaeróbia de esgoto sanitário (ES) com diferentes proporções de resíduos vegetais (tomate e banana) (RV), com TDH de 10,9 dias, utilizando como meio suporte nos reatores R1, R2 e R3 anéis de bambu e no R4 anéis de polipropileno, aplicando COV no R1 de até $10,4 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$. Os autores observaram que os reatores R1+R2 foram responsáveis pelas maiores remoções de $\text{DQO}_{\text{total}}$ superiores a 85% e para o sistema de reatores (R1+R2+R3+R4) remoções de $\text{DQO}_{\text{total}}$ 97%. Confirmando as vantagens de reatores anaeróbios contínuos em série, pois possibilitam a melhoria na remoção de matéria orgânica em menor tempo.

Existem alguns estudos no tratamento de vinhaça com o uso de sistemas combinados em reatores acidogênicos e metanogênicos de dois estágios ou sistemas combinados para produzir hidrogênio e metano nos quais a eficiência de remoção em termos de DQO são acima de 60% podendo chegar até 97%.

Ferraz Jr. et al., (2016) avaliaram o desempenho de reatores tratando vinhaça, em sistemas de estágio único (UASB I) e em dois estágios (UASB II), com sistema APBR acidogênico e um reator UASB metanogênico, com TDHs de 34 e 23 h e COV de $25 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$. Os autores observaram eficiência remoção DQO total de 60% e 74% UASB I e UASB II. SANTOS et al. (2017) avaliaram o desempenho do biorreator de membrana bifásica anaeróbio em dois estágios (2-SAnMBR) tratando vinhaça, com três diferente TDHs (5,3; 4,2 e 3,1 dias), em temperatura mesofílica com COV de até $6,0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$, obtiveram eficiência média de remoção de matéria orgânica com valores de 97%. Barros et al., (2017), que avaliou a produção de metano de vinhaça com suplementação com torta de filtro em dois reatores UASB em serie na faixa de temperatura termofílica, obtiveram eficiência de remoção de DQO 60% para o sistema (R1 + R2) foi obtida na maior DQO testada $31 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$. Cabrera-Días et al., (2017) avaliaram o tratamento anaeróbio da vinhaça bruta em um sistema combinado composto por dois reatores metanogênicos (UASB + APBR). Os autores verificaram que a melhor

condição para o sistema combinado foi de 12,5 g DQO total (L d)⁻¹ com eficiência de remoção DQO de 87% para o sistema.

A baixa eficiência de remoção de DQO observada em nossa pesquisa pode ser atribuída à presença de matéria orgânica recalcitrante de difícil degradação no substrato, que retornava ao processo com o uso da recirculação.

5.4 Produção de metano

Foram observados os maiores valores de produção volumétrica de metano de 1,230 (R1); 1,233 (R2) LCH₄ (L d)⁻¹ (Figura 9) na Fase V, com aplicações médias de COVs de 20,0 g DQO_{total} (L d)⁻¹ no R1 e temperaturas médias do ar de 24,9 °C. Em nossa pesquisa devido a configuração do sistema os reatores R3 e R4 possuem menores TDHs, que permite altas concentrações de matéria orgânica em todo sistema, tornando possível a obtenção de produção volumétrica de metano de 0,671 (R3), 0,708 LCH₄ (L d)⁻¹ (R4) e de 1,065 (R1+R2+R3+R4) L CH₄ (L d)⁻¹ na fase V, com porcentagem de metano de aproximadamente 70%. Estes valores são próximos aos observados por Barros et al., (2016), que obtiveram valores médios de 0,938 L CH₄ (L d)⁻¹ tratando vinhaça em um reator UASB, com menor COV de 11,5 g DQO_{total} (L d)⁻¹ e superiores aos valores encontrados por Barros (2017), que avaliou a produção de metano de vinhaça com suplementação com torta de filtro em dois reatores UASB em serie na faixa de temperatura mesofílica, com aplicação de COV similares as que foram utilizadas em nosso estudo durante a fase V e observou valores de 0,89 L CH₄ (L d)⁻¹ para o sistema (R1 + R2).

O aumento da COV resulta no aumento gradual da produção de biogás, que pode ter ocorrido em virtude da maior disponibilidade do substrato a ser convertido (Grover et al., 1999). Na fase VII, foi observada diminuição na produção volumétrica de metano (Figura 9 e Tabela 9), e isto ocorreu provavelmente devido ao acúmulo de AVT que não foram consumidos pelos micro-organismos. A alta concentração de AVT leva a uma diminuição de pH e altos níveis de acúmulo de ácidos, os quais inibem a atividade metanogênica e, conseqüente, redução na produção de metano (Bouallagui et al., 2005).

Tangkathitipong et al., (2017) avaliou a produção de hidrogênio e metano produzidos separadamente a partir de águas residuárias de biodiesel com adição de

glicerina sob temperatura mesofílica usando um sistema reator anaeróbico de dois estágios (ASBR) e verificou que o desempenho do processo da unidade metano ASBR em termos de produção de metano diminuiu, resultante do acúmulo de AVT, também como foi observado em nosso sistema (Figura 7). Na fase VIII foi observado que com a recirculação do efluente dos reatores UASB, ocorreu a recuperação do sistema retomando a produção volumétrica nos reatores, com os maiores valores de 0,531; 0,492; 0,410; 0,298 e 0,470 LCH₄ (L d)⁻¹ nos reatores R1,R2 R3, R4 e para o sistema (R1+R2+R3+R4), respectivamente.

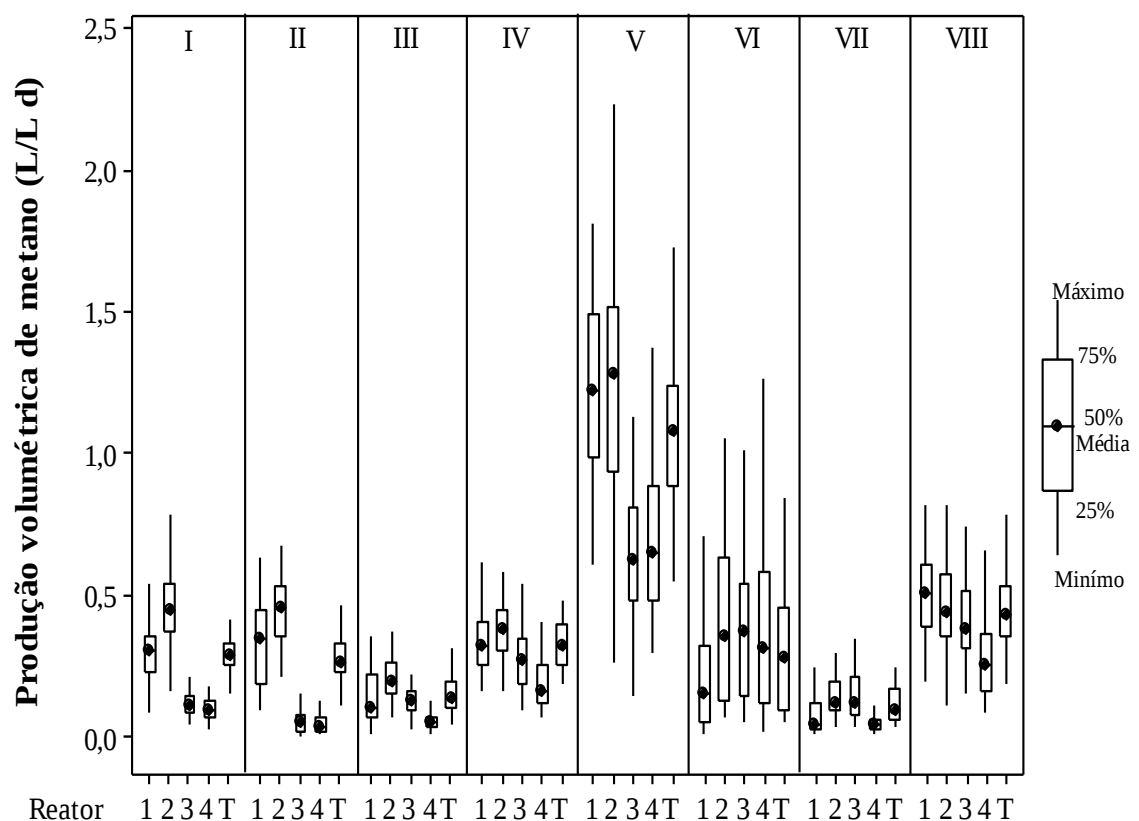


FIGURA 9. Produção volumétrica de metano nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF), em série, R1, R2, R3 e R4, no tratamento de vinhaça. T: R1 + R2 + R3 + R4.

Os valores médios da produção específica de metano no sistema foram de 0,289; 0,207; 0,255; 0,222; 0,240; 0,147; 0,077 e 0,101 L CH₄ (g DQO_{total} removida)⁻¹ nas fases I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII respectivamente (Tabela 9). Em nossa pesquisa até a fase V, com COV de 20 g DQO_{total} (L d)⁻¹, adicionando

apenas ureia, obtivemos valores superiores aos observados por (Barros, 2017) com COV similares, obteve valores de $0,17 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total}} \text{ removida})^{-1}$ para o sistema UASB (R1 + R2), fazendo suplementação com torta de filtro como fonte de nutrientes.

Cabrera-Días et al., (2017) avaliaram o tratamento anaeróbio da vinhaça bruta em um sistema combinado composto por dois reatores metanogênicos, reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) + reator anaeróbio de leito fixo (APBR), com COV de até $24 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ e TDH entre 10 e 1,3 dias para o reator UASB, para o reator APBR, COV de até $14,5 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ e TDH entre 8 e 1,2 dias. Os autores observaram que a melhor condição para o sistema combinado foi de $12,5 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ com médias de $0,289 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total}} \text{ removida})^{-1}$ para o reator UASB e $4,4 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ com $0,207 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total}} \text{ removida})^{-1}$ para o reator APBR. De acordo com os atureos a combinação de dois reatores anaeróbios metanogênicos UASB + APBR melhorou claramente o desempenho do processo, como resultado não somente de uma maior eficiência de remoção de DQO, mas também de um conteúdo maior de CH_4 .

Toledo-Cervantes et al., (2018) avaliaram digestão anaeróbica em reatores de leito fixo (PBR) de fluxo ascendente em dois estágios, para o tratamento de vinhaça de tequila, alcançaram COV de $9,5 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ com TDH de 3,3 d, utilizando com meio suporte tubos de PVC e temperatura controlada a 35°C . Os autores obtiveram produção específica de metano para o sistema de $0,29 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total}} \text{ removida})^{-1}$, valores próximos aos encontrados em nossa pesquisa.

Ferraz Jr. et al., (2016), com COV de $25 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$, obtiveram valores inferiores, utilizando sistema único, de $0,250 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total}} \text{ removida})^{-1}$ e superiores no sistema em dois estágios de $0,316 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total}} \text{ removida})^{-1}$, o que indica a necessidade da fase acidogênica para melhorar a produção de energia a partir de vinhaça.

TABELA 9. Características do biogás e produção específica de metano nos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4), instalados em série.

Parâmetros	Reator	Fases								c.v.	F
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
Produção Volumétrica de metano (LCH ₄ (L d) ⁻¹)	R1	0,305 c	0,348 c	0,150 de	0,341 c	1,230 a	0,212 d	0,085 e	0,531 b	95,20	308,90**
	R2	0,453 bc	0,446 bc	0,218 d	0,379 c	1,233 a	0,391 bc	0,144 d	0,492 b	79,05	179,48**
	R3	0,149 d	0,055 e	0,132 de	0,277 c	0,671 a	0,371 b	0,148 d	0,410 b	87,46	121,52**
	R4	0,119 cd	0,052 d	0,061 d	0,200 c	0,708 a	0,391 b	0,060 d	0,298 b	116,14	120,38**
	Rt	0,292 c	0,286 c	0,157 d	0,330 c	1,065 a	0,305 c	0,125 d	0,470 b	82,69	301,12**
Produção específica de metano (LCH ₄ (g DQOremovida) ⁻¹)	R1	0,249 a	0,179 b	0,256 a	0,224 ab	0,201 ab	0,111 c	0,053 c	0,080 c	75,21	33,18**
	R2	0,326 a	0,293 a	0,282 a	0,237 a	0,253 a	0,186 a	0,208 a	0,276 a	89,34	2,15*
	R3	0,165 c	0,067 d	0,226 ab	0,216 bc	0,283 a	0,160 c	0,097 d	0,162 c	73,20	25,99**
	R4	0,121 b	0,105 b	0,073 b	0,087 b	0,384 a	0,123 b	0,025 b	0,072 b	222,45	12,09**
	Rt	0,289 a	0,207 c	0,255 ab	0,222 bc	0,240 abc	0,140 d	0,077 e	0,101 de	59,43	42,96**
Metano no biogás (%)	R1	56 c	50 d	39 e	62 b	58 bc	49 d	71 a	58 bc	21,73	102,39**
	R2	69 b	68 b	68 b	56 d	71 ab	62 c	74 a	62 c	13,95	40,37**
	R3	76 a	46 e	72 ab	59 d	71 b	67 c	75 ab	66 c	18,06	115,68**
	R4	78 a	68 b	49 d	63 c	80 a	71 b	79 a	71 b	16,35	212,85**

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.

5.5 Macronutrientes e micronutrientes

O nitrogênio e o fósforo são nutrientes essenciais para os micro-organismos, incluindo os metanogênicos, e a absorção de nitrogênio pode ocorrer na forma de diferentes compostos de nitrogenados (Mccarty et al., 2001).

Como foi realizado a suplementação de uréia no afluente durante todo período da pesquisa, observou-se que o nitrogênio kjedahl não foi limitante para a digestão anaeróbia da vinhaça, com a relação DQO:N superior a 350:5, considerada ideal (Tabela 10) (Chernicharo, 2007), principalmente durante as fases I a V, demonstrando alcalinidade parcial elevada e estabilidade para remoção de DQO_{total} e produção de metano. As concentrações de nitrogênio Kjedahl (NK) aumentaram de 639 para 1297 mg L⁻¹, com os maiores valores nas fases IV e V. Esse aumento na quantidade de nitrogênio pode ter ocorrido devido a recirculação do efluente do reator R4, que contribuiu para que parte do nitrogênio não degradado retornasse para o sistema.

A adição de ureia para a digestão anaeróbia de vinhaça e posterior utilização da vinhaça biodigerida na fertirrigação é estratégia promissora para a redução de custos na lavoura, pois a decomposição da ureia libera amônia, o que poderia aumentar o teor de N na vinhaça e reduzir custos com a suplementação de fertilizantes minerais (Janke et al., 2017; Fuess et al., 2018)

Além disso a adição da ureia pode aumentar a alcalinidade do sistema de digestão anaeróbia, por meio da conversão da ureia em $\text{OH}^- + \text{NH}_4^+$ (Janke et al., 2016).

Os valores de P_{total} ficaram abaixo dos recomendados, que é de 350:1 (DQO: P_{total}), exceto na Fase I (Tabela 10). As maiores concentrações observadas na Fase I, pode ser explicado pelo fósforo remanescente contido nas águas residuárias de suinocultura tratadas nos reatores RAHLF, antes da realização deste trabalho.

Os valores de eficiência de remoção de NK e P_{total} nos reatores em série (R1 + R2 + R3 + R4) variaram de 12 a 46% e de 32 a 92%, respectivamente (Figura 10A e 10B). Onodera et al., (2013) concluíram que a remoção do NK e P_{total} dos reatores anaeróbios pode ser resultado da síntese celular e da precipitação de fosfato de cálcio no lodo anaeróbio.

TABELA 10. Concentrações (mg L⁻¹) e eficiência de remoção (%) dos macro nutrientes NK, P-total e K no afluente e efluente dos reatores RAHLF em série (R1, R2, R3 e R4) no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.

		Fases									
Parâmetros		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	c.v.	F
Afluente - DQO:N:P (350:5:1)											
	DQO	350	350	350	350	350	350	350	350		
	N	28	25	23	27	16	6	7	7		
	P	1,3	0,3	0,6	0,1	0,1	0,3	0,1	0,03		
NTK	Afluente	639 a	671 a	539 a	1297 a	1168 a	578 a	818 a	669 a	66	2,34*
	R1	584 b	832 b	582 b	1762 a	1106 b	732 b	751 b	662 b	69	8,84**
	R2	464 b	856 ab	644 b	2069 a	1244 ab	857 ab	814 ab	692 b	76	4,49**
	R3	595 a	541 a	635 a	1138 a	1073 a	669 a	721 a	918 a	62	ns
	R4	700 a	745 a	548 a	1189 a	1016 a	504 a	611 a	459 a	68	ns
P _{total}	Afluente	30 a	7 c	15 bc	6 c	5 c	26 ab	15 bc	1,2 c	85	10,21**
	R1	24 a	6 c	17 ab	6 c	5 c	27 a	9 bc	0,27 c	96	16,66**
	R2	19 ab	5 bc	15 abc	6 bc	5 bc	25 a	10 abc	0,20 c	91	6,11**
	R3	24 a	5 abc	14 abc	4 bc	5 abc	23 ab	15 abc	0,3 c	104	5,10**
	R4	14 b	6 b	12 b	2 b	6 b	32 a	13 b	8 b	98	8,77**
K	Afluente	73 ab	91 ab	111 a	90 ab	51 bc	68 abc	25 c	9 c	56	9,9**
	R1	69 a	92 a	99 a	93 a	67 a	64 a	19 b	13 b	54	9,73**
	R2	81 a	70 a	92 a	110 a	65 ab	73 a	20 b	13 b	58	7,4**
	R3	76 ab	91 ab	101 ab	82 ab	72 b	72 b	75 b	138 a	32	2,82*
	R4	126 a	96 a	95 a	81 a	73 a	68 a	72 a	66 a	55	ns
	Remoção (%)	28 a	31 a	27 a	39 a	35 a	12 a	38 a	0 a	75	ns

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.

Não foram observadas remoções significativas de potássio (K), e os maiores valores foram observados no afluente, de 111 mg L^{-1} (Tabela 10). De acordo com Chen et al., (2007) as concentrações baixas de potássio, menores que 400 mg L^{-1} melhoram o desempenho em reatores anaeróbios termofílicos e mesofílicos. Portanto, o potássio disponível no efluente e o NK e o P_{total} , retido no lodo poderão ser utilizados para a fertirrigação e adubação, e assim, substituir parte da adubação mineral e diminuir os custos de produção. Segundo Arienzo et al., (2009) a aplicação das águas residuárias com níveis elevados de potássio é feita com intuito de aumentar a fertilidade do solo, com a exceção de efluentes alcalinos que podem dissolver carbono orgânico no solo.

As eficiências de remoção de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu foram baixas e esses elementos permaneceram no efluente (Tabela 11). Segundo Barros et al., (2017) essa característica é interessante, porque o efluente pode ser usado na fertirrigação da cana-de-açúcar. Assim, os nutrientes disponíveis no efluente e retidos no lodo podem ser usados substituindo parte do fertilizante mineral e reduzindo os custos de produção da cultura da cana-de-açúcar. As concentrações de Ca, Fe, Zn, Mg, Cu e Mn no afluente do R1 e efluente do R4 foram de 12,0; 27,8; 33,5; 18,6; 0,9 e $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ e de 8,5; 7,0; 12,3; 13,1; 0,7 e $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabelas 11 e 12). Os micronutrientes estão principalmente relacionados ao papel de cofatores em numerosas reações enzimáticas envolvidas na bioquímica da formação de metano. Especialmente notáveis são os resultados relatados para Fe que, juntamente com seu baixo custo, o torna um suplemento promissor em digestores anaeróbios (Romero-Guiza et al., 2016). Além do papel como fator de crescimento, o Fe também atua na estimulação da formação de citocromos e ferroxinas (Fd), que são vitais para o metabolismo energético celular (Choong et al., 2016) e também é usado frequentemente para reduzir a concentração de sulfeto de hidrogênio no biogás (Xu et al., 2017). Segundo Demirel e Scherer, (2011) a disponibilidade ou a falta de elementos traços como Fe, Co, Ni, Zn, Mo definitivamente possuem papel significativo na manutenção do processo e na conversão estável e eficiente.

Janke et al. (2016) avaliaram a suplementação de uréia, fosfato e elementos traços, em um sistema UASB, com intuito de aumentar a estabilidade do processo e a produção de biogás a partir da vinhaça. De acordo com os resultados obtidos, o fosfato na forma de KH_2PO_4 induziu o acúmulo de ácidos graxos voláteis possivelmente devido à inibição da metanogênese pelo potássio, embora o nitrogênio na forma de uréia tenha aumentado a alcalinidade do reator, o processo foi sobrecarregado com uma COV de $6,1 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ e um TDH de 3,6 dias. No entanto, complementando uréia e elementos traços foi possível operação estável, mesmo a uma taxa de carregamento

orgânico de $9,6 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ e um TDH de 2,5 dias foi possível, resultando em uma taxa de produção de metano 79% maior com uma produção de metano específica estável de $239 \text{ mL g COD}^{-1}$.

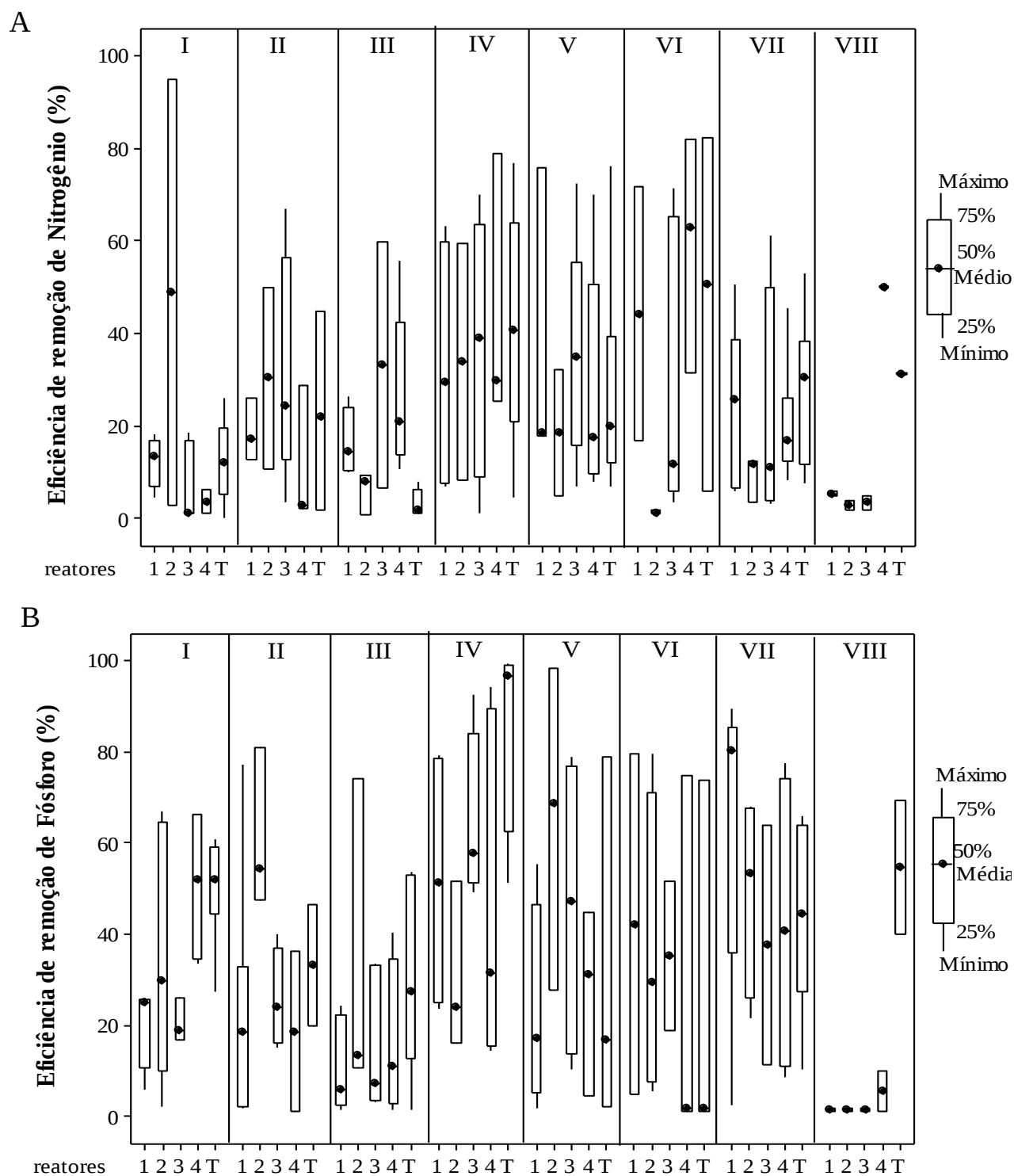


FIGURA 10. (A) Eficiência de remoção de Fósforo (B) Eficiência de remoção de Nitrogênio total kjeldahl nos reatores anaeróbios horizontais (RAHLF) de alta taxa. T: R1 + R2 + R3 + R4.

TABELA 11. Valores médios de macro e micronutrientes, Ca, Fe e Zn, do afluente e efluentes dos reatores RAHLF, em série (R1, R2, R3, R4).

Fases	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	c.v.	F
Ca										
Afluente	5,0 bc	6,1 abc	12,0 ab	3,9 c	3,2 c	13,5 a	9,7 abc	7,3 abc	73,2	4,92**
Efluente (R1)	3,5 d	4,9 bcd	10,4 abc	4,5 cd	3,3 d	14,4 a	10,4 ab	6,3 abcd	72,88	8,21**
Efluente (R2)	3,9 b	4,6 b	8,4 ab	2,8 b	3,1 b	13,7 a	10,0 a	4,4 b	76,11	8,96**
Efluente (R3)	4,7 bc	5,4 bc	5,1 bc	1,8 c	3,8 c	13,7 a	9,5 ab	4,20 bc	80,47	7,27**
Efluente (R4)	3,8 cd	5,3 bcd	9,5 abc	1,8 d	3,3 d	15,3 a	9,8 ab	4,6 bcd	81,09	10,25**
Eficiência (R1 + R4)	41,1 ab	38,4 ab	67,1 a	51,7 ab	48,8 ab	21,5 ab	15,1 b	33,2 ab	53,17	2,5
Fe										
Afluente	5,7 a	5,9 a	33,1 a	7,0 a	13,9 a	22,1 a	10,8 a	5,3 a	172,88	ns
Efluente (R1)	4,6 a	10,5 a	20,3 a	7,2 a	16,3 a	29,2 a	11,3 a	8,2 a	123,9	ns
Efluente (R2)	4,5 c	4,7 c	4,2 c	7,4 bc	15,0 ab	18,5 a	9,9 abc	6,6 bc	77,78	6,79**
Efluente (R3)	4,3 a	8,6 a	31,1 a	24,9 a	13,9 a	18,1 a	9,411 a	3,3 a	203,68	ns
Efluente (R4)	4,2 c	5,7 c	7,4 bc	6,7 c	15,8 ab	22,1 a	10,6 bc	2,0 c	78,11	8,75**
Eficiência (R1 + R4)	34,4 a	22,7 a	56,1 a	25,3 a	10,2 a	6,4 a	29,6 a	62,0 a	84,16	2,47*
Zn										
Afluente	4,8 a	2,4 a	0,5 a	6,1 a	52,6 a	33,5 a	8,2 a	1,6 a	231,81	2,80*
Efluente (R1)	3,7 a	6,1 a	0,0 a	4,9 a	39,4 a	26,3 a	15,2 a	0,4 a	210,42	ns
Efluente (R2)	5,5 a	6,8 a	0,9 a	4,8 a	66,7 a	9,6 a	8,1 a	1,1 a	273,76	2,85*
Efluente (R3)	5,3 b	15,5 ab	1,1 b	18,4 ab	74,6 a	18,1 ab	6,2 b	0,7 b	196,09	4,15**
Efluente (R4)	26,0 a	8,3 a	1,5 a	4,2 a	72,1 a	12,3 a	22,1 a	0,4 a	244,20	ns
Eficiência (R1 + R4)	44,4 a	56,5 a	100,0 a	58,8 a	40,3 a	56,6 a	75,7 a	74,0 a	46,26	ns

c.v -coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 55%. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) ns - não significativo ($p > 0,05$); p - probabilidade. Eficiência de remoção: %

TABELA 12. Valores médios de macro e micronutrientes, Mg, Cu e Mn do afluente e efluentes dos reatores RAHLF em série (R1, R2, R3 e R4).

Fases	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	c.v.	F
Mg										
Afluente	15,5 ab	9,7 ab	22,3 a	18,2 ab	9,3 b	12,6 ab	13,0 ab	7,5 b	55,28	3,31**
Efluente (R1)	16,9 ab	10,0 b	27,9 a	15,4 ab	13,2 ab	13,3 ab	13,1 ab	11,1 b	63,39	2,80*
Efluente (R2)	19,1 ab	7,7 b	23,8 a	16,8 ab	10,8 ab	12,0 ab	15,3 ab	9,2 ab	65,7	2,52*
Efluente (R3)	24,7 a	10,2 b	14,2 ab	13,4 ab	11,1 b	11,8 ab	13,5 ab	20,4 ab	59,08	2,72*
Efluente (R4)	16,2 a	10,8 a	21,9 a	12,8 a	12,7 a	12,5 a	12,3 a	21,4 a	55,66	ns
Eficiência (R1 + R4)	39,6 a	15,1 a	41,0 a	31,2 a	16,3 a	16,5 a	12,5 a	0,1 a	95	ns
Cu										
Afluente	0,6 ab	0,2 ab	0,929 a	0,3 ab	0,4 ab	0,3 ab	0,1 ab	0,02 b	123,1	2,69*
Efluente (R1)	1,0 ab	0,3 abc	1,07 a	0,3 abc	0,6 abc	0,2 bc	0,1 c	0,05 c	121,85	5,13**
Efluente (R2)	0,8 ab	0,2 ab	1,05 a	0,3 ab	0,4 ab	0,1 b	0,1 b	0,04 b	137,28	3,99**
Efluente (R3)	0,8 a	0,2 a	0,6 a	0,2 a	0,4 a	0,1 a	0,1 a	0,00 a	167,46	ns
Efluente (R4)	0,4 abc	0,3 bc	0,79 a	0,2 bc	0,5 ab	0,2 bc	0,1 bc	0,00 c	99,78	6,14**
Eficiência (R1 + R4)	55,5 ab	16,6 b	40,9 ab	48,9 ab	18,6 b	52,5 ab	49,6 ab	100,0 a	64	2,88*
Mn										
Afluente	1,5 a	1,5 a	2,7 a	3,7 a	1,4 a	4,9 a	3,4 a	1,3 a	103,35	ns
Efluente (R1)	1,3 a	1,5 a	2,9 a	2,9 a	1,9 a	5,3 a	3,6 a	1,3 a	94,97	ns
Efluente (R2)	0,9 c	1,2 bc	2,7 abc	1,4 bc	1,3 bc	4,2 a	3,6 ab	0,9 c	83,67	6,05**
Efluente (R3)	1,0 a	1,1 a	1,7 a	2,8 a	1,3 a	4,2 a	1,6 a	1,0 a	120,97	ns
Efluente (R4)	0,6 c	1,3 bc	2,5 bc	0,8 c	1,3 bc	5,5 a	3,6 ab	0,4 c	96,85	10,54**
Eficiência (R1 + R4)	51,6 ab	46,4 ab	43,0 ab	53,0 ab	25,0 ab	56,6 ab	5,8 b	66,6 a	65,01	3,27**

c.v -coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 55%. ** - Significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$); * - Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) ns - não significativo ($p > 0,05$); p - probabilidade. Eficiência de remoção: %.

Segundo Romero-Guiza et al., (2016) a suplementação de macro e micronutrientes foram utilizados com sucesso para superar a instabilidade da digestão anaeróbia através da melhoria da capacidade tampão do sistema e da atividade da biomassa anaeróbia, de acordo com os autores, este último tem sido principalmente relacionado ao papel dos micronutrientes como cofatores em inúmeras reações enzimáticas envolvidas na bioquímica da formação de metano.

Schmidt et al., (2018) avaliaram a digestão anaeróbia de efluente de matadouro com a adição de elementos traços, utilizando reatores CSTR operados à temperatura mesofílica. De acordo com os autores a adição de Fe, Ni, Co, Mn e Mo resultaram em maior eficiência de degradação, melhor estabilidade do processo e maior produção de biogás diária, sendo 84% maior em comparação com os reatores controle

Choong et al. (2016) analisaram criticamente os impactos da suplementação no desempenho da digestão anaeróbica. Ressaltaram que em vez de se adicionar os micronutrientes no digestor, o conteúdo existente de elementos traços nas matérias-primas deve ser bem utilizado. Por exemplo, a estratégia de co-digestão do substrato, que foi investigado por Barros et al. (2017) evidenciam que a digestão anaeróbia com suplementação principalmente de nitrogênio e fósforo, proveniente da adição de torta de filtro de cana-de-açúcar e a recirculação do efluente, contribuíram para o aumento da conversão da vinhaça em metano, estabilidade do processo e redução dos efeitos de possíveis choques de cargas orgânicas.

Além dos macronutrientes como carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S), os micro-organismos anaeróbios também exigem elementos traços, com uma concentração relativamente menor (Choong, et al. 2016). Consequentemente, as concentrações ótimas desses elementos são necessárias para manter a estabilidade do sistema. Com base no coeficiente de rendimento teórico das arqueias metanogênicas, a proporção de elementos essenciais em relação à remoção de DQO pode ser estimada. Usando o cálculo teórico descrito por Wu et al., (2016), foi determinado os valores teóricos ótimos para os elementos previamente descritos e comparamos com os dados experimentais obtidos para os efluentes dos reatores RAHLF. Como observado na (Tabela 13), os resultados obtidos estão entre os valores calculados para a maioria dos elementos analisados, com exceção das proporções de Fe que aumentou na fase III, e o Zn e Mn, que tiveram valores superiores em praticamente todas as fases com exceção da fase VIII (Tabela 13).

TABELA 13. Valores de macro e micronutrientes analisados nos efluentes dos reatores RAHLF nas fases I - VIII e os valores calculados.

Parâmetros	Ca - 1,3 a 45,4*								Mg - 1,4 a 56,5*							
	Fases								Fases							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
R1	4,15	2,28	13,28	1,82	0,43	9,23	8,05	1,88	12,95	3,64	23,63	8,77	1,26	8,42	9,67	3,29
R2	2,85	3,10	9,97	1,74	0,58	8,91	6,99	2,07	13,91	6,35	24,74	8,02	2,32	7,79	10,25	4,31
R3	7,23	7,12	16,05	2,14	1,55	8,09	6,92	1,83	35,70	11,79	47,77	12,61	5,36	6,71	9,53	8,87
R4	12,89	10,61	11,36	1,64	2,82	4,42	1,53	0,26	67,68	19,91	35,23	11,56	8,20	1,86	1,87	1,22
	Zn - 0,1 a 6,6*								Fe - 1,1 a 30,1*							
R1	4,01	0,90	0,62	3,20	7,12	16,62	11,26	0,13	4,72	2,23	32,91	3,30	1,87	18,5	8,4	2,4
R2	3,08	3,86	0,15	2,78	6,91	6,20	5,42	0,53	3,80	6,64	17,64	3,70	2,86	12,0	6,6	3,1
R3	10,21	10,54	1,79	3,99	33,22	10,28	4,38	0,29	8,45	7,31	9,95	5,41	7,45	10,3	6,6	1,5
R4	14,41	30,39	6,19	16,99	55,31	1,83	3,37	0,02	11,86	16,78	114,01	5,29	10,32	3,3	1,6	0,1
	Cu - 0,02 a 1,69*								Mn - 0,04 a 0,75*							
R1	0,52	0,09	0,94	0,15	0,06	0,11	0,07	0,01	1,21	0,57	5,00	0,80	0,19	3,33	2,66	0,40
R2	0,80	0,16	0,92	0,13	0,10	0,08	0,06	0,02	1,06	0,92	4,05	0,65	0,33	2,74	2,42	0,43
R3	1,47	0,29	2,01	0,21	0,22	0,08	0,05	0,00	1,64	1,81	5,35	1,00	0,66	2,41	1,16	0,42
R4	2,19	0,44	1,31	0,20	0,32	0,02	0,01	0,00	2,74	2,18	8,33	0,88	0,93	0,82	0,55	0,02

* Valores ideais de macro e micronutrientes para metanogênicos calculados de acordo com Wu et al. (2016) (mg / g DQOremovida); unidades: Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn: mg L⁻¹.

,Schmidt et al., (2014) avaliando estratégia de dosagem de elementos traços para a digestão anaeróbica de vinhaça de trigo, em reatores CSTR mesofílicos, verificaram que o reator com deficiência de Fe / Ni, resultou em rápido acúmulo no conteúdo de AGV.

Suárez et al., (2018) avaliaram o efeito da COV no desempenho e composição microbiana de um sistema UASB de dois estágios tratando águas residuárias de processamento de café, com COV de até 18,2 g DQO (L d)⁻¹ e recirculação de efluentes. Segundo os autores o sistema apresentou, estabilidade operacional, obtendo uma produção máxima de metano de 2,2 L CH₄ (L d)⁻¹, com eficiência de remoção de DQO de 84% e concluem que estas condições foram favorecidas pela operação do reator de segundo estágio, recirculação de efluentes e proporção de nutrientes (particularmente aumento de Fe).

De acordo Choong et al. (2016) a suplementação com elementos traços é eficaz para melhorar o desempenho do processo de digestão anaeróbica através da aplicação da dosagem ótima ideal, principalmente quando utilizado para os substratos que apresentam baixo teor destes elementos, como a vinhaça (Gustavsson et al., 2013).

5.6 Sólidos totais e sólidos voláteis

A relação SV/ST média do lodo nos reatores RAHLF R1, R2, R3 e R4 foram inferiores a 0,7 (Figura 11). De acordo com a Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) (Brasil, 2006) para fins de utilização agrícola, o lodo de esgoto ou produto derivado será considerado estável se a relação SV/ST for inferior a 0,70. Assim, observou-se que o lodo foi estabilizado e quando necessário, observando-se a relação SV/ST, poderia-se retirar o lodo excedente em todos os pontos de coleta dos reatores RAHLF, e o mesmo poderá ser destinado à agricultura.

Os valores de sólidos voláteis (SV) do lodo nos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4) aumentaram com o aumento gradual da COV, que proporcionou aumento da quantidade de matéria orgânica disponível para biodegradação, elevando a multiplicação da biomassa microbiana e manutenção de altas concentrações (SV de 20 a 40 g L⁻¹) de lodo biológico ativo em todos reatores (Figura 12).

No presente estudo não foi necessário fazer descarte de lodo durante todo período de operação dos reatores, com isso, verificamos acúmulo da biomassa, que possibilitou retomada estável, após 120 dias sem operação do sistema, durante a entressafra da cana-de-açúcar. O mesmo foi verificado por Damianovic et al. (2016), avaliaram o uso potencial de um reator RAHLF para o tratamento a longo prazo (888

dias), de águas residuárias sintéticas, e observaram que a capacidade dos reatores anaeróbicos em suportar longos períodos sem alimentação torna a sua aplicação viável em processos sazonais, e a estabilidade do processo a longo prazo ocorreram sem descarga de biomassa.

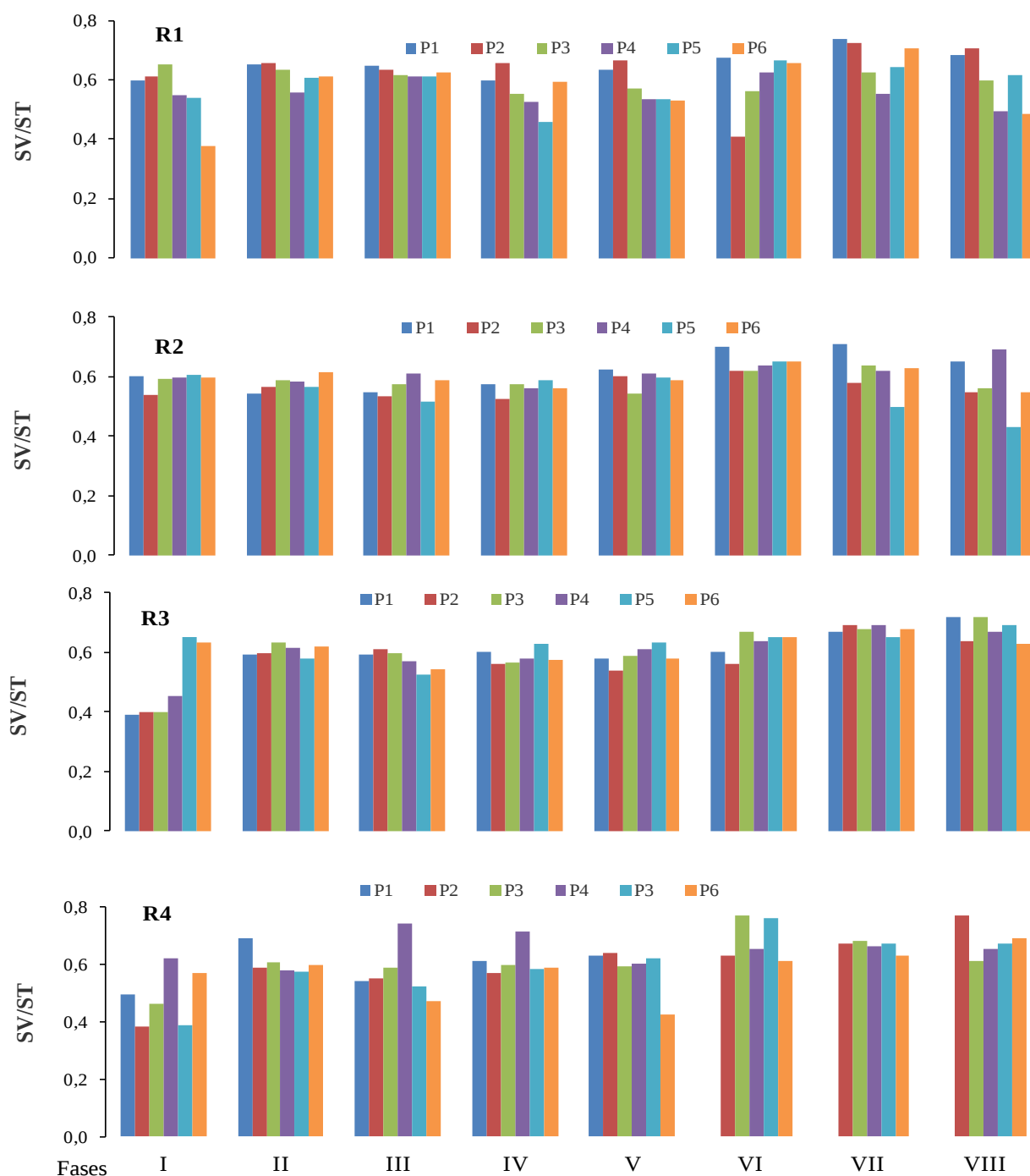


FIGURA 11. Relação de sólidos voláteis e totais (SV/ST), nos 6 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4, P5 e P6 dos reatores RAHLF em série, no tratamento anaeróbico mesofílico da vinhaça.

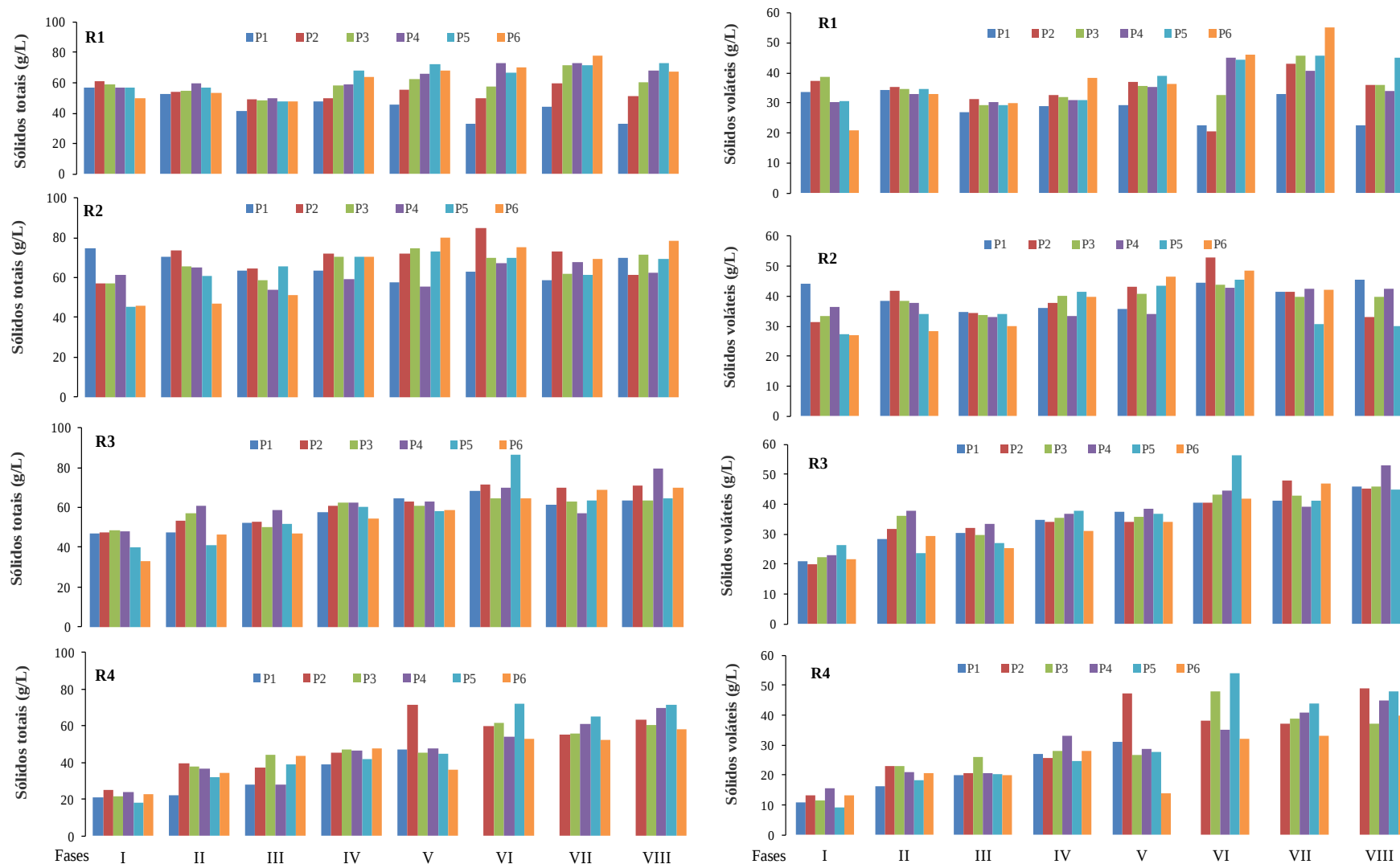


FIGURA 12. Concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV), nos 6 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4, P5 e P6 dos reatores RAHLF em série, no tratamento anaeróbio mesofílico da vinhaça.

5.7 Quantificação da microbiota presente nos reatores da fase 5

A digestão anaeróbica é usada com sucesso para o tratamento de resíduos sólidos urbanos e efluentes industriais com produção de energia concomitante. Por ser processo robusto e estável ainda existe pouco estudo e detalhamento da comunidade microbiana. Atualmente, o estudo deste ecossistema complexo é facilitado pela disponibilidade de diferentes ferramentas moleculares (Cabezas et al., 2015).

Dentre as diversas técnicas moleculares utilizadas, a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), muito sensível e reprodutível, vem sendo utilizada para identificar e quantificar grupos microbianos responsáveis pelas diversas etapas da digestão anaeróbia (Barros et al., 2017; Cerrilho et al., 2016; Duda et al., 2015).

Neste trabalho, os resultados da qPCR permitiram quantificar os principais microrganismos da digestão anaeróbia no lodo dos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4) durante a fase 5, em que foi aplicado no R1 COV média de $20,0 \text{ gDQO (L d)}^{-1}$ e observou-se maiores produções volumétricas de metano, com porcentagem em torno de 70%. Na (Figura 13) observa-se valores do número de cópias do gene 16S rDNA/g SV semelhantes entre os domínios Bacteria ($8 \times 10^9 - 6 \times 10^{10}$ de cópias do gene 16S rDNA/g SV) e Archaea ($2 \times 10^8 - 2 \times 10^9$ de cópias do gene 16S rDNA/g SV), nos diferentes reatores analisados. Essa diferença entre os domínios pode ser explicado devido ao maior número de funções que são realizados pelo domínio Bacteria, no entanto a diferença de concentração não é grande, porque as Archaea tem baixas taxas de multiplicação (μ) e de utilização de substrato (k) e portanto devem estar presentes em altas concentrações para converter as elevadas quantidades de acetato, H_2 e CO_2 em metano, como ocorreu na Fase V.

A digestão anaeróbica (DA) depende da atividade de comunidades microbianas altamente diversificadas, incluindo hidrolíticas, acidogênicas e acetogênicas, bem como archaea metanogênica. A menor diversidade de archaea metanogênica em comparação com os grupos bacterianos envolvidos na DA e a falta de redundância funcional causa maior suscetibilidade das mesmas em condições desfavoráveis (privação dos elementos traço), controlando assim a estabilidade do processo todo (Wintsche et al., 2018). Portanto, nos resultados, este equilíbrio microbiano “quantitativo” indica que não houve falta de nutrientes (elementos traços) no sistema para as diversas arqueias.

Barros et al. (2017) avaliaram a microbiota da digestão anaeróbia com o uso da torta de filtro (rico em N,P e elementos traço) no tratamento da vinhaça em reatores UASB. Os autores verificaram que os domínios Bacteria e Archaea estavam em equilíbrio, porém a diversidade de arqueias ainda continuou sendo menor. Portanto em nosso sistema não foi necessário a adição desses nutrientes, os quais foram mantidos em concentrações adequadas com o auxílio da recirculação e com os macros e micronutrientes existentes no conteúdo da vinhaça, principalmente, nas fases I a V. .

Esta complexa relação microbiana é considerada vulnerável se houver variações no acúmulo de compostos em determinadas concentrações, tais como ácidos voláteis totais (AVT), amônia livre, ou alterações abruptas nas condições operacionais, como variação de pH e temperatura, que podem inibir alguns microrganismos a exercerem sua função (Chen et al., 2014; Amha et al., 2018). O que não foi verificado em nosso estudo, pois foi possível observar equilíbrio microbiano, mesmo com COV médias acima de 20 g DQOtotal (L d)⁻¹ e altas quantidades de AVT acima de 4000 mg L⁻¹ (Figura 6). Apesar das elevadas quantidades de AVT, as maiores concentrações foram da família Methanosaetaceae o que nos indicou que a metanogênese acetotrófica foi realizada principalmente por arqueias do gênero *Methanosaeta*. Para que a estabilidade ocorra nos reatores anaeróbios, a concentração de arqueias deve ser próxima a de bactérias, para que possam utilizar eficientemente os substratos produzidos pelas mesmas, uma vez que os micro-organismos arqueias apresentam baixo crescimento e menores taxas de utilização de substrato que as bactérias (Barros et al. 2017).

Em relação às ordens, a Methanosarcinales (2×10^7 de cópias do gene 16S rDNA/g SV) se destacou em todos os reatores (Figura 13), podendo ser considerada a grande responsável pela produção de metano, a partir de acetato, H₂ e CO₂, pois são mixotróficas. Enquanto, as arqueias da ordem Methanomicrobiales tiveram maior participação na metanogênese hidrogenotrófica em relação as da ordem Methanobacteriales, o relativo equilíbrio entre as concentrações de Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae nos indicou que para a via metanogênica acetoclástica houve participação ativa de espécies arqueias de ambas as famílias.

Xing et al., (2017) utilizando compostos de triptona e acetato/propionato identificaram que a via metanogênica acetoclástica foi a dominante, com destaque para a Methanosarcina. Os mesmos autores avaliaram que em glicose ou etanol, as vias acetoclástica e hidrogenotrófica foram utilizadas simultaneamente, com abundância para Methanosarcina e Methanobacterium.

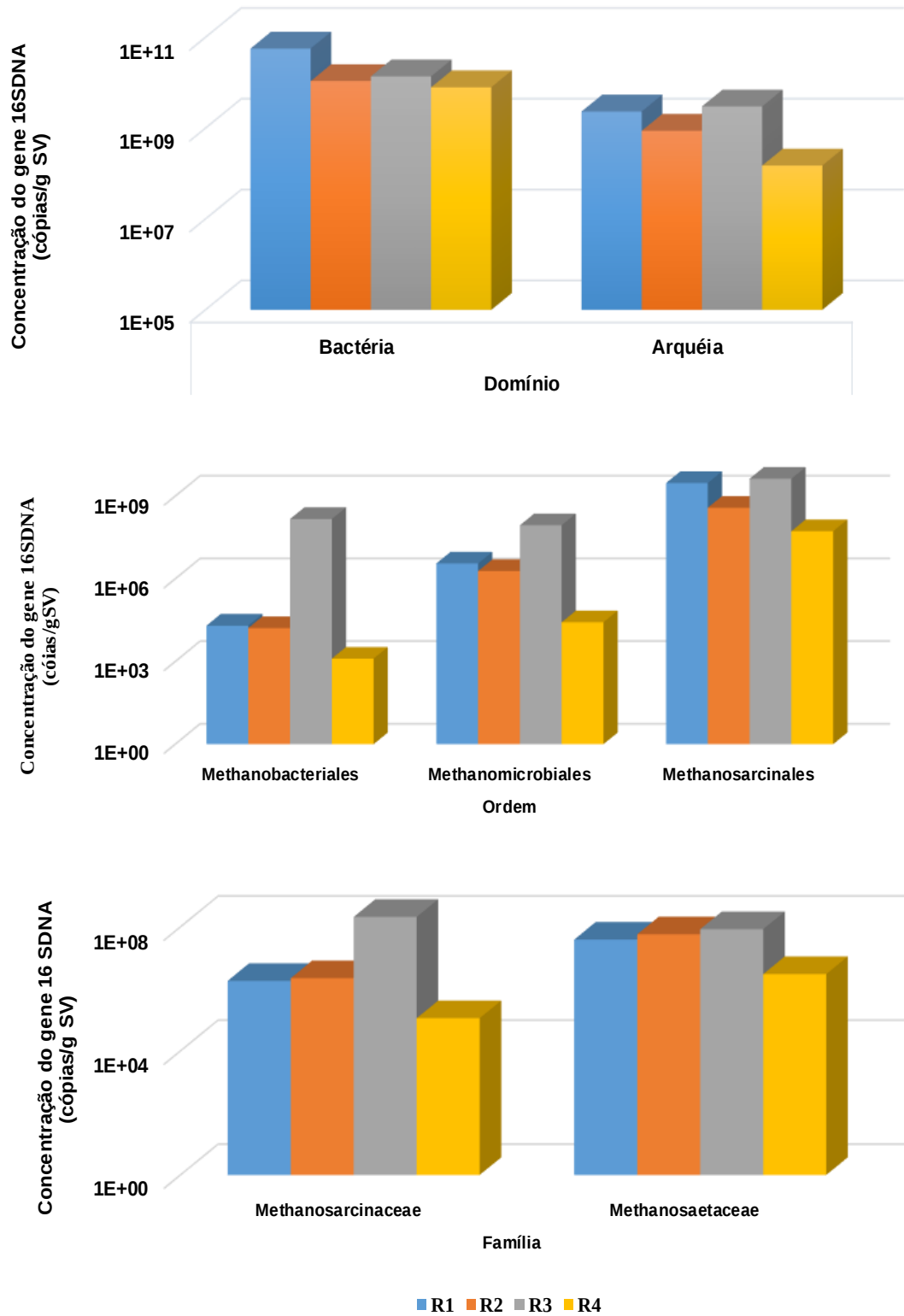


FIGURA 13. Quantificação absoluta do gene 16S rDNA por qPCR dos principais micro-organismos da digestão anaeróbia.

No presente estudo, a vinhaça, rica em compostos orgânicos, favoreceu a simultaneidade de ambas as vias da metanogênese (acetotrófica e hidrogenotrófica) (Figura 14). Esta adaptação das populações de arqueias metanogênicas sob condições de altas COV e AVT foi decorrente das fases anteriores (I a IV). O que indicando que os reatores R1 a R4 foram eficientes na decomposição inicial da vinhaça e de seus produtos intermediários, em virtude das altas concentrações de micro-organismos do domínio Bacteria. Com isso foi possível produzir os substratos necessários para as altas produções de metano, os quais foram convertidos com estabilidade devido as elevadas concentrações de arqueias metanogênicas.

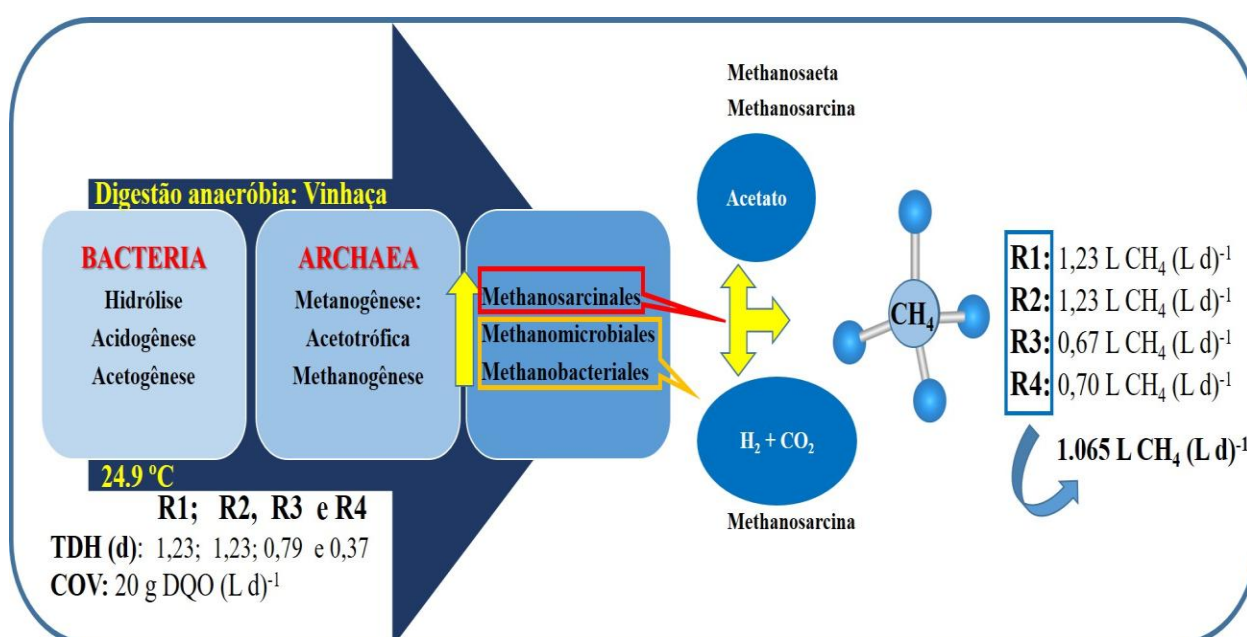


FIGURA 14. Representação esquemática da produção de metano, segundo os dados de qPCR.

6 CONCLUSÃO

A utilização de reatores anaeróbios em série e a recirculação do efluente do R4, permitiu a manutenção da estabilidade do sistema, mantendo níveis de alcalinidade suficiente para manter o pH apropriado na conversão de AVT, por micro-organismos acetogênicos e metanogênicos no sistema anaeróbio, e mesmo com a interrupção das operações na entressafra, observamos elevadas eficiências de remoções de matéria orgânica e produção de biogás, após um período de adaptação do lodo, que ocorreram sem descarte de biomassa, indicando assim baixa produção de biomassa nas condições avaliadas.

No sistema composto pelos reatores RAHLF em série foram observadas produções volumétricas de metano de até $1,06 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$, em condições de estabilidades, com COV média de $20 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$ no R1.

A quantificação absoluta dos principais micro-organismos metanogênicos, demonstraram valores semelhantes entre os domínios Bactéria e Archaea, nos reatores RAHLF em série R1, R2, R3 e R4 indicando situação favorável para o processo anaeróbio. Predominaram arqueias metanogênicas acetotróficas e mixotróficas da ordem Methanosarcinales seguidas das hidrogenotróficas da ordem Methanomicrobiales demonstrando que a produção de metano ocorreu por ambas as vias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adames LV (2017) **Co-digestão anaeróbia de resíduos vegetais e esgoto sanitário em reatores horizontais de leito fixo e alta taxa**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Amha YM, Anwar MZ, Brower A, Jacobsen CS, Stadler LB, Webster TM, & Smith AL (2018). Inhibition of anaerobic digestion processes: **Applications of molecular tools. Bioresource Technology**. V.247, p.999–1014.

APHA; AWWA; WPCF (2005) **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington.

Amorim AKB; Zaiat M; Foresti E (2005) Performance and stability of an anaerobic fixed bed reactor subjected to progressive increasing concentrations of influent organic matter and organic shock loads. **Journal of environmental management**, v. 76, n. 4, p. 319-325.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, & Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402.

Arienzo M, Christen EW, Quayle W, & Kumar AA (2009). review of the fate of potassium in the soil–plant system after land application of wastewaters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2-3, p. 415-422.

Arimi MM, Zhang Y, Götz G, Kiriamiti K, & Geißen SU (2014). Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 34-43.

Baraldi EA, Damianovic MH, Manfio GP, Foresti E, & Vazoller RF (2008). Performance of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor and dynamics of the microbial community during degradation of pentachlorophenol (PCP). **Anaerobe**, v. 14, n. 5, p. 268-274.

Barros VG; Duda RM; de Oliveira RA (2016). Biomethane production from vinasse in UASB reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 1–12.

Barros VG, Duda RM, Da Silva Vantini J, Omori WP, Ferro MIT, de Oliveira RA (2017). Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and *Thermotogae* bacteria. **Bioresource technology**, v. 244, p. 371-381.

BARROS VG (2017). **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**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Boncz MA, Formagini EL, Santos LDS, Marques RD, & Paulo PL (2012). Application of urea dosing for alkalinity supply during anaerobic digestion of vinasse. **Water Science & Technology**, v. 66, n. 11, p. 2453-2460.

Borges AC; Pereira PA; Matos ATM (2009). Partida de um reator anaeróbio horizontal para tratamento de efluentes do processamento dos frutos do cafeeiro. **Eng. Agríc.** Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 661-669.

Bouallagui H, Touhami Y, Cheikh RB, & Hamdi M (2005). Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. **Process biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 989-995, 2005.

Buitron G, Kumar G, Martinez-Arce A, Moreno G (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR+ CH₄-UASB) using tequila vinasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19249-19255.

Cabeza A, de Araujo JC, Callejas C, Galès A, Hamelin J, Marone A, & Etchebehere C (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 4, p. 555-593.

Cabrera-Díaz A, Pereda-Reyes I, Oliva-Merencio D, Lebrero R, & Zaiat M (2017). Anaerobic Digestion of Sugarcane Vinasse Through a Methanogenic UASB Reactor Followed by a Packed Bed Reactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1127-1145.

Cattony EBM, Chinalia FA, Ribeiro R, Zaiat M, Foresti E, & Varesche MBA (2005). Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 244-253.

Carrere H, Antonopoulou G, Affes R, Passos F, Battimelli A, Lyberatos G, Ferrer I (2016). Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. **Bioresource technology**, v. 199, p. 386-397.

Chen Ye; Cheng Jay J; Creamer kurt S (2007). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4044-4064.

Chen JL, Ortiz R, Steele TW, & Stuckey DC (2014). Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. **Biotechnology Advances**, v.32, p.1523-1534.

Cetesb, 2015. Vinasse—criteria and procedures for application to agricultural soil., Environmental Sanitation Technology Company (**Companhia de Tecnologia Ambiental**), de Saneamento. Brazil.

Chernicharo CADEL (2007). **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico em águas residuárias**. 2. ed ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG.

Conama. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2006. Resolução n. 375. Brazil. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>.

Choong YY, Norli I, Abdullah AZ, & Yhaya MF (2016). Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. **Bioresource technology**, v. 209, p. 369-379.

Companhia nacional de abastecimento (CONAB)- Acomp. safra bras. cana, v. 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-73, agosto 2018 - disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_24_08_59_54_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_17-18.pdf

Colin X, Farinet JL, Rojas O, & Alazard D (2007). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Bioresource technology**, v. 98, n. 8, p. 1602-1607.

Da Silva APM; Bono JAM; De Ar Pereira F (2014). Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 38-43.

Damianovic MHRZ, Moraes EM, Zaiat M, & Foresti E (2009). Pentachlorophenol (PCP) dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors. **Bioresource technology**, v. 100, n. 19, p. 4361-4367.

Damianovic MHRZ, Saia FT, De Godoi IAG, & Foresti E (2016). Long-term operation of anaerobic immobilized biomass reactor treating organic wastewater containing sulfate. **Journal of Water Process Engineering**, v. 13, p. 100-106.

Dilallo R; Albertson OE (1961). Volatile acids by direct titration. **Journal Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 33, n. 4, p. 356-365.

Duarte ICS, Oliveira IL, Saavedra NK, Fantinatti-Garboggini F, Menezes CBA, Oliveira VM, & Varesche MBA (2010). Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor. **Bioresource technology**, v. 101, n. 2, p. 606-612.

Fernandes GFR, de Oliveira RA (2006). Desempenho de processo anaeróbio em dois estágios (reator compartimentado seguido de reator UASB) para tratamento de águas residuárias de suinocultura. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 243-256.

De Francisci D, Kougias PG, Treu L, Campanaro S, Angelidaki I (2015). Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition. **Bioresource technology**, v. 176, p. 56-64.

De Jonge N, Moset V, Møller HB, & Nielsen JL (2017). Microbial population dynamics in continuous anaerobic digester systems during start up, stable conditions and recovery after starvation. **Bioresource technology**, v. 232, p. 313-320.

Demirel B, Yenigün O (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 7, p. 743-755.

Demirel B; Scherer P (2011). 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.

Dilallo R; Albertson O E (1961). Volatile acids by direct titration. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 356-365.

Dos Reis CM, Carosia MF, Sakamoto IK, Varesche MBA, & Silva EL (2015). Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **international journal of hydrogen energy**, v. 40, n. 27, p. 8498-8509.

Duda RM, Da Silva Vantini J, Martins IS, De Mello Varani A, Lemos MVF, Ferro MIT, de Oliveira RA (2015). A 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.

Feng Q; Song YC; Bae BU (2016). Influence of applied voltage on the performance of bioelectrochemical anaerobic digestion of sewage sludge and planktonic microbial communities at ambient temperature. **Bioresource technology**, v. 220, p. 500-508.

Ferraz Jr, ADN (2013). **Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Ferraz jr ADN, Wenzel J, Etchebehere C, & Zaiat M (2014). Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International journal of hydrogen energy**, v. 39, n. 30, p. 16852-16862.

Ferraz Jr ADN, Koyama MH, De Araújo Júnior MM, & Zaiat M (2016). Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252.

Foresti E; Zaiat M; Cabral AKA; Nery V (1995). Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor for Paper Industry Wastewater Treatment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 12, p. 157-163.

Fuess LT, Garcia ML (2014). Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. **Environmental technology**, v. 35, n. 3, p. 333-339.

Fuess LT, Kiyuna ISM, Ferraz Jr ADN, Persinoti GF, Squina FM, Garcia ML, & Zaiat M. (2017a) 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.

Fuess LT, de Araújo Júnior MM, Garcia ML, & Zaiat M (2017b). Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: How phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs?. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 209-220.

Fuess LT, Garcia ML, Zaiat M (2018). Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 29-40.

Galavoti RC (2003). **Efeitos das relações DQO/SO₄⁻² e das variações progressivas da concentração de sulfatos no desempenho de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)**. 287 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Global Renewable Fuels Alliance - Disponível em: <http://globalrfa.org/news-media/2017-forecast-global-ethanol-production-stable> .

Grover R; Marwaha SS; Kennedy JF (1999). Studies on the use of an anaerobic baffled reactor for the continuous anaerobic digestion of pulp and paper mill black liquors. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6-7, p. 653-657.

Hejnfelt A; Angelidaki I (2009). Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. **Biomass and bioenergy**, v. 33, n. 8, p. 1046-1054.

Hernandez-Martinez E, Puebla H, Mendez-Acosta HO, Alvarez-Ramirez J (2014). Fractality in pH time series of continuous anaerobic bioreactors for tequila vinasses treatment. **Chemical Engineering Science**, v. 109, p. 17-25.

Hwang K, Song M, Kim W, Kim N, Hwang S (2010). Effects of prolonged starvation on methanogenic population dynamics in anaerobic digestion of swine wastewater. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. S2-S6.

Janke L, Leite A, Nikolausz M, Schmidt T, Liebetrau J, Nelles M, Stinner W (2015). Biogas production from sugarcane waste: assessment on kinetic challenges for process designing. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 20685-20703.

Janke L, Leite AF, Batista K, Silva W, Nikolausz M, Nelles M, Stinner W (2016). 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.

Janke L, Weinrich S, Leite AF, Terzariol FK, Nikolausz M, Nelles M, & Stinner W (2017). Improving anaerobic digestion of sugarcane straw for methane production: Combined benefits of mechanical and sodium hydroxide pretreatment for process designing. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 378-389.

Jáuregui-Jáuregui JA, Méndez-Acosta HO, González-Álvarez V, Snell-Castro R, Alcaraz-González V, & Godon JJ (2014). Anaerobic treatment of tequila vinasses under seasonal operating conditions: Start-up, normal operation and restart-up after a long stop and starvation period. **Bioresource technology**, v. 168, p. 33-40.

Jenkins SR; Morgan JM; Sawyer CL (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 448-453.

Khan MA, Ngo HH, Guo W, Liu Y, Zhang X, Guo J, Chang SW, Nguyen DD, Wang J (2017). Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. **Renewable Energy**, v. 129, p. 754-768.

Kongjan P, Jariyaboon R, & Sompong O (2013). Anaerobic digestion of skim latex serum (SLS) for hydrogen and methane production using a two-stage process in a series of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19343-19348.

Kousi P, Remoundaki E, Hatzikioseyan A, Battaglia-Brunet F, Joulain C, Kousteni V, Tsezos M (2011). Metal precipitation in an ethanol-fed, fixed-bed sulphate-reducing bioreactor. **Journal of hazardous materials**, v. 189, n. 3, p. 677-684.

Kougias PG, Campanaro S, Treu I, Zhu X, & Angelidaki I (2017). 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.

Kuczman O; Torres DGB; Gomes SD; Tavares MHF; Alcantara MS (2007). Tratamento anaeróbico de efluente de fecalária em reator horizontal de uma fase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 36, Bonito. **Anais...** Jaboticabal: SBEA, 2007. 1 CD-ROM.

Lazaro CZ, Perna V, Etchebehere C, & Varesche MBA (2014). Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407-6418.

Li J; Li B; Zhu G; Ren N; Bo L; He J (2010). Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). **International Journal of Hydrogen Energy**, London, v. 32, n. 15, p. 3274-3283.

Lima CAA; Zaiat M; Foresti E (2005). Considerações sobre entupimentos em reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) tratando esgoto sanitário. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ABES, 2005. 1 CD-ROM.

Leme RM; Seabra JEA (2017). Technical-economic assessment of different biogas upgrading routes from vinasse anaerobic digestion in the Brazilian bioethanol industry. **Energy**, v. 119, p. 754-766.

Leng L, Yang P, Singh S, Zhuang H, Xu L, Chen WH, Dolting J, Li D, Zhang Y, Zeng H, Chu W, Lee PH (2017). A review on the bioenergetics of anaerobic microbial metabolism close to the thermodynamic limits and its implications for digestion applications. **Bioresour. Technol.**, n. 247, p. 1095–1106.

Lima de Oliveira L, Silveira Duarte IC, Sakamoto IK, Amâncio Varesche MB (2009). Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 2, p. 1261-1268.

López I; Borzacconi L; Passeggi M (2018). Anaerobic treatment of sugar cane vinasse: treatability and real-scale operation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1320-1327.

Liu CM, Wachemo AC, Yuan HR, Zou DX, Liu YP, Zhang L, Pang YZ, Li XJ (2018). Evaluation of methane yield using acidogenic effluent of NaOH pretreated corn stover in anaerobic digestion. **Renewable Energy**, v. 116, p. 224-233.

Lunedo R, Fernandez-Alarcon MF, Carvalho FMS, Furlan IR, & Macari M (2014). 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.

Mccarty PL (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. **Public works**, v. 95, n. 9.

Madejón E; Lopez R; Murillo JM; Cabrera F (2001). Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 84, n.1, p.55-65.

Marques MO (2006). Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E; NÓBREGA, J. C. M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP, p. 369-375.

Mazareli RCDS, Duda RM, Leite VD, de Oliveira RA (2016). Anaerobic co-digestion of vegetable waste and swine wastewater in high-rate horizontal reactors with fixed bed. **Waste Management**, v. 52, p. 112-121.

Moraes BS, Junqueira TL, Pavanello IG, Cavalett O, Mantelatto PE, Bonomi A, & Zaiat M (2014). 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.

Moraes BS, Zaiat M, Bonomi A (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903.

Mota VT; Santos FS; Amaral MCS (2013). 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.

Murto M; Björnsson L; Mattiasson BO (2004). Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. **Journal of environmental management**, v. 70, n. 2, p. 101-107.

Nasr N, Elbeshbishy E, Hafez H, Nakhla G, & El Naggar MH (2012). Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. **Bioresource technology**, v. 111, p. 122-126.

Nordell E, Nilsson B, Påledal SN, Karisalmi K, & Moestedt J (2016). Co-digestion of manure and industrial waste—The effects of trace element addition. **Waste Management**, v. 47, p. 21-27.

Nova Cana, (2015). Datagro faz suas estimativas para a safra 2015/16. Disponível em <<http://www.novacana.com/n/etanol/mercado/producao-etanol-2014-15-brasil-caminha-recorde-datagro/>>. Acesso em: 10 de fev. 2015.

Norma Cetesb P4.231 (2005). Vinhaça: **Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. São Paulo.

de Oliveira RA (1997). **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**. 1997. 359 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

de Oliveira RA; Bruno N (2013). Start-up of horizontal anaerobic reactors with sludge blanket and fixed bed for wastewater treatment from coffee processing by wet method. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 2, p. 353-366.

Onodera T, Sase S, Choeisai P, Yoochatchaval W, Sumino H, Yamaguchi T, & Syutsubo K (2013). Development of a treatment system for molasses wastewater: the effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. **Bioresource technology**, v. 131, p. 295-302.

Pap B, Györkei Á, Boboescu IZ, Nagy IK, Bíró T, Kondorosi É, Maróti G (2015). 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.

Pazuch FA, Nogueira CEC, Souza SNM, Micuanski VC, Friedrich L, & Lenz AM (2017). Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 34-42.

Ribas MMF (2006). **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbico operado em batelada seqüencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Ripley LE; Boyle WC; Converse JC (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 406-411.

Rizvi H, Ahmad N, Abbas F, Bukhari IH, Yasar A, Ali S, & Riaz M (2014). 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.

Romero-Güiza MS, Vila J, Mata-Alvarez J, Chimenos JM, & Astals S (2016). The role of additives on anaerobic digestion: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 1486-1499.

Rolim MM, C C Lyra MR, De Sousa Duarte A, Róbinson Fernandes de Medeiros P, Farias de França e Silva Ê, & Régis Pedrosa EM (2013). Influência de uma lagoa de distribuição de vinhaça na qualidade da água freática. **Revista Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**: v, v. 8, n. 1.

Salomon KR (2007). Avaliação técnico-econômica e ambiental da utilização do biogás proveniente da biodigestão da vinhaça em tecnologias para geração de eletricidade. **Itajubá, MG: Universidade Federal de Itajubá**.

Sambusiti C, Ficara E, Malpei F, Steyer JP, Carrère H (2013). Benefit of sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage on the anaerobic reactor stability and methane production. **Bioresource technology**, v. 144, p. 149-155.

Santana AM de (2004). **Atividade da microbiota e desempenho de Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo (UASB) em dois estágios tratando águas residuárias de suinocultura.** 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

Santana AM de; de Oliveira RA (2005). Desempenho de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo em dois estágios tratando águas residuárias de suinocultura. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 3, p. 817-830.

Santos AC Dos; de Oliveira RA (2011). Swine waste water treatment in horizontal anaerobic reactor followed by aerobic sequencing batch reactor. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 4, p. 781-794.

Santos SC, Rosa PRF, Sakamoto IK, Varesche MBA, & Silva EL (2014). Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International journal of hydrogen energy**, v. 39, n. 18, p. 9599-9610.

Santos FS, Ricci BC, França Neta LS, Amaral MCS (2017). Sugarcane vinasse treatment by two-stage anaerobic membrane bioreactor: Effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, biogas production and membrane fouling. **Bioresource technology**, v. 245, p. 342-350.

Sauer J, Dahmen N, Henrich E (2015). Chemical Reactor Types. **Encycl. Ind. Chem.** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–2.

Schmidt T, Nelles M, Scholwin F, & Pröter J (2014). Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage—optimization of metal dosing. **Bioresource technology**, v. 168, p. 80-85.

Schmidt T, McCabe BK, Harris PW, & Lee S (2018). Effect of trace element addition and increasing organic loading rates on the anaerobic digestion of cattle slaughterhouse wastewater. **Bioresource technology**, v. 264, p. 51-57.

Seabra JEA (2008). Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil.

SHUBEITA FM (2016). Análise e modelagem de sistema de digestão anaeróbica monitorado para previsão e busca de eficiência de operação.

Singla A, Verma D, Lal B, Sarma PM (2014). Enrichment and optimization of anaerobic bacterial mixed culture for conversion of syngas to ethanol. **Bioresource technology**, v. 172, p. 41-49.

Silva CEV (2008). **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir do melaço de cana-de-açúcar.** 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Siqueira LM; Damiano ESG; Silva EL (2013). Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, n. 13, p. 1707-1716.

Souza ME, Fuzaro G, Polegato AR (1992). Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. **Water Science Technology**; v. 25 p. 213–222.

Suárez WAB, da Silva Vantini J, Duda RM, Giachetto PF, Cintra IC, Ferro MIT, & Oliveira RA (2018). Predominance of syntrophic bacteria, Methanosaeta and Methanoculleus in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating coffee processing wastewater at high organic loading rate. **Bioresource technology**, v. 268, p. 158-168.

Steil L (2001). Avaliação do uso de inoculo na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frango de cortes e suínos. 2001. 109f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Stuckey DC (2012). Recent developments in anaerobic membrane reactors. **Bioresource technology**, v. 122, p. 137-148.

Tähti H; Kaparaju P; Rintala J (2013). Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 12, p. 4997-5002.

Tangkathitipong P, Intanoo P, Butpan J, Chavadej S (2017). Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Renewable Energy**, v. 113, p. 1077-1085.

Unica (2017). 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/historico-de-producao-e-moagem>.

Urbinati E; de Oliveira RA (2014). Anaerobic-aerobic treatment of swine wastewater in uasb and batch reactors in series. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 1, p. 124-142.

Wilkie AC.; Riedesel KJ.; Owens JM (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, Kidlington, v. 19, n. 2, p. 63-102.

Wu LJ, Kobayashi T, Kuramochi H, Li YY, & Xu KQ (2016). Effects of potassium, magnesium, zinc, and manganese addition on the anaerobic digestion of de-oiled grease trap waste. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, n. 7, p. 2417-2427.

Yenigün O; Demirel B (2013). Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 901-911.

Van Haandel A, de Vrieze J, Verstraete W, dos Santos VS (2013). 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.

Xing L, Yang S, Yin Q, Xie S, Strong PJ, & Wu G (2017). Effects of carbon source on methanogenic activities and pathways incorporating metagenomic analysis of microbial community. **Bioresource technology**, v. 244, p. 982-988.

Xu F, Li Y, Ge X, Yang L, Li Y (2017). Anaerobic digestion of food waste—Challenges and opportunities. **Bioresource technology**, v. 247, p. 1047-1058.

Zaiat M; Cabral AKA.; Foresti E (1994). Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactor for wastewater treatment: conception and performance evaluation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 11, p. 33-42.

Zaiat M; Cabral AKA.; Foresti E (1996). Cell wash-out and external mass transfer resistance in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactor. **Water Research**, v. 30, n. 10, p. 2435-2439.

Zaiat M; Vieira LGT; Foresti E (1997). Spatial and temporal variations of monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate. **Water Research**, v. 31, n. 7, p. 1760-1766.

Zaiat M (2003). **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias**. 135 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Zhang Q; Hu J; Lee Duu-Jong (2016). Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. **Renewable Energy**, v. 98, p. 108-119.

8 APÊNDICE

8.1 Partida dos reatores RAHLF com águas residuárias de suinocultura

Os valores médios da temperatura diária média durante a partida dos reatores RAHLF variaram de 14,8 a 27,7 °C, indicando que a partida foi realizada na faixa mesofílica. Os valores médios de temperatura máxima, média e mínima estão apresentados na (Figura 15).

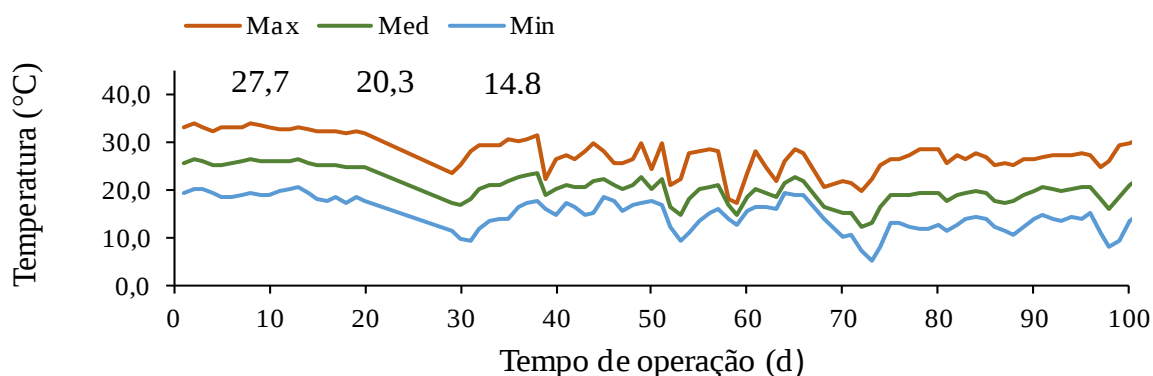


FIGURA 15. Valores de variação da temperatura (°C) do ar máxima, mínima e média durante a partida dos reatores RAHLF em série R1, R2, R3 R4.

8.2 pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal durante a partida dos reatores RAHLF.

Durante a partida os reatores RAHLF, os valores médios do pH no afluente mantiveram-se próximos de 7,0 (Figura 16A). Os valores médios da alcalinidade parcial (AP) aumentaram do R1 - 4, com o aumento da COV, com valores médios de 954 e 1617 ($\text{mg CaCO}_3\text{l}^{-1}$) (Figura 16B). Pode-se observar que os AVT diminuíram nos reatores R1 – 4 (Tabela 14), indicando que houve consumo dos ácidos gerados. Neste estudo durante a partida, foram observados valores de nitrogênio amoniacal (N-am) crescentes do afluente para o efluente do R4 (Figura 16F), indicando que ocorreu amonificação.

TABELA 14. Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI), no afluente e efluente dos reatores RAHLF mesofílico em série, R1, R2, R3 e R4.

Parâmetros	AT	c.v	AP	c.v	AI	c.v
Afluente	1808	41	954	53	855	41
R1	2019	35	1332	36	687	45
R2	2087	33	1517	35	570	47
R3	2094	32	1482	36	612	43
R4	2205	27	1617	25	588	45
	AVT	c.v	N-amoniacoal	c.v	AI/AP	c.v
Afluente	642	46	422	9	-	-
R1	551	32	416	15	0,5	59
R2	403	55	472	12	0,4	46
R3	402	53	482	11	0,5	73
R4	384	49	501	12	0,4	40

Unidades: mg L^{-1} , exceto pH

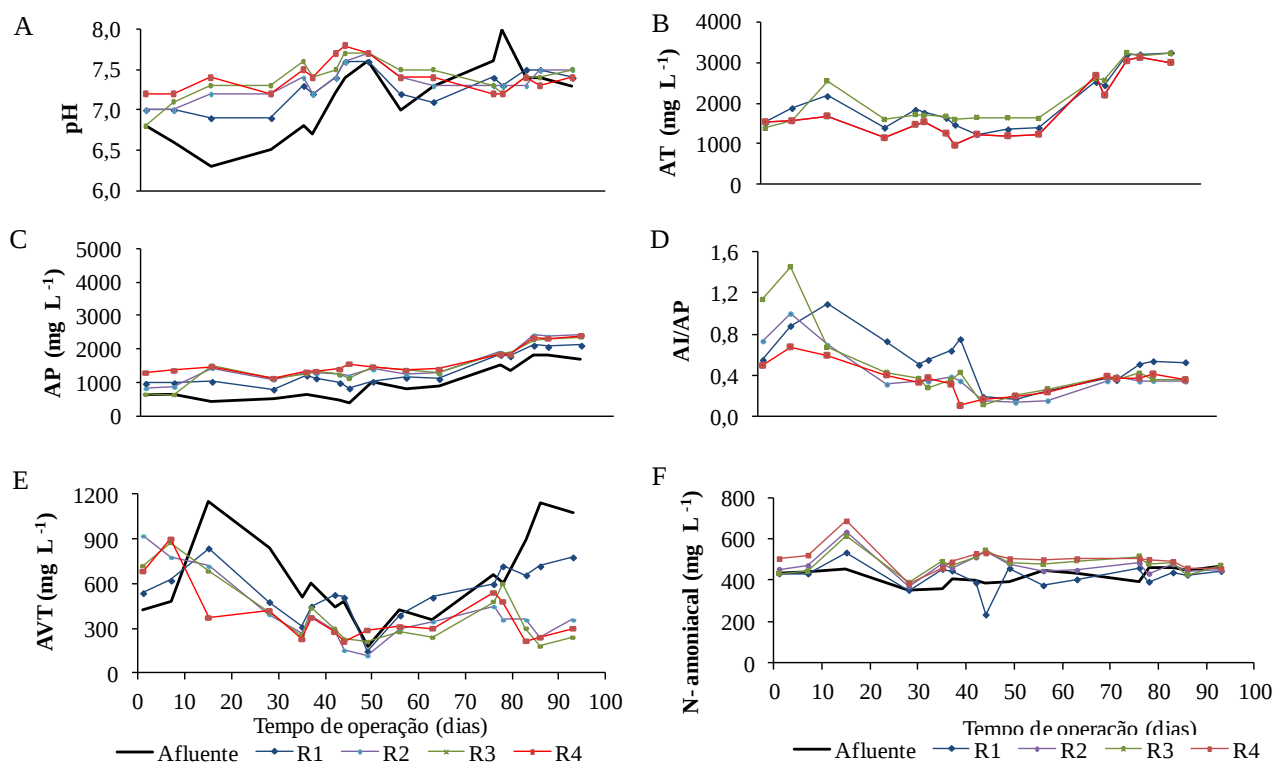


FIGURA 16. (A) Valores de pH, (B) alcalinidade total (AT), (C) alcalinidade parcial (AP); no afluente e efluentes dos reatores RAHLF (D) relação AI/AP dos efluentes, (E) ácidos voláteis totais e (F) Nitrogênio amoniacoal (Nam) dos afluente e efluentes durante a partida dos reatores RAHLF.

8.3 Demanda química de oxigênio (DQO) e eficiência de remoção de DQO durante a partida do reatores RAHLF.

Os valores médios de DQO_{total} no afluente foram de 3937 mg L^{-1} , o que proporcionou COV médias crescentes no R1, de $3,2\text{ g DQO}_{total} (\text{L d})^{-1}$, na partida (Tabela 15). O aumento gradativo das COV (Figura 17) permitiu na partida COV acima de $5\text{ g DQO}_{total} (\text{L d})^{-1}$ para o tratamento da vinhaça.

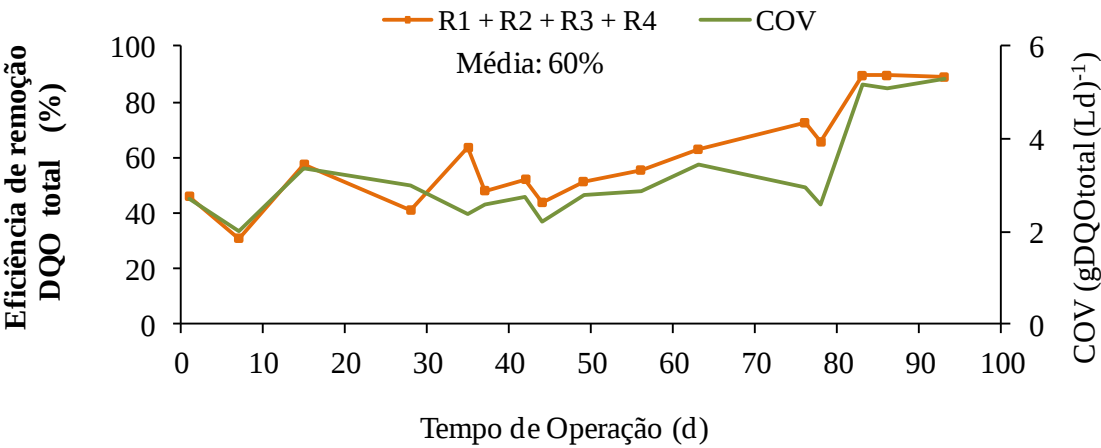


FIGURA 17. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQO_{total}) no sistema total e carga orgânica volumétrica (COV).

TABELA 15. Valores médios e coeficiente de variação (c.v. em %) da DQO_{total} no afluente e efluente (mg L^{-1}), carga orgânica volumétrica (COV) ($\text{g DQO}_{total} (\text{L d})^{-1}$) e eficiência de remoção de DQO_{total} (%) durante a partida dos reatores RAHLF em série, R1,

DQO total			Remoção de DQO total			COV		
			c.v	(%)	c.v			
Afluente	3937	33	R1	27	57	R1	3,2	33
R1	2537	19	R2	26	46	R2	1,3	27
R2	1723	28	R3	13	47	R3	0,9	35
R3	1621	31	R4	13	76	R4	1,3	36
R4	1389	33	Rt	60	30	-	-	-

8.4 Produção de metano durante a partida dos reatores RAHLF.

Foram observados valores médios de produção volumétrica de metano de 0,099 (R1); 0,226 (R2); 0,072 (R3); 0,039 (R4) e de 0,15 (R1+R2+R3+R4) L CH₄ (L d)⁻¹, com porcentagem de metano de 78, 78, 80 e 83% no R1, R2, R3 e R4, respectivamente (Figura 18).

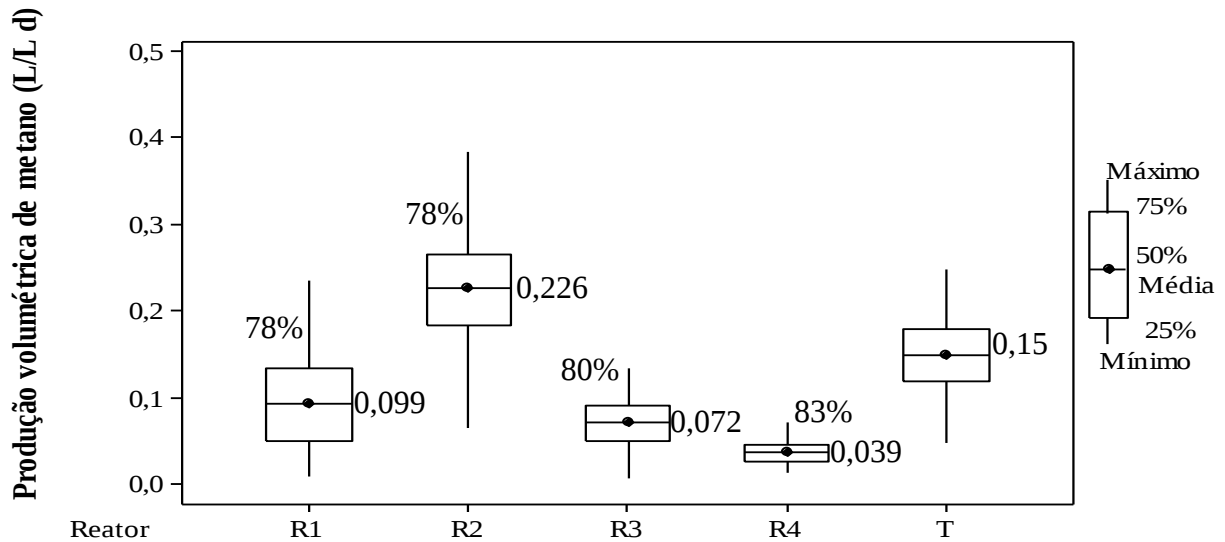


FIGURA 18. Produção volumétrica de metano observadas nos reatores RAHLF, R1, R2, R3 e R4 e valores de metano observados no biogás. T: R1 + R2 + R3 + R4.

8.5 Macronutrientes durante a partida dos reatores RAHLF.

Durante a partida dos reatores RAHLF, R1, R2, R3 e R4 observa-se que os valores de Nk e P_{total} ficaram dentro dos recomendados, que é de 350:5:1 (DQO:N:P_{total}), considerada ideal (CHERNICHARRO, 2007) (Tabela 16).

TABELA 16. Concentrações (mg L⁻¹) e eficiência de remoção (%) de macro nutrientes NK, P-total, no afluente e efluente dos reatores RAHLF em série (R1, R2, R3 e R4) durante a partida dos reatores RAHLF.

Parâmetros - Partida						
Afluente - DQO:N:P (350:5:1)		NTK			P _{total}	
			c.v			c.v
DQO N P	350 45 3,2	Afluente	504	57	36	68
		R1	513	39	25	46
		R2	584	37	23	57
		R3	337	87	24	53
		R4	418	66	27	49
		Eficiência de remoção	65	55	45	49