

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

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS E ETANOL A PARTIR DE**  
**SORGO SACARINO**

**Eliane Cristine Soares da Costa**

Engenheira Florestal

**2024**

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

**PRODUÇÃO DE BIOGÁS E ETANOL A PARTIR DE**  
**SORGO SACARINO**

**Discente: Eliane Cristine Soares da Costa**

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

**Coorientadora: Dra. Rose Maria Duda**

**Coorientador: Dr. Leonardo Lucas Madaleno**

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP,  
Campus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Doutora em Microbiologia Agropecuária

C837p Costa, Eliane Cristine Soares da  
Produção de biogás e etanol a partir de sorgo sacarino /  
Eliane Cristine Soares da Costa. -- Jaboticabal, 2024  
177 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Roberto Alves de Oliveira  
Coorientadora: Rose Maria Duda  
Coorientador: Leonardo Lucas Madaleno

1. Biocombustíveis. 2. Reatores UASB. 3. Sorgo sacarino. 4.  
Biochar. I. Título.

## **Impacto potencial desta pesquisa**

Essa pesquisa apresenta potencial para impactar positivamente tanto o setor energético quanto ambiental. Promovendo práticas sustentáveis, seu impacto tange especialmente as áreas de bioenergia, agricultura sustentável, mitigação das mudanças climáticas e de viabilidade econômica e operacional para o setor sucroenergético, evitando a ociosidade das usinas durante a entressafra.

## **Potential impact of this research**

This research has the potential to positively impact both the energy and environmental sectors. By promoting sustainable practices, its impact particularly concerns the areas of bioenergy, sustainable agriculture, climate change mitigation, and economic and operational viability for the sugar-energy sector, avoiding plant idleness during the off-season.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** PRODUÇÃO DE BIOGÁS E ETANOL A PARTIR DE SORGO SACARINO

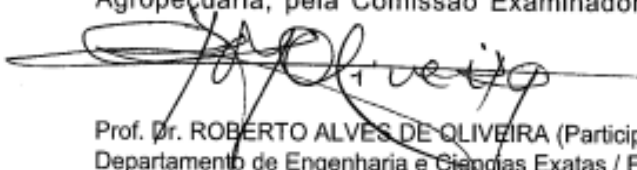
**AUTORA:** ELIANE CRISTINE SOARES DA COSTA

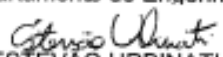
**ORIENTADOR:** ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

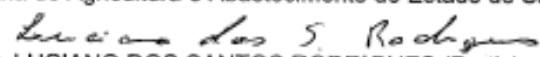
**COORIENTADORA:** ROSE MARIA DUDA

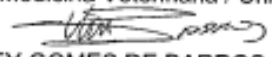
**COORIENTADOR:** LEONARDO LUCAS MADALENO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA (Participação Presencial)  
Departamento de Engenharia e Ciências Exatas / FCAV UNESP Jaboticabal

  
Dr. ESTEVAO URBINATI (Participação Presencial)  
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo / Pedregulhos/SP

  
Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS RODRIGUES (Participação Presencial)  
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte/MG

  
Prof. Dr. VALCINEY GOMES DE BARROS (Participação Presencial)  
Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani / FATEC - Jaboticabal/SP

Prof. Dr. ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA (Participação Virtual)  
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos / ESALQ USP Piracicaba/SP



Documento assinado digitalmente

ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA  
Data: 16/08/2024 17:23:00-0300  
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Jaboticabal, 16 de agosto de 2024

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Eliane Cristine Soares da Costa – Filha de Geraldo Roberto da Costa e Maria Madalena Soares da Costa, nascida em Novo Cruzeiro, no Estado de Minas Gerais, no dia 28 de junho de 1992. Graduada em Engenharia Florestal pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em agosto de 2017. Em setembro de 2017, deu início ao curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, no Laboratório de Microbiologia do Solo, defendendo sua dissertação em julho de 2019. Em Agosto de 2019, 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 e Ciências Exatas, onde desenvolveu pesquisa sobre a digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino para a produção de biogás, bem como a produção de etanol da mesma matéria-prima.

*“Tudo que é seu, por direito divino, lhe há de chegar às  
mãos, na hora oportuna, sem atraso.”*

(Carlos Torres Pastorino)

Aos meus irmãos e meu pai, pelo cuidado, amor imenso e por serem minha fonte constante de inspiração. À minha mãe (*in memoriam*) pelo incentivo aos estudos, pelo exemplo de caráter, humildade e por ainda me proteger,

DEDICO E AGRADEÇO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte de vida e amor sublime, por me guiar e intuir minhas decisões.

A minha família pelo amor, por todas as formas de auxílio, apoio e incentivo, fundamentais em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Roberto Alves de Oliveira, pela oportunidade, confiança e, sobretudo, pelos ensinamentos e experiências transmitidos nestes quase cinco anos de trabalho, essenciais para minha formação profissional e pessoal.

A minha coorientadora professora Dra. Rose Maria Duda, pela enorme disposição, pelo encorajamento, solicitude e pelas inúmeras contribuições na elaboração deste trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Leonardo Lucas Madaleno, pela compreensão, paciência, apoio e incentivo fundamentais.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- Faculdade Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), bem como ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária pela oportunidade de realização do curso e contribuição na minha formação profissional.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental e à Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC), pela cessão da infraestrutura e disponibilidade de recursos para a condução dos experimentos. Bem como aos técnicos, professores e alunos, por todas as formas de auxílio, fundamentais para realização deste trabalho.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Saneamento Ambiental, pelo acolhimento, ajuda e companheirismo. Agradeço de todo o meu coração à Renata, Stella, Valciney, Jorge, Michel, Aderbal, Vivian, Amanda, Isabela, Karen, Matheus, Gabriela, Bárbara e Maíza. E em especial ao Gabriel, pelo laço verdadeiro de amizade vivenciado entre nós, por ser um grande parceiro, sempre presente, incentivador e solícito.

Aos meus amigos queridos de Diamantina, em especial Luciano Souza e Roberta Ramires, por me apresentarem o Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária e acreditarem no meu potencial.

À Joyne Sousa e Raquel Carvalho, minhas amadas amigas, por serem grandes incentivadoras dos meus sonhos, por se fazerem presentes durante a minha longa jornada de estudos, me oferecendo escuta e acolhimento fundamentais e por vibrarem comigo a cada conquista.

Ao Lucas Amoroso pela disponibilidade e intensa contribuição na análise dos dados de biologia molecular.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia e Ciências Exatas Ailton, Davi, João, Marcos, agradeço pela atenção, contribuição e amizade. Aos membros da banca examinadora do exame de qualificação: Estevão Urbinati, Gustavo Gravatim, Mariana Frigieri e Valciney de Barros, bem como aos membros da banca de defesa de tese: Luciano Rodrigues, Antônio Baptista, Valciney de Barros e Estevão Urbinati, pela participação e valiosas contribuições.

À Claudia Fiorillo, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da UNESP/FCAV, pela disponibilidade e colaboração.

À seção técnica da Pós-Graduação, pelo auxílio, atenção e disponibilidade. À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

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

## SUMÁRIO

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMO.....                                                                                                                | i         |
| ABSTRACT.....                                                                                                              | ii        |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                                                                                | iii       |
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                                      | v         |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                      | viii      |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                                                  | <b>6</b>  |
| 2.1. Objetivo geral .....                                                                                                  | 6         |
| 2.2. Objetivos específicos.....                                                                                            | 6         |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                       | <b>7</b>  |
| 3.1. Matriz energética renovável brasileira .....                                                                          | 7         |
| <b>3.2. Sorgo sacarino .....</b>                                                                                           | <b>12</b> |
| 3.2.1 Aspectos gerais da cultura .....                                                                                     | 12        |
| 3.2.2 Utilização do sorgo sacarino na entressafra da cana-de-açúcar .....                                                  | 13        |
| 3.2.3 Potenciais do sorgo sacarino .....                                                                                   | 14        |
| 3.3 Digestão anaeróbia .....                                                                                               | 21        |
| 3.3.1 Microbiologia da digestão anaeróbia.....                                                                             | 25        |
| 3.3.2 Biochar na digestão anaeróbia.....                                                                                   | 27        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                         | <b>31</b> |
| 4.1 Localização das Unidades Experimentais .....                                                                           | 31        |
| 4.2 Plantio e manutenção do sorgo sacarino .....                                                                           | 31        |
| 4.3 Produção e análises no vinho de sorgo sacarino .....                                                                   | 33        |
| 4.4. Reatores anaeróbios .....                                                                                             | 34        |
| 4.4.1 Reatores UASB “Y” .....                                                                                              | 34        |
| 4.4.2. Reator UASB convencional .....                                                                                      | 36        |
| 4.5. Lodo de inóculo .....                                                                                                 | 36        |
| 4.6. Afluente dos reatores .....                                                                                           | 37        |
| 4.7. Condições Operacionais .....                                                                                          | 37        |
| 4.8. Adição de biochar ao sistema de digestão anaeróbia .....                                                              | 41        |
| 4.9. Exames físicos e determinações de constituintes orgânicos e inorgânicos nos afluentes, efluentes, lodo e biogás ..... | 44        |
| 4.10. Sequenciamento e análise da comunidade microbiana dos reatores anaeróbios.....                                       | 45        |
| 4.10.1. Extração de DNA.....                                                                                               | 45        |

|                                                                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.10.2. Amplificação do gene 16S rRNA sequenciamento .....                                                    | 45         |
| 4.10.3. Processamento e análise dos dados.....                                                                | 45         |
| 4.10.4. Previsão da função bacteriana .....                                                                   | 46         |
| 4.11. Cálculos e análise estatística .....                                                                    | 46         |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                        | <b>48</b>  |
| 5.1. Etanol de sorgo sacarino .....                                                                           | 48         |
| 5.1.1. Plantio e manutenção do sorgo sacarino .....                                                           | 48         |
| 5.1.2. Produção de etanol .....                                                                               | 52         |
| 5.2. Biogás de sorgo sacarino .....                                                                           | 58         |
| 5.2.1. COV, pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal .....                             | 58         |
| 5.2.2. Demanda química de Oxigênio (DQO) e produção de metano .....                                           | 71         |
| 5.2.3. Sólidos totais e voláteis do lodo .....                                                                | 81         |
| 5.2.4. Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) ..... | 87         |
| 5.2.5. Diversidade microbiana no inóculo e nos reatores anaeróbios .....                                      | 90         |
| 5.2.6. Predição de funções no metagenoma .....                                                                | 102        |
| 5.2.7. Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), Fósforo e Ortofosfato .....                                           | 106        |
| 5.2.8. Macro e micronutrientes .....                                                                          | 109        |
| 5.3 Biogás de vinhaça de sorgo .....                                                                          | 115        |
| 5.3.1 COV, pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal .....                              | 115        |
| 5.3.2. Demanda química de Oxigênio (DQO) e produção de metano .....                                           | 123        |
| 5.3.3. Sólidos totais e voláteis do lodo .....                                                                | 127        |
| 5.3.4. Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) ..... | 130        |
| 5.3.5. Diversidade microbiana no inóculo e nos reatores anaeróbios .....                                      | 132        |
| 5.3.7. Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), Fósforo e Ortofosfato .....                                           | 139        |
| 5.3.8. Macro e micronutrientes .....                                                                          | 141        |
| 5.4. Rendimento energético do biogás e etanol de sorgo sacarino .....                                         | 146        |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                     | <b>149</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                    | <b>151</b> |

## PRODUÇÃO DE BIOGÁS E ETANOL A PARTIR DE SORGO SACARINO

**RESUMO** - Diante da limitação das reservas mundiais e da instabilidade dos preços dos combustíveis fósseis, assim como da necessidade de reduzir as emissões de gases de efeito estufa, o interesse por fontes de energia renováveis tem crescido significativamente. O sorgo sacarino oferece múltiplas possibilidades de uso, apresenta produtividade satisfatória e pode ser alternativa para a geração de energia líquida e gasosa, evitando a ociosidade das usinas na entressafra da cana-de-açúcar. Neste estudo, avaliou-se o desenvolvimento da cultivar IPA 467 de sorgo sacarino durante o período de entressafra da cana-de-açúcar, bem como os efeitos da adubação de cobertura com vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida, combinada ou não com NPK 20-00-20 e ureia, nas características biométricas das plantas e na produção de etanol do caldo, utilizando levedura selecionada (FT 858) e fermento prensado. A produção de biogás da mesma matéria-prima foi avaliada em um sistema de digestão anaeróbia composto por dois reatores UASB em série, operados com cargas orgânicas volumétricas (COV) crescentes de até 22,3 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, atingindo produção volumétrica de metano superior a 1,0 L CH<sub>4</sub> (L d<sup>-1</sup>), potencializada pela adição do biochar do bagaço de sorgo ao afluente do sistema. A vinhaça de sorgo também foi submetida a digestão anaeróbia em reator UASB convencional de estágio único, apresentando potencial de produção de metano inferior ao do caldo de sorgo. Análises microbiológicas revelaram que os filos bacterianos mais abundantes no lodo dos reatores R1 e R2 na digestão anaeróbia do caldo de sorgo foram Bacteroidota, Firmicutes e Actinobacteriota, enquanto as arqueas metanogênicas mais recorrentes foram do gênero *Methanobacterium*, evidenciando predominância da via hidrogenotrófica na produção de metano. O biogás produzido na digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino apresentou potencial estimado de geração de energia elétrica de até 0,3 kWd<sup>-1</sup>, valor superior ao do etanol e da vinhaça, evidenciando vantagem no estabelecimento do cultivo de sorgo sacarino para a produção de energia gasosa, em detrimento da produção de etanol, oferecendo contribuição efetiva para melhor balanceamento energético nas destilarias de cana-de-açúcar, principalmente no período de entressafra.

**Palavras-chave:** Biocombustíveis, biochar, biogás, carga orgânica volumétrica, tratamento anaeróbio, vinhaça de sorgo

## PRODUCTION OF BIOGAS AND ETHANOL FROM SWEET SORGHUM

**ABSTRACT** - Given the limitation of global reserves and the instability of fossil fuel prices, as well as the need to reduce greenhouse-gas emissions, interest in renewable energy sources has grown significantly. Sweet sorghum offers multiple possibilities for use, presents satisfactory productivity and can be an alternative for generating liquid and gaseous energy, avoiding idleness of plants during the sugarcane off-season. In this study, the development of the sweet sorghum cultivar IPA 467 was evaluated during the sugarcane off-season period, as well as the effects of top dressing with biodigested sugarcane vinasse, combined or not with NPK. 20-00-20 and urea, on the biometric characteristics of the plants and on the ethanol production of the broth, using selected yeast (FT 858) and baker's yeasts. The production of biogas from the same raw material was evaluated in an anaerobic digestion system composed of two UASB reactors in series, operated with increasing of organic loading rate (OLR) of up to 22.3 g total COD (L d)<sup>-1</sup>, achieving production methane volume exceeding 1.0 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup>, enhanced by the addition of sorghum bagasse biochar to the system's influent. Sorghum vinasse was also subjected to anaerobic digestion in a conventional single-stage UASB reactor, presenting a lower methane production potential than sorghum broth. Microbiological analyzes revealed that the most abundant bacterial phyla in the sludge from reactors R1 and R2 in the anaerobic digestion of sorghum broth were Bacteroidota, Firmicutes and Actinobacteriota, while the most recurrent methanogenic archaea were from the genus *Methanobacterium*, demonstrating the predominance of the hydrogenotrophic pathway in methane production. The biogas produced in the anaerobic digestion of sweet sorghum broth had an estimated potential for generating electrical energy of up to 0.3 kWd<sup>-1</sup>, a value higher than that of ethanol and vinasse, demonstrating an advantage in establishing the cultivation of sweet sorghum for the production of gaseous energy, to the detriment of ethanol production, offering an effective contribution to better energy balance in sugarcane distilleries, especially in the off-season period.

**Keywords:** Biofuels, biochar, biogas, organic loading rate, anaerobic treatment, sorghum vinasse

## LISTA DE ABREVIATURAS

Al - Alcalinidade intermediária

AP - Alcalinidade parcial

AnSBBR - Reator anaeróbio de batelada sequencial com biomassa imobilizada

ASTBR - Reator anaeróbio de leito estruturado

AT - Alcalinidade total

AVT – Ácidos voláteis totais

AGV- Ácidos graxos voláteis

DQO - Demanda química de oxigênio

DQO<sub>Diss</sub> - Demanda química de oxigênio dissolvida

ETA - Estação de tratamento de água

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CH<sub>4</sub>- Metano

COV - Carga orgânica volumétrica

Nam - Nitrogênio amoniacal

NTK - Nitrogênio Kjeldahl

P<sub>total</sub> - Fósforo total

pH - Potencial hidrogeniônico

PEM – Produção específica de metano

PVM – Produção volumétrica de metano

RALF - Reator anaeróbio de leito fluidificado

SF- Sólidos fixos

ST - Sólidos totais

SV – Sólidos voláteis

SSF- Sólidos suspensos fixos

SST-Sólidos suspensos totais

SSV- Sólidos suspensos voláteis

TDH - Tempo de detenção hidráulica

UASB - *Upflow anaerobic sludge blanket*

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Comparação das características industriais e tecnológicas do caldo, colmo e bagaço entre a cultura de sorgo sacarino e cana-de-açúcar.....                                                                                                                                                    | 16 |
| <b>Tabela 2.</b> Produção mundial de etanol (milhões de litros).....                                                                                                                                                                                                                                           | 17 |
| <b>Tabela 3.</b> Análise de solo da área experimental – Fatec-Jaboticabal, SP.....                                                                                                                                                                                                                             | 31 |
| <b>Tabela 4.</b> Caracterização da vinhaça biodigerida de cana-de-açúcar.....                                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| <b>Tabela 5.</b> Caracterização de amostra composta do caldo de sorgo sacarino variedade IPA 467 aos 131 dias de crescimento.....                                                                                                                                                                              | 37 |
| <b>Tabela 6.</b> Valores médios de pH e sólidos solúveis do caldo, acidez total e açúcares redutores totais (ART) do mosto.....                                                                                                                                                                                | 53 |
| <b>Tabela 7.</b> Análise de variância para viabilidade celular, teor alcoólico e eficiência de fermentação (%) no processo fermentativo da variedade IPA 467 de sorgo sacarino com a levedura FT 858 e fermento prensado.....                                                                                  | 56 |
| <b>Tabela 8.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) do pH, alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes durante a operação do sistema composto pelos reatores UASB em série (R1 e R2) no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.....                | 62 |
| <b>Tabela 9.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) do nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT), no afluente e efluente e relação AVT/AT e AI/AP no efluente do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio de vinhaça de sorgo sacarino.....                            | 69 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores médios e coeficiente de variação (CV) da carga orgânica volumétrica (COV), DQO <sub>total</sub> no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO <sub>total</sub> durante a operação dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino..... | 74 |
| <b>Tabela 11.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de metano no biogás, produção volumétrica (PVM) e específica de metano (PEM) nos reatores UASB R1 e R2 em série no tratamento do caldo de sorgo sacarino.....                                                                 | 80 |
| <b>Tabela 12.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), em mg L <sup>-1</sup> e da relação SV/ST nos                                                                                                                                          |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4 pontos de coleta de lodo do reator UASB R1 nas fases partida, I, II e III no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.....                                                                                                                                                                                                                                      | 84  |
| <b>Tabela 13.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), em g L <sup>-1</sup> e da relação SV/ST nos 4 pontos de coleta de lodo do reator UASB R2 nas fases partida, I, II e III no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.....                                                                 | 85  |
| <b>Tabela 14.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) das concentrações de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV), em mg L <sup>-1</sup> , no afluente e efluentes dos reatores UASB R1 e R2 e eficiências de remoção do sistema (%), no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.....       | 89  |
| <b>Tabela 15.</b> Abundância dos principais gêneros das bactérias e aqueias identificadas no lodo inóculo usados para partida dos reatores UASB R1 e R2 no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.....                                                                                                                                                          | 97  |
| <b>Tabela 16.</b> Abundância dos principais gêneros das bactérias e aqueias identificadas no lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases II e III do tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.....                                                                                                                                                                   | 98  |
| <b>Tabela 17.</b> Relação DQO:N:P no afluente, valores médios de concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), fósforo total e ortofosfato no afluente e efluente dos reatores UASB em série R1 e R2 e eficiência de remoção no sistema (R1+R2), durante as fases Partida, I, II e III do tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino..... | 108 |
| <b>Tabela 18.</b> Valores médios e coeficiente de variação (CV) de macronutrientes e no afluente e efluentes e suas respectivas eficiências de remoção do conjunto reatores UASB (R1+R2) durante as fases de operação.....                                                                                                                                               | 113 |
| <b>Tabela 19.</b> Valores médios e coeficiente de variação (CV) de micronutrientes e no afluente e efluentes e suas respectivas eficiências de remoção do conjunto reatores UASB (R1+R2) durante as fases de operação.....                                                                                                                                               | 114 |
| <b>Tabela 20.</b> Valores médios e coeficientes de variação (CV) da alcalinidade total (AT), parcial (AP), intermediária (AI) no afluente e efluentes e relação AI/AP do efluente (R1) durante a operação do sistema composto pelo reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio de vinhaça de sorgo sacarino.....                                                 | 117 |

- Tabela 21.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) do nitrogênio amoniacal (N-am), ácidos voláteis totais (AVT), no afluente e efluente e relação AVT/AT no efluente do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio de vinhaça de sorgo sacarino.....121
- Tabela 22.** Valores médios e coeficiente de variação (CV) de DQO<sub>total</sub> e dissolvida (DQO<sub>Diss</sub>) no afluente e efluente e respectivas eficiências de remoção, produção volumétrica e específica de metano no reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino.....125
- Tabela 23.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), em mg L<sup>-1</sup> e da relação SV/ST nos 4 pontos de coleta de lodo do reator UASB R1 nas fases partida, I e II no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....128
- Tabela 24.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) das concentrações de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) no afluente e efluente do reator UASB R1 e eficiências de remoção no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....131
- Tabela 25.** Abundância dos principais gêneros das bactérias e aqueias identificadas no lodo do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino.....136
- Tabela 26.** Valores médios das concentrações de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), fósforo total (P-Total) e ortofosfato no afluente e efluente do reator UASB R1 e eficiências de remoção durante as fases Partida, I e II do tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....140
- Tabela 27.** Valores médios e coeficiente de variação (C.V.) de macronutrientes no afluente e efluente e eficiências de remoção do reator UASB (R1) durante as fases de operação.....144
- Tabela 28.** Valores médios e coeficiente de variação (C.V.) de micronutrientes no afluente e efluente e eficiências de remoção do reator UASB (R1) durante as fases de operação.....145
- Tabela 29.** Estimativa teórica de energia elétrica no sistema composto pelos reatores UASB R1 e R2 no tratamento do caldo de sorgo sacarino e pelo reator UASB convencional R1 no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....147

|                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 30.</b> Estimativa teórica de energia elétrica do etanol de sorgo sacarino baseada nos teores alcóolicos conseguidos no processo fermentativo da variedade IPA 467 com a levedura FT 858 e fermento prensado..... | 147 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Participação das energias renováveis na Oferta Interna de Energia (OIE).....8
- Figura 2.** Fluxograma simplificado das etapas da digestão anaeróbia e rotas metabólicas adaptado de Chernicharo (2016).....23
- Figura 3.** Vista lateral esquemática do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios UASB (R1 e R2) instalados em série.....35
- Figura 4.** Vista lateral esquemática do sistema de tratamento com os reator anaeróbio UASB convencional (R1).....36
- Figura 5.** Diagrama esquemático das fases e condições operacionais dos reatores UASB em série (R1 e R2) no tratamento anaeróbio do caldo da variedade IPA 467 de sorgo sacarino, com as médias das cargas orgânicas volumétricas (COV) em g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>, volume de caldo de sorgo utilizado em mL, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h), fonte de alcalinidade com bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>) e efluente do R2 (R) e período de operação em dias.....39
- Figura 6.** Diagrama esquemático das fases e condições operacionais do reator UASB convencional no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino, com as médias das cargas orgânicas volumétricas (COV) em g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>, volume de vinhaça utilizado em mL, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h), fontes de alcalinidade com bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>) e efluente do R1 (R) e período de operação em dias.....40
- Figura 7.** Imagens do biochar do bagaço de sorgo sacarino produzido a 450°C, visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Evo 10-33-75–ZEISS), com tensão de aceleração de 10,0 kV e ampliação de 145 x (A), 527 x (B), 622 x (C) e 4 kx (D).....43
- Figura 8.** Altura (a), diâmetro (b), sólidos solúveis (c), número de folhas (d) e índice de maturação (e) das plantas de sorgo aos 60, 70, 80, 90, 100, 120 e 130 dias de crescimento.....49
- Figura 9.** Precipitação (mm) média diária de janeiro a abril de 2022 em Jaboticabal, São Paulo.....51

- Figura 10.** Carga orgânica volumétrica (COV) dos reatores UASB R1 e R2 e pH do afluente e efluentes dos reatores UASB R1 e R2 no tratamento do caldo de sorgo.....60
- Figura 11.** Alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento de caldo de sorgo sacarino.....63
- Figura 12.** Relação Alcalinidade parcial/Alcalinidade intermediária (AI/AP) nos efluentes dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento de caldo de sorgo sacarino.....64
- Figura 13.** Nitrogênio amoniacal, Ácidos voláteis totais (AVT) no afluente e efluentes dos reatores UASB em série R1 e R2 e relação Ácidos voláteis totais/Alcalinidade total (AVT/AT) nos reatores R1 e R2 no tratamento de caldo de sorgo sacarino.....70
- Figura 14.** Produção volumétrica de metano (PVM) e carga orgânica volumétrica (COV) dos reatores UASB R1 e R2 instalados em série, durante as fases Partida, I, II e III no tratamento anaeróbico do caldo de sorgo sacarino.....76
- Figura 15.** Concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) nos 4 pontos de coletas de lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases partida, I, II e III no tratamento anaeróbico do caldo de sorgo sacarino.....86
- Figura 16.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos Bacteria (A) e Archaea (B) encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases II (T1) e III (T2).....99
- Figura 17.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos gêneros pertencentes aos Domínios Bacteria (A) e Archaea encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases II (T1) e III (T2).....100
- Figura 18.** Morfologias superficiais do lodo dos reatores anaeróbios R1 e R2 contendo biochar do bagaço de sorgo sacarino colonizado por microrganismos, na fase III da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Evo 10-33-75–ZEISS), com tensão de aceleração de 10,0 kV e ampliação de 5,25 kx (A), 1,54 kx (B), 5,89 kx (C) e 12,57 kx (D).....101

- Figura 19.** Predição funcional das principais vias metabólicas nas amostras lodo inóculo (A) e do reatores UASB R1 (B) e R2 (C) na fases II e III (D e E) do tratamento anaeróbico do caldo de sorgo sacarino.....105
- Figura 20.** Carga orgânica volumétrica (COV) dos reatores UASB R1 e R2 e pH do afluente e efluentes dos reatores UASB R1 e R2 no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....115
- Figura 21.** Alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluente e relação AI/AP no efluente do reator UASB convencional R1 no tratamento de vinhaça sorgo sacarino.....117
- Figura 22.** Nitrogênio amoniacal e ácidos voláteis totais (AVT) no afluente e efluente e relação ácidos voláteis totais/alcalinidade total (AVT/AT) no efluente do reator UASB convencional R1, no tratamento de vinhaça de sorgo sacarino.....121
- Figura 23.** Produção volumétrica (PVM) e específica (PEM) de metano e carga orgânica volumétrica (COV) do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbico da vinhaça de sorgo sacarino.....125
- Figura 24.** Concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) nos 4 pontos de coletas de lodo do reatores UASB R1 nas fases partida, I e II e III no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....128
- Figura 25.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos Bacteria (A) e Archaea (B) encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo do reator UASB convencional R1 (T1) no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....136
- Figura 26.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos gêneros pertencentes aos Domínios Bacteria (A) e Archaea (B) encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo do reator UASB convencional R1 (T1) no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.....137

## 1. INTRODUÇÃO

As fontes de energia renováveis representam aproximadamente 48% da matriz energética brasileira (EPE, 2023) e têm recebido cada vez mais interesse da sociedade durante as últimas décadas. A demanda, sobretudo de biocombustíveis, tem sido crescente, devido à contribuição significativa para a segurança energética, reduzindo a dependência dos combustíveis fósseis e concomitantemente às emissões de gases de efeito estufa (Abdullah et al., 2019; OCDE/FAO, 2021).

No entanto, para que os biocombustíveis sejam amplamente utilizados, é necessário que, além de sustentáveis ambientalmente, sejam competitivos frente aos combustíveis fósseis (Vidal, 2023). Desta maneira, políticas governamentais foram criadas para estimular sua produção através de arcabouços legais, políticos e regulatórios, vinculados às premissas de um mercado competitivo, com empresas em equilíbrio econômico e financeiro (Milanez et al. 2018).

Como resultado, um percentual crescente da produção mundial de culturas tais como cana-de-açúcar e milho passou a ser destinado à produção de biocombustíveis, sobretudo o etanol (Vidal, 2023). Sendo aproximadamente 60% da produção global a partir do milho, 23% da cana-de-açúcar, 7% de melaço, 3% de trigo e o restante de outras culturas, incluindo beterraba-açucareira e sorgo (OCDE/FAO, 2023).

No Brasil, para fortalecer a cadeia produtiva deste biocombustível, principalmente no período da entressafra da cana-de-açúcar, o setor sucroenergético tem investido na diversificação de culturas, proporcionando maximização do uso de recursos e processos agrícolas e industriais mais eficientes (Botelho et al., 2021). Dentre as culturas bioenergéticas alternativas, destaca-se o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Fernandes et al., 2014; Ahmad Dar et al., 2018), em virtude principalmente da elevada produtividade, conseguida em períodos compatíveis com o funcionamento das usinas e destilarias.

O sorgo sacarino é cultura rústica com aptidão para cultivo em áreas tropicais, subtropicais e temperadas e apresenta ampla adaptabilidade e

tolerância a estresses abióticos (Embrapa, 2010). Exibe semelhanças com a cultura da cana-de-açúcar, tanto nas características fisiológicas quanto tecnológicas (Freita, 2017), apresentando colmos com caldo rico em açúcares fermentáveis, elevada produtividade de fibra e grãos ricos em amido (Regassa e Wortmann 2014, Appiah-Nkansah et al., 2019; Parrella et al., 2021). Tais características possibilitam à cultura seu cultivo em áreas consideradas marginais, de reforma de canavial, e em sucessão de outras culturas, a fim de otimizar a produção de etanol (Viana et al., 2016; Vieira et al., 2017; Ceccon et al., 2018; Barcelos et al., 2019; Eculica et al., 2019).

Em relação ao processamento, esta matéria-prima necessita de poucos ajustes agrícolas para a colheita, podendo ser utilizados os mesmos equipamentos da cana-de-açúcar e nenhuma adaptação industrial para a produção de etanol, viabilizando sua utilização (Ferreira, 2015). Além disso, apresenta custos de produção mais baixo, uma vez que o sorgo sacarino exige menos manejo cultural, e nutricional (Embrapa, 2012; Nascimento, 2012).

A demanda nutricional das culturas energéticas tem sido frequentemente complementada com o uso da vinhaça de cana-de-açúcar *in natura*, um subproduto gerado em grandes volumes durante a destilação do bioetanol (Ortegón et al. 2016). No entanto, esse resíduo contém altos níveis de matéria orgânica e nutrientes minerais, e, embora sua aplicação direta ao solo produza resultados satisfatórios, é essencial tratá-lo antes da destinação final para garantir que essa prática seja adequada (Fuess e Garcia 2014). A vinhaça biodigerida pode ser utilizada como adubo de cobertura, constituindo a segunda etapa de reposição de nutrientes no solo para o estabelecimento das plantas, com potencial para melhorar significativamente o rendimento de etanol das culturas.

No entanto, a produção industrial de etanol de sorgo sacarino por fermentação, como ocorre com a cana-de-açúcar, gera grande volume de subprodutos, dentre eles, a vinhaça de sorgo. Esta, embora ainda seja passível de estudos quanto à quantidade e potencial utilização agronômica, possui elevado teor de matéria orgânica, com elevado potencial poluidor. Além disso, o processamento desta cultura também gera grande quantidade de bagaço remanescente, tornando-se necessário, portanto, o estabelecimento de

parâmetros operacionais que permitam o aproveitamento de todo o seu potencial enquanto matéria-prima.

A digestão anaeróbia da vinhaça e do próprio caldo de sorgo sacarino em reatores UASB em série, representa alternativa para evitar os gargalos decorrentes da geração destes subprodutos, sem prejuízo na geração de energia. Este processo possibilita maior conhecimento para o aproveitamento desta matéria-prima, não somente na produção de etanol, como habitualmente explorado, mas na produção de biogás, fonte de energia renovável, descentralizada e de baixo custo (Almeida et al., 2022a; Machado et al., 2023), cuja participação tem sido crescente na geração de energia elétrica no país (ANEEL, 2023B; EPE, 2023).

O biogás produzido a partir da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino em sistemas UASB, tal como já estudado para vinhaça e o melaço de cana-de-açúcar (Barros et al., 2016; Santana Júnior et al., 2019), pode representar ganho energético considerável por litro de etanol produzido, e consequentemente, melhoria do potencial energético das indústrias sucroenergéticas (Leme e Seabra, 2017; Parsaee et al., 2019). Este biocombustível apresenta múltiplas possibilidades de usos finais, tais como uso na alimentação de máquinas agrícolas, em substituição ao diesel, geração direta de calor por queima, ou pode ser comprimido e usado como combustível para veículos automotores (Joppert et al., 2017).

Os reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (upflow anaerobic sludge blanket – UASB) têm se sobressaído no tratamento anaeróbio de resíduos agroindustriais, apresentando maior estabilidade e desempenho na remoção de matéria orgânica e produção de metano ( $\text{CH}_4$ ) (Barros et al., 2017; Suárez et al., 2018; Santana Junior et al., 2019; Harihastuti et al., 2021; De Oliveira Lima et al., 2023). São sistemas que suportam elevadas cargas orgânicas, com alta eficiência de remoção de material orgânico suspenso e solúvel por microrganismos em condições anóxicas, com baixa produção de lodo. Além disso demandam pequenas áreas de instalação e baixo custo operacional (Duda e Oliveira, 2011).

No entanto, embora estes sistemas apresentem robustez, a microbiota componente é suscetível a condições ambientais e operacionais adversas,

podendo resultar no desequilíbrio do processo, comprometendo, consequentemente, a produção de biogás (Wu et al., 2017b ; Zhou et al., 2021; Lie et al., 2024). Para elevar a estabilidade operacional, a eficiência da adição de biochar no processo de digestão anaeróbia, tem sido frequentemente constatada (Ma et al., 2020; Deng et al., 2022; Sun et al., 2022; Xu et al., 2024),

Devido às suas propriedades, o biochar pode atuar no sistema de digestão anaeróbia como adsorvente, para atenuar toxicidade de substâncias inibidoras, como alcalinizante, para aumentar a capacidade de tamponamento do sistema, bem como propiciar pequenos habitats para os microrganismos (Chiappero et al., 2020). Desta maneira, a produção e utilização de biochar do bagaço de sorgo sacarino, constitui possibilidade de fácil transformação da biomassa remanescente da extração do caldo. Além disso, esta prática agrega valor ao subproduto, contribui para uma economia circular, concomitantemente com a redução do desperdício e a dependência de recursos.

Ainda buscando aperfeiçoar as condições operacionais e máxima eficiência dos sistemas de digestão anaeróbia, há crescente interesse em investigar a estrutura e dinâmica da comunidade microbiana componente dos reatores anaeróbios (Duda et al., 2015; Barros et al., 2017; Delforno et al., 2017; Martins et al., 2017). O estudo das interações e da diversidade de microrganismos, bem como das rotas metabólicas envolvidas no processo, gera informações em relação à estrutura e às funções desempenhadas por eles (Vanwonterghem et al., 2014). Isso, por sua vez, permite melhor compreensão dos resultados obtidos no tratamento de diferentes efluentes (Sampaio, 2022) e a promoção de condições ambientais favoráveis ao crescimento e atividade destes microrganismos, impulsionando a produção de biogás.

Diante do exposto, surge a hipótese de que a operação contínua do sistema de produção de biogás a partir do caldo do sorgo em dois reatores UASB em série, pode melhorar o balanceamento energético nas destilarias de cana-de-açúcar, sobretudo no período de entressafra. A digestão anaeróbia desta matéria prima, bem como a avaliação dos efeitos do uso de biochar do bagaço desta cultura na estabilidade do processo, são inéditos e representam proposta inovadora. O conhecimento da sinergia e quantificação dos principais grupos microbianos presentes nos reatores, também constitui fator imprescindível para

a compreensão do processo de digestão anaeróbia como um todo e se torna relevante para pesquisas na área.

Neste estudo, foi avaliada a produção de etanol a partir do sorgo sacarino, cultivado sob diferentes condições de adubação de cobertura. Comparou-se a eficiência do uso da vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida, isoladamente ou em combinação com fertilizantes minerais, no desenvolvimento da cultura, na viabilidade do processo fermentativo e nas características de rendimento e eficiência fermentativa. Além disso, o caldo de sorgo sacarino, bem como a vinhaça proveniente da destilação desta matéria-prima na produção de etanol, foram submetidos à digestão anaeróbia em reatores UASB em série, avaliando-se a produção de biogás.

Com base nos dados experimentais obtidos sobre a qualidade e capacidade energética do biogás produzido a partir do caldo de sorgo, foi estabelecida uma comparação desta com a do bioetanol da mesma matéria-prima, produzido pelo processo de fermentação alcoólica, para melhor entendimento das potencialidades energéticas da cultura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Realizar a fermentação etanólica e metânica do caldo de sorgo sacarino, com o intuito de comparar as potencialidades desta matéria-prima para a produção de etanol e biogás, respectivamente, como fontes de bioenergia.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a produção de etanol de sorgo sacarino, cultivado sob adubação de cobertura, com vinhaça biodigerida de cana-de-açúcar, combinada ou não com fertilizantes minerais, comparando a eficiência destas adubações no desenvolvimento da cultura, na viabilidade celular das leveduras, bem como nas características de rendimento e eficiência fermentativa.

- Avaliar dois reatores UASB em série, R1 e R2, na digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, quanto a produção e qualidade do biogás e efluente.

- Avaliar a utilização de biochar do bagaço de sorgo sacarino remanescente da extração do caldo, na estabilidade do processo de digestão anaeróbia e na produção de metano.

- Investigar a diversidade microbiana dos domínios Bacteria e Archaea no lodo dos reatores UASB, utilizando técnicas da biologia molecular.

- Avaliar o desempenho de um reator UASB convencional na digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo sacarino gerada na produção de etanol, quanto a produção de biogás

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Matriz energética renovável brasileira**

A evolução econômica e tecnológica da sociedade está diretamente relacionada ao aumento da demanda por energia. Em um estudo, Neto et al (2016) constataram que o aumento da demanda por energia, implica em um maior crescimento econômico para determinado período, evidenciando uma relação causal direta entre a demanda energética e o Produto Interno Bruto (PIB) de um país.

Desta forma, surgem constantemente discussões sobre a relevância dos recursos energéticos como fator de indução do desenvolvimento. E ainda, neste mesmo sentido, a sociedade, empresas e instituições públicas têm sido estimuladas a se engajarem em questões relacionadas a sustentabilidade, em busca de um novo formato de desenvolvimento, pautado essencialmente em três grandes objetivos: eficiência econômica, igualdade social e integridade ambiental (Bursztyn, 2018).

Nas duas últimas décadas, medidas que favoreçam a implementação de fontes renováveis como vetores de acesso à energia os cidadãos brasileiros, tem sido adotadas pelo estado (Santos et al, 2021). O primeiro projeto que compreendeu essa vertente foi o Programa de Aceleração do Crescimento (PAC), lançado em 2007 pelo governo federal para retomar grandes obras de infraestrutura social, urbana, logística e energética (Pinto, 2017).

Alinhado a isto, o Brasil também se comprometeu a adotar as recomendações dos Cadernos de Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), cujo alcance dos objetivos e metas requer parceria global com engajamento de governos, sociedade civil, setor privado, academia, mídia e Nações Unidas (Morais, 2019).

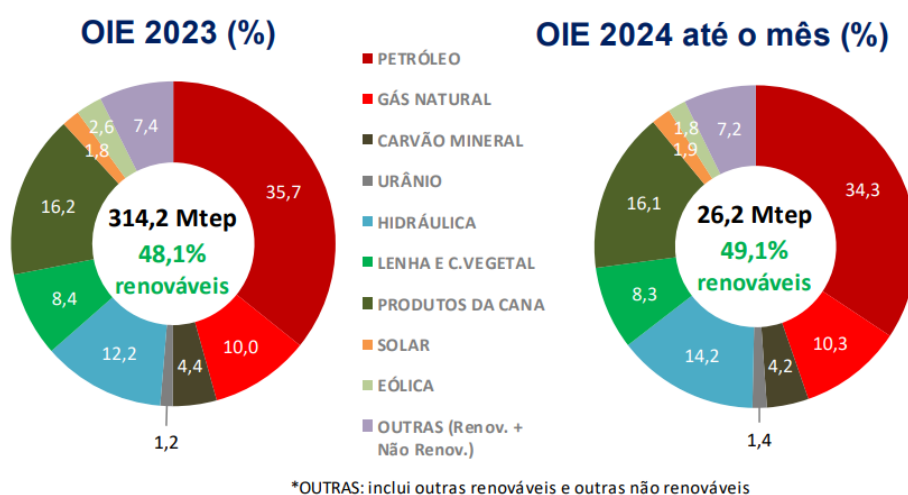
O ODS 7 é aquele que trata do setor energético, cujo objetivo é “assegurar o acesso confiável, sustentável, moderno e a preço acessível à energia para todos” e dentre as cinco metas estabelecidas pela Agenda 2030 para o desenvolvimento e maior acessibilidade a energias limpas no mundo, uma delas

trata-se de “manter elevada a participação de energias renováveis na matriz energética nacional” (Morais, 2019).

Isto, por sua vez, reafirma que, é necessário que o crescimento esteja fundamentado em premissas de conservação uma vez que, essas energias serão extraídas dos recursos naturais, tornando substancial que os países assumam o seu papel no incremento de matrizes energéticas sustentáveis, capazes de atender à crescente demanda (Dupont, 2015).

Percebe-se assim, que o Brasil está numa condição singular de promoção de suas fontes de energia renovável. Os compromissos climáticos firmados por economias em busca de uma matriz energética limpa e com baixa emissão de carbono, aliados às potencialidades brasileiras das fontes de biomassa agroindustriais, trazem oportunidades relevantes no contexto da sustentabilidade ambiental.

No país, até janeiro de 2024, 49,1% de sua energia foi de matriz renovável (Figura 1), representando uma das maiores proporções mundiais, em contraste com a média mundial, de 14,1%. E essa diferença é ainda mais significativa quando comparada com os países que compõem a Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômicos (OCDE), em sua maioria classificados como desenvolvidos, cuja média é de 11,5% (EPE, 2023).



**Figura 1.** Participação das energias renováveis na Oferta Interna de Energia (OIE). Fonte: Ministério de Minas e Energia, 2024.

Mundialmente, a demanda por fontes de energia renovável aumentou de acordo com a OCDE/FAO (2021), visando, sobretudo, reduzir as emissões de gases de efeito estufa decorrentes do uso de combustíveis fósseis, que também se apresentam em progressivo esgotamento (Abdullah et al. 2019). O Brasil possui uma matriz energética majoritariamente concentrada em grandes centrais hidrelétricas, com a geração hídrica correspondendo a cerca de 61,9% da potência instalada (EPE, 2023), no entanto, apesar de se tratar de uma fonte de energia renovável, essas centrais geram impactos negativos, devido à utilização de grandes áreas.

Nesse cenário, os biocombustíveis têm despontado como alternativa para manter a produção de energias renováveis em patamares satisfatórios no país. O bioetanol é o principal biocombustível utilizado no mundo e corresponde a 10% da matriz energética mundial, com projeções indicando que esta participação atinja 27% em 2050 (IEA, 2022), cuja produção é concentrada principalmente no Brasil e EUA (EPE, 2023).

Neste contexto, diversos fatores determinam e impulsionam ainda mais essa ascensão, tais como a disponibilidade de matéria-prima nos períodos de safra e entressafra. Pesquisas visando o melhoramento de matéria-prima, seja por produtividade, aperfeiçoamento de novas culturas bioenergéticas, ou melhora da eficiência operacional (ANP, 2016).

A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima usada no Brasil para a produção de etanol. Contudo, a utilização de milho e outras fontes de biomassa para a fabricação do biocombustível tem crescido, entre outras vantagens, pela possibilidade de estocagem das matérias-primas e a viabilização da produção de etanol na entressafra da cana-de-açúcar, evitando a ociosidade e maximizando o uso de recursos.

No que se refere ao etanol de cana, na safra 2023/2024, a previsão é que sejam produzidos 27,7 bilhões de litros, que somados à participação do biocombustível oriundo do milho, alcance 33,8 bilhões de litros (Conab, 2023). No horizonte decenal, é prevista expansão da produção de etanol em 57%, passando de 27 bilhões de litros em 2017 para 43 bilhões de litros em 2026 (EPE, 2023).

Outra fonte de energia renovável cada vez mais relevante no cenário energético nacional é o biogás, com crescente participação no setor. De 2021 para 2022, sua contribuição para a oferta interna de energia passou de 376 mil toneladas equivalentes de petróleo (tep) para 438 mil, tendo partido de apenas 14 mil tep em 2010 (EPE, 2023a). Estas perspectivas positivas para a fonte, se fundamentam nos avanços regulatórios, na visibilidade em políticas públicas e em estratégias comerciais de empresas do setor energético que possuem recursos para a sua produção, bem como na melhoria dos processos de tratamento, como o desenvolvimento de processos para digestão anaeróbica (Vieira e Polli, 2020; EPE, 2023).

O biogás dá origem ao biometano, o qual é constituído essencialmente por metano, derivado da purificação do biogás, cuja qualidade é regulada pela ANP (ANP, 2022a). Ao cumprir os requisitos para ser caracterizado como biometano, este passa a ser intercambiável com o gás natural, podendo substituir ou ser misturado ao combustível fóssil em quaisquer proporções. Essa possibilidade permite seu escoamento pela malha de gasodutos e outras soluções de entrega vinculadas originalmente ao gás de origem fóssil (EPE, 2023).

No setor elétrico, a geração de energia a partir do biogás é particularmente significativa. Até o final de 2022, havia 104,9 MW de potência instalada a biogás em 435 unidades geradoras, somando as diferentes matérias-primas, tais como resíduos animais, urbanos, agroindustriais e florestais (ANEEL, 2023b). Neste contexto, o setor sucroenergético é especialmente importante para o desenvolvimento desta fonte renovável de energia no Brasil, devido ao elevado potencial de produção a partir dos resíduos do processamento da cana-de-açúcar e de outras culturas de bioenergia (EPE, 2023).

Nas usinas de cana-de-açúcar, podem ser instaladas plantas de biogás com diferentes modelos de negócio para seu aproveitamento, com uma produção de energia descentralizada. De acordo com Joppert et al. (2017), o biogás apresenta múltiplas possibilidades de usos neste setor, como na alimentação de máquinas agrícolas, em substituição ao diesel e geração direta

de calor por queima, ou a injeção em gasodutos, após processo de refinamento, favorecendo a verticalização da cadeia, trazendo maior competitividade.

Para contínuo fortalecimento da matriz energética renovável brasileira, os setores de geração precisam estar em constante expansão. Sobretudo no que diz respeito ao setor sucroenergético, em se tratando da capacidade industrial, bem como à área cultivada com a matéria-prima, especialmente em períodos de entressafra, a diversificação de matérias-primas, constitui medida imprescindível.

A utilização de culturas alternativas de bioenergia, tais como sorgo sacarino pode reduzir os riscos de desabastecimento de etanol, ajudar na estabilização dos preços e reduzir a importação deste combustível e de gasolina, bem como potencializar a produção de biogás, fonte de energia cujas perspectivas de geração e utilização são cada vez mais positivas e comprovadamente eficiente.

## 3.2. SORGO SACARINO

### 3.2.1 Aspectos gerais da cultura

O *Sorghum bicolor* L. pertence à família Poaceae e é originário do continente africano. É o quinto cereal de maior importância cultivado no mundo, depois do trigo, arroz, milho e cevada (Fornasier Filho; Fornasier, 2009), representando importante componente da alimentação de mais de 500 milhões de pessoas, sobretudo nos países africanos e asiáticos, e uma das culturas mais importantes para as 25 regiões áridas e semiáridas do mundo (Yang et al., 2018), enquanto em países como Austrália, Brasil e Estados Unidos, é significativamente usado como componente da nutrição animal (Queiróz, 2014).

O sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L) Moench) apresenta ciclo anual e é resistente a condições desfavoráveis à maioria dos grãos produzidos (Borém, 2005; Santos et al., 2005). Seu caule é composto por nós, entrenós ou internódios, que sustentam as folhas e inflorescências. A altura da planta é variável entre genótipos, dependendo do número e comprimento dos entrenós, gerando inflorescência terminal tipo panícula, que é rica em amido. A panícula é aberta e produz grãos (sementes), o fruto é uma cariopse ou grão seco (Magalhães et al., 2010; Diniz, 2010).

O termo sacarino em *Sorghum bicolor* (L) Moench (Bryan, 1990), descreve tipos de sorgo que apresentam colmo suculento, rico em açúcar e de elevado potencial de produção de grãos. O acúmulo destes açúcares acontece primordialmente na fase de floração e é contínuo até a maturação fisiológica da planta (Ratnavati et al., 2010; Almodares e Hadi, 2009). Diferente de determinadas culturas, o sorgo sacarino não apresenta proteção para sementes, por isso sintetiza compostos fenólicos, que servem como defesa química contra pássaros, patógenos e outros competidores (Magalhães et al., 2000).

Iniciativas de introdução do sorgo sacarino no Brasil foram realizadas em épocas distintas, porém, contam com os esforços de institutos de pesquisa e universidades sobretudo a partir da década de 1950 (Purcino, 2011). Nos últimos anos, intensificaram-se os estudos visando à utilização desta cultura em função das exigências ambientais para a mitigação de emissão de gases de efeito

estufa, uma vez que esta constitui matéria-prima renovável para produção e uso de etanol de 1ª e 2ª geração, reduzindo a dependência de energia de origem fóssil (Wu et al., 2010; Fernandes et al., 2014; Ahmad Dar et al., 2018; Yang et al., 2018).

Este destaque como cultura complementar de bioenergia, se deve, entre outras razões, ao fato de o sorgo sacarino apresentar aspectos favoráveis à sua exploração, com semelhança com a cultura da cana-de-açúcar, tanto nas características fisiológicas quanto tecnológicas (Freita, 2017). Possui elevado rendimento de massa verde, hastes suculentas e altos teores de açúcares fermentescíveis em seu caldo (Regassa e Wortmann 2014, Appiah-Nkansah et al., 2019). Outra vantagem relacionada ao seu uso bioenergia é o fato de que, embora sua produção seja menor que a da cana-de-açúcar por hectare, o custo desta pode ser até um terço mais baixo que o da cana-de-açúcar, uma vez que exige menos manejo cultural (Nascimento, 2012).

Essa cultura possui metabolismo C4, apresentando uma via fotossintética adaptativa que possibilita atenuar os efeitos prejudiciais do declínio gradual de CO<sub>2</sub> atmosférico, como a fotorrespiração. Devido a este fato, o sorgo sacarino exibe características específicas, que conferem à cultura melhor adaptação e tolerância à seca e ao calor, com temperatura ótima para crescimento entre 33 e 34 °C (Fornasier Filho e Fornasier 2009; Berenji et al. 2011). No entanto, necessita de umidade adequada e bem distribuída durante todo o cultivo (Marrenco e Lopes, 2009; Batista et al., 2018).

### **3.2.2 Utilização do sorgo sacarino na entressafra da cana-de-açúcar**

O uso do sorgo sacarino na produção de etanol vem sendo estudado ao longo dos anos pelo setor sucroenergético. Para fortalecer a cadeia produtiva deste biocombustível, principalmente no que diz respeito ao preenchimento da lacuna na entressafra da cana-de-açúcar, as usinas têm utilizado esta cultura como alternativa, o que maximiza o uso de recursos e contribui para que se tenha processos agrícolas e industriais mais eficientes (Botelho et al., 2021).

O período da entressafra da cana compreende os meses de dezembro a abril, ocasionando diminuição sazonal na produção de etanol, e isto, por sua vez,

eleva o valor do biocombustível ao consumidor final (Santos et al., 2011). Ao final do ciclo de uma safra da cana-de-açúcar, e posteriormente a sua colheita, a área de cultivo encontra-se livre e apta para manter o solo em atividade, recompondo nutrientes, mantendo a sua cobertura e evitando o surgimento de pragas (Coelho, 2021).

O estabelecimento da cultura de sorgo sacarino na entressafra é viabilizada por demandar poucos ajustes agrícolas para a colheita, podendo ser utilizados os mesmos equipamentos empregados na safra da cana-de-açúcar. O processamento dos colmos pode ser feito na mesma planta industrial que opera com cana-de-açúcar, sem necessidade de adaptação (Santos, 2011; Ferreira, 2015).

Rezende e Richardson (2017), avaliaram a viabilidade econômica e os riscos associados à utilização do sorgo sacarino como matéria-prima para a produção de etanol na entressafra em uma usina que opera somente com cana-de-açúcar no estado de São Paulo. Os resultados indicaram que a adição de sorgo sacarino em 20% da área cultivada com cana-de-açúcar, na entressafra, pode aumentar o valor presente líquido (VPL) e o rendimento líquido médio anual. Além disso, o uso do sorgo sacarino aumentaria as receitas do etanol mais do que os custos variáveis de cultivo e colheita da cultura, mais os custos de produção de etanol.

Neste mesmo contexto, Cutz et al. (2013) sugeriram ainda que, o uso de sorgo na entressafra da cana-de-açúcar pode ter um benefício secundário através da queima do bagaço, constituindo um meio de produzir excedente de eletricidade durante todo o ano.

### **3.2.3 Potenciais do sorgo sacarino**

Um dos fatores essenciais na produção sustentável de culturas energéticas é a melhoria do equilíbrio e da eficiência energética (Ren et al., 2012; Garofalo et al., 2015). O sorgo sacarino é caracterizado pela ampla adaptabilidade a diferentes condições de cultivo, resiliência e, devido à sua eficiente via fotossintética C4, geração de alto rendimento de

biomassa (Embrapa, 2010; Regassa e Wortmann 2014; Glab et al., 2017), apresentando menor consumo e melhor eficiência energética que o milho (Ren et al., 2012; Rao et al., 2013). Estudos também apontam que esta cultura ainda oferece melhor rendimento energético e ganho líquido comparativamente à beterraba sacarina (*Beta vulgaris* L.) (Garofalo et al., 2015) e apresenta balanço energético líquido mais alto que o sorgo granífero e o milho (Ahmad Dar et al., 2018).

A exigência desta cultura por fertilizantes, se comparado à cultura de cana-de-açúcar, também é menor, e está diretamente relacionada com a produtividade. Verifica-se que a produção apresenta exigências por nutrientes, em ordem decrescente para o nitrogênio e potássio, seguido de cálcio, magnésio e fósforo (Embrapa, 2010), podendo, portanto, ser cultivado em diferentes tipos de solos.

Dadas estas características, nota-se que a cultura pode ser usada em áreas de reforma do canavial, e em sucessão de culturas, a fim de otimizar a produção de etanol (Viana et al., 2016; Vieira et al., 2017; Ceccon et al., 2018; Barcelos et al., 2019; Eculica et al., 2019). Além da possibilidade do cultivo em áreas consideradas marginais para a cana ou áreas que não tenham sido contempladas no zoneamento de riscos climáticos da cultura (Emydio et al., 2011).

Em comparação às características agroindustriais da cana-de-açúcar (Tabela 1), o sorgo sacarino demonstra que, embora algumas características sejam inferiores, deve-se considerar que a cultura possui ciclo vegetativo curto, com média de 100 a 120 dias, o que possibilita mais colheitas durante um ano, podendo chegar a duas ou três safras, de acordo com a região, com menores requerimentos em fertilizantes (Reddy et al., 2005; Ferreira, 2015).

Desta maneira, tem-se observado crescente interesse na utilização do sorgo sacarino para a produção de etanol, com inúmeros estudos confirmando sua viabilidade técnica e econômica (Linton et al., 2011; Basavaraj et al., 2013). Isto demonstra que, a utilização do sorgo sacarino pode significar, dentre outros aspectos, medida para reduzir os riscos de desabastecimento de etanol, podendo, além disso, auxiliar na estabilização dos preços e reduzir a importação deste combustível e gasolina. Fontes alternativas que ofereçam rentabilidade e

sustentabilidade são busca constante por parte do setor sucroenergético, para manter altos níveis de produtividade e competitividade.

**Tabela 1.** Comparação das características industriais e tecnológicas do caldo, colmo e bagaço entre a cultura de sorgo sacarino e cana-de-açúcar.

| <b>Planejamento industrial</b>           |                           |                        |
|------------------------------------------|---------------------------|------------------------|
|                                          | <b>Sorgo sacarino</b>     | <b>Cana-de-açúcar</b>  |
| Ciclo fenológico                         | 3,5 a 4 meses             | 9 a 18 meses           |
| Plantio                                  | Mecanizável, por sementes | Mecanizável, por mudas |
| Tratos culturais e colheita              | Mecanizável               | Mecanizável            |
| Produção de grãos (t há <sup>-1</sup> )  | 2 a 5                     | Não produz             |
| Produtividade (t ha <sup>-1</sup> )      | 48 - 60                   | 80 - 85                |
| <b>Análise do caldo</b>                  |                           |                        |
| Quantidade (kg t <sup>-1</sup> de colmo) | 370 - 660                 | 600 - 800              |
| Produção de etanol (L.ha <sup>-1</sup> ) | 3000 - 3600               | 7000 - 7500            |
| Brix (%)                                 | 15 - 19                   | 18 - 25                |
| Sacarose (%)                             | 8 - 13                    | 14 - 22                |
| ART (%)                                  | 12 - 17                   | 15 - 24                |
| Pureza (%)                               | 60 - 75                   | 80 - 90                |
| <b>Análise do colmo</b>                  |                           |                        |
| Sacarose (%)                             | 4 - 13                    | 12 - 16                |
| ART (%)                                  | 11,5 - 16,5               | 13 - 17                |
| Fibra (%)                                | 12 - 20                   | 10 - 15                |
| <b>Composição do bagaço</b>              |                           |                        |
| Lignina (%)                              | 11,9                      | 20,5                   |
| Pentosanas (%)                           | 26,9                      | 26,35                  |
| Celulose (%)                             | 46,57                     | 47,7                   |

Fonte: Embrapa Milho e Sorgo (2012); Gomes (2014) e Ferreira (2015)

As tecnologias comerciais de conversão biomassa para biocombustíveis de segunda geração, também favorecem a utilização do sorgo sacarino para tal finalidade. Esta cultura apresenta biomassa lignocelulósica, caracterizada por ser fibrosa e capaz de formar estrutura vegetal complexa devido ao entrelaçamento entre os principais constituintes, a celulose, hemiceluloses e lignina (Assumpção, 2015). Quando hidrolisadas, estas liberam monômeros de açúcares fermentáveis que podem ser fermentados por leveduras a etanol (Reis et al., 2016; Senna e Ansanelli, 2016).

Ainda em relação ao aproveitamento da cultura e seu potencial, atualmente, a tecnologia de digestão anaeróbica para produção de biogás também é reconhecidamente um método eficiente de geração de energia a partir de biomassa lignocelulósica do sorgo sacarino (Jankowski et al., 2016; Ahmad Dar et al., 2018), permitindo a recirculação de nutrientes, contribuindo, consequentemente para uma economia circular.

De modo geral, ao que concerne o aprimoramento de matérias-primas com capacidade para produção de biocombustíveis, este, segundo Durães (2011) está restrito, primeiro, ao aumento da densidade energética e a utilização de matérias-primas alternativas ou complementares, com domínio tecnológico, como é o caso do sorgo sacarino e, segundo, à eficiência das tecnologias de aproveitamento do conteúdo energético, tais como pré-tratamento, fermentação, destilação, biodigestão, entre outros.

### 3.2.3.1. Etanol de sorgo sacarino

A utilização de etanol apresenta crescimento progressivo, com possibilidade de utilização de diferentes matérias-primas. Atualmente, o país é o segundo maior produtor de etanol do mundo utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima (Karp et al., 2021; Renewable Fuels Association, 2024), somando com os Estados Unidos 80% da produção mundial deste biocombustível (Tabela 2).

Considerando a grande diversidade de climas, solos e recursos hídricos no Brasil, o país possui inúmeras condições favoráveis para a produção agrícola de diversas espécies destinadas à geração de energia (Michel Jr., 2010). Neste sentido, culturas bioenergéticas alternativas como o sorgo sacarino, podem ser usadas para potencializar a produção do etanol no país, sendo capazes ainda de maximizar o uso de recursos nas usinas de produção do biocombustível que utilizam a cana-de-açúcar exclusivamente como matéria-prima (Botelho et al., 2021).

**Tabela 2.** Produção mundial de etanol (milhões de litros)

| Países         | 2018  | 2019  | 2020  | 2021  | 2022  | Produção mundial (%) |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| EUA            | 60,9  | 59,7  | 52,8  | 56,8  | 58,1  | 54                   |
| Brasil         | 30,5  | 33,5  | 30,7  | 27,7  | 28,0  | 26                   |
| União Europeia | 5,1   | 5,2   | 5,0   | 5,3   | 5,5   | 5                    |
| Índia          | 1,7   | 1,9   | 2,0   | 3,3   | 4,7   | 4                    |
| China          | 3,1   | 3,9   | 3,6   | 3,4   | 3,5   | 3                    |
| Canadá         | 1,7   | 1,9   | 1,6   | 1,6   | 1,7   | 2                    |
| Tailândia      | 1,5   | 1,6   | 1,5   | 1,3   | 1,4   | 1                    |
| Argentina      | 1,1   | 1,1   | 0,8   | 1,0   | 1,2   | 1                    |
| Outros         | 2,6   | 2,4   | 2,3   | 2,6   | 2,7   | 3                    |
| Total          | 108,3 | 111,3 | 100,2 | 103,2 | 106,8 |                      |

Fonte: RFA - Renewable Fuels Association (2023).

O sorgo sacarino é constituído de três grupos de matérias passíveis para o processo fermentativo do etanol, sendo eles os açúcares, presentes no caule, o amido, componente dos grãos e o material lignocelulósico presente no bagaço (Quilhó, 2011). Apresenta colmos com caldo semelhante aos da cana-de-açúcar, ricos em açúcares fermentáveis (Yuvraj et al., 2013; Appiah-Nkansah et al., 2019), conforme atestado por Batista et al. (2018), o que, entre outros aspectos, o qualifica para a produção de etanol.

Além disso, a cultura apresenta brix variando em média de 16 até 23% (Olivetti & Camargo, 1997; Almodares & Hadi, 2009) e valores de Açúcares Redutores Totais (ART), bem próximos aos da cana-de-açúcar, tendo uma eficiência fermentativa na ordem dos 90% (Ferreira et al., 2021).

Verifica-se ainda, alta produtividade de biomassa, variando de 40 a 70 t.ha<sup>-1</sup> e rendimentos de etanol que podem chegar a 6000 L.ha<sup>-1</sup>, com o aproveitamento dos colmos e dos grãos (Wang e Liu, 2009; Yang et al., 2018). Além disso, o bagaço é passível de utilização como fonte de energia a partir da produção de etanol de segunda geração, ou ainda, como vapor para industrialização e cogeração de eletricidade, contribuindo para um balanço energético favorável (May et al., 2013; Khalil et al., 2015).

Masson et al. (2015) avaliaram a produção de etanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar e constataram que, embora a cultivar de sorgo utilizada tenha apresentado resultados inferiores aos da cana-de-açúcar, estes podem ser considerados satisfatórios para o processamento na entressafra da cana, objetivando a produção de etanol, possibilitando a redução da ociosidade das biorrefinarias, uma vez que foram conseguidos teor alcoólico e eficiência fermentativa de 6,3% e 81,38%, respectivamente.

Ao investigar a produção de etanol do bagaço de sorgo sacarino utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, Tinôco et al. (2021) constataram rendimento de etanol de 2.769,8 L/ha, representando 17,2% do lucro obtido com o caldo de cana, demonstrando seu potencial econômico ao

invés de ser queimado em caldeiras para geração de calor em processos industriais.

Diante do exposto, os esforços de institutos agronômicos brasileiros, e de pesquisa, através de programas de melhoramentos, produzem avaliações de genótipos de sorgo sacarino em todo o Brasil, buscando cultivares adaptáveis em diversos ambientes. É necessária estabilidade e adaptabilidade mediante as circunstâncias do ambiente para determinar qual genótipo é mais apto para cada região produtora, a fim de expandir o cultivo da cultura e consequentemente, impulsionar a produção de etanol (Sousa e Parrella, 2018).

### **3.2.3.2. Biogás de sorgo sacarino**

O sorgo sacarino tem se destacado entre as culturas com potencial para síntese de bioenergia, dentre outros aspectos, pelo crescimento rápido, acúmulo de açúcares fermentáveis no colmo, elevada produtividade de fibra e grãos ricos em amido (Parrella et al., 2021), bem como pela capacidade de armazenamento de carboidratos em sua biomassa (Molaverdi et al., 2013), apresentando grande interesse para o setor sucroenergético.

Neste sentido, estudos que agreguem valor a esta cultura, geram maior conhecimento para seu aproveitamento, não somente na alimentação animal e na produção de etanol, como habitualmente explorado, mas na produção de outra fonte de energia renovável, descentralizada e de baixo custo, o biogás, através da digestão anaeróbica (Molaverdi et al., 2013; Almeida et al., 2019a; Machado et al., 2023). Esta por sua vez, representa alternativa valiosa para o processamento do sorgo sacarino, devido aos custos mais baixos e à instalação simples (Salimbeni, 2013).

Mahmood et al. (2013) avaliaram diferentes cultivares de sorgo sacarino quanto à produção de matéria seca, sua composição química e produção de metano na Alemanha. O estudo revelou que os rendimentos de biogás e metano das cultivares testadas, foram equivalentes aos do milho e, portanto, podem ser utilizadas como substitutos desta cultura para a produção de bioenergia. Da mesma forma, estudo realizado por Matsakas et al. (2014) em caules secos de sorgo sacarino como substrato para geração de biogás, concluiu que mais

biogás foi produzido usando tratamento enzimático, constatando-se produção de 296 mLCH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SV.

O sorgo sacarino também foi caracterizado pela eficiente produtividade média de biogás, maior teor e produtividade de metano, quando comparado ao milho, nos estudos de Kuglarz et al. (2020). Neste mesmo contexto, Alqahtani (2024), também atestou, baseado em análises técnico-econômicas a viabilidade econômica da obtenção de biogás a partir da biomassa do sorgo sacarino, o potencial substancial da cultura como matéria-prima para a produção desta bioenergia.

Grabovsky et al. (2023), estudando o potencial bioenergético do sorgo sacarino e do milho, baseado na biomassa, estimou a partir da equação de Buswell, o rendimento de biogás, cujo volume foi de 10,3 mil m<sup>3</sup>/ha a partir do cultivo conjunto desta cultura com milho, e produção específica de metano foi de 5,9 mil m<sup>3</sup>/ha para a mesma condição.

Machado et al. (2023), avaliando o potencial de produção de biogás a partir da fermentação anaeróbica da biomassa de sorgo sacarino in natura, bem como resíduos de frutas e dejetos animais em biodigestores de bancada tipo batelada, observaram que o volume de biogás produzido a partir do sorgo foi superior ao o produzido pelos resíduos de frutas, no entanto, inferior ao produzido a partir dos dejetos animais. Segundo o mesmo autor, este resultado se justifica dada a elevada concentração de carboidratos estruturais que constituem a biomassa de sorgo sacarino, perdendo rapidamente seus carboidratos solúveis em digestão anaeróbica.

Diante do exposto, avanços notáveis tem sido observados no aproveitamento da cultura de sorgo sacarino como alternativa para a produção de bioenergia. Além das diferentes técnicas de fermentação e aproveitamento, estratégias de engenharia genética para o melhoramento e desenvolvimento de novas cultivares, oferecem caminhos potenciais para melhoria de desempenho desta cultura (Parrela et al., 2021; Lima e Dos Anjos, 2022). A avaliação das implicações ambientais também sublinha a importância de otimizar os rendimentos de conversão e o balanço energético para o estabelecimento de uma produção sustentável de bioenergia a partir do sorgo sacarino.

É neste sentido que o seu uso, sobretudo na entressafra da cana-de-açúcar, representa vantagem considerável. Acredita-se que o poder energético do biogás gerado a partir da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, tal como já estudado para vinhaça e o melaço de cana-de-açúcar (Barros et al., 2016; Santana Júnior et al., 2019), pode representar ganho energético significativo, e, conseqüentemente, melhorias no rendimento do setor sucroenergético, com múltiplas possibilidades de usos finais do biogás.

### **3.3 Digestão anaeróbia**

A recuperação energética é apontada como a principal direção de desenvolvimento do tratamento e gestão sustentável de resíduos orgânicos (Nie et al., 2023). Nesse aspecto, a digestão anaeróbica é uma tecnologia fundamental, uma vez que é capaz de converter estes resíduos orgânicos de diferentes naturezas em biogás, bicomcombustível rico em metano e biofertilizantes (Alloul et al., 2018; Pramanik et al., 2019; Xiao et al., 2022). Além disso, de acordo com Lin et al. (2019), este processo emite menores quantidades de gases de efeito estufa em comparação com outros processos de tratamento de resíduos, como a compostagem, sendo, portanto, uma opção mais sustentável do ponto de vista ambiental.

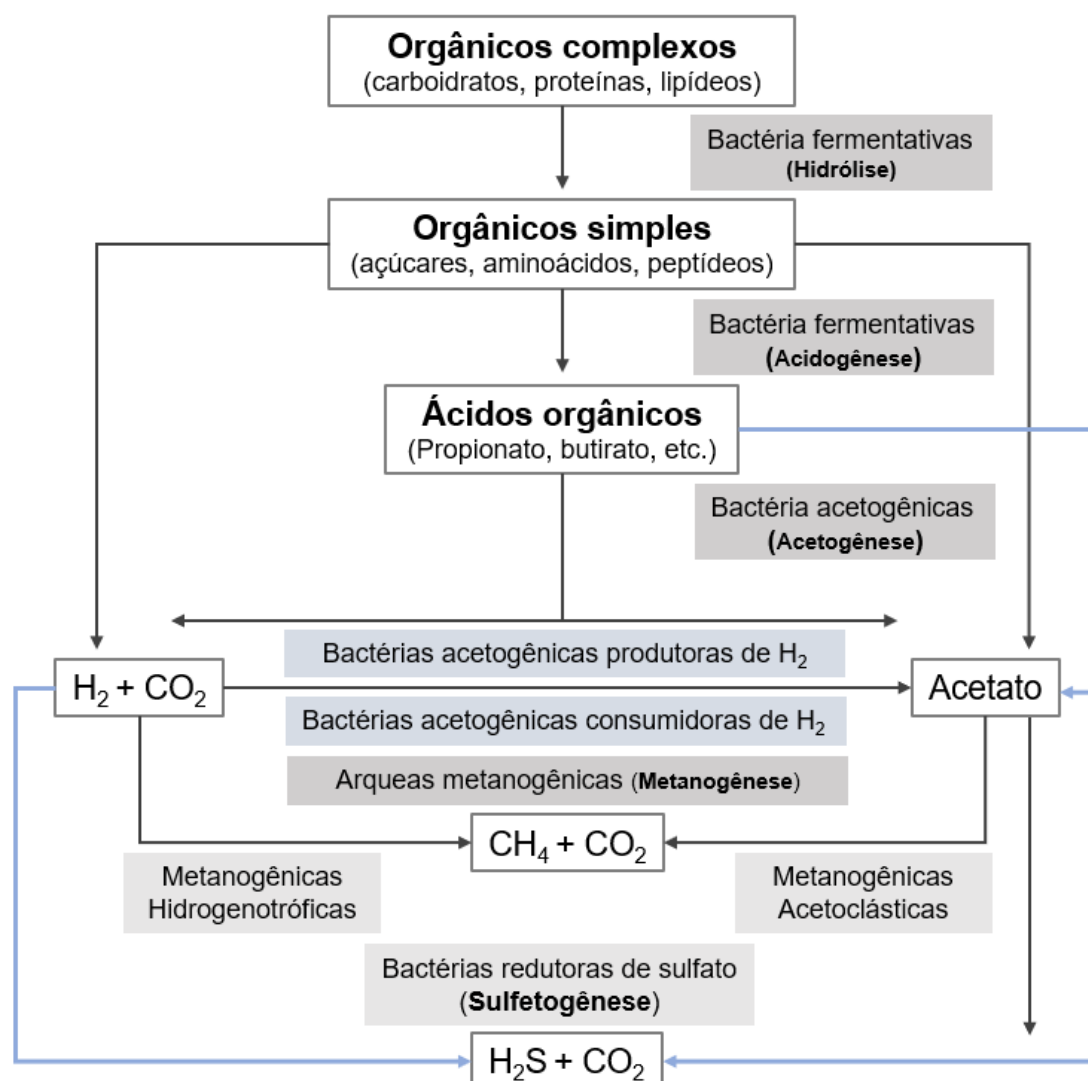
A digestão anaeróbia é constituída por um conjunto de etapas e reações bioquímicas capazes de degradar e estabilizar a fração orgânica de resíduos em meio anóxico, resultando na síntese de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ , principalmente (O'Flaherty et al., 2006). Diferentes grupos microbianos participam desta conversão da matéria orgânica em biogás, sendo os três principais constituídos pelas bactérias fermentativas (hidrolíticas e acidogênicas), as bactérias sintróficas (acetogênicas) e arqueas metanogênicas.

Devido à propensão de limitação de substrato na digestão anaeróbia, formas evolutivas de associação entre dois ou mais organismos podem ser observadas, denotando padrões sucessionais na população ecológica microbiana que decorrem de mudanças nas composições e concentrações de substrato em direção a conversão de matéria orgânica em biogás (Majd et al., 2017; He et al., 2018; Shin et al., 2019 ). Após serem veemente investigada,

através de análises bioquímicas e técnicas de isolamento e cultivo em condições laboratoriais, foi possível identificar que a interação entre os microrganismos no processo digestão anaeróbica dos resíduos orgânicos, ocorre essencialmente em quatro estágios sintróficos sequenciais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Kougias et al., 2017) (Figura 2).

A hidrólise, consiste na conversão do material orgânico particulado mais complexo tal como proteínas, lipídios, polissacarídeos e ácidos nucleicos, em compostos dissolvidos mais simples, de menor peso molecular, através da ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas (Chernicharo, 2007). As proteínas são degradadas a aminoácidos, os carboidratos se transformam em açúcares solúveis e os lipídeos são convertidos em ácidos graxos de cadeia longa e glicerina (Fernandes, 2004). A importância desta fase decorre da reação inicial que proporciona, necessária para a quebra de fortes ligações químicas complexas, por vezes responsáveis pela recalcitrância à degradação de alguns compostos (Bajpai, 2017) .

Na segunda etapa da digestão anaeróbia, a acidogênese, os produtos solubilizados oriundos da hidrólise são absorvidos nas células das bactérias fermentativas, sendo convertidos em ácidos orgânicos, tais como ácido butírico, propiônico, acético e valérico, bem como em álcoois, hidrogênio, gás carbônico e água. Esta etapa é promovida geralmente por bactérias fermentativas do gênero *Clostridium*, que abrange espécies anaeróbias esporulantes, capazes de resistir a ambientes adversos, e a família Bacteroidaceae, que participam da degradação de açúcares e aminoácidos e são frequentemente encontrados em tratamentos digestivos (Chernicharo, 2007; Ziemiński e Frac, 2012; Adekunle e Okolie, 2015).



**Figura 2.** Fluxograma simplificado das etapas da digestão anaeróbia e rotas metabólicas adaptado de Chernicharo (2016).

Na acetogênese, os produtos da acidogênese são convertidos em acetato e hidrogênio (H<sub>2</sub>) por bactéria acetogênicas e produtoras obrigatórias de H<sub>2</sub> (Kangle et al. 2012; Guo et al. 2015a, b). Caso exceda certas pressões parciais críticas, o hidrogênio produzido, pode inibir a ação de bactérias acetogênicas. Desta forma, é imprescindível que os microrganismos acetogênicos estejam em simbiose com as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. Isso se justifica porque, na metanogênese, que consiste a última etapa da digestão anaeróbia, os microrganismos consomem o hidrogênio produzido na acetogênese,

reduzindo sua pressão parcial, convertendo, por fim, o acetato em  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Chernicharo, 2007; Ziemiński e Frac, 2012; Bajpai 2017 ; Meegoda et al. 2018 ).

Na última etapa da digestão anaeróbica, a metanogênese, produtos da acetogênese são utilizados como substrato para a produção de metano, dióxido de carbono e hidrogênio, com alto potencial energético, a partir de duas vias metabólicas principais: hidrogenotrófica, onde  $\text{CO}_2$  é convertidos em metano pelos consumidores de  $\text{H}_2$  / $\text{CO}_2$  e a via acetoclástica, em que o metano é gerado a partir da conversão de acetato (Majd et al. 2017).

Outro aspecto importante, no que diz respeito à digestão anaeróbica está relacionado às questões operacionais, sendo, portanto, indispensável atender a diferentes requisitos, a fim de assegurar o bom desenvolvimento da microbiota. No que se refere à temperatura, este representa fator importante, pois está ligado ao desempenho e estabilidade do processo anaeróbio, uma vez que se correlaciona à variação da composição e da diversidade da comunidade microbiana, e também com as alterações nas vias e no equilíbrio termodinâmico das reações bioquímicas (Lin et al., 2016).

A digestão anaeróbica pode ser operada na faixa de temperatura mesofílica, de 30 a 40 °C, com temperatura ótima de 35 a 37 °C ou na termofílica, de 50 a 60 °C, com temperatura ótima de 54°C (Van Lier, 1995). Comparativamente, embora menos comumente aplicada, esta última oferece inúmeras vantagens em relação à primeira, tais como aceleração de reações, taxa de reação acelerada e melhor remoção de patógenos (Buffière et al., 2018).

A maioria dos microrganismos metanogênicos tem seu desenvolvimento e produção de metano em condições neutras ou ligeiramente alcalinas, que compreendem a faixa de pH de 7,0 a 8,0. Para se manterem em condições adequadas, os sistemas de digestão anaeróbia são usualmente submetidos a medidas de controle operacional, evitando o acúmulo excessivo de ácidos voláteis totais (AVT). Para isso, a adição de alcalinizantes químicos é, por vezes, uma estratégia recomendada (Del Nery et al., 2018; Volpi et al., 2021b), devendo-se atentar, no entanto, a dosagem utilizada, uma vez que esta pode provocar alterações no processo em termos de eficiência econômica e ambiental (Fuess et al, 2018). A recirculação do efluente no sistema de digestão anaeróbia

também tem se mostrado um método eficaz para manter a capacidade de tamponamento e o retorno de nutrientes, favorecendo os processos de degradação da matéria orgânica (Barros et al., 2017; Chuenchart et al., 2020; Harihastuti et al., 2021; Kee et al., 2022).

O fornecimento de nutrientes ao sistema é indispensável para a multiplicação e sobrevivência dos microrganismos e, portanto, para a eficiência da digestão anaeróbia. A demanda nutricional da população microbiana envolvida nos processos biológicos é baseada na sua composição celular, e, de acordo com Chernicharo (2007), a suplementação de nutrientes é retratada na literatura em quantidades variáveis, baseada na demanda química de oxigênio (DQO), sendo a relação DQO:N:P = 350:5:1 tida como suficiente, considerando-se que os nutrientes presentes estão na forma disponível para os microrganismos.

De forma geral, o processo de digestão anaeróbia exige a presença tanto de macro como de micronutrientes em níveis suficientes para garantir eficiência e estabilidade do sistema. Os macronutrientes (C, N, P, K, Na, S, Ca e Mg) são os principais elementos utilizados nos processos anabólicos. Já os micronutrientes (Fe, Co, Ni, Cu, Mn, Mo, Se, W e B) são indispensáveis para produção e funcionamento de enzimas, sendo utilizados como cofatores enzimáticos das vias metabólicas da digestão anaeróbia (Choong et al, 2016; Hendriks et al., 2018).

### **3.3.1 Microbiologia da digestão anaeróbia**

A digestão anaeróbia em si, constitui um ecossistema complexo formado por arqueas e diferentes grupos bacterianos que atuam em sintrofia nos processos bioquímicos da produção de biogás. Com o objetivo de elucidar detalhadamente a estrutura das comunidades envolvidas, bem como as rotas metabólicas e a relação desses organismos frente as condições impostas durante a digestão de diferentes substratos (Delforno et al., 2017; Menzel et al., 2020; Liu et al, 2021), a diversidade de microrganismos envolvidos no sistema de digestão anaeróbia tem sido intensamente investigada (Martins et al., 2016, Barros et al., 2017; Sampaio, 2022; Souza, 2022). O conhecimento desses, é

fundamental para a indústria biotecnológica, a fim de compreender as interações e capacidades metabólicas de cada grupo taxonômico nos reatores anaeróbios (Martínez et al., 2020).

Nos primeiros estágios da digestão anaeróbia são encontrados predominantemente microrganismos dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (Menzel et al., 2020), no entanto, mudanças nas condições e substratos do processo, podem promover o enriquecimento de diversos microrganismos (Li et al., 2017; Castellano-Hinojosa et al., 2018). Estes são capazes de metabolizar substratos variados, que incluem proteínas, lipídios, lignina, celulose, açúcares, e aminoácidos, mediante a produção de enzimas extracelulares. Já o gênero de bactérias *Clostridium* predomina na fermentação com alta produção de ácido acético, ácido butírico e hidrogênio, (Wang et al., 2016; Greses et al., 2017; Menzel et al., 2020).

As bactérias fermentativas hidrolíticas diminuem em uma operação de longo prazo (O'Reilly et al., 2010), e a comunidade desaparece quando as ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales predominam. As arqueas metanogênicas, a partir de então, passam a cooperar para a sobrevivência das bactérias acetogênicas sintróficas. Estas, por sua vez, sustentam as bactérias metanogênicas e controlam a abundância relativa de bactérias metanogênicas hidrogenofílicas sobre as arqueobactérias metanogênicas acetoclásticas (Oh et al., 2018).

Em particular, as bactérias acetogênicas sintróficas fornecem acetato na rota metabólica dos organismos metanogênicos acetoclásticos para produzir energia, ou armazenam acetato no citosol destes organismos sob a condição de necessidade de acetato (Wolfe, 2005). Desta forma, arqueobactérias metanogênicas coexistem com táxons acetogênicos sintróficos (Carolle et al., 2017).

Na metanogênese, em condições termofílicas, os organismos metanogênicos da ordem *Methanobacteriales* são particularmente dominantes na presença de arqueobactérias metanogênicas acetoclásticas, que incluem os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Guo et al., 2014; Oh et al., 2018). *Methanosarcinas* crescem formando agregados e grânulos irregulares, podendo oferecer maior tolerância a compostos iônicos tóxicos, produzindo

metano a partir de acetato, metanol, monoacetilamina, dimetilamina, trimetilamina,  $H_2/CO_2$  pelas rotas acetoclásticas e hidrogenotróficas (Guo et al., 2014).

Em condições mesofílicas, *Bacteroidetes* e *Proteobactérias* sintróficas são maioria (O'Reilly et al., 2010), no entanto, a longo prazo desaparecem e arqueobactérias metanogênicas acetoclásticas da família *Methanosarcinaceae* são responsáveis por recompor o enriquecimento da microbiota, cujos principais organismos consistem em membros das ordens *Methanobacteriales*, *Methanococcales* e *Methanosarcinales* (Oh et al., 2018).

Informações sobre a diversidade, estrutura e funções desempenhadas pelos microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, são de grande relevância para o entendimento do funcionamento de um biorreator (Vanwonterghem et al., 2014; Cabezas et al., 2015). A complexidade destes microrganismos frente às condições operacionais, tais como tipo de substrato, pH, temperatura e fatores hidráulicos, ainda não são bem elucidados (Santos, 2009), sendo necessário, portanto, entender a dinâmica microbiológica, e os papéis das espécies nas rotas bioquímicas, para então, promover condições ambientais favoráveis ao crescimento e atividade destes organismos, a fim de otimizar a produção de metano. Desta maneira, a utilização de técnicas moleculares na investigação dos microrganismos presentes nos processos de digestão anaeróbia pode propiciar importantes avanços tecnológicos e um novo campo de pesquisa.

### **3.3.2 Biochar na digestão anaeróbia**

A estabilidade da digestão anaeróbia depende da sinergia dos microrganismos presentes no sistema e do equilíbrio entre os estágios. No entanto, microrganismos anaeróbios são vulneráveis a condições e ambientes desfavoráveis (Wu et al., 2017b ; Zhou et al., 2021). Assim, situações de variação de substrato e carga orgânica, podem ocasionar o desequilíbrio do sistema, levando a menor remoção de matéria orgânica, e consequente diminuição da produção de metano (Lie et al., 2024).

Entende-se que, um sistema de digestão anaeróbia estável deve ser capaz de contornar problemas associados a elevada carga orgânica, presença de substrato tóxico e acúmulo de ácidos graxos voláteis (Chen et al., 2008 ; Li et al., 2018; Huang et al., 2022c). Uma alternativa promissora para aumentar a estabilidade operacional destes sistemas é o uso de aditivos biológicos, oligoelementos, adsorventes e materiais à base de carbono ( Romero-Guiza et al., 2016; Liu et al., 2021d).

Dentre os materiais aditivos atualmente estudados, o biochar tem sido reconhecidamente promissor, dentre outros aspectos, por constituir partícula de tamanho reduzido, estável, de fácil preparação, com múltiplas funcionalidades e ambientalmente sustentável (Wu et al., 2017a; Ambaye et al., 2021). Este, consiste em um material rico em carbono, produzido usando biomassa como matéria-prima, submetida à pirólise, gaseificação, carbonização hidrotérmica ou outros processos termoquímicos sob condições anóxicas.

Na digestão anaeróbia, o biochar tem sido amplamente estudado para aprimoramento do processo, eficiência de degradação da matéria orgânica e produção de metano (Hao et al., 2018; Lu et al., 2020; Kumar et al., 2021). Dentre suas funções no sistema, o biochar pode atuar como microambiente para os microrganismos, como adsorvente para atenuar toxicidade de substâncias inibidoras, como alcalinizante para aumentar a capacidade de tamponamento dos sistemas anaeróbicos e como material condutor promovendo a transferência direta de elétrons entre espécies (Chiappero et al., 2020).

Estudos evidenciaram que a adição de biochar alivia efetivamente o estresse devido à amônia (Lü et al., 2016), ácidos (Luo et al., 2015) ou ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleo (Lü et al., 2019). Grupos funcionais de superfície, bem como propriedades eletroquímicas foram apontados como características do biochar que favorecem o desempenho da digestão anaeróbia (Qiu et al., 2019; Wang et al., 2020b; Chiappero et al., 2020; Kumar et al., 2021). No entanto, tais propriedades podem ser influenciadas pelo tipo de matéria-prima, método de produção, bem como temperatura e tempo de residência (Zhang et al., 2018; Qin et al., 2020; Deng et al., 2021a).

Estudos demonstraram que o biochar sintetizado a partir de diferentes substratos, resultam em diferentes características e, portanto, em diferentes

efeitos no processo de digestão anaeróbia, denotando, assim, que, suas propriedades estão fortemente correlacionadas ao seu efeito no processo (Pan et al., 2019; Lu et al., 2020; Zhou et al., 2020; Deng et al., 2021a).

Light et al. (2018) relataram que a adição de biochar pode fornecer mais transportadores de elétrons para as reações redox, estimulando o metabolismo de microrganismos, uma vez que, a reatividade química do biochar está geralmente associada à sua porção redox-ativa, ou seja, grupos funcionais contendo oxigênio em suas moléculas orgânicas. Neste sentido, a forte reatividade química do biochar denotou que os elétrons poderiam ser transferidos dos microrganismos para os receptores de elétrons extracelulares.

Ao estudar o efeito da adição de biochar de casca de arroz na digestão anaeróbia de sorgo sacarino, Ma et al. (2020) constataram que este foi capaz de atenuar a diminuição do pH sob condições de alta carga, reduzir a concentração de ácidos graxos voláteis e aumentar a taxa máxima de produção de metano em 25%. Em outro estudo, Deng et al. (2022) observaram que sob condições de enriquecimento de amônio, o uso de biochar de sabugo de milho alivia o acúmulo de ácidos graxos voláteis, quebrando a barreira termodinâmica do butirato ao acetato, acelerando a degradação do propionato, com consequente melhoria da produção de metano. Este mesmo efeito foi relatado por Sun et al. (2022) ao utilizar biochar de palha de milho em biodigestores anaeróbios de resíduos alimentares.

A eficiência do uso de biochar na digestão anaeróbia foi novamente evidenciada nos estudos de Xu et al. (2024). Ao adicionar biochar de bagaço de cana-de-açúcar à digestão anaeróbia de resíduos de casca de camarão, os autores observaram que sua estrutura porosa facilitou a colonização de arqueas metanogênicas, potencializando a produção de metano em aproximadamente 20%. Também foi apontada redução do acúmulo de ácidos orgânicos voláteis na fase acidogênica em 62,15%.

Isto posto, verifica-se que o uso do biochar na digestão anaeróbia representa uma alternativa promissora para o desempenho dos sistemas, sobretudo no que diz respeito à redução da acidificação e à produção de metano. No entanto, sua aplicação também representa destinação adequada do material orgânico remanescente da colheita de culturas agrônômicas, tais como milho,

cana, sorgo, arroz, dentre outros, que constituem matéria-prima com múltiplas possibilidades de reaproveitamento. A produção de biochar destas biomassas proporciona a transformação do material carbonáceo de baixa eficiência energética para uma eficiência economicamente viável. Além disso, agrega valor aos subprodutos, ao mesmo tempo em que contribui para uma economia circular, reduzindo a dependência em recursos e o desperdício.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Localização das Unidades Experimentais

A pesquisa foi desenvolvida na área experimental da Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo - FATEC de Jaboticabal, São Paulo, 21°15'03.1"S, 48°18'23.6"W, bem como nas instalações experimentais do Laboratório de Saneamento Ambiental, do Departamento de Engenharia e Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Jaboticabal 21°15'22" S, 48°18'58" W. O clima da região, segundo classificação de "Koppen", é Cwa (subtropical úmido, seco no inverno e com chuvas no verão), com precipitação média anual de 1.300 mm e temperatura média de 22,3 °C (Universidade Estadual Paulista, 2018).

### 4.2 Plantio e manutenção do sorgo sacarino

Foi estabelecido o plantio da variedade IPA 467 de sorgo sacarino, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), mantido de novembro de 2021 a abril de 2022, período correspondente à entressafra da cana-de-açúcar. O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho eutroférico, textura muito argilosa (LVef) (Dos Santos 2018), cujas características estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Análise de solo da área experimental – Fatec-Jaboticabal, São Paulo

| Amostra | pH                | M.O.                | P                    | S | Ca | Mg | Na | K   | Al | H+Al | S.B. | CTC  | V  | Sat. Al |
|---------|-------------------|---------------------|----------------------|---|----|----|----|-----|----|------|------|------|----|---------|
|         | CaCl <sub>2</sub> | -g dm <sup>-3</sup> | -mg dm <sup>-3</sup> |   |    |    |    |     |    |      |      |      | V% | m%      |
| 0-20 cm | 6,5               | 35                  | 35                   | 5 | 41 | 8  | ns | 3,4 | 0  | 11   | 52,6 | 63,7 | 83 | 0       |

M.O.: Matéria Orgânica; CTC: Capacidade de troca catiônica- S.B+H+Al; S.B.: Soma de bases- Ca+Mg+Na+K; V: Saturação por bases- (SB/CTC)\*100; Sat. Al: Saturação por alumínio- (Al/(SB+Al)) \*100

Para o plantio da cultura, aplicou-se o equivalente a 420 kg ha<sup>-1</sup> da formulação NPK 8-28-16, tendo como fonte de nutrientes, ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio. Este ocorreu junto à semente, com plantadeira regulada para 144.000 plantas por hectare, com espaçamento de 0,9 m entre linhas. Um mês após o plantio, foi realizada a adubação de cobertura, de uma única vez, segundo os tratamentos do experimento.

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com parcelas subdivididas, contendo 6 tratamentos correspondentes às adubações de cobertura: controle (sem adubação de cobertura), vinhaça biodigerida (VB), VB + ureia (VB+U), VB + NPK 20-00-20 (VB+NPK), ureia apenas (U) e NPK 20-00-20 apenas (NPK), com sete épocas de avaliação e quatro repetições.

A vinhaça biodigerida utilizada neste estudo foi resultante do tratamento anaeróbico da vinhaça *in natura* da cana-de-açúcar, para a produção de biogás em reatores horizontais de leito fixo (RAHLF), submetida ao processo oxidativo avançado Fenton, utilizando-se peróxido de hidrogênio e  $\text{Fe}^{2+}$  (Nunes 2022) (Tabela 4). Este processo é utilizado para o tratamento de águas residuárias, dentre outras razões, por sua capacidade de oxidar substratos orgânicos de alta complexidade (Romero et al., 2016), como aqueles presentes em grandes quantidades na vinhaça *in natura*. Além disso, ele reduz os contaminantes e, conseqüentemente, a toxicidade dos resíduos (Alcalá-Delgado et al., 2018), uma vez que alguns poluentes orgânicos permanecem mesmo após o tratamento biológico.

Nos tratamentos com vinhaça biodigerida, considerou-se o volume total de efluente disponível, de 500 litros e a utilização deste de forma integral, aplicando-se, desta maneira, 42 litros por parcela, ao lado da linha de plantio, de forma manual. Os demais tratamentos com adubação de cobertura, foram baseados nas recomendações do Boletim 100, bem como na quantidade de nitrogênio total (NTK) da vinhaça biodigerida, de  $520 \text{ mg L}^{-1}$ . Desta forma, tem-se para cada tratamento por parcela: Controle: sem adubação de cobertura; VB: 42 L de vinhaça biodigerida; VB + U: 42 L de VB + 1,36 kg de ureia; VB + NPK: 42 L de VB + 3,083 kg de NPK 20-00-20; U: 1,38 kg de ureia e NPK: 3,105 kg de NPK 20-00-20

**Tabela 4.** Caracterização da vinhaça biodigerida de cana-de-açúcar.

| Vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida | pH   | DQO  | NTK   | N-am  | P-t  | Ca  | Mg   | K    | Na   | Fe   | Mn  |
|---------------------------------------|------|------|-------|-------|------|-----|------|------|------|------|-----|
|                                       | 8,75 | 6900 | 520,0 | 332,0 | 24,0 | 6,2 | 20,5 | 11,6 | 21,3 | 11,0 | 1,1 |

DQO: Demanda química de oxigênio; NTK: Nitrogênio total Kjeldahl; N-am: Nitrogênio amoniacal; P-t: Fósforo total. Unidade:  $\text{mg L}^{-1}$  (exceto pH).

As parcelas no campo foram constituídas por nove linhas de oito metros cada, no entanto, foram consideradas para área útil as cinco linhas centrais, com seis metros de comprimento, excluindo 1 m de cada lado da borda da parcela em linha reta, totalizando 27 m<sup>2</sup> de área útil. Para avaliação do desenvolvimento do sorgo, foram tomadas, aleatoriamente, cinco plantas da área útil de cada parcela.

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado através de avaliações biométricas de altura, diâmetro, sólidos solúveis (Brix) do caldo, número de folhas e índice de maturação aos 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 130 dias após emergência. A altura das plantas foi determinada com régua graduada, rente ao solo até a inflexão da folha bandeira e o diâmetro do colmo foi determinado no terço médio das plantas, com auxílio de um paquímetro. Para determinação dos sólidos solúveis, foi extraído o caldo de uma planta de sorgo de cada parcela, com posterior leitura em refratômetro digital portátil RHC-200ATC Megabrix®. O número de folhas foi determinado pela contagem das folhas verdes completas de cinco plantas escolhidas aleatoriamente, na área útil da parcela. Já o índice de maturação, foi dado pela relação entre o teor de sólidos solúveis da ponta e da base, como realizado para cana-de-açúcar.

Aos 131 dias de crescimento, as plantas foram colhidas manualmente e, após a remoção das folhas e dos ponteiros, os feixes foram acondicionados próximos à moenda. Em seguida, procedeu-se a extração do caldo das plantas correspondentes a cada tratamento, separadamente, através de moenda de cana com rolo de inox, motor M 730 Maqtron®. Este foi coletado em baldes de 10 L, filtrado e acondicionado em ultrafreezer a -80 °C.

#### **4.3 Produção e análises no vinho de sorgo sacarino**

Para o processo de fermentação etanólica do sorgo sacarino, foi realizada a extração do caldo, filtragem deste em algodão para separação de impurezas e, em seguida determinados o pH e o teor de sólidos solúveis (ICUMSA 2011).

Posteriormente, foi conduzido o preparo do mosto de cada tratamento separadamente. Para isto, não foi necessário acertar o Brix do caldo, uma vez que, o valor médio deste para os tratamentos era menor que 14. O pH foi corrigido com ácido sulfúrico 5 N para 4,5. Avaliou-se nos mostos o teor de

açúcares redutores totais (ART), bem como acidez total (Centro de Tecnologia Canavieiro 2011).

Para a condução do processo fermentativo, estabeleceu-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x2, correspondente ao caldo das plantas tratadas com as seis adubações de cobertura, conforme experimento de campo e duas leveduras fermentadoras, com quatro repetições.

Alíquotas de 150 mL de mosto foram inoculadas com a levedura fermentadora selecionada para a produção de etanol FT 858 e fermento prensado, na concentração de 30 g L<sup>-1</sup>, determinada a partir da análise de viabilidade celular, que correspondeu a 81,1% para primeira e 78% para a segunda, para que as condições de população de leveduras fossem semelhantes entre os tipos.

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 250 ml, os quais foram mantidos a 32 °C, sob agitação de 50 rpm, em incubadora tipo shaker, cujo tempo foi igualmente padronizado para todos os tratamentos em seis horas. Ao final do processo fermentativo, amostras de vinho foram retiradas para as análises de viabilidade celular, através de câmara de Neubauer (Lee et al. 1981), bem como para análise de teor alcoólico (Centro de Tecnologia Canavieiro 2011).

O rendimento fermentativo foi obtido através do cálculo, seguindo a relação álcool produzido (rendimento de álcool prático x 100)<sup>-1</sup>, sendo o rendimento real calculado, considerando que 100 g de ART produz 64,75 mL de etanol, com base em equação estequiométrica (Fernandes 2011).

#### **4.4. Reatores anaeróbios**

##### **4.4.1 Reatores UASB “Y”**

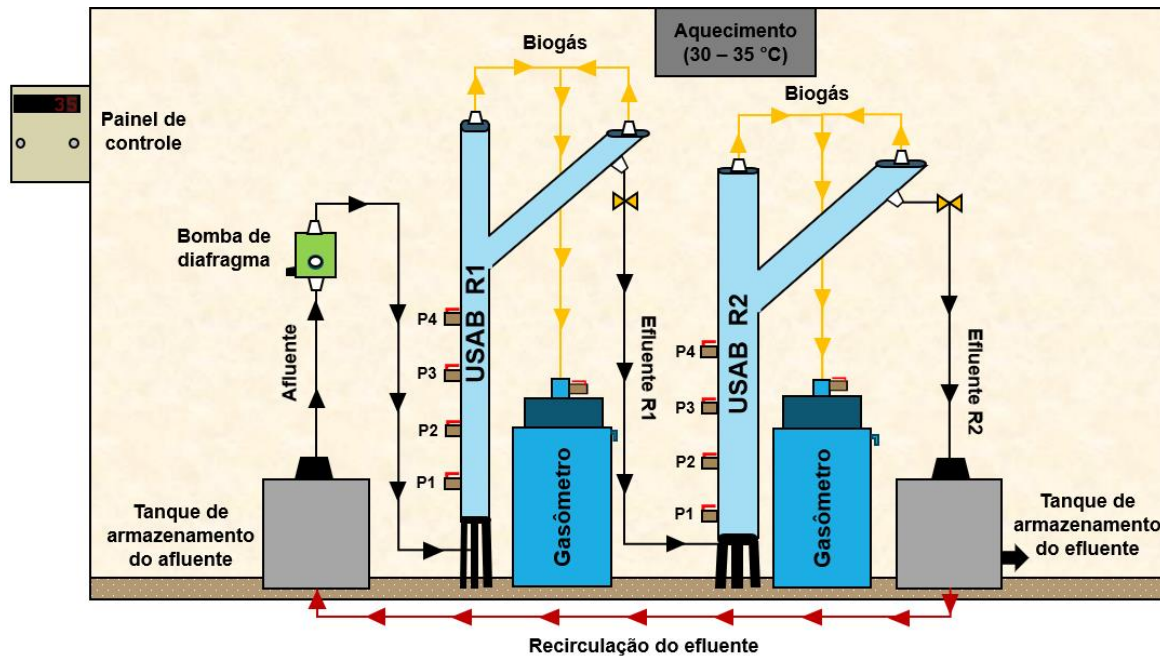
Os reatores foram confeccionados com tubos e conexões em policloreto de vinila (PVC), contendo separador de fases não convencional, com ramificação na lateral em forma de “Y”, com ângulo de 45° em relação à vertical (Cavalcanti

et al. 1999 adaptado por Bruno e Oliveira, 2013; Villa-Montoya et al., 2016) (Figura 3).

O sistema foi composto por dois reatores UASB (R1 e R2) instalados em série, em escala de bancada, com volumes de 3,4 e 6 L, alturas de 110 e 130 cm, e diâmetros de 5,3 e 7,7 cm, respectivamente e vazão de 7,5 L d<sup>-1</sup>.

Cada reator possuía, distribuídos ao longo de sua altura, quatro pontos para a coleta de amostras de lodo, denominados P1, P2, P3 e P4 (Figura 3). Foram acoplados aos dois sistemas, tanques de 20 L para o armazenamento do afluente do reator UASB R1 e o do efluente do reator UASB R2 e a alimentação do afluente nos reatores foi realizada por bomba diafragma, em que o efluente do R1 era conduzido até o R2 por gravidade através de tubo de PVC, interligando os reatores.

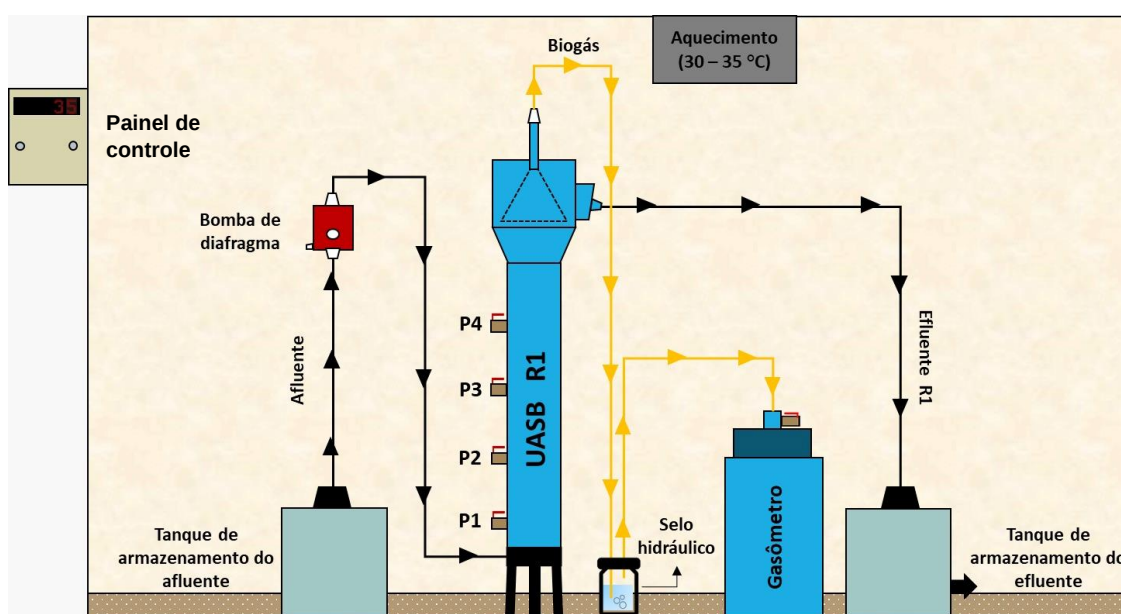
Acoplados às saídas de gás dos reatores UASB, foram instalados gasômetros individuais de 35 L tipo cúpula flutuante, construídos com fibra de vidro, através dos quais foi efetuado o monitoramento diário da produção de biogás nos reatores R1 e R2.



**Figura 3.** Vista lateral esquemática do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios UASB (R1 e R2) instalados em série, em que foi digerido o caldo de sorgo sacarino.

#### 4.4.2. Reator UASB convencional

A unidade experimental foi constituída por um reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) convencional, com volume de 15,2 L, caixa armazenadora de afluente e efluente, bomba diafragma, selo hidráulico e gasômetro, conforme ilustrado na Figura 4. O reator R1 possuía quatro pontos de coleta de lodo, os quais foram denominados P1, P2, P3 e P4, distribuídos ao longo da altura do reator. Este, assim como o UASB Y, foi construído com tubo rígido de policloreto de vinila (PVC), e para manutenção da temperatura desejada foi mantido em cabine com sistema de aquecimento com temperatura controlada de 30 a 35°C, por meio de aquecedores elétricos e termostato.



**Figura 4.** Vista lateral esquemática do sistema de tratamento com o reator anaeróbio UASB convencional (R1), em que foi digerida a vinhaça de sorgo.

#### 4.5. Lodo de inóculo

Para a partida de ambos os reatores UASB, foi utilizado como inóculo, lodo granulado proveniente de reatores UASB operados em faixa de temperatura mesofílica, em escala-piloto, tratando vinhaça de cana-de-açúcar. O lodo de inóculo apresentou concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) de 46,92 e 28,52 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo o volume adicionado aos reatores UASB, suficiente para atender a carga biológica recomendada pela bibliografia

especializada e descrita por Chernicharo (2016), de 0,05 a 0,15 kg DQO<sub>total</sub> / kg STV.d, correspondendo a aproximadamente 30% do volume total de cada reator (R1 e R2).

#### 4.6. Afluente dos reatores

O substrato utilizado no afluente dos reatores UASB “Y” foi composto pelo caldo de sorgo sacarino da variedade IPA 467, cuja composição foi caracterizada conforme descrito na Tabela 5. No reator UASB convencional, utilizou-se como substrato a vinhaça obtida através do processo de destilação do caldo de sorgo sacarino. Por apresentarem elevado valor de demanda química de oxigênio total (DQO total), houve necessidade de diluição de ambos os substratos em água, para posterior aumento gradual da carga orgânica volumétrica (COV).

O caldo de sorgo apresentou concentrações de sólidos totais (ST) e sólidos solúveis (SV) de 113,55 e 101,95 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto a vinhaça possuía 38,8 e 27,8 g L<sup>-1</sup> de ST e SV, respectivamente. Em virtude do baixo valor de pH, característico de ambos os substratos, procedeu-se com correção do pH do afluente para aproximadamente 7,0, utilizando bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), objetivando também o aumentando da sua alcalinidade.

**Tabela 5.** Caracterização de amostra composta do caldo de sorgo sacarino variedade IPA 467 aos 131 dias de crescimento.

| Sorgo<br>sacarino | pH                 | DQO    | NTK   | P    | Ca  | Mg  | K    | Na  | Cu   | Fe  | Mn  | Zn  | Co   | Ni   |
|-------------------|--------------------|--------|-------|------|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|
|                   | mg L <sup>-1</sup> |        |       |      |     |     |      |     |      |     |     |     |      |      |
|                   | 4,85               | 160200 | 251,4 | 23,8 | 2,5 | 1,9 | 37,3 | 8,8 | 0,06 | 2,6 | 2,0 | 1,2 | 0,04 | 0,07 |

#### 4.7. Condições Operacionais

O sistema de tratamento anaeróbio com caldo de sorgo foi operado durante 462 dias, de agosto de 2022 a novembro de 2023 e o experimento dividido em quatro fases de operação, correspondentes ao aumento progressivo da carga orgânica volumétrica (COV): Partida, Fase I, Fase II e Fase III, conforme descrito na Figura 5. Já o sistema com UASB convencional com vinhaça de sorgo foi operado por 204 dias, de dezembro de 2022 a junho de

2023, sendo dividido em três fases: Partida, fase I e II, de acordo com a Figura 6.

A digestão anaeróbia do caldo e da vinhaça de sorgo sacarino ocorreu em condições consideradas mesofílicas, em que os reatores foram mantidos em câmara aclimatada com temperatura controlada entre 30 e 35°C, por meio de aquecedores elétricos e termostato.

Inicialmente, diluiu-se ambos os substratos com água e o pH foi corrigido para valores próximos de 7,0 utilizando bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Nos reatores UASB “Y” tratando o caldo de sorgo, aos 131 dias de operação, iniciou-se a utilização de 50% do próprio efluente do sistema para a diluição, com suspensão pontual e temporária do recirculado em alguns momentos de iminente acidificação do sistema ao longo dos 462 dias do estudo. No reator UASB convencional, com a vinhaça de sorgo, a recirculação parcial do efluente do reator R1 foi iniciada aos 138 dias e mantida até o final da operação.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) nos sistema constituído pelos dois reatores UASB “Y” foi de 30 h, sendo o TDH do R1 de 10,8 h e do R2 de 19,2 h, enquanto o reator UASB convencional foi operado com TDH de 12 h.

As cargas orgânicas volumétricas aplicadas em ambos os sistemas, tiveram aumento gradual no decorrer do experimento, para adaptação do lodo inóculo, bem como averiguação das condições de estabilidade do sistema com COVs mais elevadas.

A COV foi calculada por meio da razão entre a DQO total do afluente e o TDH dos reatores, conforme Equação 1. A taxa de carregamento do lodo (TCL), foi dada pela razão entre a carga orgânica (DQO<sub>total</sub> do afluente vezes a vazão (Q) diária de afluente) e a massa de sólidos voláteis (SV) contida na manta de lodo dos reatores UASB, conforme Equação 2.

$$COV (gDQO L^{-1} d^{-1}) = \frac{DQO (g L^{-1})}{TDH (d)} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$TCL gDQO (gSV d)^{-1} = \frac{DQO (g L^{-1}) \cdot Q (L d^{-1})}{SV(g)} \quad (\text{Eq. 2})$$

| 2022 - 150 dias       |        |                                  | 2023 - 312 dias                          |                                          |                                           |                                  |        |  |
|-----------------------|--------|----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|--------|--|
| Fases                 |        |                                  |                                          |                                          |                                           |                                  |        |  |
| Partida               |        |                                  | I                                        | II                                       |                                           |                                  | III    |  |
| COV-R1                | Média  | 2,5                              | 9,2                                      | 17,8                                     |                                           |                                  | 22,3   |  |
|                       | CV (%) | 30                               | 48                                       | 25                                       |                                           |                                  | 6      |  |
| COV-R2                | Média  | 0,8                              | 3,6                                      | 7,7                                      |                                           |                                  | 8,8    |  |
|                       | CV (%) | 47                               | 59                                       | 31                                       |                                           |                                  | 19     |  |
| Caldo de sorgo        |        | 50 mL – 150 mL                   | 150 mL – 350 mL                          | 350 mL – 500 mL                          |                                           |                                  | 500 mL |  |
| TDH-R1                |        | 10,9 h                           |                                          |                                          |                                           |                                  |        |  |
| TDH-R2                |        | 19,2 h                           |                                          |                                          |                                           |                                  |        |  |
| Fonte de alcalinidade |        | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 50% R | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 50% R | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 100% R | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> | 100% R |  |
| Período de operação   |        | 462 dias                         |                                          |                                          |                                           |                                  |        |  |

**Figura 5.** Diagrama esquemático das fases e condições operacionais dos reatores UASB em série (R1 e R2) no tratamento anaeróbio do caldo da variedade IPA 467 de sorgo sacarino, com as médias das cargas orgânicas volumétricas (COV) em g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, volume de caldo de sorgo utilizado em mL, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h), fonte de alcalinidade com bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>) e efluente do R2 (R) e período de operação em dias.

| 2022 - 25 dias        |        | 2023 - 179 dias                  |                                           |                                           |                                  |  |
|-----------------------|--------|----------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|--|
| Fases                 |        |                                  |                                           |                                           |                                  |  |
|                       |        | Partida                          | I                                         | II                                        |                                  |  |
| COV-R1                | Média  | 1,6                              | 5,3                                       | 9,5                                       |                                  |  |
|                       | CV (%) | 32                               | 36                                        | 12                                        |                                  |  |
| Vinhaça de sorgo      |        | 350 – 700 mL                     | 700 – 1200 mL                             | 1200 mL                                   |                                  |  |
| TDH-R1                |        | 12 h                             |                                           |                                           |                                  |  |
| Fonte de alcalinidade |        | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 100% R | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> + 100% R | NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> |  |
| Período de operação   |        | 204 dias                         |                                           |                                           |                                  |  |

**Figura 6.** Diagrama esquemático das fases e condições operacionais do reator UASB convencional no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino, com as médias das cargas orgânicas volumétricas (COV) em g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, volume de vinhaça utilizado em mL, tempo de detenção hidráulico (TDH) em horas (h), fontes de alcalinidade com bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{CO}_3$ ) e efluente do R1 (R) e período de operação em dias.

#### 4.8. Adição de biochar ao sistema de digestão anaeróbia

Com o objetivo de maximizar o aproveitamento energético da cultura de sorgo sacarino, produziu-se biochar a partir do bagaço remanescente da extração do caldo, para ser adicionado ao sistema de digestão anaeróbia, visando melhorar a estabilidade e aprimorar a produção de metano.

O bagaço de sorgo foi previamente seco ao sol para retirada do excesso de umidade, em seguida seco em estufa a 105 °C até peso constante. Posteriormente, o biochar foi produzido por pirólise, em forno mufla a 450 °C, por duas horas. Este foi triturado, transformado em pó e passado por peneira com malha de 0,5 mm, posteriormente armazenado em frasco de vidro a temperatura ambiente.

O biochar do bagaço de sorgo foi caracterizado quanto ao pH e condutividade elétrica, segundo metodologia proposta por Rajkovich et al. (2011), apresentando valores de 9,79 e 1272  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , respectivamente. De acordo com o método, pesou-se 1 g de biochar em frascos de plástico e adicionou-se 20 mL de água deionizada. Em seguida a mistura foi agitada em mesa agitadora orbital por 1,5 h. Após agitação usou-se pHmetro previamente calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0 para determinar os valores de pH das amostras. Estas foram deixadas em repouso por aproximadamente 12h quando foi determinada a condutividade elétrica com condutivímetro.

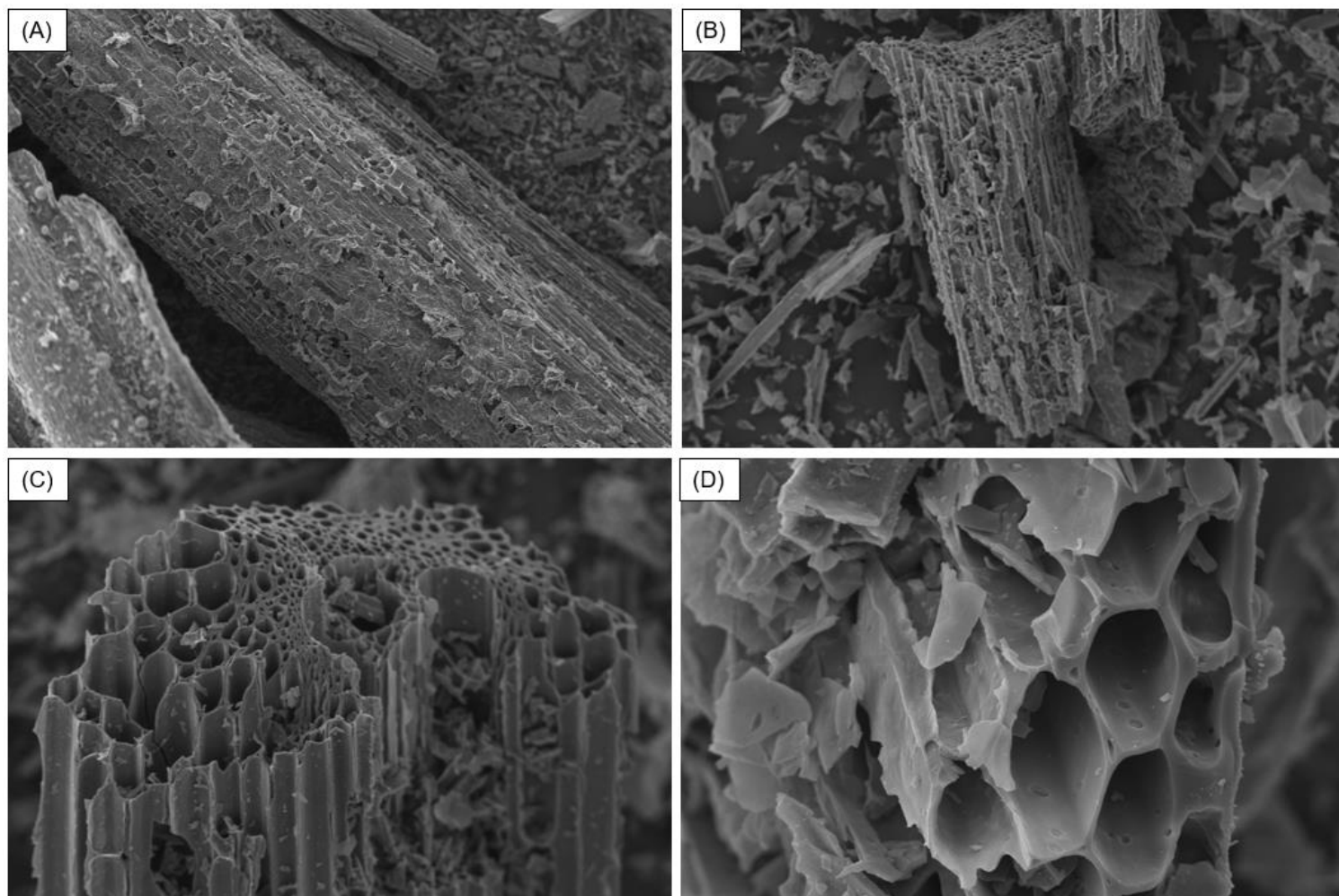
Também foi determinado o rendimento gravimétrico em base seca do material, dado pela relação entre a massa do biochar produzido e a massa do bagaço de sorgo seco, vezes cem, apresentando valor de rendimento de 27%.

Aos 371 dias de operação, correspondendo ao início da fase III de operação, iniciou-se a adição do biochar ao sistema de reatores (R1 e R2). Baseando-se no estudo apresentado por Chiappero et al., (2020), foram adicionados diariamente 4,53 g deste material ao sistema de digestão anaeróbia, representando concentração diária de 1,33 g L<sup>-1</sup>, os quais foram homogeneizados no afluente do R1.

A caracterização morfológica do biochar produzido (Figura 7) também foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Laboratório

de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- UNESP/FCAV. Para isto, anteriormente à análise da estrutura, as amostras foram fixadas em stubs de alumínio com esmalte incolor acrescido de grafite e recobertas com ouro pela técnica de sputtering, para garantir condutividade elétrica efetiva e produção de imagens de alta qualidade, em seguida foram geradas as imagens utilizando o equipamento Evo MA-10 Zeiss.

Ao final da terceira fase de operação do sistema de digestão anaeróbia, amostras de lodo contendo biochar também foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura, afim de avaliar a colonização dos microrganismos. O material úmido coletado foi fixado em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio 0,1M, por 72 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas com o tampão e submetidas à fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 12 horas. Em seguida, passaram por desidratação gradual em diferentes concentrações alcoólicas (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%), seguido pela secagem em ponto crítico. Posteriormente, as amostras foram metalizadas e analisadas de forma similar às do biochar seco.



**Figura 7.** Imagens do biochar do bagaço de sorgo sacarino produzido a 450°C, visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Evo 10-33-75-ZEISS), com tensão de aceleração de 10,0 kV e ampliação de 145 x (A), 527 x (B), 622 x (C) e 4 kx (D).

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

Ao longo do período de operação, amostras dos afluentes e efluentes dos reatores R1 e R2 foram coletadas duas vezes por semana. Para cada ponto de coleta, foi realizada amostragem composta, com intervalos de 30 minutos, até recolhimento de um volume aproximado de 300 mL de amostra.

Das amostras coletadas, foram determinados pH, alcalinidade total (AT), demanda química de oxigênio total (DQO<sub>total</sub>), nitrogênio amoniacal (N-am), de acordo com as metodologias descritas pela APHA (2017); alcalinidade parcial (AP) e alcalinidade total (AT), como descrito por Ripley et al. (1986) e ácidos voláteis totais (AVT), segundo DiLallo e Albertson (1961), na mesma frequência da coleta de amostras.

Já as determinações de demanda química de oxigênio dissolvida (DQO<sub>diss</sub>), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF) foram realizadas semanalmente. Enquanto as análises de nitrogênio Kjeldahl (NK), fósforo total (P-total), feitas a cada quinze dias, conforme metodologias descritas por APHA (2017).

A produção de biogás foi medida diariamente por meio de gasômetros (Bruno e Oliveira, 2013) e sua composição determinada mensalmente por cromatografia gasosa (APHA, 2017). Os cálculos da produção específica de metano (PEM) e da produção volumétrica de metano (PVM) foram realizados considerando as condições normais de temperatura e pressão (CNTP de 0°C e 1 atm).

Para conversão dos rendimentos de metano produzido a partir da digestão anaeróbia do caldo de sorgo, o cálculo de energia elétrica teórica foi realizado como descrito por Kythreotou et al (2011), considerando-se para tal, eficiência energética de 35%, poder calorífico do metano de 55,6 MJ Kg<sup>-1</sup> e a densidade do metano de 0,6556 Kg m<sup>-3</sup>. Para o etanol, considerou-se os teores alcoólicos conseguidos a partir da fermentação do caldo de sorgo sacarino utilizando as leveduras FT858 e o fermento prensado, densidade do etanol de 0,789 kg L<sup>-1</sup> e poder calorífico interior de 26,8 MJ kg<sup>-1</sup> (Engineering Toolbox, 2024).

#### **4.10. Sequenciamento e análise da comunidade microbiana dos reatores anaeróbios**

As amostras para extração e sequenciamento de DNA genômico foram coletadas do lodo inóculo dos sistemas e nos quatro pontos de coleta de lodo distribuídos no comprimento dos reatores UASB em série (R1 e R2) e do reator UASB convencional R1 (Figuras 3 e 4). No primeiro sistema, as amostras foram coletadas aos 368 e 460 dias de operação, nas fases II e III, respectivamente, enquanto para o segundo sistema, estas foram coletadas somente ao final da operação, no 204º dia. As amostras de lodo dos pontos de coleta de cada reator foram homogeneizadas para formar amostras compostas representativas dos reatores R1 e R2 do UASB Y e do R1 do UASB convencional.

##### **4.10.1. Extração de DNA**

A extração de DNA bacteriano das amostras de lodo dos reatores foi realizada utilizando o kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep ( Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante, em seguida, as amostras de DNA foram imediatamente congeladas em freezer a -20°C até análise molecular.

##### **4.10.2. Amplificação do gene 16S rRNA sequenciamento**

O gene 16S ribossomal foi parcialmente amplificado na região V4, a partir de amostras utilizando primers universais 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') e os amplicons das bactérias foram sequenciados pela plataforma Illumina.

##### **4.10.3. Processamento e análise dos dados**

Os dados brutos foram fornecidos no formato fastq e a análise de família, filo e gênero em formato txt. Esta foi realizada na plataforma QIIME 2 com banco de dados Silva 138 de sequências de OTUs de comprimento total de 99% (ASV, Chao 1, ACE, Shannon, Simpson, diversidade alfa e beta). As análises de

metabolismo foram geradas com o software PICRUST 2, obtendo-se ao final, relatório com os principais resultados.

Os dados de sequências foram processados e analisados com QIIME [Quantitative Insights Into Microbial Ecology, versão 2022.2.0 ( <https://qiime2.org/> )]. Inicialmente, durante as etapas de demultiplexação e corte, as leituras de baixa qualidade, como leituras até Q30, leituras com comprimento insatisfatório e quimeras, foram removidas com QIIME. As leituras limpas foram utilizadas na definição do ASV (Amplicon Sequence Variant).

Para medir as taxas presentes nas amostras, foi utilizado um modelo preditor da região V4 (sequências de OTUs de comprimento total SILVA 138, 99%). As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram agrupadas por leituras de cluster com 99% de similaridade. A taxonomia foi atribuída às OTUs utilizando a base de dados de referência SILVA 138.

A curva de rarefação foi gerada utilizando a plataforma QIIME. A diversidade alfa foi calculada aplicando diferentes métricas. Os índices de Shannon, Simpson e Fisher foram calculados representando a diversidade de espécies e os índices Chao1 e ACE foram calculados representando a riqueza de espécies.

#### **4.10.4. Previsão da função bacteriana**

O perfil funcional preditivo das comunidades bacterianas foi identificado pelo Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2 (PICRUST2, versão 2.4.2). As OTUs bacterianas exportadas do QIIME2 em formato padrão foram importadas para o PICRUST2. A análise exploratória dos dados genômicos foi realizada em Python (versão 3.7)

#### **4.11. Cálculos e análise estatística**

As variáveis biométricas do sorgo, bem como as relacionadas às análises no vinho, foram submetidas à análise de variância, aplicando o teste F, e as médias comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de significância no software AgroEstat (Barbosa e Maldonado 2011).

Para a digestão anaeróbia, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos para o caldo de sorgo sacarino, correspondentes às fases de operação: partida, fase I, fase II e fase III, e três tratamentos para a vinhaça de sorgo sacarino, relacionados às fases de partida, fase I e II de operação, com repetições no tempo. Os valores obtidos das variáveis monitoradas, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e para a comparação das médias foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando o software Sisvar.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Etanol de sorgo sacarino

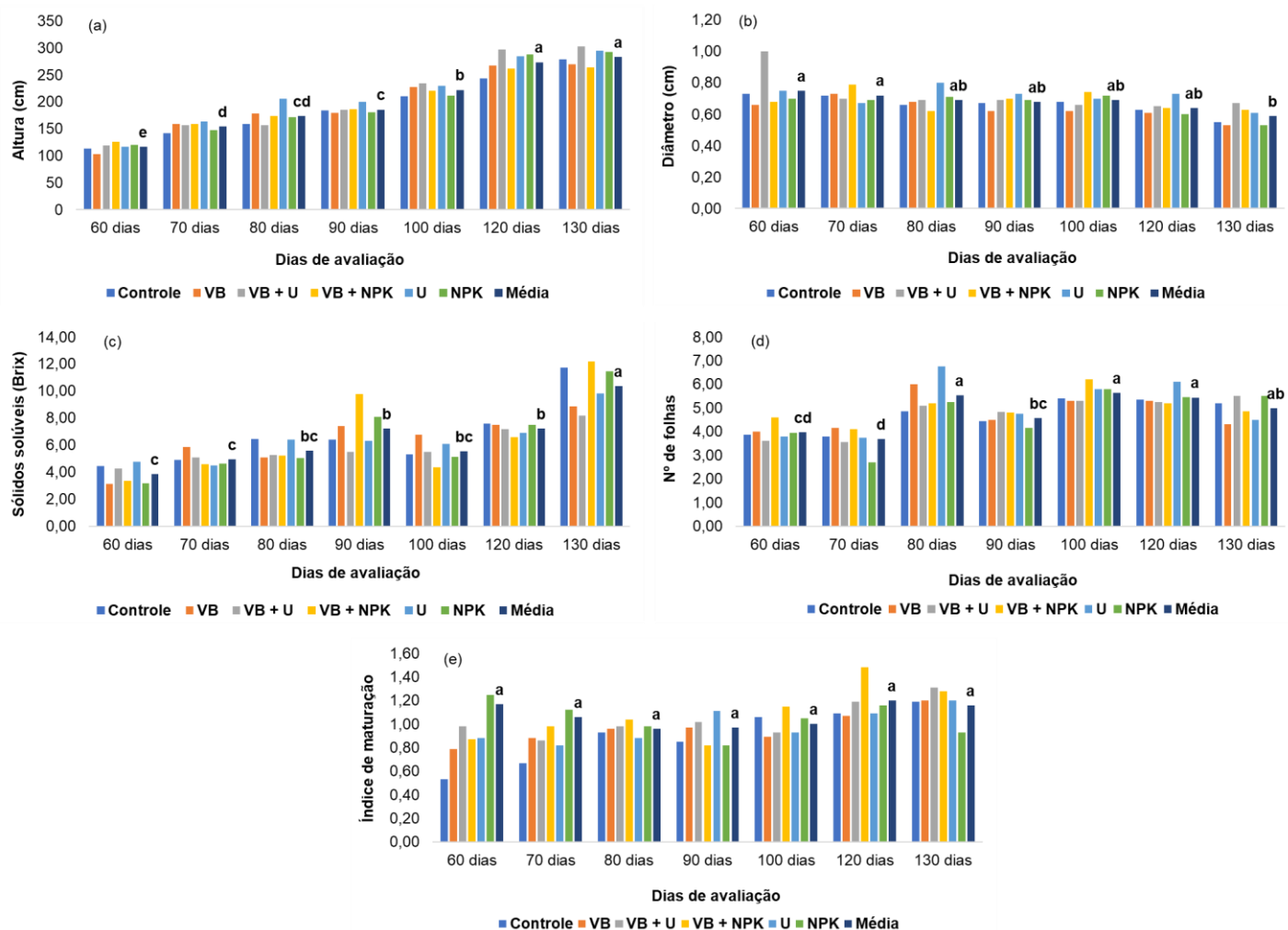
#### 5.1.1. Plantio e manutenção do sorgo sacarino

Para as análises biométricas, não houve diferença significativa em função dos tratamentos de adubação de cobertura, somente entre os períodos de avaliação (Figura 8), exceto para o índice de maturação. A diferença de valor dos sólidos solúveis da base e da ponta do sorgo se revela não poder ser utilizado como é realizado para a cana-de-açúcar, que tem a base da planta com maior teor de carboidratos do que o ponteiro. Para os colmos da cana, valores próximos a um (1) para o índice de maturação indicam que a cultura está madura (Fernandes, 2011). Para a cultivar IPA 467, ainda que os valores de índice de maturação estivessem próximos a 1,6 (Figura 8 e), as plantas não poderiam ser consideradas maduras, pois os valores de sólidos solúveis apresentavam-se consideravelmente baixos.

As alturas médias de plantas variaram de 116,4 cm a 283,63 cm, valores relativamente menores que o esperado para esta cultivar de sorgo sacarino, que varia entre 250 a 350 cm (IPA-Instituto Agrônomo de Pernambuco, s.d.). No entanto, presume-se que a adubação de cobertura promoveria valores de altura próximos a 350 cm, caso não houvessem efeitos fitossanitários adversos.

Durante o plantio do sorgo, bem como todo o ciclo de desenvolvimento da cultura, nenhuma medida de controle fitossanitário foi adotada, devido à escassez e aumento expressivo dos valores de insumos agrícolas no período 2021/2022. Houve ataque de lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus*) na bordadura da cultura, pulgão do sorgo (*Melanaphis sacchari*) e aparecimento de plantas daninhas de forma geral entre todas as parcelas.

A altura desta cultivar de sorgo varia na literatura. Souza Jr. et al. (2019) observaram média de 122 cm no semiárido paraibano após 120 dias de crescimento. De acordo com Brandão et al. (2016), a altura máxima das plantas de sorgo na primeira safra e na rebrota ocorre na época do florescimento, e a partir de então não são observadas alterações significativas até o fim do ciclo.



**Figura 8.** Altura (a), diâmetro (b), sólidos solúveis (c), número de folhas (d) e índice de maturação (e) das plantas de sorgo aos 60, 70, 80, 90, 100, 120 e 130 dias de crescimento. Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

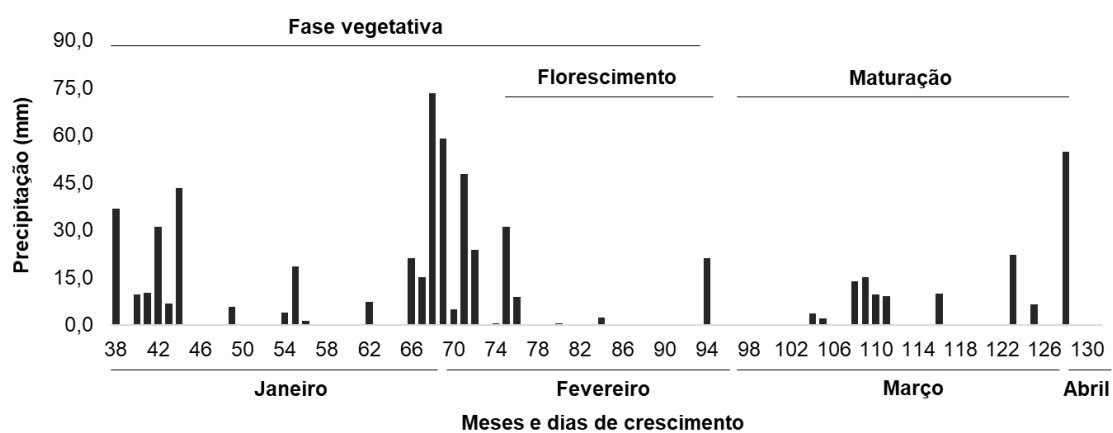
Para o diâmetro do colmo, as médias variaram entre 0,63 e 0,75 cm. Costa et al. (2017), estudando o crescimento e produção da primeira rebrota de cultivares de sorgo sob irrigação, observou valor médio de 1,76 cm para o diâmetro do colmo da cultivar IPA 467, valor significativamente maior que o verificado neste estudo para todos os tratamentos de adubação de cobertura e períodos de avaliação. A incidência de pragas e doenças supracitada pode ter reduzido o diâmetro dos caules. No entanto, não houve incidentes de acamamento ou quebra de plantas. A nutrição adequada da cultura, proporcionada pela boa fertilidade do solo (Tabela 3) e pela fertilização pré-plantio, garantiu boa arquitetura morfológica da planta.

Comportamento semelhante ao das variáveis altura e diâmetro, foi observado para a quantidade de sólidos solúveis e número de folhas nas plantas (Figura 8 c, d). A recomendação para esta cultivar é de 15% de sólidos solúveis (IPA-Instituto Agrônomo de Pernambuco, s.d.), que corresponde ao valor mínimo para seu processamento industrial. No entanto, esta tem apresentado valores menores de teor de sólidos solúveis, a depender das condições e fatores bióticos e abióticos no cultivo.

O conteúdo de sólidos solúveis é variável durante a fase de desenvolvimento da planta. A posição no colmo onde amostras são coletadas, bem como a forma como a análise é conduzida, contribuiu para essa variação (Emygdio et al. 2011). Devido a estes fatores e à complexidade desta variável, são encontradas variações significativamente abrangentes de seus valores na literatura (Tabosa et al. 2010; Silva et al. 2017).

Embora nem sempre diretamente, os teores de sólidos solúveis se correlacionam com o teor de sacarose, glicose e frutose no caldo (Amorim et al. 2011). Idealmente, esses níveis de carboidratos devem ser os mais altos possíveis, uma vez que são utilizados para produção de etanol (Fernandes 2011). Ao longo das avaliações, observou-se que o teor de sólidos solúveis não aumentou, como previsto, até os 130 dias pós-plantio, apresentando valor médio de 12%. O índice de maturação, no entanto encontrava-se elevado (próximo a 1,6), enquanto a cultura permanecia em pleno florescimento e formação das panículas. Diante disso, com o risco iminente de secagem dos colmos e comprometimento do volume de caldo a ser extraído, procedeu-se com a realização da colheita.

A hipótese apontada para o atraso da elevação dos sólidos solúveis foi a precipitação em maior volume na fase de maturação da cultura. Assim, quando se previa o aumento dos sólidos solúveis, houve prolongamento do período vegetativo (Figura 9). Gutjahr et al. (2013) afirmam que o sorgo sacarino inicia o seu processo de acúmulo de açúcar no colmo após o florescimento, encerrando assim o seu período vegetativo, no qual ocorre a acumulação de massa verde. Para a cultivar IPA 467, o florescimento ocorre entre 75 e 95 dias de crescimento (IPA-Instituto Agrônômico de Pernambuco, s.d.).



**Figura 9.** Precipitação (mm) média diária de janeiro a abril de 2022 em Jaboticabal, São Paulo.

A precipitação média foi de 168,56 mm, superior à do ano anterior (114,9 mm) (EMC/UNESP, 2022). Por apresentar metabolismo fotossintético C4, o sorgo sacarino exibe características específicas, que conferem à cultura melhor adaptação e tolerância à seca e ao calor, com temperatura ótima para crescimento entre 33 e 34 °C (Fornasier Filho e Fornasier 2009). Condições diferentes das observadas durante a condução da cultura, em que a temperatura média variou entre 23,4 °C e 25,4 °C (EMC/UNESP, 2022). Desta forma, entende-se que, os fatores supracitados podem justificar a ausência de efeito significativo observada para as variáveis biométricas.

O número de folhas variou entre 4,7 e 5,06 na cultivar, com aumento desta variável ao longo das últimas avaliações, no entanto, ainda abaixo dos valores esperados, devido aos efeitos bióticos (pragas) e abióticos (incidência excessiva de chuva durante a maturação) durante o crescimento da cultura, o que pode ter contribuído, em parte, para os valores baixos de sólidos solúveis encontrados no

caldo. Este parâmetro é relevante, pois o desenvolvimento e a produtividade da cultura são promovidos pela fotossíntese, e, em geral, o número de folhas, e a área foliar são proporcionais à taxa fotossintética efetuada pela planta (Bilhalva et al., 2016).

Considerando as características do efluente utilizado (Tabela 4), infere-se que, para os tratamentos correspondentes à sua utilização (VB, VB+U e VB+NPK), a ausência de diferença significativa nas variáveis biométricas (Figura 6), está possivelmente relacionada, dentre outros aspectos, à elevada disponibilidade de nutrientes, oferecida pela boa fertilidade do solo (Tabela 3) evidenciada, dentre outros aspectos pela elevada saturação por bases, de 83% e pH de 6,5. As vantagens da fertilização com vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida para as culturas energéticas são ainda pouco conhecidas, sendo necessário, portanto, estabelecer condições ótimas de aplicação, assim como existem para o uso da vinhaça in natura.

Na vinhaça biodigerida utilizada neste estudo, a forma predominante de nitrogênio encontrada é o amoniacal ( $332,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Nunes 2022). Segundo estudos, os íons de amônio são a forma predominante de nitrogênio absorvido pelas plantas, principalmente em condições de estresse, revelando suas vantagens na nutrição vegetal e desenvolvimento (Magalhães e Fernandes, 1990; Bredemeier e Mundstock, 2000).

Ainda, considerando os teores de NPK da vinhaça biodigerida, esta pode ser utilizada para a fertirrigação ao invés da vinhaça in natura, com a vantagem de mais fácil manuseio devido ao pH neutro (Xavier 2012). Porém, a aplicação dessa fonte orgânica de adubação deve ser controlada em dosagens, de acordo com as características de cada solo em que será empregada, uma vez que, a quantidade de componentes químicos não é estável e pode ser facilmente lixiviado.

### **5.1.2. Produção de etanol**

O caldo de sorgo para a produção de etanol constituiu uma amostra composta dos caldos das plantas submetidas a cada tratamento de adubação

de cobertura e proveniente das repetições de campo, não havendo análises estatísticas para preparo de caldo e mosto.

A Tabela 6 apresenta o pH do caldo da cultivar IPA 467, cujos valores variaram entre 4,53 e 5,52 para Controle e para o tratamento com NPK, respectivamente, mantendo-se na faixa favorável para o processo fermentativo na produção de etanol, bem como para o crescimento das leveduras (Ripoli e Ripoli, 2009). Processos fermentativos ocorrem entre 4,5 e 5,0 levando a melhores rendimentos de etanol devido à redução da contaminação bacteriana e diminuição da produção de glicerol (Ribeiro et al. 2022) . Por essa razão, o pH é considerado parâmetro crucial para a qualidade do caldo extraído. Portanto, durante a padronização do mosto , o pH do caldo de todos os tratamentos foi ajustado para 4,5.

**Tabela 6.** Valores médios de pH e sólidos solúveis do caldo, acidez total e açúcares redutores totais (ART) do mosto.

| Tratamentos | Caldo |       | Mosto                                                      |         |
|-------------|-------|-------|------------------------------------------------------------|---------|
|             | pH    | Brix  | Acidez (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> ) | ART (%) |
| Controle    | 4,53  | 10,60 | 1,76                                                       | 10,22   |
| VB          | 5,10  | 12,30 | 1,37                                                       | 10,22   |
| VB + U      | 4,94  | 12,20 | 1,86                                                       | 10,24   |
| VB + NPK    | 4,86  | 11,00 | 1,67                                                       | 10,22   |
| U           | 4,67  | 11,20 | 0,88                                                       | 10,19   |
| NPK         | 5,52  | 11,00 | 1,27                                                       | 10,34   |
| Médias      | 4,85  | 11,3  | 1,47                                                       | 10,24   |

Neste estudo, foram observados valores de sólidos solúveis para o caldo extraído em torno de 12% para todos os tratamentos (Figura 6), inferiores ao recomendado de 15%, conforme discutido anteriormente. O volume de caldo obtido por colmo aos 131 dias após o plantio foi de 0,43 L, valor inferior ao das cultivares típicas de cana-de-açúcar, que rendem cerca de 1,0 L por colmo, apontando que, a baixa quantidade de caldo, pode impossibilitar a produção econômica de etanol com esta cultivar.

No Brasil, usinas sucroenergéticas foram construídas sem sucesso utilizando sorgo para produção de etanol. Uma razão para tal fato pode ser a baixa quantidade de caldo extraído desta cultura. Embora o caldo de sorgo possua sólidos altamente solúveis e açúcares fermentáveis, que possibilitam a

continuidade da produção de etanol na entressafra da cana-de-açúcar, este difere do caldo da cana-de-açúcar na quantidade e, por exemplo, na acidez.

De acordo com a Tabela 6, a acidez do caldo de sorgo foi maior que a do caldo de cana-de-açúcar, mesmo no pH padrão de 4,5. Contudo, a quantidade foi consistente com a relatada por Ferreira et al. (2021), que relataram valores entre 1,42 e 1,57 g/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bisio e Bulanti (2012) e Masson et al. (2015), no entanto, observaram maiores níveis de acidez para o caldo de sorgo sacarino, de aproximadamente 1,69 e 1,71 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ , respectivamente.

Níveis elevados de acidez do caldo podem representar fator prejudicial, dificultando a fermentação da levedura (Basso et al. 2008) e reduzindo o rendimento de etanol. Segundo Ripoli e Ripoli (2009), este parâmetro, para a cultura de cana-de-açúcar, constitui em indicativo de sua qualidade e deve exibir valores inferiores a 0,8 g  $\text{L}^{-1}$ . Isto indica, por sua vez que, em termos de acidez, o caldo do sorgo sacarino não se assemelha ao da cana de açúcar.

Em se tratando dos teores de açúcares redutores totais (ART), os valores observados neste estudo foram pouco variáveis para os tratamentos em questão (Tabela 6). O valor médio de ART observado (10,24%) aproxima-se aos relatados por Almodares e Hadi (2009), variando de 12 a 17%. Schaffert e Parrella (2012) afirmaram que, para a produção econômica e sustentável de etanol a partir do sorgo sacarino, é necessário, no mínimo, 12,5% de ART, e este valor é utilizado para se estabelecer o PUI (Período Útil de Industrialização), que compreende o período em que a cultivar pode permanecer no campo, mantendo a produtividade e a qualidade em níveis ótimos.

No entanto, neste estudo, observou-se eficiência fermentativa significativa, ainda que os valores de ART tenham se apresentado abaixo do ideal. Segundo Souza (2016), o PUI do sorgo sacarino é variável entre genótipos, tendo em consideração a curva de acumulação dos açúcares, podendo, portanto, determinar genótipos que apresentem maior ou menor potencial de processamento. Além disso este também varia em função do manejo e do local.

Apesar do baixo rendimento em termos de volume de caldo extraído da cultivar e da acidez do mosto, observou-se diferença significativa entre as estirpes de levedura, e, embora ambas tenham possivelmente sido impactadas pela acidez elevada do mosto, ao final do processo fermentativo, FT 858 exibiu

melhor viabilidade e desempenho em termos de teor alcoólico e rendimento de fermentação (Tabela 7), comparada ao fermento prensado, apresentando diferença significativa também para os tratamentos de adubação de cobertura.

A utilização da vinhaça biodigerida manteve a viabilidade final da levedura selecionada FT 858 (Tabela 7). As plantas submetidas à adubação de cobertura proporcionaram condições favoráveis à levedura industrial. A viabilidade celular é essencial para o processo de fermentação. Nas indústrias brasileiras, as leveduras passam por tratamento para reduzir a carga bacteriana e são utilizadas em novas fermentações (Varize et al. 2022). Cada reutilização é denominada ciclo de fermentação, e uma maior viabilidade torna o processo mais econômico com a reutilização destas leveduras (Della-Bianca et al. 2013).

Segundo Martins et al. (2017), o processo fermentativo propicia ambiente adverso e diferente da condição fisiológica ideal para as leveduras. Neste, agentes físico-químicos estressores se alternam e estimulam respostas celulares adaptativas para conservar a integridade celular. Esses fatores podem justificar a diferença significativa de viabilidade entre as leveduras utilizadas neste estudo. O fermento prensado é utilizado para variados processos fermentativos, com menor especificidade, tendendo, portanto, a ser sensível aos inibidores provenientes do sorgo, implicando, assim, na capacidade fermentativa limitada (Shima 2009). A levedura industrial, por sua vez, suporta a produção de etanol em condições adversas, dentre outras razões, por apresentar mecanismos de resposta a estas condições, se adaptando, devido a capacidade de ajuste do metabolismo para evitar a perda de viabilidade celular (Zhao 2009).

A linhagem FT 858 é utilizada na produção industrial de etanol e possui, dentre outras características, elevado rendimento fermentativo, resistência a baixo pH, tolerância a alto teor alcoólico, elevada viabilidade durante ciclos fermentativos, baixa formação de espuma e velocidade de fermentação, com baixo açúcar residual no vinho (Amorim 2013).

Por outro lado, Mueller et al. (2019) ao avaliarem o etanol como agente estressor, verificaram que, a levedura de panificação Fleischmann® exibiu maior nível de dano ao DNA, evidenciando maior sensibilidade à ação genotóxica, ao contrário da levedura selecionada, que se apresentou mais resistente, portanto, com menor dano. O que por sua vez, reafirma a efetividade da utilização de leveduras selecionadas na produção de etanol.

**Tabela 7.** Análise de variância para viabilidade celular, teor alcoólico e eficiência de fermentação (%) no processo fermentativo da variedade IPA 467 de sorgo sacarino com a levedura FT 858 e fermento prensado.

| Tratamentos | Viabilidade celular (%) |                   | Teor alcoólico (%) |                   | Eficiência de fermentação (%) |                   |
|-------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
|             | FT 858                  | Fermento prensado | FT 858             | Fermento prensado | FT 858                        | Fermento prensado |
| Controle    | 70,93 Bb                | 70,82 Ba          | 3,97 Bc            | 3,70 Ba           | 60,02 Bc                      | 55,94 Bb          |
| VB          | 81,13 Aab               | 70,78 Ba          | 5,36 Aab           | 3,57 Ba           | 80,93 Aab                     | 53,90 Bb          |
| VB+U        | 80,74 Aab               | 70,46 Ba          | 5,08 Aab           | 3,79 Ba           | 76,55 Aab                     | 57,19 Bb          |
| VB+NPK      | 80,38 Aab               | 72,19 Ba          | 4,95 Aabc          | 3,82 Ba           | 74,74 Aabc                    | 57,68 Bb          |
| U           | 80,31 Aab               | 72,97 Ba          | 4,31 Bbc           | 3,71 Ba           | 62,27 Bbc                     | 55,98 Bb          |
| NPK         | 84,22 Aa                | 71,35 Ba          | 5,53 Aa            | 3,38 Ba           | 82,60 Aa                      | 50,44 Bb          |
| CV          | 6,84                    |                   | 11,67              |                   | 11,65                         |                   |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A fermentação realizada resultou em vinho com teor alcoólico significativamente maior para a levedura FT 858 em comparação a levedura prensada (Tabela 7). Os tratamentos com adubos de cobertura nitrogenados com apenas vinhaça biodigerida, vinhaça biodigerida e ureia, e NPK apresentaram maior produção de etanol e eficiência fermentativa em 25,9%, 21,8% e 28,2 %, respectivamente para os dois parâmetros, em relação ao tratamento controle.

A vinhaça biodigerida apresentou o mesmo desempenho do adubo mineral na adubação de cobertura, com potencial para substituí-lo, em relação à produção de etanol. Para a recomendação, os estudos devem ser realizados e aprofundados para confirmação dessa hipótese e de verificação de outros parâmetros de avaliação da qualidade da fermentação e do vinho, além das utilizadas neste estudo.

As leveduras utilizam vários compostos de nitrogênio, como amônia, aminoácidos e peptídeos (Cooper 1992). Amônia, glutamato, glutamina, e asparagina induzir melhorou crescimento e são preferencialmente usado por microrganismos (Magasanik 1992). Este comportamento possivelmente explica o melhor desempenho da cepa FT 858 para os tratamentos de cobertura à base de nitrogênio.

Os resultados médios de teor alcoólico observados neste estudo utilizando a levedura selecionada FT 858, corroboram Ribeiro Filho et al. (2008), que obtiveram 5,9% de etanol a partir do processamento de sorgo. Nos estudos

de Santos et al. (2018) utilizando a mesma estirpe na fermentação de caldo de cana-de-açúcar e de sorgo sacarino, foi evidenciado que a levedura apresentou maior teor alcoólico no caldo de cana-de-açúcar, em comparação ao caldo sorgo, sendo estes de 7,5% e 7,0%, respectivamente, porém com tempo de fermentação e concentração de ART maiores.

Mueller et al. (2019), no entanto, observaram produção mais eficiente de etanol de caldo de sorgo pela estirpe FT 858, com acúmulo de 9,6%, contra 7,5%, utilizando levedura de panificação Fleischmann®. Amorim et al. (2009) afirmam que, leveduras selecionadas quando avaliadas em condições similares às etapas dos processos industriais, apresentaram ganhos de rendimento de 3% sobre as leveduras prensadas.

Em termos de eficiência fermentativa, houve efeito significativo na levedura FT 858 (Tabela 7), que foi 75% superior ao fermento prensado. Em estudo de fermentação usando *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858) em caldo de três genótipos de sorgo sacarino, Davila-Gomez et al. (2011), observaram elevada eficiência fermentativa, variando de 79,99% a 86,09%.

Estes resultados se aproximam dos observados no presente estudo. E, sobretudo, no que diz respeito ao uso da vinhaça biodigerida somente ou combinada, infere-se que a disponibilidade de nitrogênio, principalmente amoniacal, presente neste afluente, pode ter potencializado o desempenho da levedura selecionada FT 858, fazendo com que os resultados de fermentação fossem semelhantes ao uso dos adubos minerais somente. Sabe-se que compostos nitrogenados são necessários para a síntese estrutural e enzimática de proteínas no metabolismo da levedura (Taylor e Boyd 1986), melhorando o desempenho da fermentação.

O crescimento da levedura requer a absorção de nitrogênio para sintetizar as proteínas da célula e outros componentes nitrogenados. No entanto, estes microrganismos podem utilizar apenas materiais nitrogenados de baixo peso molecular, como íons de amônio inorgânicos, uréia, aminoácidos e pequenos peptídeos (Jiranek et al., 1995; Han e Liu, 2010).

A adubação de cobertura é uma prática recomendada para a maioria das culturas e pode ser melhorada com vinhaça biodigerida. Embora não se tenha observado efeito significativo deste procedimento agrícola no crescimento do sorgo, este foi determinante para a produção de etanol e a qualidade do

processo de fermentação. Houve melhora notável no desempenho da levedura selecionada quando a adubação nitrogenada em cobertura foi aplicada às plantas de sorgo.

Encontrar novas formas de aproveitamento dos resíduos processados é essencial para o meio ambiente. A produção de biogás a partir da vinhaça não é novidade no setor sucroenergético brasileiro, essa prática reduz os efeitos nocivos do uso da vinhaça *in natura* na fertirrigação, como a contaminação de lençóis freáticos e salinização do solo. No entanto, faltam estudos sobre destinos de efluentes da produção de biogás.

A vinhaça biodigerida deve ser aplicada como agente de cobertura em culturas sacarinas para potencializar a produção na indústria de etanol. Entretanto, mais estudos são desejáveis para compreender os benefícios desta prática utilizando concentrações variadas do efluente e em outras culturas e com mais ciclos fermentativos. Há uma oportunidade de melhorar a ciclagem de nutrientes nas biorrefinarias com a produção de energia limpa a partir de etanol e biogás.

## **5.2. Biogás de sorgo sacarino**

### **5.2.1. COV, pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal**

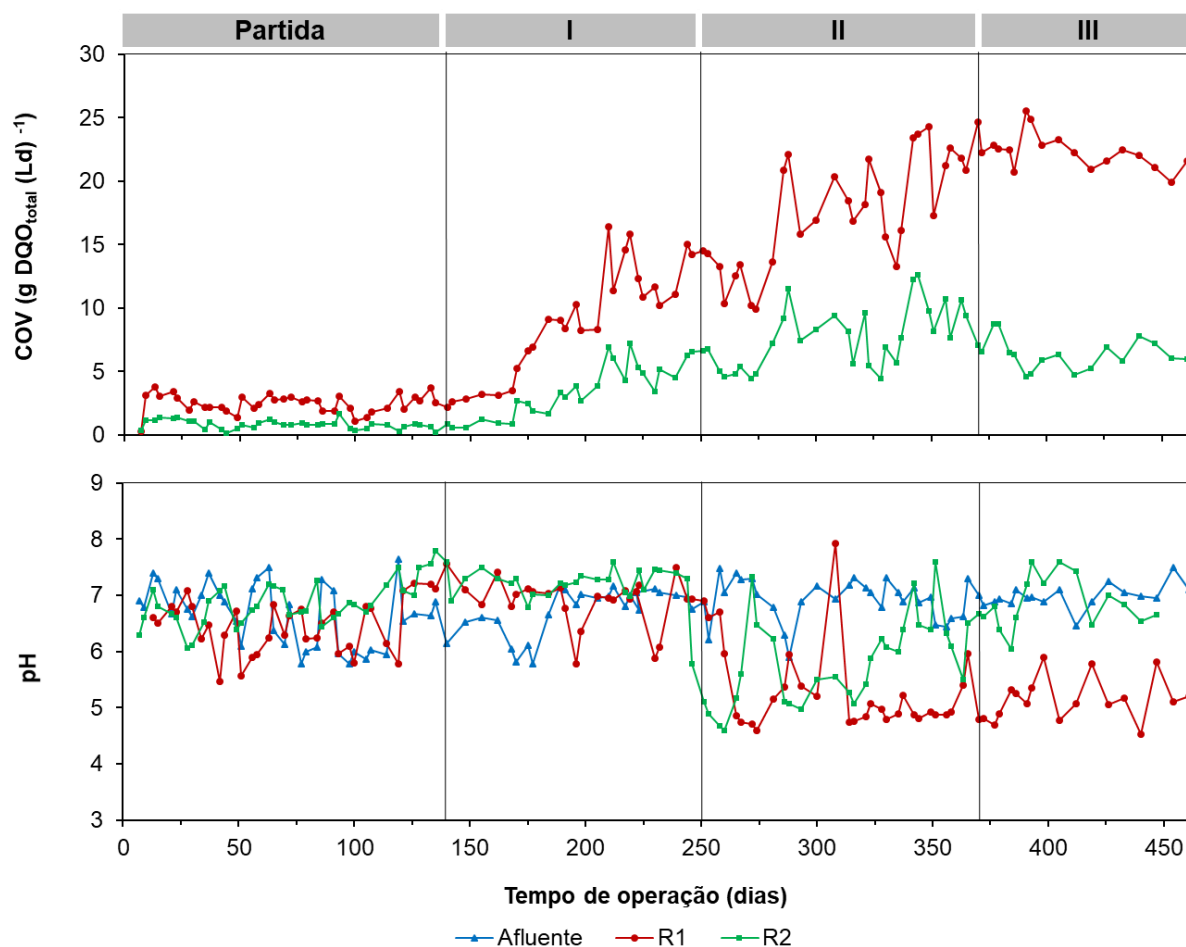
Durante a digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, foram aplicadas diferentes COVs ao sistema (Figura 10). Ao longo dos 462 dias de operação, divididos em partida, fases I, II e III, os valores médios de COV aplicados foram crescentes de 2,5; 9,2; 17,8 e 22,3 g DQO (L d)<sup>-1</sup>, respectivamente, no reator UASB R1 (Tabela 8).

Ao iniciar o experimento com COV baixa, seguido de aumentos progressivos, objetivou-se adaptar o inóculo utilizado para o tratamento do caldo de sorgo sacarino, bem como prevenir sobrecarga e consequente distúrbio do sistema, uma vez que ainda não há precedentes de digestão anaeróbia deste tipo substrato em reatores UASB. De acordo com Arantes et al. (2017), na digestão anaeróbia, cada tipo de inóculo apresenta condições distintas que

favorecem a produção de biogás, sendo, portanto, fator importante no tratamento de diferentes substratos.

Em virtude do baixo valor de pH, característico do substrato, foi feita correção do pH do afluente até aproximadamente 7,0, utilizando para tal bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) como alcalinizante e fonte de N. Por isso, durante as quatro fases de operação do sistema de digestão anaeróbia, os valores de pH no afluente se mantiveram entre 6,6 e 7,0, (Tabela 8) dentro da faixa considerada ideal para o desenvolvimento das arqueas metanogênicas, segundo Chernicharo, (2016). A recirculação parcial e total do efluente do reator UASB R2 em momentos específicos também foi fundamental para manutenção destes valores.

Alguns substratos, assim como o caldo de sorgo, podem apresentar caracteristicamente baixos valores de pH e elevadas concentrações de ácidos voláteis totais (AVT), nesse sentido, para manter o pH próximo à neutralidade, bem como preservar a biomassa microbiana, algumas substâncias alcalinizantes têm sido utilizadas, como por exemplo, bicarbonato, que é produto final da metanogênese (Barros; Duda; Oliveira, 2016; Doll; Foresti, 2010).



**Figura 10.** Carga orgânica volumétrica (COV) dos reatores UASB R1 e R2 e pH do afluente e efluentes dos reatores UASB R1 e R2 no tratamento do caldo de sorgo.

As concentrações de alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP) e alcalinidade intermediária (AI) sofreram intensa variação nas diferentes fases operacionais (Figura 11). Observou-se diferença expressiva especialmente da partida para a fase I, com o início da recirculação parcial do efluente do reator UASB R2, que conseguiu manter o efeito de tamponamento no sistema. Nestas fases os valores médios de AT para R1 variaram entre 386,2 mg L<sup>-1</sup> e 1193,9 mg L<sup>-1</sup> e 423,3 mg L<sup>-1</sup> e 1593,3 mg L<sup>-1</sup> para R2. Já os valores de AP variaram entre 196,6 mg L<sup>-1</sup> e 579,9 mg L<sup>-1</sup> para R1 e entre 284,1 mg L<sup>-1</sup> e 1171,7 mg L<sup>-1</sup> para R2, entres as duas primeiras fases. Enquanto os valores de AI variaram de 189,6 mg L<sup>-1</sup> a 613,9 mg L<sup>-1</sup> no R1 e de 139,2 mg L<sup>-1</sup> a 421,6 mg L<sup>-1</sup> no R2 (Tabela 8). Nas fases seguintes, sobretudo na fase II, os valores de alcalinidade parcial apresentaram-se mais baixos, com o aumento considerável da COV. De acordo

com Scherer et al. (2009), isso acontece facilmente no sistema de digestão por falta de capacidade tampão do substrato, uma vez que as culturas energéticas em geral, são substratos com baixa alcalinidade devido à alta relação C/N.

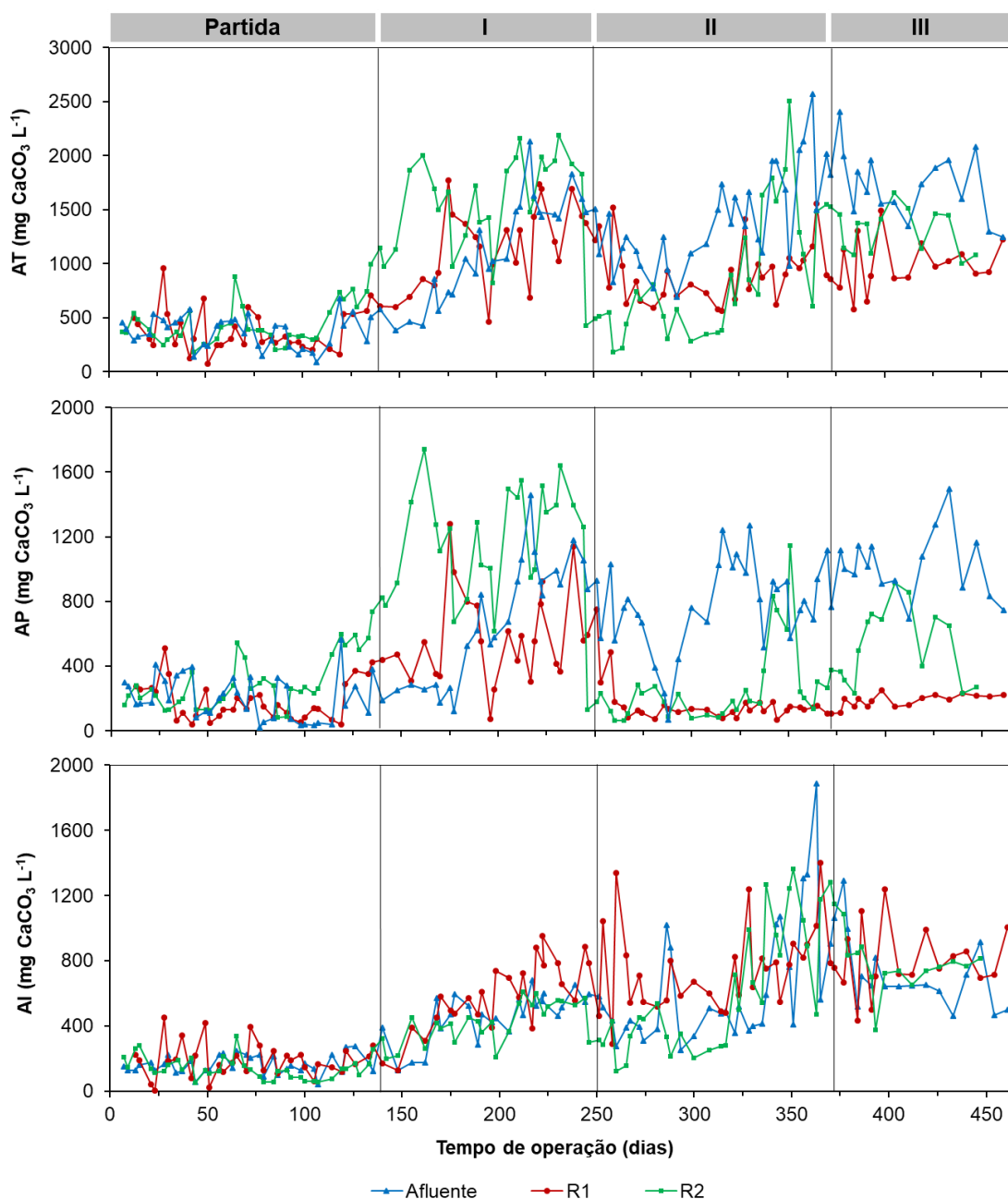
Observada a diminuição progressiva da alcalinidade parcial, nesta mesma fase de operação (Figura 11), houve necessidade de diminuição e por vezes, retirada estratégica da recirculação do efluente, em momentos específicos, como medida de controle e tentativa de restabelecimento da estabilidade do sistema. Na fase III, constatou-se indicativos de recuperação, com aplicação de biochar do bagaço de sorgo sacarino como alcalinizante. Este, foi capaz de aumentar a capacidade de tamponamento do sistema anaeróbio, denotando, dentre outros aspectos, sua capacidade de promover a transferência direta de elétrons entre espécies, como material condutor (Chiappero et al., 2020).

Ma et al. (2020), constataram que a adição de biochar de casca de arroz na digestão anaeróbia de sorgo sacarino, aumentou significativamente a alcalinidade do sistema e manteve a variação do pH próxima da faixa neutra, mesmo sob condições de alta carga orgânica. Neste mesmo sentido, Wang et al. (2017), também observaram aumento da alcalinidade a partir do uso de biochar de vermicomposto na digestão anaeróbia de resíduos alimentares e esterco de galinha e atribuem este comportamento à presença de metais alcalinos (Na, K) e metais alcalino-terrosos (Ca, Mg) no biochar, além dos grupos funcionais ácidos básicos presentes na estrutura do material, que podem desempenhar um papel importante na capacidade tampão (Yang et al., 2015 e Cao e Harris, 2010).

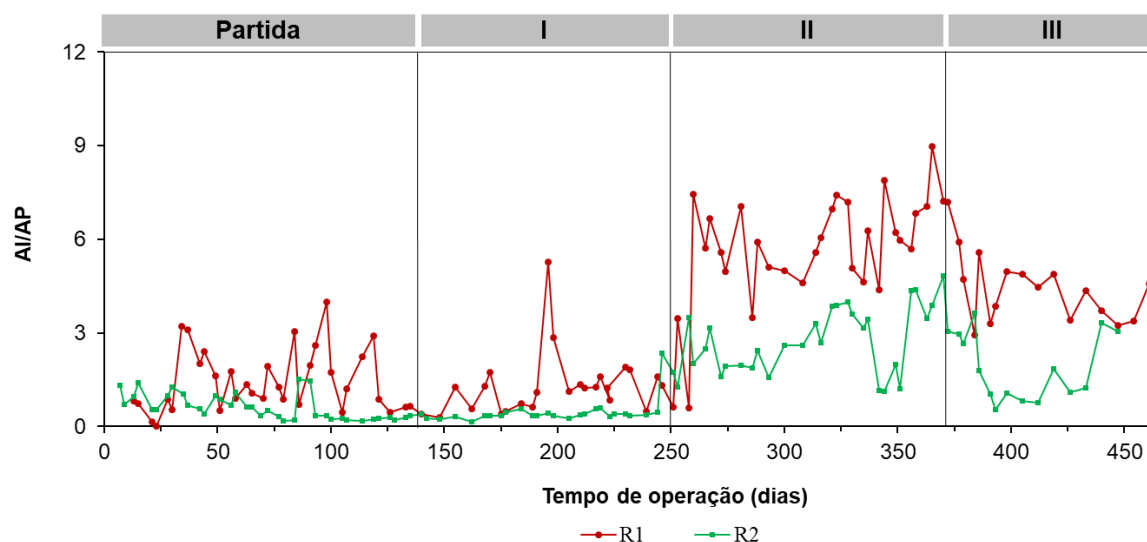
**Tabela 8.** Valores médios e coeficientes de variação (c.v.) do pH, alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes durante a operação do sistema composto pelos reatores UASB em série (R1 e R2) no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

| Parâmetros                               |                 | Fases   |           |           |           | CV (%) | Teste F |
|------------------------------------------|-----------------|---------|-----------|-----------|-----------|--------|---------|
|                                          |                 | Partida | I         | II        | III       |        |         |
| <b>Tempo de operação (dias)</b>          |                 | 1 - 138 | 139 - 250 | 251 - 370 | 371 - 462 |        |         |
| <b>COV-R1 (g DQO (L d)<sup>-1</sup>)</b> |                 | 2,5     | 9,2       | 17,8      | 22,3      |        |         |
| <b>COV-R2 (g DQO (L d)<sup>-1</sup>)</b> |                 | 0,8     | 3,6       | 7,7       | 8,8       |        |         |
| <b>pH</b>                                | <b>Afluente</b> | 6,6 a   | 6,7 a     | 6,9 a     | 7,0 a     | 6,6    | 2,7**   |
|                                          | <b>R1</b>       | 6,5 a   | 6,8 a     | 5,1 b     | 5,2 b     | 8,6    | 87,7**  |
|                                          | <b>R2</b>       | 6,8 b   | 7,2 a     | 5,8 c     | 6,8 b     | 8,5    | 47,4**  |
| <b>AT (mg L<sup>-1</sup>)</b>            | <b>Afluente</b> | 369,2 d | 1154,1 c  | 1407,9 b  | 1733,9 a  | 59,5   | 83,1**  |
|                                          | <b>R1</b>       | 386,2 c | 1193,9 a  | 890,4 b   | 1044,2 ab | 50,9   | 32,9**  |
|                                          | <b>R2</b>       | 423,3 d | 1593,3 a  | 818,9 c   | 1342,0 b  | 62,9   | 68,9**  |
| <b>AP (mg L<sup>-1</sup>)</b>            | <b>Afluente</b> | 205,7 c | 686,4 b   | 773,8 b   | 1010,0 a  | 65,1   | 63,4**  |
|                                          | <b>R1</b>       | 196,6 b | 579,9 a   | 126,2 b   | 198,2 b   | 88,5   | 22,6**  |
|                                          | <b>R2</b>       | 284,1 c | 1171,7 a  | 259,0 c   | 498,3 b   | 84,7   | 100,2** |
| <b>AI (mg L<sup>-1</sup>)</b>            | <b>Afluente</b> | 163,6 c | 467,7 b   | 634,1 a   | 723,8 a   | 70,4   | 37,7**  |
|                                          | <b>R1</b>       | 189,6 c | 613,9 b   | 764,2 ab  | 845,9 a   | 59,3   | 54,9**  |
|                                          | <b>R2</b>       | 139,2 c | 421,6 b   | 559,9 b   | 843,8 a   | 75,4   | 46,4**  |

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



**Figura 11.** Alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento de caldo de sorgo sacarino



**Figura 12.** Relação Alcalinidade parcial/Alcalinidade intermediária (Al/AP) nos efluentes dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento de caldo de sorgo sacarino.

A relação entre alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial (Al/AP) representa um importante fator indicador da estabilidade do processo de digestão anaeróbia. Segundo Ripley et al. (1986), valores de Al/AP inferiores a 0,3 são considerados ideais para a digestão anaeróbia no tratamento de esgoto doméstico. No entanto, Foresti (1994) afirma que a estabilidade do processo de digestão anaeróbia pode ser mantida mesmo com valores de Al/AP superiores a 0,3. Isso foi observado neste estudo, em que os valores médios da relação Al/AP variaram de 1,4 a 6,1 para o reator R1 e de 0,4 a 2,6 para o reator R2 ao longo das fases de operação (Tabela 9, Figura 12), como resultado do aumento gradual das COVs.

Os valores médios de Al/AP mais críticos foram observados na fase II, sendo estes de 6,1 e 2,61 para R1 e R2, respectivamente (Figura 12). Este aumento é atribuído a COV aplicada, que foi em média o dobro da fase I. Após sinais de instabilidade, como a redução expressiva da alcalinidade parcial, optou-se pela recirculação parcial, seguida da suspensão desta prática, o que resultou na atenuação da relação Al/AP na fase seguinte.

O acúmulo de AGV é um fenômeno comum sob alta taxa de carga orgânica durante o processo de digestão anaeróbica. Foi observado o aumento progressivo da concentração de AVT com os acréscimos na COV nas fases de

operação (Tabela 9). Na fase de partida dos reatores, as concentrações de AVT aumentaram de 124,8 a 1223,1 mg L<sup>-1</sup> e se apresentaram pouco variáveis para R1 e R2, cujos valores foram de 288,4 e 219,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 9). O acúmulo de ácidos voláteis totais (AVT) pode ser explicado, segundo Mota et al. (2013), pela insuficiência da população de arqueias metanogênicas ou pela falta de aclimação adequada dessas arqueias às condições impostas, especialmente em função do aumento das COVs.

Na fase I observou-se redução das concentrações de AVT do afluente para o efluente de 69 %. As maiores concentrações foram observadas nas fases II e III (Tabela 9 e Figura 13), significativamente maiores em relação as anteriores. Na fase II, os valores médios dos AVT foram de 1903,8 mg L<sup>-1</sup> e 1605,2 mg L<sup>-1</sup> para R1 e R2, respectivamente. De acordo com Zhang et al. (2015), o excesso de AVT pode ser produzido a partir de substratos facilmente hidrolisáveis.

O caldo de sorgo sacarino, é rico em açúcares simples fermentáveis (Regassa e Wortmann 2014, Appiah-Nkansah et al., 2019), sendo, portanto, facilmente degradados por microrganismos acidogênicos, levando ao acúmulo de AVT. Outro fator que pode ter contribuído para este aumento, pode ser o choque de carga orgânica decorrente do aumento abrupto da COV na fase II, sendo em média o dobro, em relação a fase I, como também observado por Santana Júnior et al. (2019), avaliando o efeito do aumento gradual de COV, no tratamento de vinhaça em reatores anaeróbios horizontais de alta taxa.

O acúmulo de compostos recalcitrantes nos efluentes do sistema, devido à recirculação contínua também pode ter sido outro agravante no acúmulo de AVT, pois possivelmente, parte dos ácidos produzidos que não foram consumidos pelos micro-organismos retornaram ao processo. Nesta fase, iniciou-se a recirculação total do efluente do R2, e quando percebidos os sinais de instabilidade, optou-se pela recirculação parcial do efluente, até que o sistema apresentasse sinais de estabilidade e fosse possível retomá-la em sua totalidade.

Na fase III, os valores médios de AVT para R1 e R2 foram de 1687,6 e 1194,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, que resultaram em pH de 5,2 no R1 (Tabela 8). Em contrapartida, os valores de pH foram mantidos na média de 6,8 para R2, o

que pode ser atribuído ao consumo dos ácidos orgânicos e aumento da AP, que promoveu a neutralização dos ácidos, conforme observado por Quintanilha (2020) (Figura 10).

Os valores médios de AVT/AT nos efluentes, tal como o observado para a relação AI/AP, variaram ao longo das diferentes fases de operação, acompanhando o aumento progressivo da COV (Tabela 9). Os maiores valores foram observados nas fases II e III, sendo estes de 2,2 e 1,67 para R1 e 2,87 e 0,9 para R2, respectivamente, indicando possível desequilíbrio no sistema. Zhao e Viraraghavan (2004), afirmam que valores de AVT/AT acima de 0,8 podem inibir microrganismos metanogênicos, valores entre 0,3 e 0,4 indicam um sistema instável, e entre 0,1 e 0,2 são considerados adequados.

De acordo com Nie et al. (2024), quando as características do substrato, bem como as cargas orgânicas sofrem flutuações, há uma tendência de desequilíbrio do sistema anaeróbio, resultando, por sua vez, em menor taxa de remoção, e conseqüentemente, diminuição da taxa de conversão de matéria orgânica em metano. No entanto, na fase III observou-se redução da relação AVT/AT, sobretudo no efluente do R2, denotando eficiência do sistema de digestão anaeróbia em se recuperar do acúmulo de ácidos graxos voláteis.

Isto foi possível porque estratégias operacionais como redução da recirculação em momento oportuno, na fase anterior, bem como adição de biochar na fase III, foram adotadas nos reatores anaeróbicos, a fim de melhorar a estabilidade operacional, evitando colapso do sistema (Liu et al., 2021d; Romero-Guiza et al., 2016). Ma et al. (2020), ao estudarem o efeito da adição de biochar de casca de arroz na digestão anaeróbia de sorgo sacarino, constataram que este foi capaz de atenuar a diminuição do pH sob condições de alta carga e reduzir a concentração de ácidos graxos voláteis. Em outro estudo, Deng et al. (2022) observaram que o uso de biochar de sabugo de milho alivia o acúmulo de ácidos graxos voláteis, quebrando a barreira termodinâmica do butirato ao acetato, acelerando a degradação do propionato, com consequente melhoria da produção de metano.

Os resultados do estudo conduzido por Shi et al. (2023) sobre a digestão anaeróbia de solução salina nutritiva em reatores AnSBR, também indicaram que a adição de biochar resultou na diminuição das concentrações de ácidos

graxos voláteis como propionato, butirato e valerato. Este efeito atribuído ao biochar foi relacionado aos seus inúmeros grupos funcionais, tais como  $C=O$ ,  $C-O$  e  $O-H$ , presentes em sua superfície (Zhu et al., 2023). Estes, foram identificados como facilitadores na transferência de elétrons provenientes da decomposição dos AGVs para os metanógenos, promovendo assim, a produção de biogás. Efeito também observado neste estudo, em que obteve-se menores valores de AVT e maior produção volumétrica de metano na fase III, comparativamente a fase II sem a adição de biochar (Tabela 9).

O nitrogênio amoniacal (N-am) constitui nutriente inorgânico essencial para a digestão anaeróbia, requerido em maiores concentrações para o crescimento dos microrganismos (Chernicharo, 2016), inferindo-se que, quantidades insuficientes deste elemento podem exigir a sua adição para tornar o efluente tratável, biologicamente (Metcalf e Eddy, 2016). O nitrogênio amoniacal representa o nitrogênio predominantemente na forma de amônia ( $NH_3$ ) e íons amônio ( $NH_4^+$ ), estes são produzidos ao longo da degradação anaeróbica de compostos nitrogenados orgânicos, como proteínas ou aminoácidos (Khanal, 2008), podendo contribuir para o aumento da alcalinidade, tornando-se, portanto, de grande importância para a estabilidade do sistema (Ariunbaatar et al., 2015).

No afluente do sistema de digestão anaeróbia, as concentrações de nitrogênio amoniacal variaram de 86 a 401  $mg\ L^{-1}$  nas diferentes fases de operação. No R1 variaram de 87 a 400  $mg\ L^{-1}$  e para o R2 as variações das concentrações foram de 86 a 412  $mg\ L^{-1}$  (Tabela 9). De acordo com Hejnfelt e Angelidaki (2009), valores de nitrogênio amoniacal entre 1500 a 3000  $mg\ L^{-1}$  podem causar toxicidade em microrganismos metanogênicos, entretanto, os valores verificados neste estudo foram inferiores a esta faixa (Figura 13).

Exceto na partida, para todas as fases observou-se a ocorrência do processo de amonificação, onde a matéria orgânica predominantemente proteica foi convertida em amônia e íon amônio. Na fase III, com a retirada do bicarbonato de amônio, fonte direta de adição de nitrogênio no sistema, constatou-se ligeira diminuição das concentrações de N-am, no entanto, a manutenção da recirculação total do efluente, manteve as médias deste nutriente em faixa favorável à estabilidade dos reatores, com ligeira amonificação. Leite (2019)

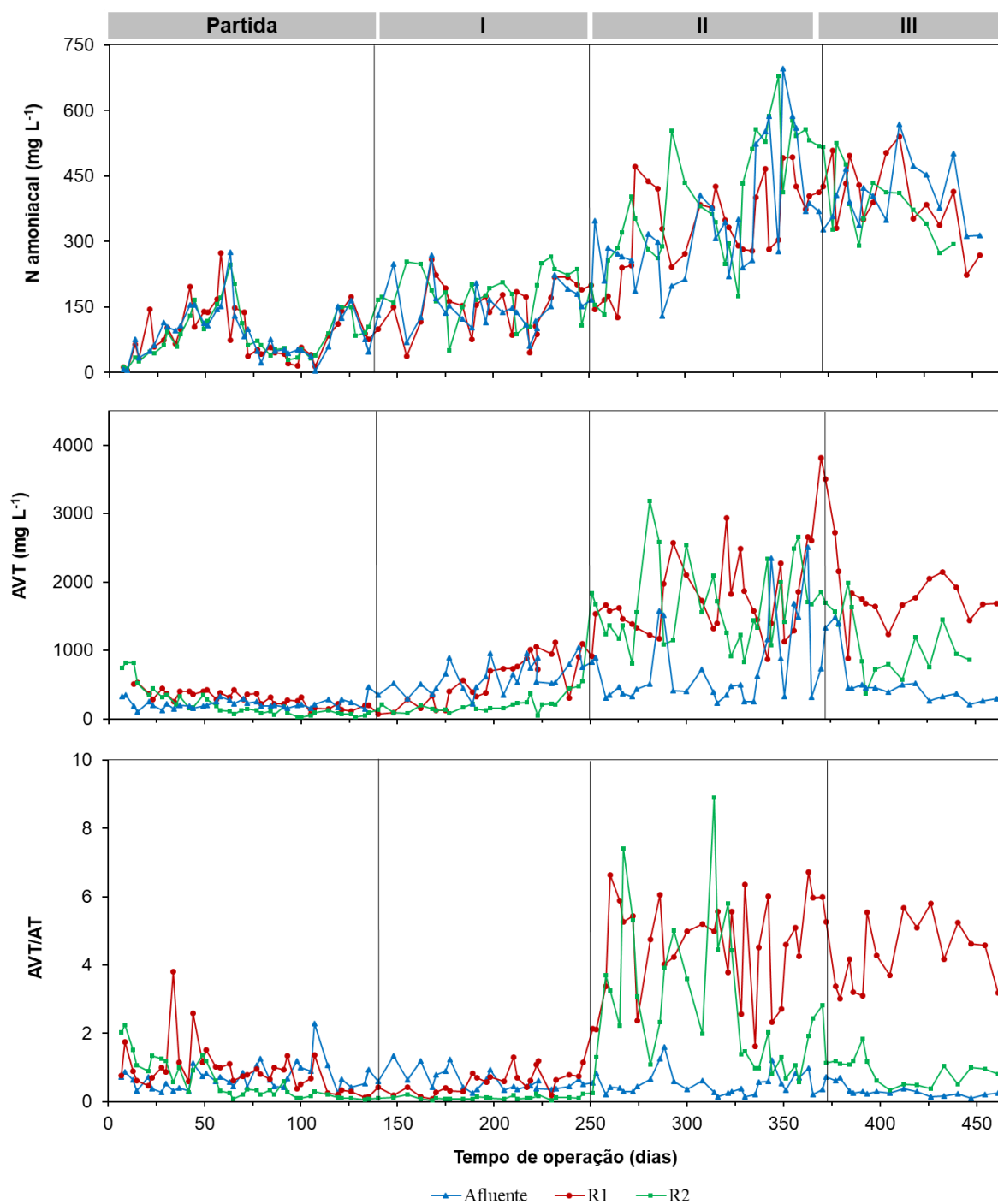
afirma que esse processo é capaz de gerar alcalinidade, aumentando o pH nos reatores, reafirmando, portanto, a importância de fatores operacionais, como a recirculação, e de processos biológicos, como a amonificação, na dinâmica do sistema anaeróbio.

Sousa, (2022) avaliando a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores horizontais de alta taxa, com COVs elevadas em até 27 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, também constatou processo de amonificação do sistema, com valores médios de concentração de nitrogênio amoniacal variando entre 377 mg L<sup>-1</sup> e 420 mg L<sup>-1</sup> do afluente ao efluente, respectivamente.

**Tabela 9.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) do nitrogênio amoniacal (N-am) e ácidos voláteis totais (AVT), no afluente e efluente e relação AVT/AT e AI/AP no efluente do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio de vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros                          |          | Fases   |           |           |           | CV (%) | Teste F |
|-------------------------------------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|--------|---------|
|                                     |          | Partida | I         | II        | III       |        |         |
| Tempo de operação (dias)            |          | 1 - 138 | 139 - 250 | 251 - 370 | 371 - 462 |        |         |
| COV-R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 2,5     | 9,2       | 17,8      | 22,3      |        |         |
| COV-R2 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 0,8     | 3,6       | 7,7       | 8,8       |        |         |
| N-am (mg L <sup>-1</sup> )          | Afluente | 86,8 b  | 149,1 b   | 339,5 a   | 401,7 a   | 70,5   | 73,2**  |
|                                     | R1       | 87,2 c  | 151,7 c   | 327,8 b   | 400,1 a   | 67,2   | 68,9**  |
|                                     | R2       | 86,7 c  | 177,6 b   | 363,4 a   | 412,8 a   | 69,7   | 79,5**  |
| AVT (mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 220,8 b | 609,8 a   | 759,1 a   | 566,9 a   | 84,7   | 9,9**   |
|                                     | R1       | 288,4 c | 699,6 b   | 1903,8 a  | 1687,6 a  | 79,1   | 101,9** |
|                                     | R2       | 219,6 c | 188,9 c   | 1605,2 a  | 1194,5 b  | 100,8  | 84,1**  |
| AVT/AT                              | R1       | 1,00 bc | 0,63 c    | 2,2 a     | 1,67 ab   | 72,31  | 14,8**  |
|                                     | R2       | 0,61 bc | 0,12 c    | 2,87 a    | 0,90 b    | 134,9  | 44,7**  |
| AI/AP                               | R1       | 1,39 c  | 1,41 c    | 6,1 a     | 4,2 b     | 74,5   | 187,5** |
|                                     | R2       | 0,62 b  | 0,37 b    | 2,61 a    | 2,20 a    | 91,4   | 41,0**  |

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



**Figura 13.** Nitrogênio amoniacal, Ácidos voláteis totais (AVT) no afluente e efluentes dos reatores UASB em série R1 e R2 e relação Ácidos voláteis totais/Alcalinidade total (AVT/AT) nos reatores R1 e R2 no tratamento de caldo de sorgo sacarino.

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

Os valores de demanda química de oxigênio total (DQO<sub>total</sub>) do afluente aplicados ao R1 foram crescentes (Tabela 10), consequentemente as COVs também foram elevadas, uma vez que não houve alteração do tempo de detenção hidráulica (TDH) durante todo o experimento (Figura 5). As COVs aplicadas ao R1 (Tabela 10) variaram de 2,5 a 9,2 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> durante o período de partida à fase I. Nas fases II e III, as COVs aplicadas variaram de 17,8 a 22,3 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>. O aumento gradativo das COVs permitiu a adaptação dos microrganismos ao caldo de sorgo sacarino e a estabilidade na remoção de DQO<sub>total</sub>, bem como na produção volumétrica de metano para o sistema (R1+R2) no final das fases I e III, como também observado por Barros et al., (2017) e Santana Júnior et al., (2019) no tratamento anaeróbico da vinhaça de cana-de-açúcar.

De acordo com os resultados obtidos nos efluentes dos reatores, independente da fase de operação, foi observada remoção da DQO total do afluente para o efluente (Tabela 10), demonstrando a estabilização da matéria orgânica promovida pelo sistema anaeróbico composto pelos reatores UASB em série R1 e R2. Os valores médios de DQO total no afluente variaram significativamente ( $p < 0,05$ ) e foram de 1147, 4126, 7997 e 10042 mg L<sup>-1</sup> nas fases partida, I, II e III, respectivamente.

Na partida e fase I, que compreendeu os primeiros 250 dias de operação, os valores de eficiência de remoção de DQO<sub>total</sub> foram superiores a 30 e 50% no R1 e R2, respectivamente (Tabela 10). Após este período, na fase II o desempenho dos reatores foi comprometido, obtendo-se valores significativamente menores de eficiência de remoção de DQO, comparativamente às fases anteriores, sendo estes de 23 e 30 % para R1 e R2, respectivamente, resultando em menor produção volumétrica de metano (PVM) (Tabela 11). Esse comportamento pode ser atribuído ao acúmulo de AVT em ambos os reatores neste período, onde foram observados valores da relação AVT/AT de 2,2 e 2,87 para R1 e R2, respectivamente, sendo, portanto, considerado inibitório para os microrganismos metanogênicos.

A maior eficiência de remoção de DQO total observada para o sistema (R1+R2) foi de 76%, obtida com DQO no afluente, de 1147 mg L<sup>-1</sup> e COV no R1

de 2,5 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, na partida (Tabela 10). Eficiências de remoção de DQO<sub>total</sub> elevadas são comumente observadas em reatores anaeróbios de alta taxa em condições de baixas COVs, e podem ser observadas em outros estudos tratando diversos tipos de águas residuárias (Barros; Duda; Oliveira, 2016; Suárez et al., 2018; Lima, 2022).

Na fase I, o sistema mante-se com eficiência de remoção de DQO elevada, de 72%, ao contrário da fase seguinte (fase II), cujo valor foi significativamente inferior, com 46% de remoção. Nesta fase, a COV foi elevada consideravelmente, sendo aproximadamente sete e duas vezes maior que a da partida e fase I, respectivamente. Neste caso, a ocorrência de menor eficiência de remoção de DQO, pode ser atribuída ao aumento de compostos recalcitrantes, elevando também a DQO<sub>total</sub>, sem, no entanto, contribuir com matéria orgânica viável para consumo microbiano.

Durante a degradação anaeróbia de alguns substratos orgânicos, a maior parte da matéria orgânica é removida, porém, nutrientes e alguns compostos orgânicos recalcitrantes de difícil degradação são acumulados no efluente (Barros et al., 2016; Wilkie et al., 2000), o que, por sua vez, pode ser potencializado pela recirculação contínua do efluente. Ramos e Silva (2020), Quintanilha (2020) e Lima (2022) ao estudarem o tratamento anaeróbio de diferentes substratos, também relataram diminuição da eficiência de remoção de DQO<sub>total</sub> com o aumento da COV.

Na fase III, ambos os estágios apresentaram participação equilibrada na remoção da DQO total, considerando as eficiências de remoção de 30 % no R1 e de 31% no R2, respectivamente (Tabela 10). Com a adição do biochar, foi observado ligeiro aumento da eficiência de remoção de DQO total, variando de 46% na fase II para 51% no sistema de tratamento (R1+R2). Embora não tenham diferenciado estatisticamente entre si, este último resultou em melhores produções volumétrica e específica de metano (Tabela 11).

Vários estudos têm comprovado a eficiência de remoção de DQO com o uso de diferentes tipos de biochar, na digestão anaeróbia de diversos tipos de substrato (Sharma e Melkania, 2017; Wambugu et al., 2019; Cheng et al., 2020). Ngo et al. (2024), no estudo da digestão anaeróbia de esterco de galinha, utilizando biochar de madeira nobre puro e tratado com ácido nítrico e hidróxido de sódio, constataram que a remoção de DQO foi significativamente maior em

todos os reatores com biochar, em comparação com o controle, alcançando remoções de até 80%. Os autores sugerem que o uso de biochar facilitou a utilização mais eficiente da matéria orgânica nos digestores. Seguindo a mesma linha, Song et al. (2024) também verificaram que o uso de biochar de pinha, na digestão anaeróbia de água residuária de licor, favoreceu a remoção de DQO de 7000 mg L<sup>-1</sup> para aproximadamente 300 mg L<sup>-1</sup>, em detrimento do tratamento controle, sem biochar.

Tal efeito pode ser atribuído, dentre outros aspectos, às propriedades eletroquímicas do biochar, com alta capacidade de troca catiônica. Este também possui caracteristicamente grande área superficial e estrutura porosa, que pode aumentar a capacidade de adsorção de substâncias orgânicas presentes no meio (Qiu et al., 2019; Wang et al., 2020b; Chiappero et al., 2020; Kumar et al., 2021).

**Tabela 10.** Valores médios e coeficiente de variação (CV) da carga orgânica volumétrica (COV), DQO<sub>total</sub> no afluente e efluente e eficiência de remoção de DQO<sub>total</sub> durante a operação dos reatores UASB em série R1 e R2 no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

| Parâmetros                                  |          | Fases   |        |        |         | CV (%) | Teste F           |
|---------------------------------------------|----------|---------|--------|--------|---------|--------|-------------------|
|                                             |          | Partida | I      | II     | III     |        |                   |
| COV(g DQO (L d) <sup>-1</sup> )             | R1       | 2,5 d   | 9,2 c  | 17,8 b | 22,3 a  | 73     | 431**             |
|                                             | R2       | 0,8 c   | 3,6 b  | 7,7 a  | 8,8 a   | 79     | 60**              |
| DQO <sub>total</sub> (mg L <sup>-1</sup> )  | Afluente | 1147 d  | 4126 c | 7997 b | 10042 a | 73     | 196**             |
|                                             | R1       | 650 c   | 2887 b | 6154 a | 7015 a  | 79     | 112**             |
|                                             | R2       | 265 c   | 1283 c | 4303 b | 4604 b  | 97     | 71**              |
| DQO <sub>Diss</sub> (mg L <sup>-1</sup> )   | Afluente | 839 c   | 2966 b | 6842 a | 7248 a  | 56     | 110**             |
|                                             | R1       | 421 c   | 1921 b | 4584 a | 4897 a  | 48     | 53**              |
|                                             | R2       | 163 c   | 934 c  | 2711 a | 3003 a  | 32     | 21**              |
| Eficiência de remoção de DQO total (%)      | R1       | 41 a    | 34 ab  | 23 b   | 30 a    | 54     | 7**               |
|                                             | R2       | 61 a    | 56 a   | 30 b   | 31 b    | 43     | 25**              |
|                                             | R1+R2    | 76 a    | 72 a   | 46 b   | 54 b    | 29     | 28**              |
| Eficiência de remoção de DQO dissolvida (%) | R1       | 44 a    | 43 a   | 32 a   | 31 a    | 51     | 2,2 <sup>ns</sup> |
|                                             | R2       | 59 a    | 49 ab  | 38 c   | 35 c    | 44     | 6,2**             |
|                                             | R1+R2    | 79 a    | 72 ab  | 58 c   | 56 c    | 25     | 5,8**             |

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.

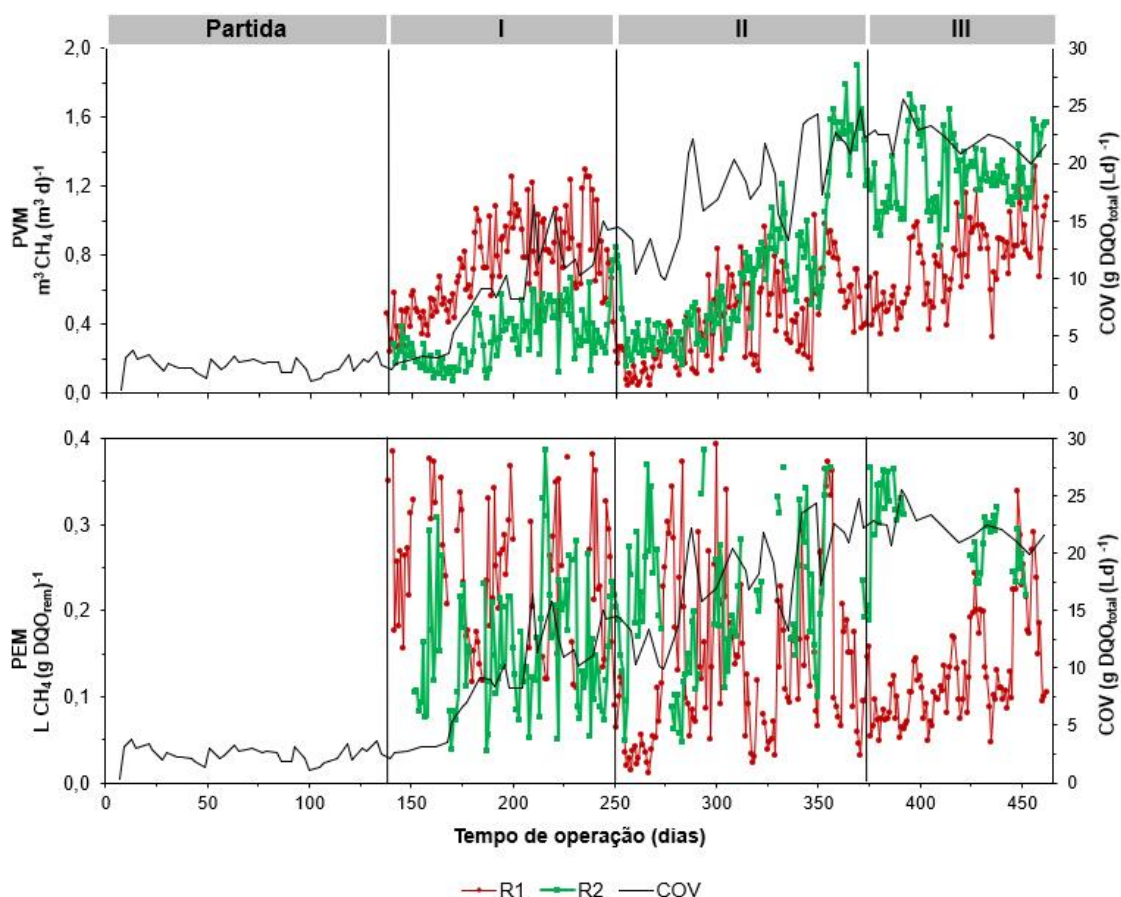
Na tabela 10, também estão descritos os valores médios da demanda química de oxigênio dissolvida (DQO<sub>diss</sub>) e eficiências de remoção obtidas nos afluentes e efluentes dos reatores R1 e R2. A DQO dissolvida é um parâmetro analisado objetivando determinar a presença de compostos orgânicos dissolvidos em amostras de efluentes (Chernicharo, 2016). As concentrações médias verificadas no afluente durante o experimento variaram de 839 a 7248 mg L<sup>-1</sup> da partida a fase III. Assim como observado para a DQO total, foram constatadas reduções da DQO dissolvida do afluente para o efluente do sistema de tratamento (Tabela 10). O sistema composto pelos reatores R1 e R2, apresentou as maiores eficiências de remoção no R1, de 59 e 49% para na partida e fase I, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si.

Chernicharo (2016) afirma que, em sistemas de tratamento de efluentes, é possível que haja remoção de DQO dissolvida através de mecanismos não biológicos, principalmente pela sua incorporação no lodo ou na fração particulada com o efluente. Ainda segundo o mesmo autor, os principais mecanismos que contribuem para essa ocorrência são a precipitação, geralmente desencadeada por mudanças no pH ou pela adição de compostos alcalinos. Esse processo promove a precipitação e sedimentação, levando os compostos a integrarem o lodo ou serem removidos do sistema junto com a DQO afluente. Além disso, ocorre a adsorção, resultado de reações em que a DQO solúvel é absorvida nas superfícies das partículas de biomassa presentes no sistema de tratamento.

A digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino em reatores UASB em série, resultou na produção de biogás em virtude da biodegradação da matéria orgânica. Observou-se que, o aumento progressivo da COV proporcionou maior produção volumétrica de metano (CH<sub>4</sub>) no conjunto R1+R2, cujos valores médios apresentados foram de 0,46, 0,58 e 1,08 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> para as fases I, II, e III, respectivamente (Tabela 10).

Durante a fase de partida, não foi observada produção de biogás (Figura 14) e tal comportamento pode estar associado à baixa COV aplicada, implicando em menor disponibilidade de matéria orgânica a ser degradada pelos microrganismos, e, conseqüentemente, menos substrato para ser convertido em biogás. Além disso, a fase de partida consiste na fase de adaptação gradual dos microrganismos presentes no lodo dos reatores às condições impostas ao

ambiente anaeróbio, até que apresentem condições para reprodução, desenvolvimento e estabilização no sistema.



**Figura 14.** Produção volumétrica de metano (PVM) e carga orgânica volumétrica (COV) dos reatores UASB R1 e R2 instalados em série, durante as fases Partida, I, II e III no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

As maiores produções volumétricas de metano foram observadas na fase III, com valores de 0,75 e 1,28 L CH<sub>4</sub> (L d<sup>-1</sup>), para R1 e R2, respectivamente. Após 250 dias de operação, representando a fase II de operação, a concentração de metano em R1 e R2, bem como a produção específica de metano no sistema (R1+R2), diminuíram em relação ao observado nas demais fases, o que pode ser atribuído ao aumento considerável dos valores médios de AVT/AT neste mesmo período (Tabela 9), fazendo com que o desempenho do sistema (R1+R2) diminuísse significativamente.

De acordo com Ma et al. (2020), o acúmulo de ácidos graxos voláteis indica possível desequilíbrio entre as etapas de hidrólise, acidogênese e metanogênese na digestão anaeróbia, fazendo com

que o processo de metanogênese se torne a etapa limite, sob pressão de alta carga orgânica e acidogênese vigorosa. No entanto, mesmo nestas circunstâncias, neste estudo, a produção volumétrica de metano foi mantida, conforme demonstrado na Tabela 11, impedindo que o sistema apresentasse sinais de colapso. Além disso, a manutenção do uso de bicarbonato de amônio para correção do pH do afluente, juntamente com a redução temporária da recirculação do efluente pela metade, foram identificadas como estratégias essenciais para prevenir a exacerbação de instabilidades no processo.

Os percentuais de metano nos reatores ao longo das fases de operação neste estudo, se apresentaram superiores no R2 (Tabela 11). O percentual médio de metano em R1 variou de 39,1 a 52,7%, enquanto o de R2 variou entre 51,1 e 66,6%, desempenho esperado em função da separação em dois estágios, que favorece a metanogênese no segundo reator. No entanto, este também demonstra que, ainda que predominantemente acidogênico, o reator R1 manteve produção de metano considerável para o sistema.

Os valores médios da produção específica de metano variaram de 0,13 a 0,17 L CH<sub>4</sub> (g DQO removida)<sup>-1</sup> no R1 e de 0,12 a 0,13 L CH<sub>4</sub> (g DQO removida)<sup>-1</sup> no R2 (Tabela 11). De acordo com Oliveira e Foresti (2004), a produção de metano pode ser menor do que a prevista com base em considerações estequiométricas, em virtude das perdas de biogás na coleta e de metano dissolvido na fase líquida, cuja concentração depende da temperatura e da pressão parcial desse gás na fase gasosa. Considerando que, a produção específica de metano máxima teórica obtida na digestão anaeróbia corresponde a 0,35 L de CH<sub>4</sub> por g de DQO removida (MCCARTY, 1964), a alcançada neste estudo, correspondeu a eficiência de até 74% para o sistema R1+R2 na fase III de operação.

Comparativamente ao uso de outros substratos, tais como os resíduos agrícolas convencionais, estudos específicos sobre a produção de biogás a partir do caldo de sorgo sacarino ainda são escassos. Trabalhos neste sentido, em sua maioria, utilizam a biomassa desta cultura como matéria-prima, sendo constatadas variações nos rendimentos de biogás. A exemplo, Matsakas et al. (2014), avaliando a digestão anaeróbia de caules secos de sorgo sacarino submetidos a tratamento enzimático, constataram produção máxima de metano de 296 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SV. Zhang et al. (2016), por sua vez, obtiveram rendimento

de biogás de 413 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SV, na digestão anaeróbia do caule de sorgo sacarino em digestores de garrafa de vidro.

Machado et al. (2023), investigando a produção de biogás a partir da fermentação anaeróbia da biomassa de sorgo sacarino em um biodigestor tipo batelada, constataram produção volumétrica de metano máxima de 0,0003 L CH<sub>4</sub> L d<sup>-1</sup>, expressivamente inferior aos valores observados no presente estudo. Prask et al. (2023), no entanto, utilizando fermentadores de bancada de 1 litro, na codigestão anaeróbia de lodo de esgoto e 5% de caldo de sorgo sacarino, obtiveram percentual de metano de aproximadamente 54%.

Na fase III deste estudo, após inclusão diária do biochar de sorgo sacarino na concentração de 1,33 g L<sup>-1</sup> ao afluente do reator R1, houve incremento de 27% e 34% na produção específica de metano do sistema (R1+R2), comparativamente as fases I e II, respectivamente, corroborando os resultados observado por Xu et al. (2024). Ao empregarem biochar de bagaço de cana-de-açúcar na digestão anaeróbia de resíduos de casca de camarão, em digestores de vidro de 0,5 L, estes autores constataram aumento de aproximadamente 20% na produção de metano e atribuíram este resultado ao consumo de AGV facilitado pelo biochar, bem como ao aumento da comunidade microbiana proporcionado pela estrutura porosa do material.

É fundamental considerar que, a última fase deste estudo ocorreu após o período mais crítico de operação do sistema (fase II), durante o qual os valores de AVT foram significativamente mais altos. No entanto, de acordo com Lee et al. (2022), o rápido e direto fenômeno de transferência de elétrons, facilitado pelo biochar, ajuda a reduzir a energia livre de Gibbs, resultando no rápido consumo de AGV pela comunidade microbiana. Isso, por sua vez, pode ter contribuído para a maior produção específica de metano observada no sistema R1+R2 durante a fase III. Este resultado corrobora o apontado por Deng et al. (2022) em seu estudo, onde observaram que, o uso de biochar de sabugo de milho aliviou o acúmulo de ácidos graxos voláteis na digestão anaeróbia de dejetos de suínos, quebrando a barreira termodinâmica do butirato ao acetato, acelerando a degradação do propionato, com consequente melhoria da produção de metano.

Em estudo recente, Song et al. (2024), demonstraram que a digestão anaeróbia de águas residuais alcoólicas foi significativamente melhorada pela inclusão de biochar de pinha. A utilização da dosagem de 2,5 g/L deste material

demonstrou uma produção cumulativa máxima de metano de 71% em relação ao grupo controle sem biochar. Segundo os autores, o biochar atenuou os efeitos inibitórios dos fatores de influência, aumentou a eficiência da degradação dos compostos orgânicos e promoveu maior abundância relativa de arqueias metanogênicas, tais como *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. Além disso, análises de difração de raios-x (XRD) e de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), indicaram que os compostos e grupos funcionais contendo oxigênio presentes no biochar, podem atuar como tampões e acelerar a transferência de elétrons.

**Tabela 11.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de metano (% metano) no biogás, produção volumétrica (PVM) e específica de metano (PEM) nos reatores UASB R1 e R2 em série no tratamento do caldo de sorgo sacarino.

| Parâmetros                                                                            | Fases     |           |           | CV (%) | Teste F           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|-------------------|
|                                                                                       | I         | II        | III       |        |                   |
| <b>Tempo de operação (dias)</b>                                                       | 139 - 250 | 251 - 370 | 371 - 462 |        |                   |
| COV-R1                                                                                | 9,2       | 17,8      | 22,3      |        |                   |
| COV-R2                                                                                | 3,6       | 7,7       | 8,8       |        |                   |
| <b>Produção volumétrica de metano (L CH<sub>4</sub> (L d<sup>-1</sup>))</b>           |           |           |           |        |                   |
| R1                                                                                    | 0,73 a    | 0,42 b    | 0,75 a    | 47     | 55**              |
| R2                                                                                    | 0,32 c    | 0,67 b    | 1,28 a    | 67     | 339**             |
| R1+R2                                                                                 | 0,46 c    | 0,58 b    | 1,08 a    | 52     | 155**             |
| <b>Concentração de metano no biogás (%)</b>                                           |           |           |           |        |                   |
| R1                                                                                    | 52,7 a    | 39,1 c    | 45,5 b    | 15     | 329**             |
| R2                                                                                    | 66,6 a    | 51,1 c    | 58,6 b    | 13     | 428**             |
| <b>Produção específica de metano (L CH<sub>4</sub> (g DQOremovida) <sup>-1</sup>)</b> |           |           |           |        |                   |
| R1                                                                                    | 0,17 a    | 0,14 ab   | 0,13 c    | 59     | 13,3**            |
| R2                                                                                    | 0,12 a    | 0,13 a    | 0,12 a    | 47     | 0,1 <sup>ns</sup> |
| R1+R2                                                                                 | 0,19 b    | 0,17 b    | 0,26 a    | 45     | 21,4**            |

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

### 5.2.3. Sólidos totais e voláteis do lodo

Os valores de taxa de carregamento orgânico no lodo (TCL) alcançaram valores de até 2,13 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup> no reator UASB R1 e de até 1,35 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup> no R2 (Tabelas 12 e 13). Conforme mencionado por Chernicharo (2016), valores de TCL próximos 2,0 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup> podem ser encontrados, a depender do tipo de afluente a ser tratado, isso implica que os valores observados neste estudo se encontram dentro do limite estabelecido.

Barros et al. (2016), ao avaliarem a digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reatores UASB em série, registraram maiores produções de metano com TCL de até 0,68 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup>. Nunes (2022) também observou maior produção específica de metano com TCL de 0,68 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup> no tratamento de vinhaça em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) submetida ao processo oxidativo avançado Fenton. Em contrapartida, Lima (2022) constatou maior PEM em R1 e R2, operados com TCL de 1,9 e 2,8 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup>, respectivamente, durante a codigestão de vinhaça e lodo de ETA em reatores UASB mesofílicos.

No presente estudo, as maiores produções volumétrica e específica de metano do sistema (R1+R2) foram observadas na fase III, com valores de TCL de 0,6 e 0,41 g DQOtotal g<sup>-1</sup> SV d<sup>-1</sup> para R1 e R2, respectivamente. Isso indica que, neste caso, o TCL não foi um fator limitante para o desempenho do sistema.

Nas Tabela 12 e 13 estão apresentados os valores médios das concentrações de sólidos totais (ST), voláteis (SV), fixos (SF) e a relação entre sólidos voláteis e totais (SV/ST) do lodo dos reatores UASB R1 e R2, obtidos das amostras retiradas nos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4, instalados no comprimento dos reatores, durante as fases II e III do tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

Em ambos os reatores, os valores médios de sólidos totais e voláteis do lodo diminuíram da base (P1) para o topo da manta de lodo (P4). Observou-se que, as concentrações médias dos sólidos totais (ST) do lodo no R1, na partida para a fase III de operação, variaram entre 10,8 a 91,2 mg L<sup>-1</sup> em P1 e de 0,69 a 9,9 mg L<sup>-1</sup> em P4. Enquanto estes valores para o reator UASB R2 ficaram entre

9,6 mg L<sup>-1</sup> e 66,5 mg L<sup>-1</sup> no ponto 1 (P1) e 0,21 e 6,3 no ponto 4 (P4) (Tabelas 12 e 13 e Figura 15).

De maneira geral, os valores de ST e SV variaram entre os pontos de coleta, porém as concentrações mais elevadas foram observadas principalmente nos pontos inferiores de cada reator (Figura 15), em virtude da estratificação proporcionada pela mistura proveniente do fluxo ascendente e da produção de biogás o que denota boa sedimentação do lodo. Quanto aos reatores, no ponto de maior concentração de sólidos (P1), tanto ST, quanto SV se apresentaram maiores no reator R1, em comparação a R2. Este aumento de sólidos no primeiro reator é comportamento esperado, e deve-se, de acordo com Oliveira et al. (2017) e Marques (2017), possivelmente, ao transporte de pequenas partículas contidas na superfície do material orgânico ou devido a lixiviação de açúcares e outros compostos orgânicos presentes no material.

Observou-se, no entanto, que, apesar destas variações de concentração, os valores de ST e SV no lodo dos reatores UASB R1 e R2 aumentaram em decorrência do aumento gradual da COV, da partida para a fase III de operação (Figura 15), evidenciando o crescimento da massa microbiana em ambos os reatores do início ao final da operação do sistema, corroborando com o que é pontuado por Von Sperling (2014), de que todos os processos de tratamento biológico geram lodo, originado pela própria biomassa que cresce em virtude do alimento fornecido pelo afluente do sistema.

Apesar disso, a taxa de acumulação de sólidos é variável de acordo com o tipo de efluente, sendo esta mais elevada quando as concentrações de sólidos suspensos são maiores, especialmente sólidos não biodegradáveis. Além disto, a acumulação de sólidos também está associada à presença de carbonato de cálcio ou de outros precipitados minerais, além da produção de biomassa (Chernicharo et al., 2016). Neste estudo o aumento significativo de sólidos totais no lodo ao longo das fases de operação, também pode estar relacionado aos crescentes valores de nitrogênio amoniacal observados (Tabela 9), já que este constitui nutriente necessário em maiores concentrações para a multiplicação dos microrganismos (Chernicharo, 2016). Além disso, o desenvolvimento do lodo no período operacional, revela a capacidade do sistema de manter uma microbiota adaptada às condições impostas, o que por sua vez, contribui para melhor desempenho e estabilidade dos reatores (Quintanilha, 2020).

As maiores concentrações de sólidos totais e voláteis evidenciadas na fase III (Figura 15) da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, também podem ser atribuídas à adição de biochar do bagaço de sorgo ao sistema. O material inerte possui alta porosidade e grande área superficial (Else et al., 2024), o que possibilita sua atuação como micro habitats para os microrganismos, facilitando, portanto, a colonização e crescimento destes (Figura 18). Estudos recentes constataram que o uso de biochar de variados materiais em reatores anaeróbios, pode aumentar a riqueza e diversidade na comunidade de arqueias e bactérias (Lu et al., 2016; Nie et al., 2023; Sun et al., 2022 ; Wang et al., 2021c ; Zhuang et al., 2020a; Xu et al., 2024).

As razões SV/ST foram superiores a 0,7 nos pontos de coleta de lodo, para o reator UASB R1 (Tabelas 12 e 13). Os menores valores de SV/ST foram observados nos pontos 3 e 4 do reator UASB R2, nas de partida e fase II, respectivamente. Metcalf e Eddy (2016) afirmam que, a relação entre os sólidos voláteis e sólidos totais (SV/ST) avalia a estabilidade do lodo de digestores, portanto, elevadas concentrações de SV/ST evidenciam a predominância de matéria orgânica no lodo, revelando a presença de microrganismos (Oliveira e Duda, 2009) e alta atividade dos mesmos.

De acordo com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 498, para fins de utilização agrícola, para que o lodo de esgoto ou produto derivado deste seja considerado estável, é necessário que a relação entre sólidos voláteis e sólidos totais (SV/ST) seja inferior a 0,70 ( $SV/ST < 0,70$ ), a fim de evitar concentrações de matéria orgânica no solo e atividade microbiana (Villa-Montoya; Ferro; Oliveira, 2016). Observa-se, no entanto que, neste estudo, esta relação se manteve quase sempre acima deste valor, em todos os pontos, reatores e fases de operação. A elevada relação SV/ST do lodo constatada durante o experimento, pode ser atribuída ao TDH aplicado, podendo este ter sido baixo para permitir a estabilização da fração orgânica presente na biomassa. Quando necessário, o descarte de lodo nos reatores pode ser realizado nos pontos onde for verificada estabilidade ( $SV/ST < 0,70$ ). No entanto, não houve descarte de lodo durante o período experimental neste estudo.

**Tabela 12.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), em mg L<sup>-1</sup> e da relação SV/ST nos 4 pontos de coleta de lodo do reator UASB R1 nas fases partida, I, II e III no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

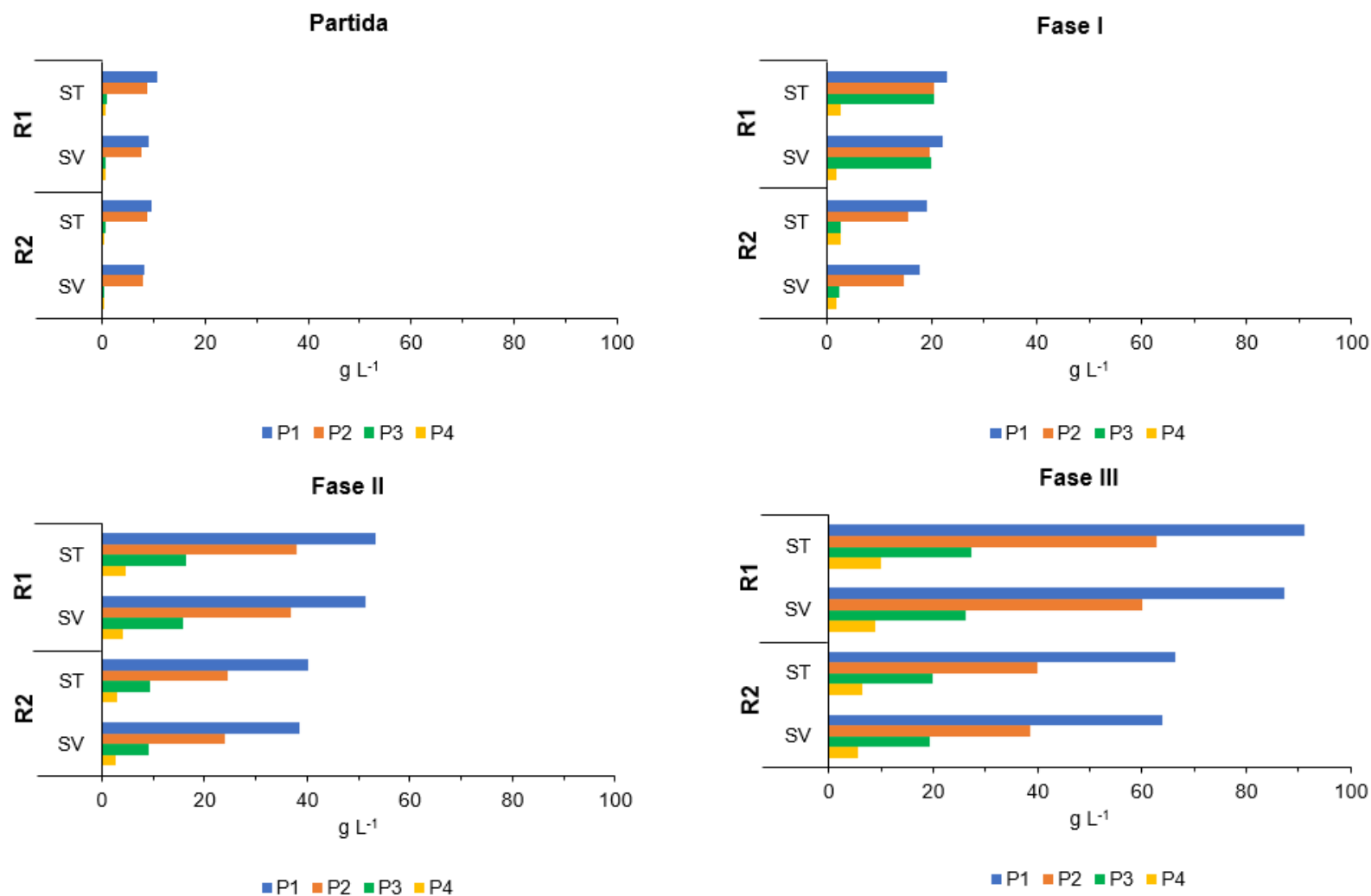
| Parâmetros                                           |       | Fases   |         |        |        | CV (%) | Teste F         |
|------------------------------------------------------|-------|---------|---------|--------|--------|--------|-----------------|
|                                                      |       | Partida | I       | II     | III    |        |                 |
| TCL (g DQOtotal g <sup>-1</sup> SV d <sup>-1</sup> ) |       | 0,87    | 2,13    | 0,83   | 0,60   |        |                 |
| P1                                                   | ST    | 10,8 d  | 20,4 c  | 53,2 b | 91,2 a | 4,5    | 67*             |
|                                                      | SV    | 8,9 d   | 19,5 c  | 51,3 b | 87,2 a | 4,5    | 70*             |
|                                                      | SV/ST | 0,83 b  | 0,96 a  | 0,97 a | 0,96 a | 0,7    | 22*             |
| P2                                                   | ST    | 8,8 d   | 14,5 c  | 37,8 b | 62,9 a | 2,9    | 15*             |
|                                                      | SV    | 7,7 d   | 13,5 c  | 36,9 b | 60,2 a | 3,1    | 13*             |
|                                                      | SV/ST | 0,87 b  | 0,93 a  | 0,98 a | 0,96 a | 1,2    | 33*             |
| P3                                                   | ST    | 0,9 d   | 6,8 c   | 16,4 b | 27,4 a | 8,6    | 21*             |
|                                                      | SV    | 0,7 d   | 6,3 c   | 15,9 b | 26,2 a | 9,4    | 19*             |
|                                                      | SV/ST | 0,8 b   | 0,92 a  | 0,97 a | 0,96 a | 2,0    | 22*             |
| P4                                                   | ST    | 0,69 c  | 2,6 bc  | 4,6 b  | 9,9 a  | 18,2   | 48*             |
|                                                      | SV    | 0,61 c  | 1,93 bc | 4,2 b  | 8,8 a  | 17,9   | 54*             |
|                                                      | SV/ST | 0,88 a  | 0,8 a   | 0,9 a  | 0,9 a  | 12,1   | 1 <sup>ns</sup> |

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

**Tabela 13.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), em g L<sup>-1</sup> e da relação SV/ST nos 4 pontos de coleta de lodo do reator UASB R2 nas fases partida, I, II e III no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

| Parâmetros                                           |       | Fases   |         |        |        | CV (%) | Teste F |
|------------------------------------------------------|-------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|
|                                                      |       | Partida | I       | II     | III    |        |         |
| TCL (g DQOtotal g <sup>-1</sup> SV d <sup>-1</sup> ) |       | 0,45    | 1,35    | 0,47   | 0,41   |        |         |
| P1                                                   | ST    | 9,6 c   | 17,1 c  | 40,2 b | 66,5 a | 6,0    | 32*     |
|                                                      | SV    | 8,2 c   | 15,8 c  | 38,6 b | 64,0 a | 5,8    | 36*     |
|                                                      | SV/ST | 0,86 c  | 0,92 b  | 0,96 a | 0,96 a | 1,0    | 71*     |
| P2                                                   | ST    | 8,7 c   | 11,8 c  | 24,4 b | 39,8 a | 7,8    | 14*     |
|                                                      | SV    | 7,8 c   | 11,0 c  | 24,0 b | 38,7 a | 8,0    | 21*     |
|                                                      | SV/ST | 0,90 b  | 0,92 b  | 0,98 a | 0,97 a | 1,1    | 25*     |
| P3                                                   | ST    | 0,54 c  | 3,4 c   | 9,4 b  | 20 a   | 16,0   | 77*     |
|                                                      | SV    | 0,4 c   | 2,9 c   | 8,9 b  | 19,3 a | 19,0   | 65*     |
|                                                      | SV/ST | 0,7 c   | 0,86 b  | 0,96 a | 0,96 a | 2,2    | 91*     |
| P4                                                   | ST    | 0,21 c  | 1,87 bc | 3,1 b  | 6,3 a  | 22,2   | 33*     |
|                                                      | SV    | 0,16 b  | 1,2 a   | 2,7 a  | 5,5 a  | 28,0   | 24*     |
|                                                      | SV/ST | 0,77 ab | 0,64 b  | 0,89 a | 0,86 a | 4,3    | 21*     |

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



**Figura 15.** Concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) nos 4 pontos de coletas de lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases partida, I, II e III no tratamento anaeróbico do caldo de sorgo sacarino.

#### **5.2.4. Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV)**

Conforme Von Sperling (2016) explica, a unidade de massa de células microbianas é frequentemente expressa em sólidos em suspensão (SS), pois a biomassa é constituída por sólidos que permanecem suspensos em um reator quando há crescimento disperso. No entanto, é importante ressaltar que, parte da massa que compõe os sólidos consiste em uma fração inerte, conhecida como sólidos totais fixos, que não contribui para o desempenho do tratamento biológico de um dado substrato. Desta forma, a biomassa de um reator pode ser caracterizada também pelos sólidos em suspensão voláteis (SSV), que representam a fração orgânica da biomassa. Isso ocorre porque a matéria orgânica é suscetível à volatilização (Von Sperling, 2016).

As concentrações de SST, SSF e SSV do afluente aumentaram gradualmente entre as fases de operação, a medida em que a COV foi elevada. Foram observados valores de SST variando de 79 a 563 mg L<sup>-1</sup> entre a partida e a fase III, enquanto os valores de SSV variaram entre 67 e 472 mg L<sup>-1</sup>, entre as fases de operação do sistema (Tabela 14). Nos efluentes, as maiores concentrações de SST foram observadas no R1, devido à aplicação de menor TDH e maior COV neste reator. Estes valores decresceram para o efluente do reator R2, indicando que houve redução do teor de sólidos suspensos pelo sistema (R1+R2), com eficiência média de remoção de até 67% (Tabela 14).

As concentrações da fração orgânica (SSV) e inorgânica (SSF) dos sólidos totais do afluente do sistema, também reduziram do afluente ao efluente do reator UASB R2. Embora não tenha apresentado diferença significativa entre as fases, observou-se tendência de aumento da eficiência de remoção dos SSF do sistema na fase III de operação, com 55%. A maior eficiência de remoção dos SSV do sistema R1+R2 foi constatada nesta mesma fase, em que houve a inclusão do biochar de sorgo sacarino no afluente do sistema de digestão anaeróbia, com 68% (Tabela 14).

O biochar, composto por biomassa carbonácea, apresenta propriedades físico-químicas favoráveis, como alcalinidade, abundantes grupos funcionais

ricos em oxigênio e alta capacidade de troca catiônica. Essas características lhe conferem elevado valor como adsorvente para o tratamento de águas residuais, permitindo a remoção eficiente de contaminantes orgânicos e inorgânicos (Okiemute et al., 2022), corroborando os resultados observados neste estudo para as remoções de SSF e SSV.

Estudos anteriores, como os de Florio et al. (2020) e Kanjanarong et al. (2017), corroboram a eficácia do biochar na digestão anaeróbia, por meio da sorção de inibidores como  $\text{NH}_3$ , metais pesados, sulfetos e alguns compostos orgânicos. Mecanismos de adsorção, como complexação de superfície, troca iônica e atração eletrostática, têm sido identificados como responsáveis por esse processo (Ambaye et al., 2021; El-Naggar et al., 2022).

Além disso, estudos recentes destacam as excelentes capacidades de adsorção de metais pesados (Dashti et al., 2023; Shaaban e Abid, 2021) e a eficácia na remoção de micro e nanoplásticos em ambientes aquosos por adsorventes à base de biochar (Adeleye et al., 2023). Esses efeitos são atribuídos à estrutura porosa e à grande área superficial do material, que proporcionam amplos sítios ativos para adsorção (Olugbenga et al., 2024).

**Tabela 14.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) das concentrações de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV), em mg L<sup>-1</sup>, no afluente e efluentes dos reatores UASB R1 e R2 e e eficiências de remoção do sistema (%), no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

| Parâmetros                |          | Fases   |        |       |        | CV (%) | Teste F         |
|---------------------------|----------|---------|--------|-------|--------|--------|-----------------|
|                           |          | Partida | I      | II    | III    |        |                 |
| SST (mg L <sup>-1</sup> ) | Afluente | 79 b    | 416 a  | 426 a | 563 a  | 74,0   | 27*             |
|                           | R1       | 51 b    | 256 a  | 239 a | 325 a  | 81,0   | 9*              |
|                           | R2       | 47 b    | 172 ab | 216 a | 192 ab | 85,0   | 4**             |
|                           | R1+R2    | 25 b    | 42 ab  | 43 ab | 67 a   | 81,0   | 3*              |
| SSF (mg L <sup>-1</sup> ) | Afluente | 13 b    | 74 a   | 97 a  | 91 a   | 108,0  | 11*             |
|                           | R1       | 6 b     | 50 a   | 48 ab | 46 ab  | 118,0  | 3*              |
|                           | R2       | 10a     | 29 a   | 35 a  | 31 a   | 81,0   | 1 <sup>ns</sup> |
|                           | R1+R2    | 22 a    | 43 a   | 48 a  | 55 a   | 88,0   | 2 <sup>ns</sup> |
| SSV (mg L <sup>-1</sup> ) | Afluente | 67 c    | 342 ab | 329 b | 472 a  | 81,0   | 21*             |
|                           | R1       | 43 b    | 206 a  | 190 a | 279 a  | 84,0   | 7*              |
|                           | R2       | 37 b    | 142 ab | 181 a | 161ab  | 93,0   | 3*              |
|                           | R1+R2    | 25 b    | 39 ab  | 42 ab | 68 a   | 84,0   | 4*              |

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

### 5.2.5. Diversidade microbiana no inóculo e nos reatores anaeróbios

A avaliação da diversidade microbiana foi realizada no lodo inóculo, antes do início do experimento, bem como no lodo dos reatores UASB, R1 e R2 aos 368 e 462 dias de operação, representando as fases II e III, respectivamente. A determinação do perfil da comunidade microbiana foi conduzida em nível taxonômico de gênero, sendo este o último nível taxonômico identificável. Quando a classificação do microrganismo neste nível não foi possível, o último nível taxonômico (família, ordem, classe, filo) disponível foi utilizado para tal.

A análise do lodo inóculo evidenciou maior diversidade de microrganismos do domínio Bacteria, em detrimento do domínio Archaea. Dos filos bacterianos, observou-se maior proporção de Bacteroidota e Firmicutes, representados pelo gênero *DMER64* e *Fastidiosipila* (Tabela 15). O primeiro gênero foi identificado como o grupo de potenciais bactérias sintróficas que podem estabelecer transferência direta de elétrons com metanógenos (Lee et al., 2019), enquanto o gênero *Fastidiosipila* é composto por bactérias responsáveis pela fermentação de carbono e geração de acetato e hidrogênio (Zhang et al., 2018), podendo acelerar a etapa de hidrólise dos compostos orgânicos complexos, promovendo, portanto, a produção de ácidos graxos voláteis (Li et al., 2022).

As arqueias do lodo inóculo foram predominantemente representadas pelo filo Halobacterota, com 93% de abundância relativa (Figura 16 B e Tabela 15) e ocorrência expressiva do gênero *Methanosaeta* (Figura 17 B e Tabela 15), diretamente ligado a etapa de degradação metanogênica (Sampaio, 2022; Dengler et al., 2022), cuja abundância relativa foi de 89%. A presença significativa destes microrganismos metanogênicos pode ser atribuída ao fato do lodo inóculo utilizado ser proveniente de reatores UASB operados na codigestão de vinhaça e torta de filtro por Barros et al. (2017), em que foi alcançada produção específica de metano considerável, de até 3,39 L CH<sub>4</sub> (Ld<sup>-1</sup>).

No lodo dos reatores UASB, R1 e R2, o domínio Bacteria exibiu maior abundância em relação ao Domínio Archaea, e destes, conjuntamente, foram identificados 23 diferentes filos. Entre os filos de arqueias, 91% (R1) e 84,7% (R2) e mais de 80% (R1) e 70% (R2) pertenciam ao filo Euryarchaeota, nas

amostras analisadas na fase II e III, respectivamente (Figura 16 B). Do Domínio Bacteria, nas mesmas fases, mais de 49% (R1) e 38% (R2) e 39% (R1) e 22% (R2) pertenciam ao filo Bacteroidota, seguido de Firmicutes, Actinobacteriota e Chloroflexi (Figura 16 A).

Martínez et al. (2020) também relataram maior abundância dos filos Firmicutes, Bacteroidota e Euryarchaeota em reatores anaeróbios tratando diferentes substratos, tais como resíduos de cervejaria, de farinha de milho, esterco animal e sedimento estuarino.

De modo geral, as abundâncias dos filos mais recorrentes, diminuíram do reator UASB (R1) para o (R2). Bacteroidota esteve presente em 52,6% (R1) e 40,1% (R2) e 40,6% (R1) e 27,1% (R2) nas fases II e III, respectivamente. Enquanto o filo Firmicutes ocorreu 22,7% (R1) e 21,7% (R2) e 18,4% (R1) e 15,95% (R2), nas mesmas fases (Tabela 16). A degradação da biomassa lignocelulósica eventualmente remanescente no caldo do sorgo sacarino, pode ser considerada uma etapa limitante durante a digestão anaeróbia e o conhecimento a respeito da comunidade microbiana envolvida nesse processo é fundamental para aprimorar o desempenho do sistema de tratamento nas condições impostas. Neste sentido, a maior ocorrência de bactérias hidrolíticas no primeiro reator (R1), é justificável, uma vez que ambos os filos citados são conhecidos pela versatilidade em degradar compostos orgânicos complexos (Garcia-Peña et al., 2011; Kadnikov et al., 2013; Kougias et al., 2018), bem como proteínas e lipídios (Yao et al., 2019).

Os filos Bacteroidota e Firmicutes estão reconhecidamente envolvidos na degradação da biomassa vegetal (De Francisci et al., 2015; Luo et al., 2015), e participam da fermentação de aminoácidos que resultam na produção de acetato para posteriormente serem utilizados pelas metanogênicas acetoclásticas (Okabe et al., 2007). Apesar de passar por processo de peneiramento antes do preparo do afluente, é provável que pequenas partículas de bagaço remanescente do caldo entrem no reator. Portanto, a presença desses filos, indica que microrganismos capazes de degradar compostos complexos estavam presentes na digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, contribuindo para a estabilidade do sistema e produção de metano. Fonseca et al. (2021) também observaram a presença de representantes do filo Firmicutes como fermentador de resíduo lignocelulósico.

O filo Firmicutes observado neste estudo foi o mais diversificado, representado pelas classes Negativicutes, Clostridia, Bacilli e Syntrophomonadia, com maior abundância da primeira. A Classe Negativicutes, assim como a ordem Veillonellales-Selenomonadales foram mais abundantes em R1, em ambas as fases analisadas, representando 10,6% e 13,27% do total de microrganismos nas fases II e III, respectivamente, enquanto no R2 foi de 8,2% e 3,4% nas mesmas fases (Tabela 16).

Esses microrganismos são capazes de produzir AGV e pequenas quantidades de H<sub>2</sub> usando frutose ou glicose como substratos (Vos et al., 2009), açúcares predominantemente presentes no caldo de sorgo sacarino, cuja composição, de acordo com Ahmad Dar et al. (2018), varia entre 43 e 58% de açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) e 22,6–47,8% de açúcares insolúveis (celulose e hemiceluloses), podendo, além destes, outros tais como arabinose, galactose, manose, sorbose e xilose também estarem presentes (Yuvraj et al., 2013). A presença desses microrganismos valida ainda, portanto, as maiores concentrações de ácidos voláteis totais observadas especificamente nas fases II e III. Tal como neste estudo, Eng et al. (2022), também observaram a ocorrência dominante de membros da ordem Veillonellales-Selenomonadales em experimento altamente produtor de AGV.

Do filo Actinobacteriota, nota-se expressivo aumento do gênero *Olsenella* nas amostras de lodo de R1 e R2 na fase III, com 23,3% e 18,0%, respectivamente (Tabela 16). Este gênero caracteristicamente produz anaerobicamente ácido láctico, etanol e ácido acético usando carboidratos e proteínas como substratos (Feng et al., 2018). O que por sua vez, pode justificar a maior abundância deste gênero na fase em questão, uma vez que, trata-se da fase em que as maiores COVs foram aplicadas e valores ainda elevados de AVT foram observados.

Apesar de reduzida abundância, o gênero *Flexilinea*, pertencente ao filo Chloroflexi e a classe Anaerolineae, também foi identificado nas amostras de lodo dos reatores anaeróbios nas fases II e III, com maior abundância evidenciada no R2 da fase III (Tabela 17 e Figura 17 A). Embora o papel desta classe bacteriana ainda necessite de investigação, devido à escassez de isolados, sabe-se que a maioria das espécies pertencentes a ela apresentam

metabolismo fermentativo, contribuindo para a degradação de carboidratos em condições anaeróbicas (Sun et al., 2016; Zhang et al., 2024), sendo responsáveis por fermentarem glicose, tendo como produtos finais AVT e hidrogênio (Yamada et al., 2006). Juntamente com o filo Firmicutes, Chloroflexi foi encontrado em processos de digestão anaeróbica de resíduos alimentares em temperaturas tanto mesófilas, quanto termofílicas (Wang et al., 2018).

A classe Anaerolineae apresentou aumento expressivo no sistema de digestão de lodo no estudos de Xia et al. (2016) e Zhao et al. (2018a). Nos estudos de Zhang et al. (2024), utilizando lixiviado de biochar de madeira de pinus na digestão anaeróbia de lodo de fábrica de papel, a presença desta foi novamente verificada. Os autores constataram que, apesar de nem sempre serem estáveis no sistema anaeróbio, haviam associações sintróficas entre a classe Anaerolineae e os organismos metanogênicos hidrogenotróficos, onde os produtos fermentativos ( $H_2$  por exemplo) podiam ser utilizados por estes últimos, o que corrobora com a maior produção volumétrica de metano produzida pelo reator R2 na fase III (Tabela 11).

Conforme observado na Figura 16 A e B, houve dominância da comunidade bacteriana sobre as arqueias, e esta, por sua vez, pode ser explicada pela alta taxa de crescimento e da elevada versatilidade metabólica desses primeiros microrganismos (Botello-Suárez et al., 2018). O filo Euryarchaeota foi o mais abundante nos reatores, com 91% (R1) e 84,7% (R2) e 80,2% (R1) e 72,69% (R2), nas fases II e III, respectivamente. Os demais filis encontrados consistiram em Halobacterota e Thermoplasmata, com abundâncias relativas expressivamente menores.

Os gêneros *Methanobacterium* e *Methanosaeta* dominaram a comunidade metanogênica, apresentando maiores abundâncias relativas (Figura 17B), denotando que as vias de produção de metano inevitavelmente eram a metanogênese hidrogenotrófica e acetoclástica. Juntamente com os gêneros supracitados, *Methanosarcinas* também foram observadas, sendo, portanto, as abundâncias relativas destes três principais gêneros de: 91,05, 5,34 e 2,75% no R1 e de 84,7; 11,62, e 3,4% no R2 na fase II, 80,2, 15,21 e 3,03% no R1 e de 72,69, 20,55 e 4,63% em R2, na fase III (Tabela 16). Os gêneros *Candidatus Methanofastidiosum*, *Methanocella* e *Methanomassiliicoccus*

também foram observados, no entanto, com abundâncias relativas consideravelmente inferiores aos demais (Tabela 16).

A família *Methanobacteriaceae*, a qual pertence o gênero *Methanobacterium*, de maior incidência nos reatores em ambas as fases, é constituída por representantes metanogênicos hidrogenotróficos, sendo assim, sua abundância está relacionada à concentração de hidrogênio nos reatores, uma vez que estes microrganismos podem utilizar  $H_2$  e  $CO_2$  como substratos para crescimento e produção de metano (Kern et al., 2015; Su et al., 2019). Com base na alta abundância de *Methanobacterium*, pode-se inferir que sob condições moderadas de cargas orgânicas volumétricas, a digestão do caldo de sorgo sacarino favorece processos hidrogenotróficos em detrimento da metanogênese acetoclástica. Isto, por sua vez, enfatiza a importância de equilibrar a comunidade microbiana no sistema de digestão anaeróbica para otimizar a produção de metano e reduzir o teor de matéria orgânica no efluente tratado.

O gênero *Methanosaeta* é conhecido por sua capacidade de utilizar ácido acético, ao mesmo tempo que exibe resistência significativa a altas concentrações deste (Vikromvarasiri et al., 2023), sendo capaz de sintetizar  $CH_4$  a partir de acetato (Hattori, 2008).

No filo Halobacterota, os gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* apresentaram maior abundância relativa (Tabela 16). *Methanosaeta* tem sido relatado como possuidor de maior afinidade de substrato para acetato do que outros gêneros e é considerado um metanógeno acetotrófico obrigatório (Ferraro et al., 2018, Lim et al., 2013), produzindo metano e dióxido de carbono como subprodutos (Kong et al., 2018). O gênero *Methanosarcina*, no entanto, é mais versátil e pode metabolizar tanto hidrogênio quanto acetato como fonte de energia (Kong et al., 2018).

Os gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* constituem os mais comumente encontrados em faixas mesofílicas de temperatura, faixa em que os reatores foram operados neste estudo. O que reforça a importância da manutenção da temperatura uniforme e adequada dentro dos reatores, para evitar o desequilíbrio entre as populações microbianas e consequentemente, no processo de digestão como um todo, pois este em si, também pode ser suscetível a mudanças bruscas de tal condição (Chernicharo, 2016).

*Methanomassiliicoccus* foi o gênero observado em menor abundância, encontrado somente na fase III da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, com 0,10% em R1 e 0,58% em R2 (Tabela 16 e Figura 17 B). De acordo com Becker et al. 2016), esse gênero está relacionado com a produção de metano via metanol, metilamina e hidrogênio como doadores de elétrons. Acetato, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CO, metanol e metilaminas compõem entre outras, as principais fontes de carbono utilizados pelos microrganismos metanogênicos (Angelidaki et al., 2011).

Ainda em se tratando do filo Archaea, observou-se que, exceto para *Methanobacterium*, a abundância relativa dos demais gêneros, sobretudo de *Methanosaeta*, foi maior na fase III, tanto no R1, quanto no R2 (Figura 17 B), denotando, entre outros aspectos que, a presença do biochar, pode ter sido capaz de garantir nicho para colonização e crescimento dos microrganismos, conforme observado na Figura 18.

De acordo com Nie et al. (2024), o biochar pode alterar a comunidade microbiana, bem como as vias metabólicas da digestão anaeróbia. Diversos estudos têm constatado que seu uso, de variados materiais, em reatores anaeróbios, pode aumentar a riqueza e diversidade na comunidade de arqueias e bactérias (Sun et al., 2022 ; Wang et al., 2021c ; Zhuang et al., 2020a), bem como aumentar a atividade de microrganismos sob condições adversas (Yan et al., 2022).

Lu et al. (2016) investigaram o uso de biochar de madeiras frutíferas para mitigar o estresse combinado de amônio e ácido e analisaram a distribuição taxonômica de arqueias em diferentes estágios da digestão anaeróbia, constatando aumento nas populações de *Methanosarcina*, *Methanosaeta* e, em menor quantidade, *Methanoculleus* nos tratamentos com biochar. Esses microrganismos colonizaram as regiões mais porosas internas e a superfície das partículas de biochar na fase posterior da digestão anaeróbia, um padrão corroborado pelos resultados deste estudo, conforme demonstrado nas Figuras 5 e 12, que representam o biochar antes e depois da digestão anaeróbia.

Shao et al. (2019), também constataram o enriquecimento de *Methanosarcina* e *Methanosaeta* a partir do uso de biochar de madeira em reatores anaeróbios de escala laboratorial, submetidos a estresse de voltagem externa, corroborando os resultados de Lü et al. (2016) e Luo et al.

(2015). Os autores afirmam ainda que, as razões para o efeito positivo do biochar na digestão anaeróbica incluem a lixiviação de minerais para tamponamento, a adsorção de compostos inibitórios, e sobretudo, apoio à colonização microbiana e enriquecimento de microrganismos funcionais .

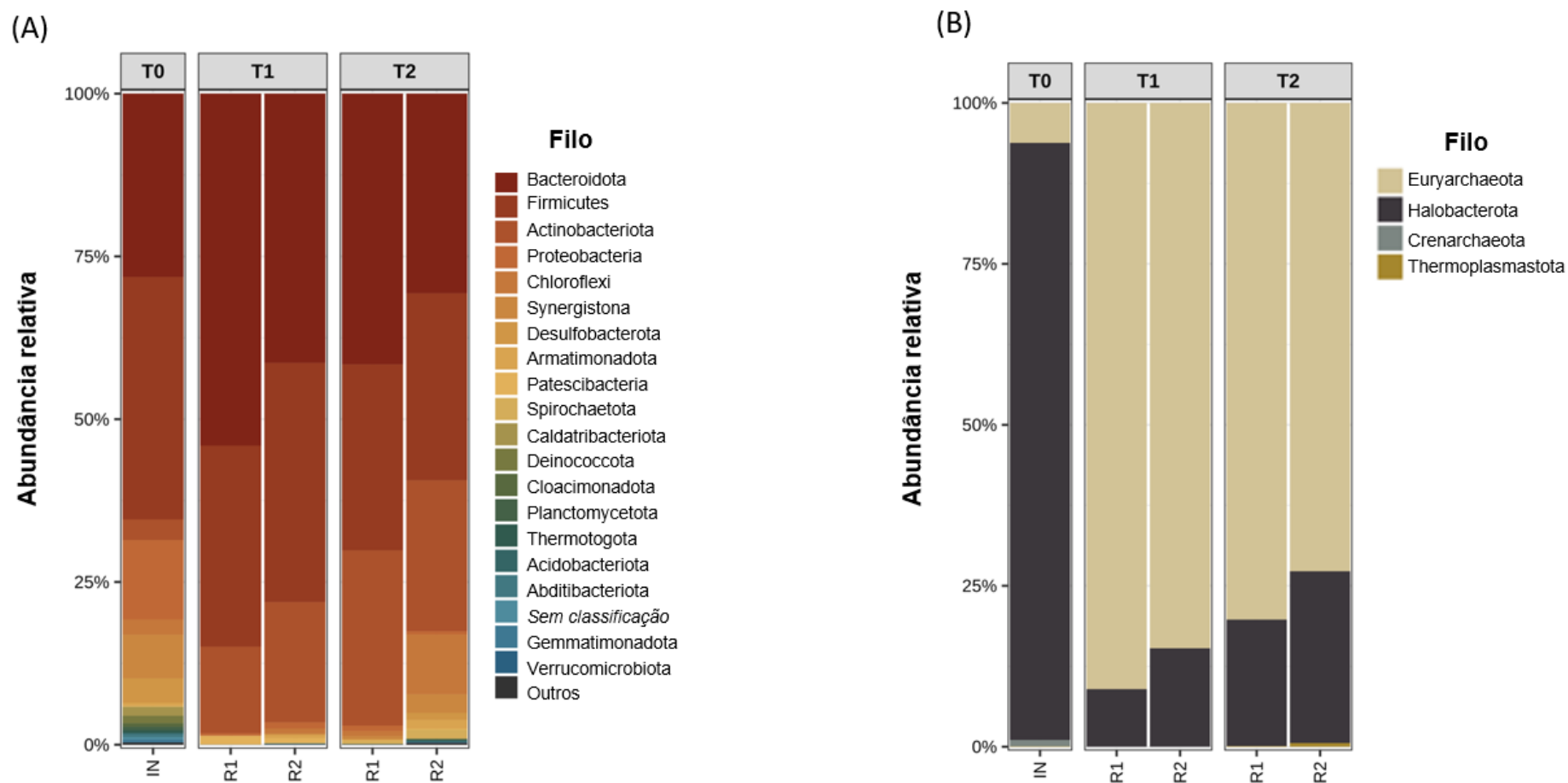
De acordo com Lü et al. (2016), a acessibilidade dos metanógenos aos poros do biochar, pode ser explicada pela sua morfologia celular. *Methanosaetas* são bastonetes com tamanho de 0,8-1,3 por a 2-7 µm, sua forma fibrosa e curta pode favorecer seu movimento e fixação aos poros externos e internos do material (Whitman et al., 2006; Zhang et al., 2014a). Isso pode explicar sua predominância na fase III, comparativamente a fase II deste estudo, conforme observado na Figura 18 C e D, onde o biochar parece ser colonizado principalmente por esse gênero. *Methanosarcinas* são cocos imóveis de 1 a 2 µm ou macrocistos de até 100 µm de diâmetro. Considerando a colonização inicial, a agregação de microrganismos deste gênero poderia bloquear gradualmente os poros do biochar, o que por sua vez, protegeria as células localizadas mais profundamente nos poros dos inibidores (Whitman et al., 2006; Zinder et al., 1985). Já as *Methanobacterium*, por apresentarem largura de 0,2 a 1,0 µm, com comprimento variando amplamente entre 1,2 e 120 µm, possuem capacidade limitada de penetração nos poros do biochar, colonizando, preferencialmente a superfície do material (Whitman et al., 2006). Essa tendência também é observada neste estudo, conforme mostrado na Figura 18 A, onde a superfície do biochar de sorgo sacarino parece estar predominantemente habitada por esses organismos.

**Tabela 15.** Abundância dos principais gêneros das bactérias e aqueias identificadas no lodo inóculo usados para partida dos reatores UASB R1 e R2 no tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

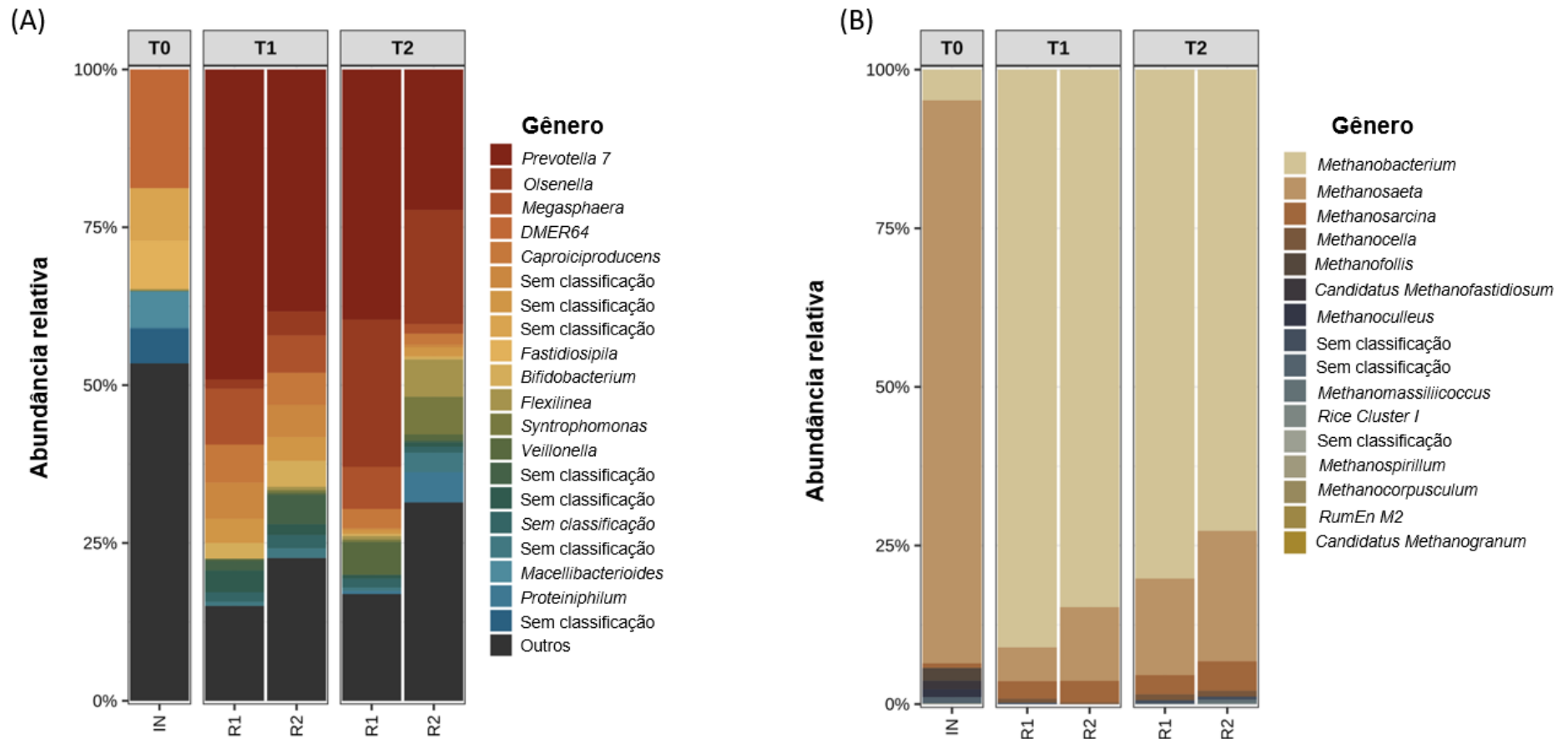
| Domínio  | Filo          | Classe          | Ordem                | Família                | Gênero                               | Lodo inóculo |
|----------|---------------|-----------------|----------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------|
| Bactéria | Bacteroidota  | Bacteroidia     | Bacteroidales        | Rikenellaceae          | <i>DMER64</i>                        | 19%          |
|          | Bacteroidota  | Bacteroidia     | Bacteroidales        | Tannerellaceae         | <i>Macellibacteroides</i>            | 6%           |
|          | Firmicutes    | Clostridia      | Oscillospirales      | Hungateiclostridiaceae | <i>Fastidiosipila</i>                | 8%           |
|          | Firmicutes    | Clostridia      | Proteinivoracales    | Unclassified           | Unclassified                         | 5%           |
|          | Firmicutes    | Limnochordia    | MBA03                | Unclassified           | Unclassified                         | 8%           |
|          | Synergistota  | Synergistia     | Synergistales        | Synergistaceae         | <i>Thermovirga</i>                   | 5%           |
| Archaea  | Halobacterota | Methanosarcinia | Methanosarciniales   | Methanosaetaceae       | <i>Methanosaeta</i>                  | 89%          |
|          | Halobacterota | Methanomicrobia | Methanomicrobiales   | Methanomicrobiaceae    | <i>Methanofollis</i>                 | 2%           |
|          | Halobacterota | Methanomicrobia | Methanomicrobiales   | Methanomicrobiaceae    | <i>Methanoculleus</i>                | 1%           |
|          | Halobacterota | Methanosarcinia | Methanosarciniales   | Methanosarcinaceae     | <i>Methanosarcina</i>                | 1%           |
|          | Euryarchaeota | Methanobacteria | Methanobacteriales   | Methanobacteriaceae    | <i>Methanobacterium</i>              | 5%           |
|          | Euryarchaeota | Thermococci     | Methanofastidiosales | Methanofastidiosaceae  | <i>Candidatus Methanofastidiosum</i> | 1%           |
|          | Crenarchaeota | Bathyarchaeia   | Unclassified         | Unclassified           | Unclassified                         | 1%           |

**Tabela 16.** Abundância dos principais gêneros das bactérias e aqueias identificadas no lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases II e III do tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

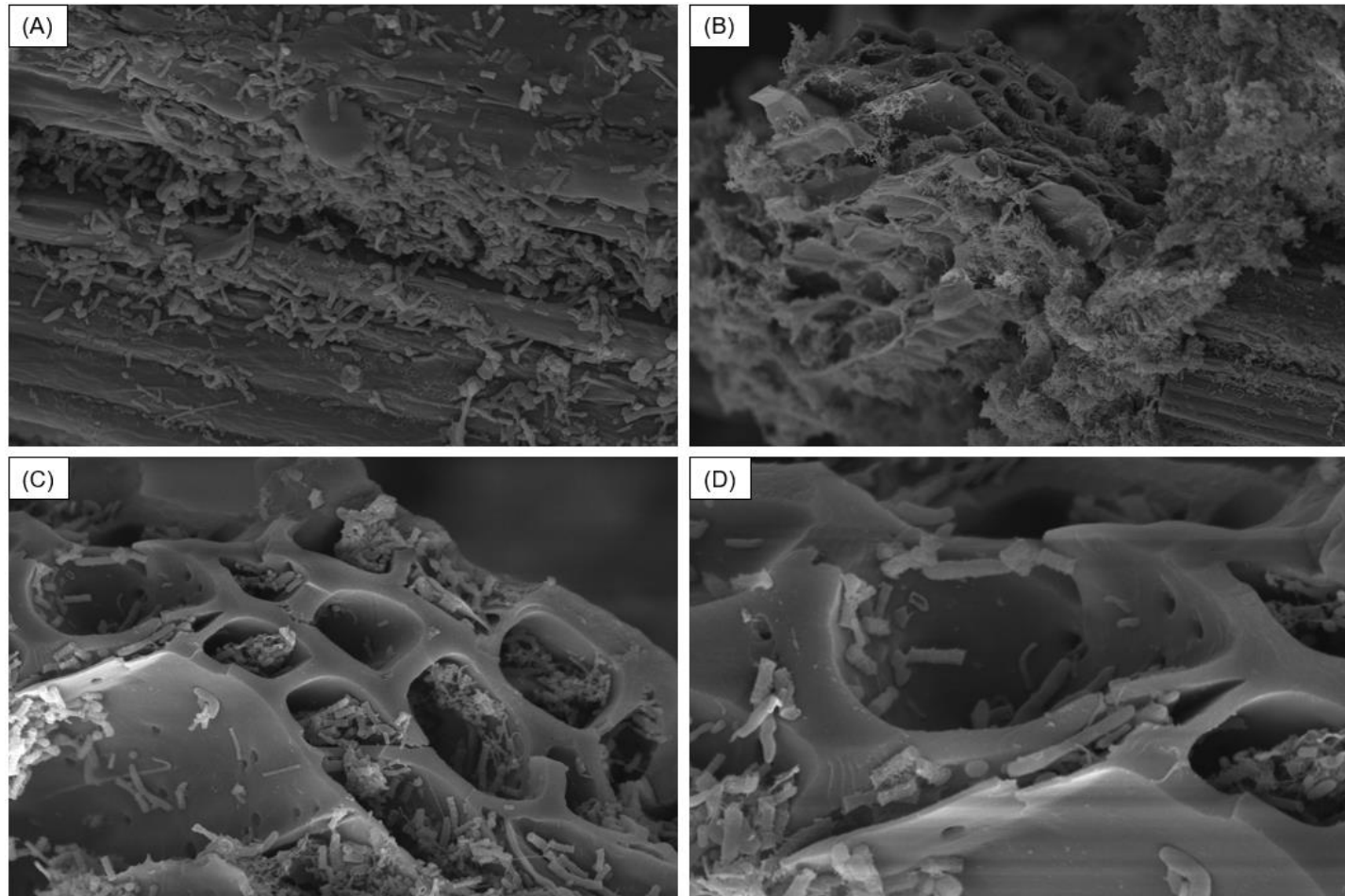
| Domínio  | Filo             | Classe           | Ordem                          | Família                  | Gênero                               | Etapas de degradação    | Fase II |        | Fase III |        |
|----------|------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------|--------|----------|--------|
|          |                  |                  |                                |                          |                                      |                         | R1      | R2     | R1       | R2     |
| Bacteria | Bacteroidota     | Bacteroidia      | Bacteroidales                  | Prevotellaceae           | <i>Prevotella 7</i>                  | Hidrólise               | 49,10%  | 38,34% | 39,64%   | 22,25% |
|          | Bacteroidota     | Bacteroidia      | Bacteroidales                  | Não classificado         | Não classificado                     | Hidrólise               | 3,46%   | 1,71%  | 0,54%    | 0,68%  |
|          | Bacteroidota     | Bacteroidia      | Bacteroidales                  | Dysgonomonadaceae        | <i>Proteiniphilum</i>                | Hidrólise               | 0,01%   | 0,03%  | 0,45%    | 4,81%  |
|          | Actinobacteriota | Actinobacteria   | Bifidobacteriales              | Bifidobacteriaceae       | Não classificado                     | Acidogênese             | 5,73%   | 5,08%  | 0,21%    | 0,43%  |
|          | Actinobacteriota | Actinobacteria   | Bifidobacteriales              | Bifidobacteriaceae       | <i>Bifidobacterium</i>               | Hidrólise e Acidogênese | 2,48%   | 4,09%  | 0,36%    | 0,48%  |
|          | Actinobacteriota | Coriobacteriia   | Coriobacteriales               | Atopobiaceae             | <i>Olsenella</i>                     | Acidogênese             | 1,46%   | 3,78%  | 23,31%   | 18,07% |
|          | Firmicutes       | Negativicutes    | Veillonellales-Selenomonadales | Veillonellaceae          | <i>Megasphaera</i>                   | Hidrólise e Acidogênese | 8,86%   | 5,92%  | 6,66%    | 1,53%  |
|          | Firmicutes       | Clostridia       | Oscillospirales                | Ruminococcaceae          | <i>Caproiciproducens</i>             | Acidogênese             | 6,02%   | 5,09%  | 3,07%    | 1,74%  |
|          | Firmicutes       | Bacilli          | Erysipelotrichales             | Erysipelotrichaceae      | Não classificado                     | -                       | 3,84%   | 3,79%  | 0,68%    | 1,43%  |
|          | Firmicutes       | Clostridia       | Lachnospirales                 | Lachnospiraceae          | Não classificado                     | -                       | 1,54%   | 2,66%  | 0,09%    | 0,31%  |
|          | Firmicutes       | Negativicutes    | Veillonellales-Selenomonadales | Veillonellaceae          | Não classificado                     | Hidrólise e Acidogênese | 1,48%   | 2,11%  | 1,44%    | 0,97%  |
|          | Firmicutes       | Bacilli          | Lactobacillales                | Não classificado         | Não classificado                     | Acidogênese             | 0,67%   | 1,50%  | 0,55%    | 3,06%  |
|          | Firmicutes       | Negativicutes    | Veillonellales-Selenomonadales | Veillonellaceae          | <i>Veillonella</i>                   | Acidogênese             | 0,31%   | 0,23%  | 5,17%    | 0,95%  |
| Archaea  | Firmicutes       | Syntrophomonadia | Syntrophomonadales             | Syntrophomonadaceae      | <i>Syntrophomonas</i>                | Acidogênese             | 0,01%   | 0,41%  | 0,39%    | 5,96%  |
|          | Chloroflexi      | Anaerolineae     | Anaerolineales                 | Anaerolineaceae          | <i>Flexilinea</i>                    | Hidrólise, Acidogênese  | 0,00%   | 0,53%  | 0,54%    | 5,91%  |
|          | Euryarchaeota    | Methanobacteria  | Methanobacteriales             | Methanobacteriaceae      | <i>Methanobacterium</i>              | Metanogênese            | 91,05%  | 84,70% | 80,20%   | 72,69% |
|          | Euryarchaeota    | Thermococci      | Methanofastidiosales           | Methanofastidiosaceae    | <i>Candidatus Methanofastidiosum</i> | Metanogênese            | 0,00%   | 0,00%  | 0,05%    | 0,05%  |
|          | Halobacterota    | Methanosarcinia  | Methanosarciniales             | Methanosaetaceae         | <i>Methanosaeta</i>                  | Metanogênese            | 5,34%   | 11,62% | 15,21%   | 20,55% |
|          | Halobacterota    | Methanosarcinia  | Methanosarciniales             | Methanosarcinaceae       | <i>Methanosarcina</i>                | Metanogênese            | 2,75%   | 3,40%  | 3,03%    | 4,63%  |
|          | Halobacterota    | Methanocellia    | Methanocellales                | Methanocellaceae         | <i>Methanocella</i>                  | Metanogênese            | 0,63%   | 0,28%  | 0,92%    | 0,92%  |
|          | Halobacterota    | Methanomicrobia  | Methanomicrobiales             | Methanoregulaceae        | Não classificado                     | Metanogênese            | 0,24%   | 0,00%  | 0,48%    | 0,45%  |
|          | Thermoplasmatota | Thermoplasmata   | Methanomassiliicoccales        | Methanomassiliicoccaceae | <i>Methanomassiliicoccus</i>         | Metanogênese            | 0,00%   | 0,00%  | 0,10%    | 0,58%  |



**Figura 16.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos Bacteria (A) e Archaea (B) encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases II (T1) e III (T2).



**Figura 17.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos gêneros pertencentes aos Domínios Bacteria (A) e Archaea encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo dos reatores UASB R1 e R2 nas fases II (T1) e III (T2).



**Figura 18.** Morfologias superficiais do lodo dos reatores anaeróbios R1 e R2 contendo biochar do bagaço de sorgo sacarino colonizado por microrganismos, na fase III da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Evo 10-33-75-ZEISS), com tensão de aceleração de 10,0 kV e ampliação de 5,25 kx (A), 1,54 kx (B), 5,89 kx (C) e 12,57 kx (D).

### 5.2.6. Predição de funções no metagenoma

A análise das comunidades microbianas é essencial para a compreensão das suas funções metabólicas. No entanto, determinar diretamente os processos metabólicos é um desafio (Le et al., 2024). O programa BLASTx foi aplicado para comparação das sequências obtidas no lodo inóculo, bem como nos reatores anaeróbios R1 e R2, nas fases II e III da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, com as sequências de proteínas previamente depositadas no GenBank. Essas proteínas foram agrupadas em categorias funcionais, utilizando o programa Cluster of Orthologous Groups of proteins (COGs) do NCBI. Como resultado foram listadas 25 funções metabólicas, sendo consideradas para este estudo, somente aquelas com abundância relativa maior que 5%. Estas foram distribuídas em gráficos para melhor visualização, conforme a Figura 16.

As funções metabólicas foram listadas em ordem decrescente de abundância relativa, que apresentou pouca ou nenhuma variação entre as amostras de lodo inóculo e dos reatores R1 e R2, em ambas as fase de operação consideradas (Figura 19). Estas incluíram vias de transcrição, estrutura ribossômica e biogênese, transporte e metabolismo de aminoácidos, biogênese da parede celular, transporte e metabolismo de carboidratos, produção e conversão de energia, transporte e metabolismo de coenzimas e íons inorgânicos e transcrição.

Vias metabólicas específicas podem contribuir para a produção de metano ou para atividades sintróficas e desempenhar papéis variados em diversos processos (Le et al., 2024). As vias de biossíntese e metabolismo de aminoácidos, por exemplo, são essenciais para o crescimento e processos metabólicos de comunidades microbianas em sistemas anaeróbicos, culminando na produção de AGV durante a fermentação anaeróbica (Zhang et al., 2020, Le et al., 2024). A constatação desta via metabólica nos reatores UASB, é consistente com as vias dos microrganismos dos filos Bacteroidota e Firmicutes, que estão envolvidos na fermentação de aminoácidos, resultando na produção de acetato, utilizado pelas metanogênicas acetoclásticas subsequentemente (Okabe et al., 2007) e foram predominantes no sistema anaeróbio tratando caldo de sorgo sacarino.

A dominância desta via em reatores UASB sugere ainda que, o sistema de digestão anaeróbia pode estar funcionando sob condições ricas em nitrogênio (Chen et al., 2022). A prevalência da via de transporte e metabolismo de aminoácidos neste estudo, pode ser atribuída à elevada concentração de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) atribuída ao uso de bicarbonato de amônio para correção do pH do afluente, bem como da recirculação do efluente para manutenção da alcalinidade do sistema.

Vias de transporte e metabolismo de carboidratos também foram observadas neste estudo. Estas envolvem a degradação e fermentação de carboidratos e são responsáveis pela conversão de açúcares e aminoácidos em AGVs (acetato, propionato e butirato), hidrogênio, CO<sub>2</sub> e amônia. No geral, as vias de degradação de carboidratos, fermentação e biossíntese de estrutura celular, são vias metabólicas importantes na fase ácida da digestão anaeróbia (Le et al., 2024). A presença da primeira, corrobora a abundância expressiva do gênero *Olsenella*, observada na fase III da digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, em que o sistema foi operado com maiores cargas orgânicas volumétricas, bem como com a presença, ainda que sutil, do gênero *Flexilinea*, ambos envolvidos na degradação de carboidratos em condições anaeróbicas (Sun et al., 2016; Zhang et al., 2024), sendo capazes de produzir anaerobicamente ácido láctico, etanol e ácido acético usando carboidratos e proteínas como substratos (Feng et al., 2018).

As vias de produção e conversão de energia observadas, revelam papel importante dos organismos metanogênicos no sistema de digestão anaeróbia e são coerentes com a presença notadamente significativa dos gêneros *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina* constatada neste estudo, responsáveis pela produção de metano através da metanogênese hidrogenotrófica e acetoclástica.

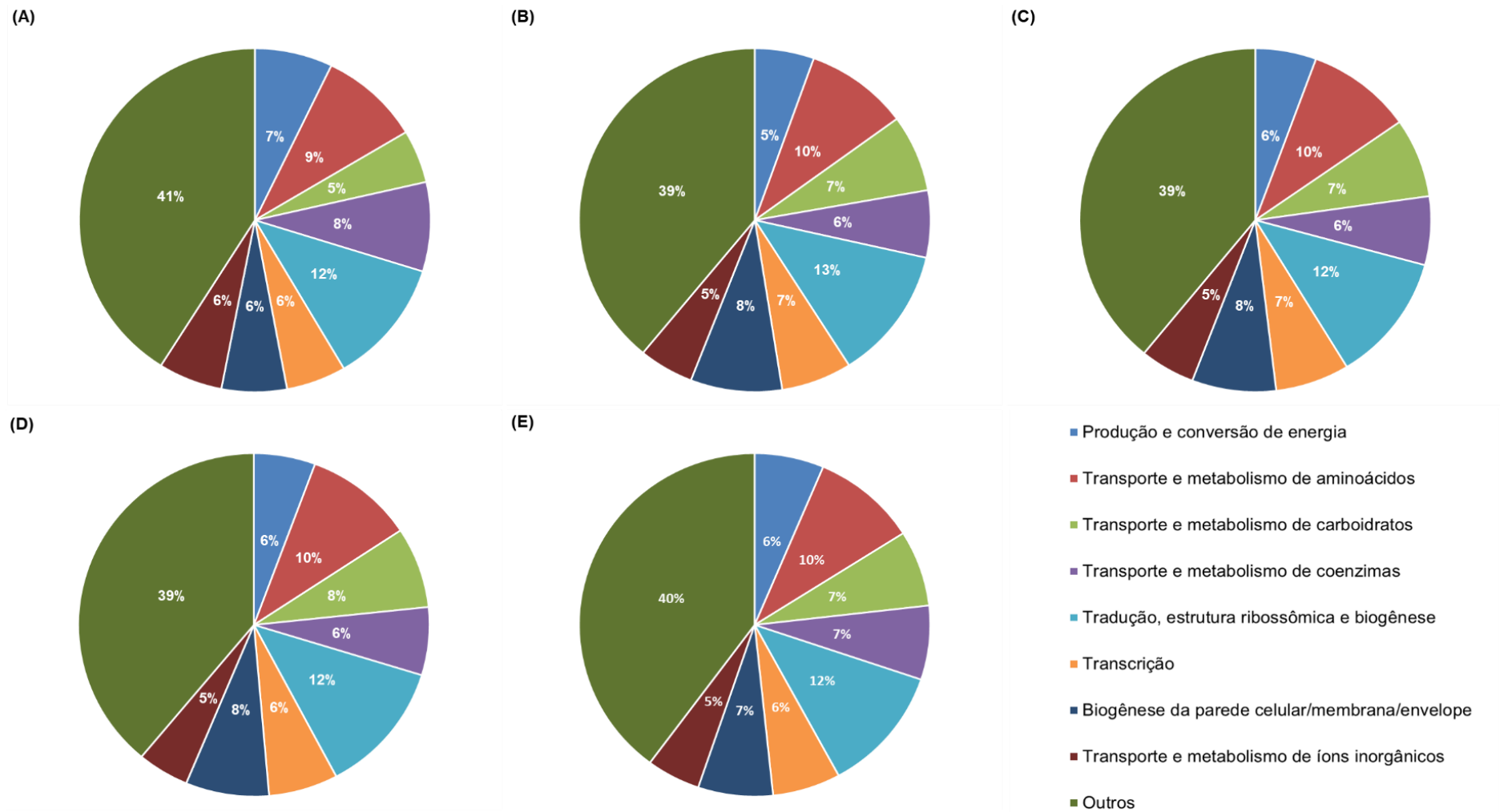
*Methanobacterium* é conhecido por produzir metano através do processo de metanogênese hidrogenotrófica, que consiste na redução de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> usando H<sub>2</sub> e/ou formiato. *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, ambos pertencentes à ordem Methanosarcinales, cujas abundâncias relativas também foram consideráveis neste estudo, estão reconhecidamente associados à metanogênese acetoclástica, que envolve a conversão de acetato em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (Zabranska e Pokorna, 2018). O primeiro gênero se caracteriza por exibir maior

afinidade por acetato do que outros gêneros e é considerado um metanógeno acetotrófico obrigatório (Ferraro et al., 2018; Lim et al., 2013), enquanto o segundo pode se tornar compatível com as vias de metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica (Zabranska e Pokorna, 2018).

Outras vias tais como de transporte e metabolismo de íons inorgânicos e de coenzimas também foram identificadas neste estudo. O metabolismo de íons inorgânicos pode fornecer aos metanógenos os requisitos de energia necessários, enquanto as coenzimas facilitam a produção de metano pelos metanógenos usando hidrogênio e acetato, fornecendo condições necessárias para a reação, completando eficientemente a conversão da matéria orgânica (Tian et al., 2021). A via de transporte e metabolismo de coenzimas pode ainda estar relacionada à produção de  $H_2$  no processo de fermentação anaeróbia, devido à capacidade de alguns microrganismos de reduzir prótons ( $H^+$ ) a hidrogênio molecular ( $H_2$ ), por meio de enzimas hidrogenases, envolvendo processo de redução/oxidação de transportadores de elétrons, mantendo a neutralidade elétrica do meio, suprimindo o processo com ATP, bem como redução e oxidação das coenzimas NAD e NADH (Lee et al., 2011).

As vias de tradução, estrutura ribossômica e biossíntese, bem como as de transcrição e biogênese de parede celular, também constatadas neste estudo, representam vias essenciais para manutenção da atividade vital microbiana (Hu et al., 2023), sem estas, possivelmente as atividades fisiológicas microbianas seriam comprometidas (Qi et al., 2021).

De modo geral, as vias metabólicas identificadas neste estudo, desempenham papéis fundamentais no sistema de digestão anaeróbia, assegurando condições necessárias às atividades da comunidade microbiana. Estas vias sugerem ainda a possibilidade de síntese ativa de compostos como aminoácidos e cofatores para suporte dos processos metabólicos pela microbiota, enquanto produz lipídeos e carboidratos como fontes de energia. Além de produzirem ácidos orgânicos e álcoois que podem atuar como substratos para a metanogênese (Le et al., 2024).



**Figura 19.** Predição funcional das principais vias metabólicas nas amostras lodo inóculo (A) e do reatores UASB R1 (B) e R2 (C) na fases II e III (D e E) do tratamento anaeróbico do caldo de sorgo sacarino.

### 5.2.7. Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), Fósforo e Ortofosfato

Para o sucesso do processo de digestão anaeróbia, o crescimento e atividade da comunidade microbiana, sobretudo os organismos metagenômicos é substancial (Chernicharo, 2016). Estes, por sua vez, dependem fortemente de fatores ambientais, tais como a disponibilidade adequada de nutrientes, sobretudo nitrogênio e fósforo, podendo sua carência, implicar em distúrbios no sistema e comprometer sobremaneira a qualidade do efluente, bem como a produção de biogás (Ma et al., 2009).

De acordo com Chernicharo (2016), a quantidade de nutrientes recomendada na digestão anaeróbia é baseada na concentração da matéria orgânica do substrato. Os requisitos de nitrogênio baseiam-se na composição química empírica da célula dos microrganismos, enquanto para fósforo, o autor afirma que, para a incorporação microbiana deste nutriente, a quantidade necessária deve estar entre 1/5 e 1/7 da quantidade definida para o nitrogênio, recomendando, portanto, que, a relação de DQO:N:P seja de 350:5:1

Neste estudo, foi observada disponibilidade adequada de nutrientes no afluente do sistema para a digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino, evidenciada pela relação DQO:N:P satisfatória em todas as fases de operação (Tabela 17). Esta condição pode ter sido favorecida pela adição de bicarbonato de amônio para correção do pH do afluente, bem como pela recirculação do efluente, permitindo que parte do nitrogênio e fósforo presentes retornasse ao sistema, contribuindo para a elevação da relação DQO:N:P, evitando, conseqüentemente, distúrbios no processo como um todo.

Com o aumento gradual da COV, as concentrações de NTK, P-Total e ortofosfato no afluente aumentaram de 102 para 434 mg L<sup>-1</sup>, 19 para 43 mg L<sup>-1</sup> e 11 para 32 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 17), sendo verificada redução dos teores destes nutrientes do afluente para o efluente dos reatores em todas as fases de operação. Oliveira et al. (1997), afirmam que, um dos prováveis mecanismos de remoção do nitrogênio e do fósforo nos sistemas de digestão anaeróbia, pode ser a formação de estruvita (NH<sub>4</sub>MgPO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O) e vivianita (Fe<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O), uma vez que, estes compostos precipitam nos reatores e são imobilizados na manta de lodo..

Onodera et al. (2013), por sua vez, pontua que, a diminuição das concentrações desses nutrientes em reatores anaeróbios pode ser atribuída ao processo de síntese celular, pois esses elementos são indispensáveis para os microrganismos. Segundo Metcalf e Eddy (2016), o nitrogênio desempenha um papel crucial na síntese de proteínas. Em relação ao ortofosfato, Chernicharo (2016) destaca que uma proporção significativa dos microrganismos é capaz de utilizá-lo, sendo esta forma prontamente disponível prioritariamente consumida (Gerardi, 2003).

Neste estudo, as eficiências de remoção do sistema (R1+R2) não apresentaram diferença significativa entre as fases para NTK e ortofosfato. Fósforo total, no entanto, apresentou remoção máxima 48% na fase III de operação, supostamente proporcionada pela adição do biochar de sorgo sacarino ao afluente do sistema (Tabela 17).

A literatura tem registrado efeitos positivos do uso de diferentes tipos de biochar na remoção de nutrientes de águas residuárias. Lü et al. (2016) constataram que a inclusão de biochar de madeira frutífera ajudou a reduzir os impactos de altas concentrações de amônio durante a digestão anaeróbia de glicose. Zhang et al. (2019), ao empregar biochar de casca de milho, observaram uma significativa diminuição na concentração total de nitrogênio amoniacal durante o processo de digestão anaeróbia do lodo de esgoto.

Yuan et al. (2021) relataram que o biochar de palha agrícola modificado foi altamente eficaz na remoção de fósforo de água residuária de esgoto doméstico, atribuindo este resultado principalmente à sua maior área superficial específica e aos locais de adsorção do material. Da mesma forma, Fu et al. (2022) também relataram uma alta taxa de remoção de fósforo de água residuária artificial utilizando biochar da planta aquática *Hydrocotyle vulgaris* carregado com magnésio.

**Tabela 17.** Relação DQO:N:P no afluente, valores médios de concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), fósforo total e ortofosfato no afluente e efluente dos reatores UASB em série R1 e R2 e eficiência de remoção no sistema (R1+R2), durante as fases Partida, I, II e III do tratamento anaeróbio do caldo de sorgo sacarino.

| Parâmetros                        |          | Fases   |       |       |       | CV (%) | Teste F           |
|-----------------------------------|----------|---------|-------|-------|-------|--------|-------------------|
|                                   |          | Partida | I     | II    | III   |        |                   |
| Relação DQO:N:P (350:5:1)         | DQO      | 350     | 350   | 350   | 350   |        |                   |
|                                   | N        | 29      | 21    | 18    | 13    |        |                   |
|                                   | P        | 6       | 3     | 2     | 2     |        |                   |
| NTK (mg L <sup>-1</sup> )         | Afluente | 102 c   | 243 b | 412 a | 434 a | 54,5   | 71,1*             |
|                                   | R1       | 117 c   | 246 b | 411 a | 409 a | 55,0   | 57,6*             |
|                                   | R2       | 94 c    | 239 b | 376 a | 422 c | 58,0   | 49,2*             |
|                                   | R1+R2    | 7a      | 13 a  | 15 a  | 17 a  | 114,6  | 1,7 <sup>ns</sup> |
| P-Total (mg L <sup>-1</sup> )     | Afluente | 19 b    | 36 a  | 39 a  | 43 a  | 37,0   | 29,6**            |
|                                   | R1       | 16 b    | 31 a  | 34 a  | 29 a  | 38,0   | 10,5**            |
|                                   | R2       | 15 c    | 29 ab | 32 a  | 23 b  | 39,0   | 13,6**            |
|                                   | R1+R2    | 19 b    | 20 b  | 17 c  | 48 a  | 66,0   | 8,5**             |
| Ortofosfato (mg L <sup>-1</sup> ) | Afluente | 11 c    | 24 b  | 27 ab | 32 a  | 40,0   | 38,0**            |
|                                   | R1       | 8 c     | 16 b  | 18 ab | 23 a  | 50,0   | 19,5**            |
|                                   | R2       | 6 b     | 13 a  | 16 a  | 17 a  | 46,0   | 10,5**            |
|                                   | R1+R2    | 41 a    | 46 a  | 43 a  | 47 a  | 32,0   | 1 <sup>ns</sup>   |

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.

### 5.2.8. Macro e micronutrientes

Os macro e micronutrientes são reconhecidos por desempenharem funções essenciais no metabolismo dos microrganismos, sendo indispensáveis para diversas atividades metabólicas. A suplementação destes na digestão anaeróbia, por vezes, se faz necessária, tendo por objetivo principal garantir a estabilidade do processo, bem como otimizar a produção de metano, uma vez que são fundamentais para a síntese de enzimas vitais tanto no processo de fermentação, quanto na degradação de ácidos graxos voláteis (Cai et al., 2017). Neste mesmo sentido, Juntupally et al. (2022) afirmam que, a falta de micro e macronutrientes afeta mais significativamente a atividade metabólica dos microrganismos metanogênicos do que dos acidogênicos.

Segundo Choong et al. (2016), embora a eficácia e a combinação adequada de nutrientes no metabolismo microbiano já estejam bem estabelecidas, é necessário investigar a concentração ideal para cada situação, dada a diversidade de operações nos processos de digestão anaeróbia de diferentes substratos. Neste estudo, as concentrações médias dos macronutrientes Sódio (Na) e Magnésio (Mg) e dos micronutrientes Níquel (Ni), Cobalto (Co) e Manganês (Mn) no afluente, seguiram o aumento da carga orgânica volumétrica até a fase II (Tabela 18 e 19), em que houve recirculação do efluente.

Em contrapartida, na fase III, com a retirada do recirculado, para adição do biochar, notou-se diminuição de tais concentrações. Isto pode ser atribuído ao fato de o efluente recirculado conter nutrientes que não foram completamente utilizados na primeira passagem pelo reator. Com a recirculação, no entanto, esses nutrientes podem ser reaproveitados pelos microrganismos, aumentando sua eficiência de uso, denotando ser uma estratégia operacional adequada para fornecimento de desses ao sistema, conforme também observado por Barros et al. (2017) e Santana Junior et al. (2019).

Os macronutrientes Mg e Na apresentam influência direta na produção de biogás. De acordo com Ma et al. (2009), o magnésio é um nutriente importante que sustenta o funcionamento adequado da biomassa, podendo fortalecer o

metabolismo dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, resultando, portanto, em maior a produção de metano. Stieb e Schink (1985), relataram que a oxidação de ácidos graxos, uma das principais rotas para a produção de acetato na digestão anaeróbia, geralmente realizada por bactérias sintróficas, exige magnésio para ocorrer de forma eficiente, o que por sua vez, pode justificar as concentrações mais altas desse nutriente na fase II deste estudo, em que foi observada a maior concentração de AVT.

O Sódio por sua vez, de acordo com Chen et al. (2008), é nutriente essencial para o equilíbrio osmótico e o metabolismo dos microrganismos anaeróbios. Em concentrações excessivas, no entanto, pode levar à inibição microbiana e prejudicar o processo. Alhraishawi e Alani (2018), constataram que concentrações de 3100 mg L<sup>-1</sup> ou mais de NaCl foram inibitórias no processo de digestão anaeróbia. Neste estudo, no entanto, as maiores concentrações médias de Sódio no afluente e efluente dos reatores, foram observadas na fase II de operação, sendo estas de 180, 185 e 177 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 18), estando na faixa considerada estimuladora do processo, segundo McCarty (1964).

O Cálcio (Ca) e o Potássio (K) também representam nutrientes essenciais para a estabilidade da digestão anaeróbia, contribuindo para o aumento da produção de metano e hidrogênio (Yang et al., 2021). Segundo Kalemelawa et al. (2012) e Parra-Orobio et al. (2018), o cálcio pode atenuar o efeito inibitório dos ácidos graxos de cadeia longa no processo de digestão anaeróbia, além de favorecer o acúmulo de biomassa no sistema. Neste estudo, as concentrações de Ca no afluente dos reatores aumentaram da fase de partida para a fase I de operação, decaindo posteriormente na fase II, na qual foram detectadas altas concentrações de ácidos voláteis totais (AVT). Na fase seguinte, no entanto, foi constatado o aumento das concentrações de Ca, o que pode ter contribuído para a elevação da alcalinidade do sistema (Tabela 8 e Figura 11).

Neste estudo, as concentrações de potássio no afluente foram de 417, 598, 533 e 428 mg L<sup>-1</sup> nas fases de partida, fase I, II e III. Embora elevadas, essas concentrações se encontram fora da faixa considerada inibitória para a microbiota da digestão, conforme indicado por McCarty (1964) e Mota (2013),

cujos valores variam de 2500 a 4500 mg L<sup>-1</sup>. Li et al. (2018), ao investigarem o efeito do potássio na digestão anaeróbia de águas residuárias salinas, observaram que esse macronutriente melhorou a produção de metano e as eficiências de remoção de DQO, além de favorecer o consumo de ácidos graxos voláteis (AGVs).

As altas concentrações de potássio (K) encontradas neste estudo parecem ser características do caldo de sorgo sacarino e podem estar associadas à aplicação de NPK na adubação de plantio e cobertura, na dosagem de 420 kg ha<sup>-1</sup>. Laopaiboon et al. (2009) observaram uma concentração de K de 1790 mg L<sup>-1</sup> no caldo da cultivar KKU 40, cultivada na Tailândia. Já Bernardes et al. (2019) relataram concentrações de até 1144 mg L<sup>-1</sup> no caldo do híbrido SweetMon 2, submetido a uma adubação potássica de 100 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. Silva (1983) também registrou uma concentração elevada de K, de aproximadamente 2000 mg L<sup>-1</sup> no caldo da cultivar Brandes, sob adubação com 200 kg ha<sup>-1</sup> de NPK.

Em se tratando dos micronutrientes, Ni e Co constituem alguns dos mais usados por bactérias e arqueias, pois, desempenham papel fundamental em suas vias enzimáticas (Bardi et al., 2023). Diversos estudos relataram melhora da digestão anaeróbia induzida por Ni (Tian et al., 2017; Zhang et al., 2015; Afroze et al., 2022). Em um estudo avaliando diferentes concentrações de Ni na digestão anaeróbia de vinhaça, Gustavsson et al. (2011) constataram que a ótima foi de 0,2 mg L<sup>-1</sup> para a obtenção de melhores rendimentos de metano, corroborando ao valores observados neste estudo, em todas as fases de operação. Já o Co é requerido por bactérias anaeróbicas e arqueias para a síntese de metaloenzimas e coronoide, um ativador para reações enzimáticas necessárias para microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos e acetoclásticos (Bardi et al., 2023). Neste estudo, as concentrações de Co foram ligeiramente maiores na fase II de operação, período em que o sistema apresentava sinais de acidificação e houve predomínio do gênero metanogênico hidrogenotrófico *Methanobacterium* (Tabela 16). Gonzales-Gil et al. (2012) também constataram em seu estudo que, na fase acidogênica, a biodisponibilidade de Co foi alta, provavelmente devido ao pH mais baixo.

Os micronutrientes Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Cobre (Cu) apresentaram concentrações, bem como eficiência de remoção, crescentes no decorrer das fases de operação dos reatores (Tabela 18). De acordo com Bardi et al. (2023), o Fe pode promover interações sintróficas na digestão anaeróbia e sua adição, segundo Yu et al. (2015) e Meng et al. (2013), pode reduzir os efeitos adversos do acúmulo de metabólitos termodinamicamente desfavoráveis e melhorar a estabilidade do processo por meio do aprimoramento da via de oxidação do propionato sintrófico, somado ao enriquecimento dos microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos. Consequentemente, a via acetoclástica potencialmente inibida pode ser contornada para a metanogênese hidrogenotrófica, conforme observado neste estudo, sobretudo na fase II. Entretanto, Wang et al. (2024), estudando a digestão anaeróbia de alcachofra com adição de limalhas de ferro e biochar, constataram aumento da via acetoclástica de produção de metano, atribuindo tal efeito a transferência direta de elétrons, facilitada por ambos, corroborando os resultados observados neste estudo, com o uso do biochar de sorgo sacarino na fase III.

Zinco e Cobre também são micronutrientes importantes na digestão anaeróbia, que podem afetar a eficiência do processo. O Zn desempenha papel essencial no metabolismo de microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos e acetoclásticos, devido à ativação de coenzimas (Meng et al., 2013), já o Cobre, pode estimular a degradação de ácidos voláteis (Dong et al., 2022). Neste estudo, as maiores concentrações e remoções desses micronutrientes foram observadas na fase III (Tabela 19), em que foi usado o biochar do bagaço de sorgo sacarino no sistema de reatores R1 e R2 e foram observadas maiores PVM e PEM (Tabela 11). Wang et al. (2024), constataram que a adição de  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  e biochar derivado de esterco suíno desidratado, tanto individualmente quanto combinado, melhorou a produção de metano na digestão anaeróbia de água residuária de suinocultura. Cada aditivo atuou por mecanismos diferentes, o  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  acelerou a hidrólise e a metanogênese, enquanto o biochar facilitou a metanogênese através de interações eletroativas. A combinação de ambos resultou em benefícios sinérgicos e auxiliou a redução de toxicidade do digestato para aplicação no solo.

**Tabela 18.** Valores médios e coeficiente de variação (C.V) de macronutrientes no afluente e efluentes e suas respectivas eficiências de remoção do conjunto reatores UASB (R1+R2) durante as fases de operação.

| Parâmetros                            |          | Fases   |           |           |           | CV (%) | Teste F           |                   |
|---------------------------------------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------|
|                                       |          | Partida | I         | II        | III       |        |                   |                   |
| Tempo de operação (dias)              |          | 1 - 138 | 139 - 250 | 251 - 370 | 371 - 462 |        |                   |                   |
| COV - R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 2,5 d   | 9,2 c     | 17,8 b    | 22,3 a    |        |                   |                   |
| COV - R2 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 0,8 d   | 3,6 c     | 7,7 b     | 8,8 a     |        |                   |                   |
| Na<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 43,70 c | 107,21 b  | 180,81 a  | 86,20 bc  | 59,1   | 17*               |                   |
|                                       | R1       | 28,40 c | 117,92 b  | 185,10 a  | 98,80 b   | 63,9   | 22*               |                   |
|                                       | R2       | 25,64 c | 103,10 b  | 177,61 a  | 94,40 b   | 67,2   | 20*               |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 38 a      | 11 a      | 9 a       | 5 a    | 161,4             | 2,6 <sup>ns</sup> |
| Ca<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 38,8 a  | 62,0 a    | 49,4 a    | 53,4 a    | 71,8   | 0,4 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 28,7 a  | 65,8 a    | 64,7 a    | 45,0 a    | 92,6   | 1,4 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R2       | 26,4 a  | 65,4 a    | 76,0 a    | 52,4 a    | 80,2   | 2,1 <sup>ns</sup> |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 44 a      | 6 b       | 12 ab     | 14 ab  | 127,5             | 3,7*              |
| K<br>(mg L <sup>-1</sup> )            | Afluente | 417,4 a | 433,2 a   | 598,8 a   | 428,2 a   | 49,0   | 0,9 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 442,0 a | 553,1 a   | 534,3 a   | 443,4 a   | 55,1   | 0,9 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R2       | 393,3 b | 576,2 a   | 527,0 a   | 378,3 b   | 55,8   | 3,9*              |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 27 a      | 3 a       | -         | 26 a   | 227,5             | 1,6 <sup>ns</sup> |
| Mg<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 45,12 a | 36,71 a   | 44,11 a   | 24,70 a   | 90,2   | 1 <sup>ns</sup>   |                   |
|                                       | R1       | 3,68 b  | 37,37 a   | 45,52 a   | 34,61 ab  | 94,6   | 4,2*              |                   |
|                                       | R2       | 5,48 b  | 39,60 a   | 45,24 a   | 33,33 ab  | 97,6   | 3,9**             |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 33 a      | 16 a      | 6 a       | 12 a   | 158,6             | 1 <sup>ns</sup>   |

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%.

\*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,05).

**Tabela 29.** Valores médios e coeficiente de variação (C.V) de micronutrientes no afluente e efluentes e suas respectivas eficiências de remoção do conjunto reatores UASB (R1+R2) durante as fases de operação.

| Parâmetros                            |          | Fases   |           |           |           | CV (%) | Teste F           |                   |
|---------------------------------------|----------|---------|-----------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------|
|                                       |          | Partida | I         | II        | III       |        |                   |                   |
| Tempo de operação (dias)              |          | 1 - 138 | 139 - 250 | 251 - 370 | 371 - 462 |        |                   |                   |
| COV - R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 2,5 d   | 9,2 c     | 17,8 b    | 22,3 a    |        |                   |                   |
| COV - R2 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 0,8 d   | 3,6 c     | 7,7 b     | 8,8 a     |        |                   |                   |
| Fe<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,23 a  | 1,73 a    | 2,29 a    | 5,70 a    | 264,3  | 1,8 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 0,27 a  | 1,82 a    | 1,91 a    | 4,59 a    | 232,1  | 1,1 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R2       | 0,30 a  | 1,05 a    | 1,58 a    | 1,83 a    | 66,5   | 0,1 <sup>ns</sup> |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 6 a       | 8 a       | 15 a      | 26 a   | 163,3             | 1,1 <sup>ns</sup> |
| Ni<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,02 a  | 0,01 a    | 0,04 a    | 0,02 a    | 146,0  | 1,3 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 0,01 a  | 0,01 a    | 0,03 a    | 0,01 a    | 174,1  | 1,3 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R2       | 0,01 a  | 0,03 a    | 0,03 a    | 0,01 a    | 169,9  | 0,8 <sup>ns</sup> |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 14 a      | 16 a      | 28 a      | 16 a   | 186,0             | 0,2 <sup>ns</sup> |
| Co<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,03 b  | 0,22 a    | 0,23 a    | 0,22 a    | 47,6   | 41*               |                   |
|                                       | R1       | 0,03 b  | 0,22 a    | 0,24 a    | 0,22 a    | 49,4   | 43*               |                   |
|                                       | R2       | 0,03 b  | 0,23 a    | 0,24 a    | 0,22 a    | 47,8   | 44*               |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 2 a       | -         | -         | 2 a    | 242,7             | 0,8 <sup>ns</sup> |
| Zn<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,10 a  | 0,16 a    | 0,34 a    | 0,41 a    | 64,9   | 0,7 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 0,07 b  | 0,33 ab   | 0,70 a    | 0,426 ab  | 196,3  | 2,7**             |                   |
|                                       | R2       | 0,04 a  | 0,10 a    | 0,19a     | 0,21 a    | 132,4  | 0,3 <sup>ns</sup> |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 27 a      | 47 a      | 54 a      | 57 a   | 76,2              | 1,2 <sup>ns</sup> |
| Mn<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,20 a  | 0,54a     | 0,66 a    | 0,43 a    | 80,9   | 2,5 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 0,14 b  | 0,46 ab   | 0,66 a    | 0,53 ab   | 84,4   | 3,1**             |                   |
|                                       | R2       | 0,10 b  | 0,49 ab   | 0,62 a    | 0,51 ab   | 92,2   | 3,3**             |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 25 a      | 15 a      | 12 a      | 18 a   | 135,3             | 0,4 <sup>ns</sup> |
| Cu<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,02 a  | 0,03 a    | 0,04 a    | 0,06 a    | 91,5   | 2,4 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 0,02 a  | 0,02 a    | 0,03 a    | 0,05 a    | 82,1   | 1,3 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R2       | 0,02 a  | 0,02 a    | 0,03 a    | 0,030 a   | 100,9  | 0,5 <sup>ns</sup> |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1+R2   | 14 d      | 33 c      | 41 b      | 54 a   | 85,9              | 2,4**             |

c.v. – coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5%.

\*\* - Significativo a 1% de probabilidade (p<0,05).

### 5.3 Biogás de vinhaça de sorgo

#### 5.3.1 COV, pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal

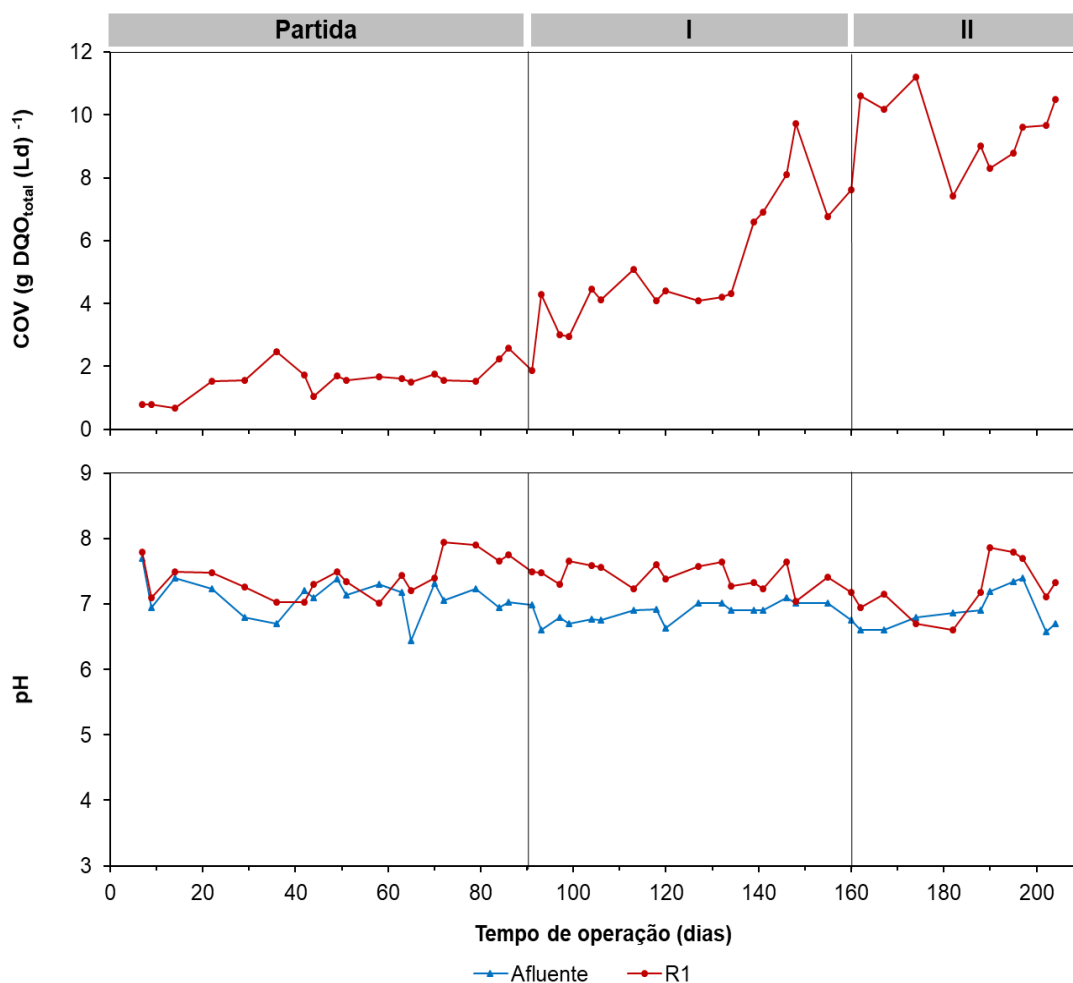
O sistema composto pelo reator UASB convencional no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino apresentou estabilidade na maior parte do tempo, com aumento gradual da COV, variando de 1,6 a 9,5 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> durante as fases de operação (Figura 20). Aumentos progressivos de COV em sistemas anaeróbios, também foram observados em estudos tratando vinhaça de cana-de-açúcar (Barros et al., 2016; EspañaGamboa et al., 2012; Janke et al., 2016, Santana Júnior, 2018), sendo de grande relevância para a adaptação e estabelecimento de microrganismos propícios a degradação do substrato.

Neste estudo, em virtude do baixo pH característico da vinhaça de sorgo sacarino, procedeu-se com a adição de bicarbonato de amônio ao afluente para correção, durante a operação do sistema, com redução a partir do 142º dia de operação, a partir do qual, iniciou-se a recirculação total do efluente do reator UABS convencional R1, retomando o uso normalmente a partir do 180º. A capacidade de tamponamento aumentou ao longo das fases de operação, demonstrada através do aumento na AP de 359 a 1076 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 20), bem como pelo consumo eficiente dos AVT, mantendo o pH dentro da faixa considerada ótima para o desenvolvimento das arqueias metanogênicas, conforme Chernicharo, (2016), com valores do efluente maiores que os do afluente, variando entre 6,6 e 7,9 no R1 (Figura 20).

De acordo com Feng et al. (2016), de modo geral, a alcalinidade pode aumentar em virtude da metanogênese acetoclástica, da redução do sulfato, bem como do íon amônio decorrente da degradação de compostos nitrogenados. Na fase II foi observou-se uma diminuição da alcalinidade parcial, em virtude do aumento dos AVT (Tabela 20), provocado provavelmente pela elevação da COV de 7,3 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> no dia 160 para 10,6 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup> no dia 162.

Os valores médios de AI/AP observados foram superiores a 0,3, considerado ideal a digestão anaeróbia no tratamento de esgoto sanitário, de acordo Ripley; Boyle; Converse, (1986). Estes não apresentaram diferença

significativa entre as fases de operação no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino, sendo de 0,6, 0,5 e 1,0 para partida, fase I e fase II, respectivamente (Tabela 20). Contudo, foi constatada estabilidade adequada do processo, corroborando os resultados de Barros et al. (2017) e Santana Junior (2018), em que também foi possível obter estabilidade no processo anaeróbio, utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, com relações AI/AP superiores a 0,6, e 1,4, respectivamente.

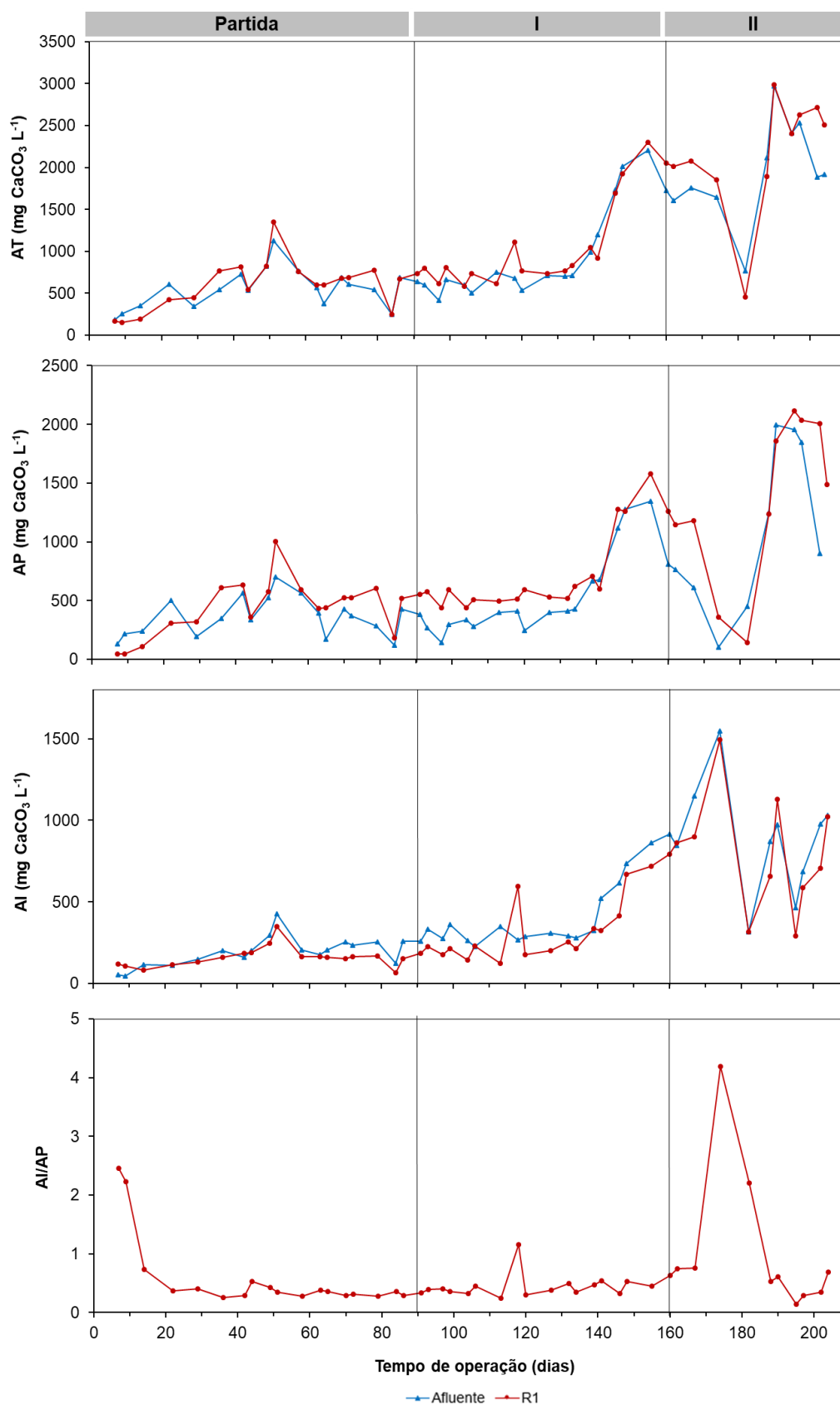


**Figura 20.** Carga orgânica volumétrica (COV) dos reatores UASB R1 e R2 e pH do afluente e efluentes dos reatores UASB R1 e R2 no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino

**Tabela 20.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) da alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluentes durante a operação do sistema composto pelo reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio de vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros                          |          | Fases   |        |         | CV (%) | Teste F         |
|-------------------------------------|----------|---------|--------|---------|--------|-----------------|
|                                     |          | Partida | I      | II      |        |                 |
| Tempo de operação (dias)            |          | 1-91    | 92-160 | 161-204 |        |                 |
| COV-R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 1,6     | 5,3    | 9,5     |        |                 |
| AT (mg L <sup>-1</sup> )            | Afluente | 561 c   | 1007 b | 1961 a  | 69     | 28**            |
|                                     | R1       | 613 c   | 1904 b | 2153 a  | 69     | 34**            |
| AP (mg L <sup>-1</sup> )            | Afluente | 359 b   | 578 b  | 1076 a  | 80     | 10**            |
|                                     | R1       | 449 b   | 746 b  | 1357 a  | 71     | 17**            |
| AI (mg L <sup>-1</sup> )            | Afluente | 202 c   | 429 b  | 885 a   | 79     | 33**            |
|                                     | R1       | 164 b   | 348 b  | 796 a   | 88     | 28**            |
| AI/AP                               | R1       | 0,6 a   | 0,5 a  | 1,0 a   | 115    | 2 <sup>ns</sup> |

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



**Figura 21.** Alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI) no afluente e efluente e relação AI/AP no efluente do reator UASB convencional R1 no tratamento de vinhaça sorgo sacarino.

A maior concentração média de AVT foi observada na fase II, com valores superiores a  $780 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 21) e COV média no R1 acima de  $9 \text{ g DQOtotal (L d)}^{-1}$ . Este aumento de AVT pode ser atribuído primeiramente ao aumento da COV nesta fase, provocando o aumento da matéria orgânica do afluente em quantidade maior que a capacidade de degradação pelos microrganismos, não havendo tempo suficiente para a adaptação dos mesmos a carga orgânica aplicada. Além disso, a recirculação do efluente do reator R1 pode ter sido em adição, outro fator que influenciou o aumento de AVT, pois provavelmente, parte dos ácidos produzidos que não foram consumidos pelos micro-organismos retornaram ao processo, conforme também observado por Barros et al. (2017) e Santana Júnior (2018). Zhang et al. (2016) afirmam que a produção de AVT em excesso pode ser observada a partir de substratos facilmente hidrolisados.

Diante do comprometimento do efluente do R1, aos 173º dia de operação, a recirculação foi estratégica e temporariamente interrompida, utilizando água e bicarbonato de amônio no preparo e correção do pH do afluente. Diante disso, observou-se a redução das concentrações de ácidos, restabelecendo o equilíbrio do sistema, que rapidamente retomou o consumo dos ácidos voláteis totais (Figura 22 ).

Na fase II também foram observados os maiores valores da relação AVT/AT, com média de 0,4 no R1 (Tabela 21), em virtude do aumento das concentrações de AVT (Figura 22). No entanto, foram inferiores ao valor indicativo de instabilidade do processo de digestão anaeróbia de 0,8, conforme estabelecido por Zhao e Viraraghavan (2004). Isso foi possível devido a suspensão temporária da recirculação do efluente do reator UASB convencional R1, evitando que o sistema entrasse em colapso, reforçando a importância desta estratégia operacional na manutenção das condições adequadas ao sistema e na preservação da atividade microbiológica. Fuess et al. (2017b) afirma que, independentemente do tipo de agente alcalinizante utilizado, a recirculação de efluentes tende a ser a abordagem mais eficaz e econômica para alcançar uma estratégia de alcalinização eficiente em sistemas completos de tratamento de vinhaça.

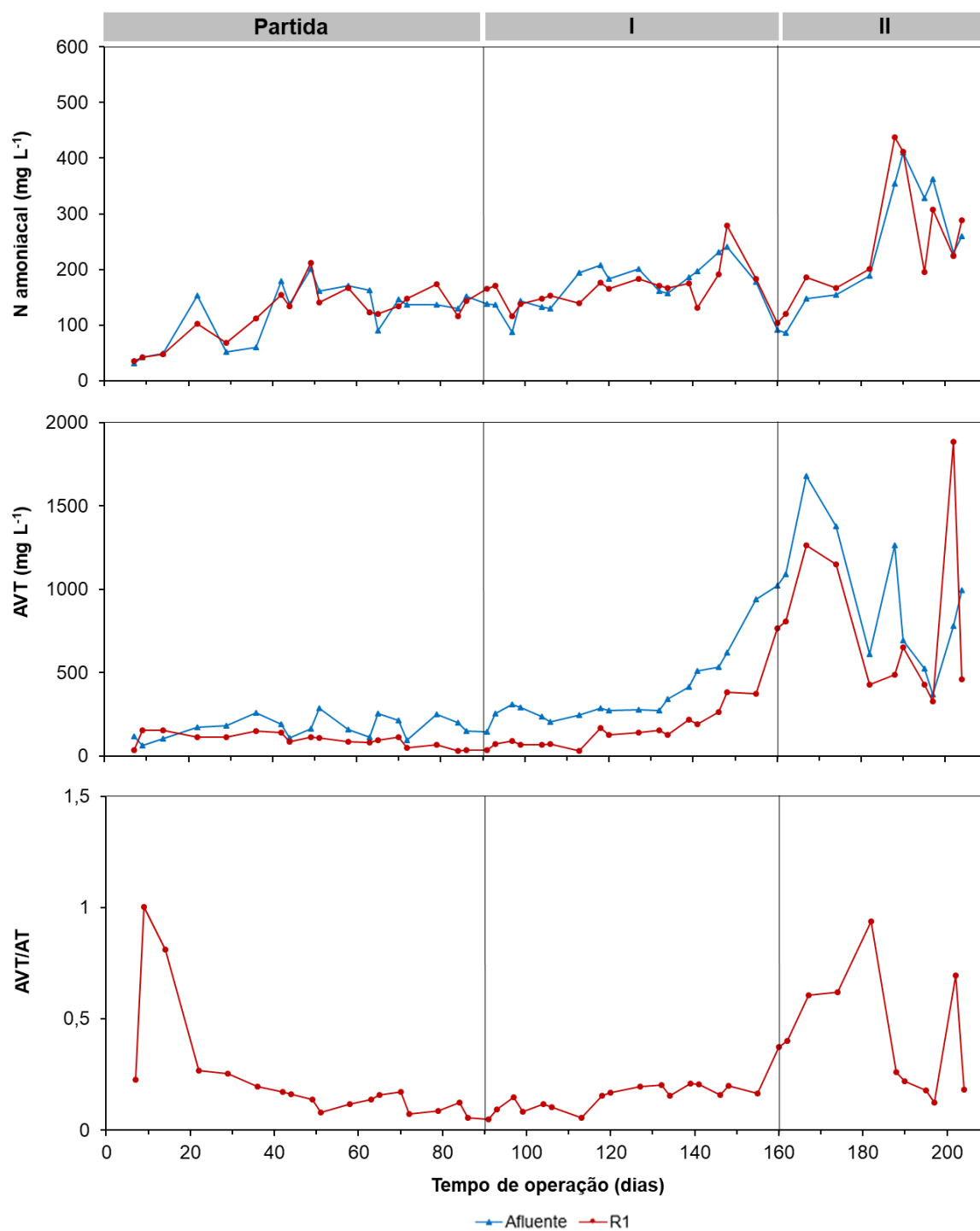
As concentrações de nitrogênio amoniacal no reator UASB convencional R1 se mantiveram-se estáveis. Os maiores valores foram reportados na fase II, com valores médios de  $218$  e  $177 \text{ mg L}^{-1}$  para o afluente e R1, respectivamente,

podendo atribuí-los a aplicação da maior COV, à retomada da recirculação total do afluente, bem como ao uso de bicarbonato de amônio. O N-am é indispensável para estabilidade, visto que é nutriente essencial para digestão microbiana, e além disso, é fator importante para melhora da alcalinidade do sistema, de acordo com Ariunbaatar et al. (2015). As concentrações de N-am reportadas neste trabalho foram próximas as observadas por Barros et al. (2017) e Souza (2022) no tratamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar e são consideradas benéficas para a digestão anaeróbia, uma vez que se encontram abaixo da faixa capaz de causar toxicidade em microrganismos metanogênicos, de 1500 a 3000 mg L<sup>-1</sup> conforme preconizam Hejnfelt e Angelidaki (2009).

**Tabela 21.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) do nitrogênio amoniacal (N-am), ácidos voláteis totais (AVT), no afluente e efluente e relação AVT/AT no efluente do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio de vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros                          |          | Fases   |        |         | CV (%) | Teste F |
|-------------------------------------|----------|---------|--------|---------|--------|---------|
|                                     |          | Partida | I      | II      |        |         |
| Tempo de operação (dias)            |          | 1-91    | 92-160 | 161-204 |        |         |
| COV-R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 1,6     | 5,3    | 9,5     |        |         |
| N-am (mg L <sup>-1</sup> )          | Afluente | 127 c   | 175 b  | 218 a   | 33     | 19**    |
|                                     | R1       | 98 b    | 146 a  | 177 a   | 36     | 15**    |
| AVT (mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 171 c   | 415 b  | 938 a   | 38     | 31**    |
|                                     | R1       | 94 c    | 197 b  | 789 a   | 130    | 27**    |
| AVT/AT                              | R1       | 0,2 ab  | 0,16 b | 0,4 a   | 93     | 4*      |

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



**Figura 22.** Nitrogênio amoniacal e ácidos voláteis totais (AVT) no afluente e efluente e relação ácidos voláteis totais/alcalinidade total (AVT/AT) no efluente do reator UASB convencional R1, no tratamento de vinhaça de sorgo sacarino.

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

Os valores de DQO total variaram entre 794 e 4764 mg L<sup>-1</sup> no afluente e entre 267 e 2456 mg L<sup>-1</sup> no R1, enquanto a média da DQO dissolvida variou de 670 a 3700 mg L<sup>-1</sup> no afluente e de 186 a 1549 mg L<sup>-1</sup> no R1 (Tabela 22), acompanhando o aumento progressivo da COV. Estatisticamente, não houve diferença significativa para eficiências de remoção tanto de DQO total, quanto de DQO dissolvida no reator UASB convencional R1, entre as fases, e este resultado pode ser atribuído a operação em estágio único. No entanto, foram observados valores médios acima de 45 e 50% para DQO total e dissolvida, respectivamente.

Ferraz Jr. et al. (2016) ao avaliarem o desempenho de reatores tratando vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas de estágio único (UASB I) e em dois estágios (UASB II), com sistema APBR acidogênico em paralelo, verificaram maior eficiência de remoção de DQO total no sistema UASB em dois estágios, com 74%, contra 60% observado no sistema de estágio único. Barros et al., (2017), analisando a produção de metano de vinhaça de cana-de-açúcar com suplementação com torta de filtro em dois reatores UASB em série mesofílicos, obtiveram eficiência de remoção de DQO total de 60% para o sistema (R1 + R2) com COV de 31 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>.

Neste mesmo sentido, Santos et al. (2017) ao usarem biorreator de membrana bifásica anaeróbio em dois estágios (SAnMBR) tratando o mesmo substrato, com de COV de até 6,0 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>, constataram eficiência média de remoção de matéria orgânica de até 97%. Estes resultados ressaltam a relevância do tratamento anaeróbio de substratos em dois estágios, pois este tipo de configuração permite que o tratamento do efluente ocorra em duas fases distintas, cada uma otimizando diferentes aspectos do processo de degradação da matéria orgânica.

De modo geral, espera-se que o aumento da COV resulte no aumento gradual da produção de biogás, em virtude da maior disponibilidade de substrato a ser convertido pelos microrganismos, conforme preconiza Grover et al. (1999). Ocorre que, embora não tenha apresentado diferença significativa, na fase II deste estudo, em que maior COV foi aplicada, obteve-se baixa produção

volumétrica de metano, com  $0,112 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$ , bem como ligeira diminuição na produção específica de metano, com valores médios de  $0,023 \text{ L CH}_4 (\text{g DQO}_{\text{total removida}})^{-1}$  (Tabela 22 e Figura 23).

Este resultado, provavelmente decorre do acúmulo de AVT também observado, que não foram consumidos pelos micro-organismos, inibindo a atividade metanogênica (Bouallagui et al., 2005). Além disso, o sistema com UASB convencional em estágio único, pode ter contribuído para os baixos valores de PVM e PEM observados, uma vez que podem apresentar menor eficiência na remoção de matéria orgânica, implicando, conseqüentemente em menor produção de biogás, conforme também constatado por Meng et al. (2017), avaliando a produção de metano em um reator anaeróbio de leito fixo de dois estágios e um em escala de laboratório, de estágio único, utilizando melaço.

O aumento da produção de metano com a elevação da COV, tem sido avaliado e as vantagens do sistema de dois estágios destacadas em reatores UASB (Barros et al., 2017; Suárez et al., 2018) e RALF em série (Santana Júnior, 2018; Ramos et al., 2021).

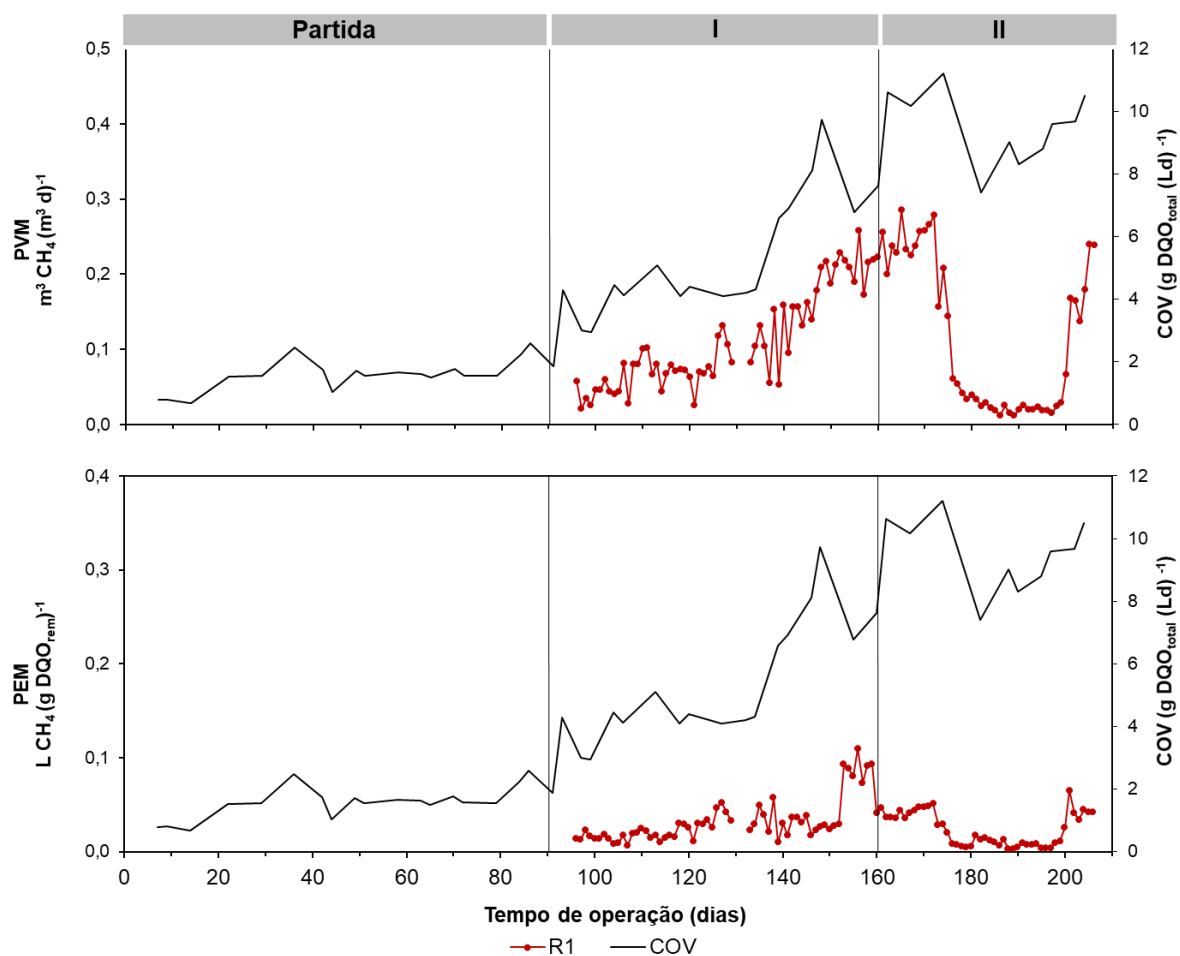
Cabrera-Díaz et al. (2017) avaliaram o tratamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar bruta em sistema combinado composto por um reator UASB e um reator anaeróbio de leito fixo (APBR), com COVs de  $12,5 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$  e  $4,4 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ , respectivamente, constatando evidente melhoria do processo com a combinação dos dois reatores anaeróbios metanogênicos (UASB + APBR), resultando em maior eficiência de remoção de DQO (86,7%), e teor de  $\text{CH}_4$ .

Em outro estudo, Toledo-Cervantes et al., (2018) ao avaliarem a digestão anaeróbica de vinhaça de tequila em reatores de leito fixo (PBR) de fluxo ascendente em dois estágios, a  $35^\circ\text{C}$ , utilizando tubos de PVC como meio suporte, alcançaram produção específica de metano para o sistema de  $0,29 \text{ L (g DQO}_{\text{total removida}})^{-1}$ , com COV de  $9,5 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$ , valores superiores aos encontrados neste estudo, com mesma COV. Lima (2022), aplicando COV de  $7,1 \text{ g DQO}_{\text{total}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar e lodo de ETA, em reatores UASB termofílicos em dois estágios, obteve remoção de DQO total de 36% para R1 e 13% para R2, resultando em PVM de 0,43 e 0,03  $\text{L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$  e PEM de 0,23 e 0,04  $\text{L (g DQO}_{\text{total removida}})^{-1}$  em R1 e R2, respectivamente.

**Tabela 22.** Valores médios e coeficiente de variação (CV) de DQO<sub>total</sub> e dissolvida (DQO<sub>Diss</sub>) no afluente e efluente e respectivas eficiências de remoção, produção volumétrica e específica de metano no reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros                                                    |                 | Fases   |         |         | CV (%) | Teste F           |
|---------------------------------------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|--------|-------------------|
|                                                               |                 | Partida | I       | II      |        |                   |
| <b>Tempo de operação</b> (dias)                               |                 | 1-91    | 92-160  | 161-204 |        |                   |
| <b>COV-R1</b> (g DQO (L d) <sup>-1</sup> )                    |                 | 1,6 c   | 5,3 b   | 9,5 a   | 71     | 119**             |
| <b>DQO<sub>total</sub></b> (mg L <sup>-1</sup> )              | <b>Afluente</b> | 794 c   | 2670 b  | 4764 a  | 71     | 152**             |
|                                                               | <b>R1</b>       | 267 c   | 1042 b  | 2456 a  | 94     | 45**              |
| Eficiência de remoção de DQO total (%)                        | <b>R1</b>       | 62 a    | 61 a    | 47 a    | 30     | 2 <sup>ns</sup>   |
| <b>DQO<sub>Diss</sub></b> (mg L <sup>-1</sup> )               | <b>Afluente</b> | 670 c   | 2507 b  | 3700 a  | 72     | 43**              |
|                                                               | <b>R1</b>       | 186 a   | 790 ab  | 1549 a  | 88     | 8**               |
| Eficiência de remoção de DQO total (%)                        | <b>R1</b>       | 72 a    | 67 a    | 54 a    | 22     | 2 <sup>ns</sup>   |
| <b>PVM</b> (L CH <sub>4</sub> (L d) <sup>-1</sup> )           | <b>R1</b>       | -       | 0,108 a | 0,112 a | 40     | 0,1 <sup>ns</sup> |
| <b>PEM</b> (L CH <sub>4</sub> (g DQOremovida) <sup>-1</sup> ) | <b>R1</b>       | -       | 0,031 a | 0,023 a | 51     | 4 <sup>ns</sup>   |

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



**Figura 23.** Produção volumétrica (PVM) e específica (PEM) de metano e carga orgânica volumétrica (COV) do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino.

### 5.3.3. Sólidos totais e voláteis do lodo

Os valores de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) no lodo do reator UASB R1, aumentaram durante a operação com o aumento gradual da COV (Tabela 23 e Figura 24), indicando que houve crescimento na manta de lodo do reator. Ao longo da altura do UASB R1, as maiores concentrações de SV foram observadas nos pontos inferiores representados por P1 e P2, com valores de 118 g L<sup>-1</sup> e 43 g L<sup>-1</sup>, na Fase II. As menores concentrações foram observadas nos pontos P3 e P4, pontos superiores da coleta de lodo, cujas concentrações máximas foram de 15 e 5 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, na última fase de operação.

A relação SV/ST, que expressa a proporção de matéria orgânica volátil em relação à matéria orgânica total presente em uma amostra, também é demonstrada neste estudo no UASB R1, no tratamento da vinhaça de sorgo. Essa relação é frequentemente utilizada para avaliar a composição da biomassa em sistemas biológicos, como os reatores anaeróbios (Villa-Montoya; Ferro; Oliveira, 2017). Os valores de ST/SV do lodo na parte inferior do reator (P1 e P2), foram maiores que as observadas nos pontos superiores (P3 e P4) e não apresentaram diferença estatística entre as fases de operação (Tabela 23).

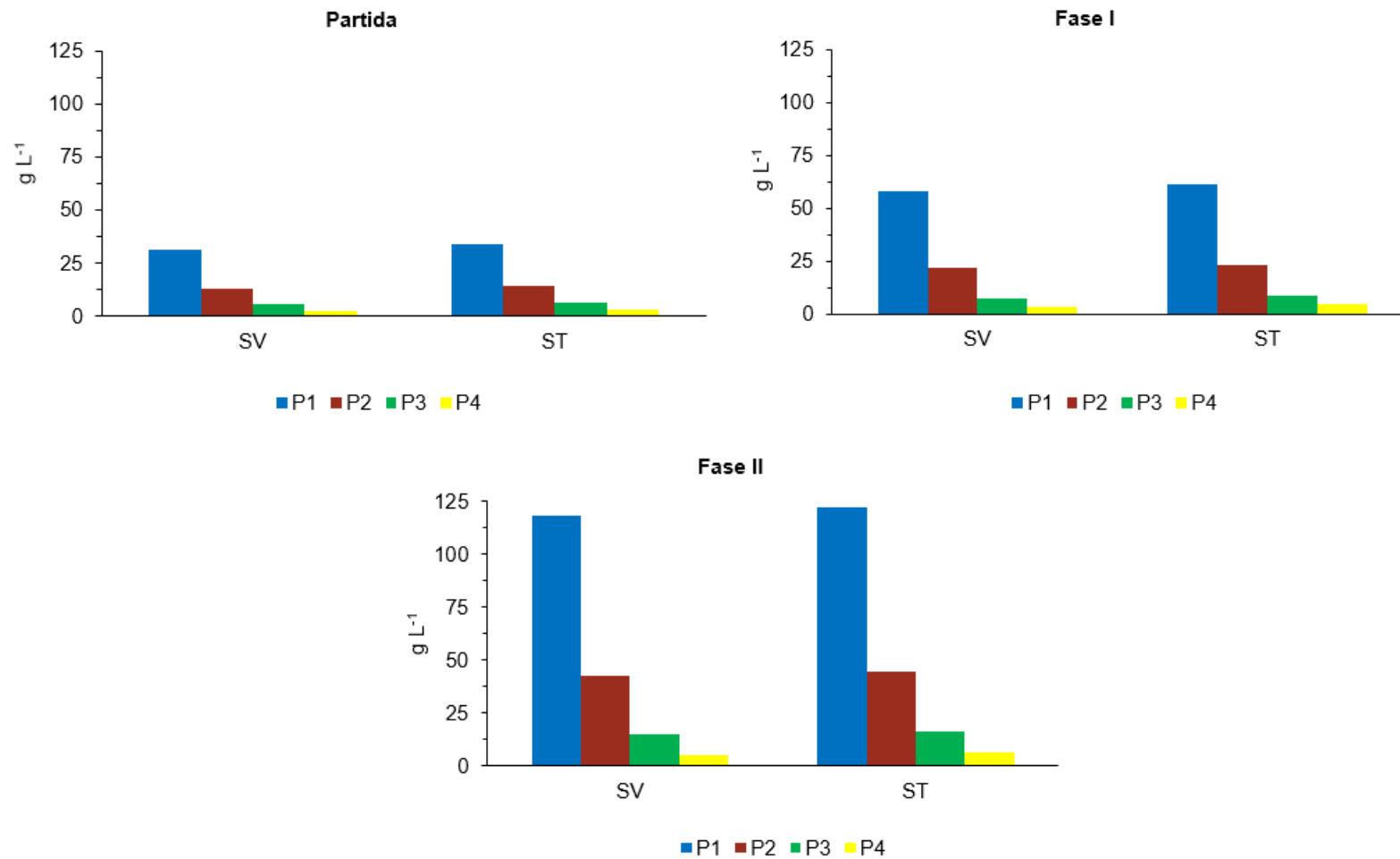
Observa-se, no entanto, que, para fins de utilização agrícola, o lodo deste reator não atenderia aos padrões de estabilidade, conforme a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 498/2020, que estabelece para tal, valores da relação SV/ST menores que 0,7 para lodo de esgoto e derivados. Além disso, os valores da relação evidenciados, excluem a necessidade de descarte do lodo, denotando que se deve manter nos reatores a maior quantidade de material orgânico e de microrganismos, resultando em maior atividade dos mesmos (Oliveira, 1997).

O desenvolvimento do lodo evidenciado durante o período experimental, permitiu o desenvolvimento e manutenção de uma microbiota adaptada às condições impostas, contribuindo para o bom desempenho e estabilidade do reator.

**Tabela 23.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), em mg L<sup>-1</sup> e da relação SV/ST nos 4 pontos de coleta de lodo do reator UASB R1 nas fases partida, I e II no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros |       | Fases   |        |        | CV (%) | Teste F         |
|------------|-------|---------|--------|--------|--------|-----------------|
|            |       | Partida | I      | II     |        |                 |
| P1         | ST    | 34 c    | 61 b   | 122 a  | 3,6    | 58**            |
|            | SV    | 31 c    | 58 b   | 118 a  | 3,0    | 93**            |
|            | SV/ST | 0,92 b  | 0,95 a | 0,97 a | 1,0    | 25**            |
| P2         | ST    | 14 c    | 23 b   | 44 a   | 6,0    | 158**           |
|            | SV    | 13 c    | 22 b   | 43 a   | 8,0    | 123**           |
|            | SV/ST | 0,91 a  | 0,95 a | 0,97 a | 2,0    | 5 <sup>ns</sup> |
| P3         | ST    | 7 c     | 9 b    | 17 a   | 10,0   | 52**            |
|            | SV    | 5 b     | 8 b    | 15 a   | 11,0   | 51**            |
|            | SV/ST | 0,82 b  | 0,86 b | 0,93 a | 1,0    | 76**            |
| P4         | ST    | 3 a     | 4 a    | 7 a    | 20,0   | 6 <sup>ns</sup> |
|            | SV    | 2 a     | 3 a    | 5 a    | 24,0   | 7 <sup>ns</sup> |
|            | SV/ST | 0,74 b  | 0,78 a | 0,83 a | 2,0    | 52**            |

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



**Figura 24.** Concentrações de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) nos 4 pontos de coletas de lodo do reatores UASB R1 nas fases partida, I e II e III no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino

#### **5.3.4. Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV)**

As concentrações de SST do afluente aumentaram gradualmente, acompanhando o aumento progressivo da COV ao longo das fases de operação (Tabela 24). Para a fração de SSF dos sólidos totais do afluente do sistema, as maiores concentrações foram constatadas na fase II, com COV média de 9,5 g DQO (L d)<sup>-1</sup>. Para os SSV, também foi observada uma tendência ao aumento das concentrações no afluente, à medida em que a COV foi elevada, com maior média na última fase de operação.

Os valores médios de SST, SSF e SSV, mensurados do afluente ao efluente dos reatores foram decrescentes (Tabela 24), indicando que houve redução do teor de sólidos suspensos pelo reator UASB R1, no entanto não foi observada diferença significativa na eficiência de remoção de nenhuma das frações entre as fases de operação.

Sousa (2022) e Nunes (2022) verificaram que as concentrações de sólidos suspensos totais (SST) e da fração orgânica (SSV) foram reduzidas no decorrer do conjunto de reatores anaeróbios horizontais, dispostos em série, no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar. Foram observadas eficiências de remoção de até 84 e 89% para SST e SSV, respectivamente no primeiro trabalho, com COV média de 17,8 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup> e de 55 e 64% no segundo, com COV média de 14,31 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. Resultados também promissores foram observados por Quintanilha (2022), com 89 e 88% de eficiência de remoção de SST e SSV em reatores UASB em série, tratando água residuária de cervejaria, com valor médio de COV de 27,4 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>.

Observa-se, então, a vantagem do uso de sistemas de tratamento anaeróbio em dois estágios, em relação ao sistema de único estágio, como o deste estudo, nos quais, com o segundo reator, aumentam as eficiências de remoção e estabilização da matéria orgânica, melhorando a qualidade do efluente final, conforme foi observado nos estudos supracitados.

**Tabela 24.** Valores médios e coeficientes de variação (CV) das concentrações de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) no afluente e efluente do reator UASB R1 e eficiências de remoção no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros                       |                 | Fases   |       |       | CV (%) | Teste F           |
|----------------------------------|-----------------|---------|-------|-------|--------|-------------------|
|                                  |                 | Partida | I     | II    |        |                   |
| <b>SST</b> (mg L <sup>-1</sup> ) | <b>Afluente</b> | 88 b    | 127 b | 200 a | 48     | 15**              |
|                                  | <b>R1</b>       | 45 a    | 71 a  | 83 a  | 49     | 2 <sup>ns</sup>   |
| Eficiência de remoção (%)        | <b>R1</b>       | 46 a    | 45 a  | 56 a  | 45     | 0,5 <sup>ns</sup> |
| <b>SSF</b> (mg L <sup>-1</sup> ) | <b>Afluente</b> | 32 b    | 43 b  | 98 a  | 69     | 16**              |
|                                  | <b>R1</b>       | 13 a    | 32 a  | 40 a  | 85     | 3 <sup>ns</sup>   |
| Eficiência de remoção (%)        | <b>R1</b>       | 57 a    | 43 a  | 51 a  | 58     | 0,5 <sup>ns</sup> |
| <b>SSV</b> (mg L <sup>-1</sup> ) | <b>Afluente</b> | 57 a    | 83 a  | 102 a | 64     | 2 <sup>ns</sup>   |
|                                  | <b>R1</b>       | 32 a    | 39 a  | 42 a  | 77     | 0,1 <sup>ns</sup> |
| Eficiência de remoção (%)        | <b>R1</b>       | 42 a    | 47 a  | 58 a  | 57     | 0,6 <sup>ns</sup> |

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.

### 5.3.5. Diversidade microbiana no inóculo e nos reatores anaeróbios

Os resultados da análise da comunidade microbiana no lodo do reator UASB convencional R1, revelaram que os filos bacterianos mais abundantes foram Firmicutes, Chloroflexi e Bacteroidota, seguidos por Desulfobacterota, Spirochaetota, Synergistota e Proteobacteria (Tabela 25 e Figura 25 A).

O filo Firmicutes, de acordo com Yin et al. (2016) e Venkata Moham et al. (2011), é composto por microrganismos facultativos amplamente conhecidos pela produção de celulases, lipases e outras enzimas extracelulares, bem como ácidos orgânicos, tais como propiônico, butírico e seus derivados. Neste filo também estão incluídas as bactérias das classes Clostridia e Bacilli, maioritariamente observadas nestes estudo (Tabela 25), responsáveis pela quebra de compostos orgânicos complexos (Wirth et al., 2012).

A classe Bacilli foi representada pela presença significativa do gênero *Trichococcus*. Sua abundância pode estar relacionada a versatilidade metabólica desse gênero, bem como a variedade de condições ambientais em que sobrevivem. O gênero é formado por microrganismos fermentativos, que em ambientes anaeróbios produzem acetato, lactato, formiato e etanol a partir de glicose (Rainey, 2005). O que justifica a presença predominante destes microrganismos no reator, contribuindo para a degradação da vinhaça de sorgo sacarino, substrato rico em açúcares fermentáveis, incluindo a glicose.

O filo Chloroflexi, também abundante neste estudo (Figura 25 A), tem sido se destacado em alguns sistemas de digestão anaeróbia desempenhando funções importantes no processo, devido a sua ligação na degradação de carboidratos (Si et al., 2016; Sundberg et al., 2013) e também foi relatado no estudo de Barros et al. (2017) no tratamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar com suplementação de torta de filtro em reatores UASB mesofílicos. Nota-se que, do filo Chloroflexi foi encontrada apenas a ordem Anaerolineae, com maior abundância relativa do gênero *Anaerolineaceae* UCG-001, pertencente à família Anaerolineaceae (Tabela 25).

Lou et al. (2024) destacam este gênero foi relatado como excelente no consumo de fontes de carbono para remoção de nitrogênio. Além disso, segundo Zamanzadeh et al. (2016) e Greses et al. (2017) as bactérias do filo Chloroflexi

predominam em sistemas anaeróbios com concentrações de amônia em torno de 284 mg L<sup>-1</sup>, valores próximos aos obtidos neste estudo.

O filo Bacteroidota, foi encontrado em considerável abundância (Figura 25 A), e é composto por bactérias envolvidas na hidrólise e acidogênese (Dias et al., 2016), com grande relevância na degradação de polímeros complexos (Jabari et al., 2016), produzindo propionato e acetato como na fermentação (Desvignes et al., 2009). Deste filo, apenas os gêneros *Macellibacteroides* e *DMER64* foram identificados neste estudo. A presença deste primeiro, de acordo com Zhang et al., (2022), está associada à formação de ácidos na digestão anaeróbia e tem sido relatada como proeminente na degradação de matéria orgânica em reatores anaeróbios (Zhou et al., 2021). Já o segundo, é reconhecidamente membro ativo da comunidade bacteriana sintrófica em sistemas de digestão anaeróbia, sendo potencialmente benéfico na transferência de elétrons entre as espécies (Lee et al., 2019).

O gênero *Desulfovibrio* também foi observado neste estudo, com abundância 8,5% (Figura 26 A, Tabela 25), podendo estar relacionada a presença de compostos sulfurados encontrados na vinhaça de sorgo, uma vez que este gênero é composto por bactérias gram-negativas redutoras de sulfato a sulfeto (Dias, 2015), apresentando como fontes de carbono preferenciais, compostos orgânicos como lactato, piruvato, malato e álcoois, como o etanol, propanol e butanol (Gibson, 1990). De acordo com Shah et al. (2014), *Desulfovibrio* pode participar, juntamente com o gênero *Methanobacterium*, na formação de ácido acético e H<sub>2</sub> no processo de digestão anaeróbia, utilizando o sulfato e lactato para dar origem aos produtos supracitados.

A abundância de Spirochaetota observada neste estudo foi de 2,88%. De acordo com Karakashev et al. (2006) e Lee et al. (2015) estes microrganismos são oxidantes de acetato sintrófico, o que segundo o primeiro autor, pode comprometer a produção de metano nos reatores. Além disso Si et al. (2016) e Lee et al., (2013) afirmam que a abundância destes microrganismos se correlaciona negativamente a alcalinidade do sistema de digestão anaeróbia, pois a reação de oxidação de acetato sintrófico é dificultada em condições alcalinas, devido aos aspectos termodinâmicos

desfavoráveis ( $\Delta G_0 = +105$  KJ), no entanto correlaciona-se positivamente com as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Em relação às arqueias, o filo Euryarchaeota apresentou maior representatividade (Figura 24 B), com abundância significativa do gênero *Methanobacterium* (Tabela 25). De acordo com Bolello-Suárez et al. (2018), a predominância dos microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos, representados pela ordem Methanobacteriales, pode ser explicada principalmente pela diferença na taxa de crescimento específica entre os metanógenos acetoclásticos e hidrogenotróficos. Neste estudo foi constatada a presença de bactérias sintróficas produtoras de hidrogênio, tais como as famílias Desulfovibrionaceae e Spirochaetaceae, que podem ter proporcionado condições favoráveis para a transferência de hidrogênio entre espécies, permitindo o aumento expressivo do metanógeno hidrogenotrófico *Methanobacterium*.

A importante fração destes microrganismos no reator, pode ter proporcionado condições de estabilidade durante a digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo sacarino, no entanto, não levou à produção expressiva de metano. Diferente do observado em estudos anteriores, na digestão anaeróbia de diferentes águas residuária, com altas COV, em que a mudança da via acetoclástica para hidrogenotrófica, bem como a predominância principalmente da ordem Methanobacteriales, proporcionaram produções significativas de metano (Barros et al., 2017, Bolello-Suárez et al., 2018, Jang et al., 2014).

Outro gênero predominante entre as arqueias metanogênicas foi *Methanosarcina*, com abundância relativa de 22,2% (Figura 26 B e Tabela 25). De acordo com Liu e Whitman (2008), os membros de Methanosarcinaceae são metabolicamente versáteis, sendo capazes de usar  $H_2$ - $CO_2$ , acetato e compostos metílicos como substrato. Portanto, a abundância de Methanosarcinaceae pode ser atribuída ao seu metabolismo mixotrófico (Bolello-Suárez et al., 2018).

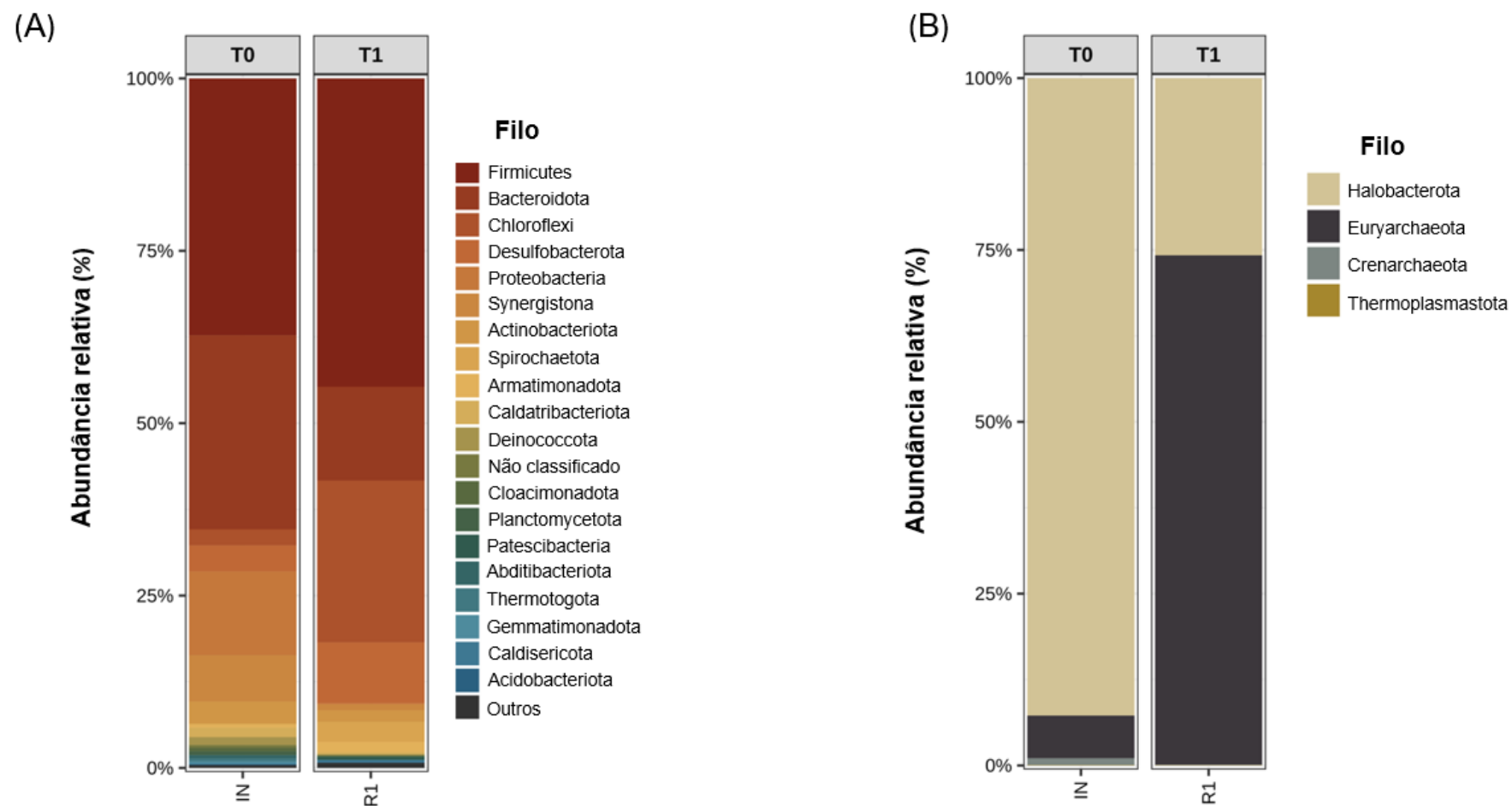
Methanosaeta também foram identificadas no lodo do reator UASB no tratamento da vinhaça de sorgo, com abundância relativa de 3,49% (Tabela 25). Estes microrganismos são estritamente anaeróbios e constituem os principais representante na degradação do acetato, utilizando apenas este composto como

fonte de energia para crescimento, produzindo metano e dióxido de carbono como subprodutos (Kong et al., 2018).

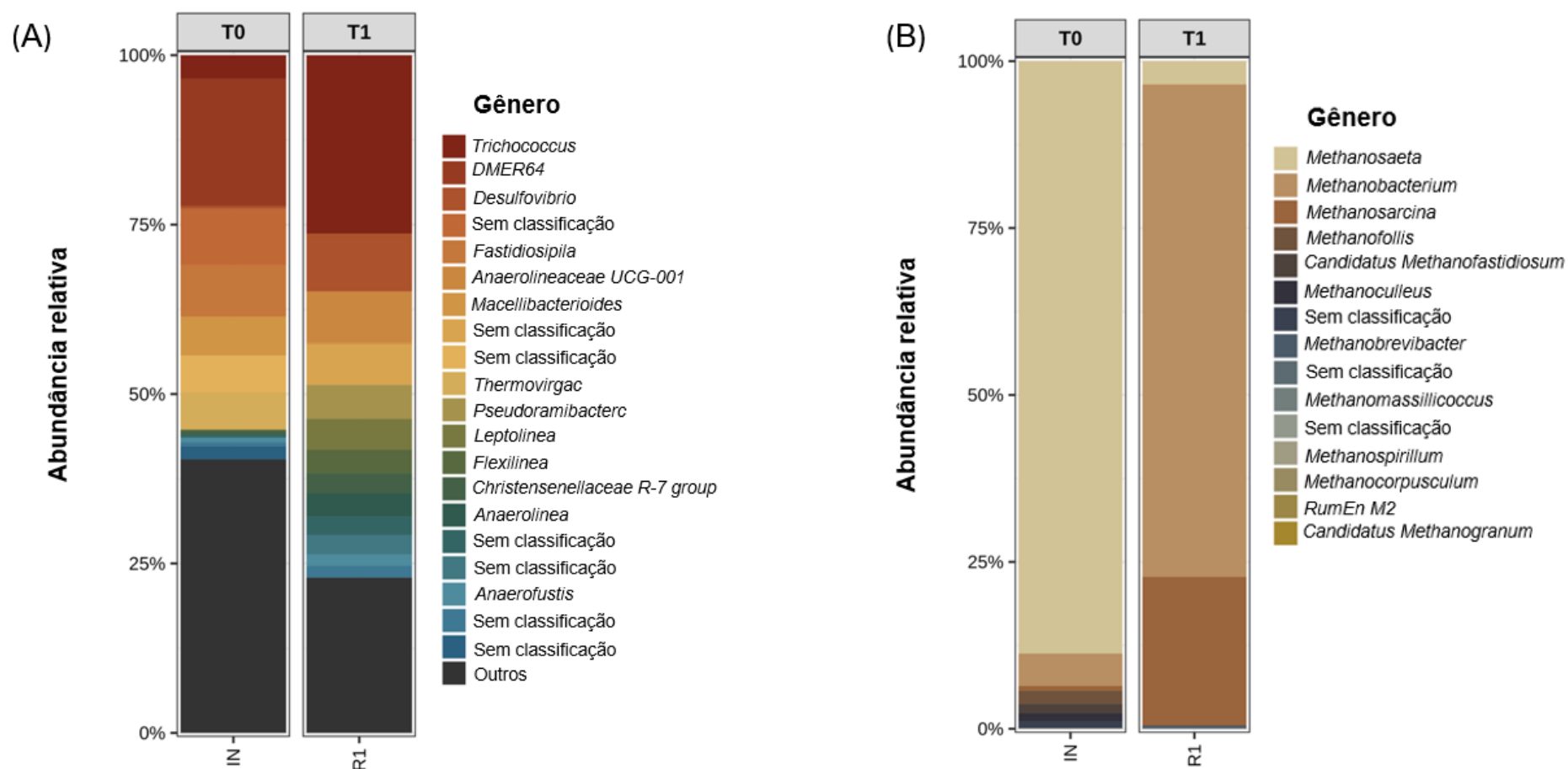
A distribuição das arqueias entre hidrogenotróficas e acetoclásticas como observado no lodo do reator UASB durante o tratamento da vinhaça de sorgo sacarino, neste trabalho, permitiu a produção de  $\text{CH}_4$  a partir do ácido acético,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  produzidos, no entanto, a presença expressiva dos primeiros, indicar que via hidrogenotrófica foi o caminho mais importante para a produção de metano.

**Tabela 25.** Abundância dos principais gêneros das bactérias e aqueias identificadas no lodo do reator UASB convencional R1 no tratamento anaeróbio da vinhaça de sorgo sacarino.

| Dominio  | Filo             | Classe              | Ordem                   | Familia                  | Gênero                               | Etapas de degradação                | R1     |
|----------|------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| Bacteria | Firmicutes       | Bacilli             | Lactobacillales         | Carnobacteriaceae        | <i>Trichococcus</i>                  | Acidogênese                         | 26,33% |
|          | Firmicutes       | Clostridia          | Eubacteriales           | Eubacteriaceae           | <i>Pseudoramibacter</i>              | Acidogênese                         | 5,04%  |
|          | Firmicutes       | Clostridia          | Christensenellales      | Christensenellaceae      | <i>Christensenellaceae R-7</i>       | Hidrólise                           | 2,95%  |
|          | Firmicutes       | Clostridia          | Eubacteriales           | Anaerofustaceae          | <i>Anaerofustis</i>                  | Hidrólise e Acidogênese             | 1,69%  |
|          | Desulfobacterota | Desulfovibrionia    | Desulfovibrionales      | Desulfovibrionaceae      | <i>Desulfovibrio</i>                 | Acetogênese                         | 8,50%  |
|          | Chloroflexi      | Anaerolineae        | Anaerolineales          | Anaerolineaceae          | <i>Anaerolineaceae UCG-001</i>       | Acidogênese                         | 7,55%  |
|          | Chloroflexi      | Anaerolineae        | Anaerolineales          | Anaerolineaceae          | <i>Leptolinea</i>                    | Acidogênese                         | 4,55%  |
|          | Chloroflexi      | Anaerolineae        | Anaerolineales          | Anaerolineaceae          | <i>Flexilinea</i>                    | Acidogênese                         | 3,47%  |
|          | Chloroflexi      | Anaerolineae        | Anaerolineales          | Anaerolineaceae          | Não classificado                     | Hidrólise, acidogênese, acetogênese | 1,72%  |
|          | Bacteroidota     | Bacteroidia         | Sphingobacteriales      | Lentimicrobiaceae        | Não classificado                     | Hidrólise e Acidogênese             | 5,89%  |
|          | Bacteroidota     | Bacteroidia         | Bacteroidales           | Bacteroidetes vadinHA17  | Não classificado                     | Hidrólise e Acidogênese             | 2,75%  |
|          | Bacteroidota     | Bacteroidia         | Bacteroidales           | Tannerellaceae           | <i>Macellibacteroides</i>            | Acetogênese                         | 0,33%  |
|          | Bacteroidota     | Bacteroidia         | Bacteroidales           | Rikenellaceae            | <i>DMER64</i>                        | Hidrólise                           | 0,02%  |
|          | Spirochaetota    | Spirochaetia        | Spirochaetales          | Spirochaetaceae          | Não classificado                     | Acidogênese                         | 2,88%  |
|          | Synergistota     | Synergistia         | Synergistales           | Synergistaceae           | <i>Thermovirga</i>                   | Acidogênese                         | 0,02%  |
|          | Proteobacteria   | Alphaproteobacteria | Rhodobacterales         | Rhodobacteraceae         | Não classificado                     | Hidrólise                           | 0,01%  |
| Archaea  | Euryarchaeota    | Methanobacteria     | Methanobacteriales      | Methanobacteriaceae      | <i>Methanobacterium</i>              | Metanogênese                        | 73,77% |
|          | Euryarchaeota    | Methanobacteria     | Methanobacteriales      | Methanobacteriaceae      | <i>Methanobrevibacter</i>            | Metanogênese                        | 0,19%  |
|          | Euryarchaeota    | Methanobacteria     | Methanobacteriales      | Methanobacteriaceae      | Não classificado                     | Metanogênese                        | 0,12%  |
|          | Euryarchaeota    | Thermococci         | Methanofastidiosales    | Methanofastidiosaceae    | <i>Candidatus Methanofastidiosum</i> | Metanogênese                        | 0,02%  |
|          | Halobacterota    | Methanosarcinia     | Methanosarciniales      | Methanosarcinaceae       | <i>Methanosarcina</i>                | Metanogênese                        | 22,22% |
|          | Halobacterota    | Methanosarcinia     | Methanosarciniales      | Methanosaetaceae         | <i>Methanosaeta</i>                  | Metanogênese                        | 3,49%  |
|          | Halobacterota    | Methanomicrobia     | Methanomicrobiales      | Methanomicrobiaceae      | <i>Methanoculleus</i>                | Metanogênese                        | 0,04%  |
|          | Halobacterota    | Methanomicrobia     | Methanomicrobiales      | Methanomicrobiaceae      | <i>Methanofollis</i>                 | Metanogênese                        | 0,02%  |
|          | Crenarchaeota    | Bathyarchaeia       | Não classificado        | Não classificado         | Não classificado                     | Metanogênese                        | 0,07%  |
|          | Thermoplasmatota | Thermoplasmata      | Methanomassiliicoccales | Methanomassiliicoccaceae | <i>Methanomassiliicoccus</i>         | Metanogênese                        | 0,05%  |



**Figura 25.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos filos Bacteria (A) e Archaea (B) encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo do reator UASB convencional R1 (T1) na fase II do tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.



**Figura 26.** Afiliações taxonômicas e abundância relativa dos gêneros pertencentes aos Domínios Bacteria (A) e Archaea (B) encontrados nas amostras de lodo inóculo (T0) e no lodo do reator UASB convencional R1 (T1) na fase II do tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.

### 5.3.7. Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), Fósforo e Ortofosfato

As concentrações de NTK no afluente variaram de 149 a 258 mg L<sup>-1</sup> nas fases de operação, enquanto as de P-Total variaram de 14 a 20 mg L<sup>-1</sup> e as de ortofosfato de 2,6 a 8,1 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 26). Estes valores, de maneira geral, foram inferiores aos encontrados em estudos anteriores, no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar.

Lima (2022), encontrou valores de NTK no afluente variando entre 258 e 780 mg L<sup>-1</sup>, e P-Total na faixa de 42,4 a 84 mg L<sup>-1</sup>, com COVs de 5,5 a 23,3 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. No estudo de Nunes (2022), os valores de NTK verificados no afluente variaram de 647 a 802 mg L<sup>-1</sup>, enquanto P-Total variou na faixa de 56,8 a 172,5 mg L<sup>-1</sup>, onde a COV aplicada de maneira decrescente, foi de 19,68 a 14,31 g DQOtotal (L d)<sup>-1</sup>. Souza (2022) constatou variações ainda maiores de NTK e P-Total no afluente de reatores horizontais no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, com valores de 461 a 922 mg L<sup>-1</sup> para NTK e de 15 a 40 mg L<sup>-1</sup> para P-Total.

Sabe-se que, tal como ocorre para a cana-de-açúcar, as concentrações de nutrientes contidas na vinhaça de sorgo sacarino podem variar conforme a característica da matéria-prima e do processo produtivo de geração do etanol. Neste estudo, o próprio caldo de sorgo apresentava baixas concentrações de macro e micronutrientes, conforme observado na Tabela 5, o que pode ter refletido diretamente nos baixos valores desses nutrientes observados no afluente e efluente do reator UASB R1 no tratamento da vinhaça de sorgo.

As concentrações nutricionais do afluente merecem atenção especial, dado que, conforme Souza (1984), o resíduo a ser tratado necessita de quantidades adequadas de nitrogênio e fósforo para a digestão anaeróbia. Quando este não os possuir em quantidades necessárias, deve-se adicioná-los ao sistema, pois são indispensáveis para acelerar a taxa metabólica nos microrganismos envolvidos no processo de degradação e estabilização da matéria orgânica e por sua vez, pode implicar em maiores produções volumétricas e específicas de metano (Mehariya et al., 2018).

**Tabela 26.** Valores médios das concentrações de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), fósforo total (P-Total) e ortofosfato no afluente e efluente do reator UASB R1 e eficiências de remoção durante as fases Partida, I e II do tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.

| Parâmetros                          |          | Fases   |        |         | CV (%) | Teste F         |
|-------------------------------------|----------|---------|--------|---------|--------|-----------------|
|                                     |          | Partida | I      | II      |        |                 |
| Tempo de operação (dias)            |          | 1-91    | 92-160 | 161-204 |        |                 |
| COV-R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 1,6     | 5,3    | 9,5     |        |                 |
| NTK (mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 149 c   | 205 b  | 258 a   | 25     | 70**            |
|                                     | R1       | 114 c   | 159 b  | 212 a   | 28     | 56**            |
| Eficiência de remoção (%)           | R1       | 24 a    | 22 a   | 18 a    | 27     | 2 <sup>ns</sup> |
| P-Total (mg L <sup>-1</sup> )       | Afluente | 14 c    | 18 b   | 20 a    | 15     | 87**            |
|                                     | R1       | 12 c    | 15 b   | 18 a    | 16     | 78**            |
| Eficiência de remoção (%)           | R1       | 14 a    | 11 a   | 13 a    |        | 1 <sup>ns</sup> |
| Ortofosfato (mg L <sup>-1</sup> )   | Afluente | 2,6 c   | 4,4 b  | 8,1 a   | 57     | 43**            |
|                                     | R1       | 1,5 b   | 2,2 b  | 5,2 a   | 64     | 21**            |
| Eficiência de remoção (%)           | R1       | 41 a    | 51 a   | 34 a    | 42     | 2 <sup>ns</sup> |

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.

### 5.3.8. Macro e micronutrientes

De acordo com Chernicharo (2016), as necessidades nutricionais das populações microbianas são geralmente definidas com base na composição química das células, e, uma vez que, a composição exata dessas células raramente é conhecida, os requisitos de nutrientes são estimados a partir de uma composição empírica. Isso se deve ao fato de que quase todas as células vivas são constituídas por tipos semelhantes de compostos, com composições químicas parecidas, requerendo, portanto, os mesmos elementos em proporções similares. Além disso, caso as concentrações ideais de nutrientes não sejam fornecidas, deve-se adotar alguma forma de compensação, incluindo a aplicação de menores cargas orgânicas ao sistema de tratamento ou permitindo uma redução na eficiência do processo.

De maneira geral, o processo de digestão anaeróbia exige tanto a presença de macronutrientes como micronutrientes, em níveis suficientes para garantir um sistema eficiente e estável. Os macronutrientes são essenciais para o crescimento e divisão celular e metabolismo dos microrganismos metanogênicos (Scherer, Lippert e Wolff, 1984). Já em se tratando dos micro, estes são elementos exigidos em menores concentrações, sendo utilizados como cofatores enzimáticos (Hendriks et al., 2018). De acordo com Schmidt et al. (2014), a deficiência destes pode causar a diminuição do desempenho da digestão anaeróbia e aumento das concentrações de AVT.

Neste estudo, as concentrações dos macronutrientes (Na, Ca, K e Mg) e micronutrientes (Fe, Ni, Co, Zn, Mn e Cu) no afluente, aumentaram com o acréscimo da COV ao longo das fases de operação do reator UASB convencional (R1), alcançando valores máximos na fase II, cuja COV média foi de 9,5 g DQO<sub>total</sub> (L d)<sup>-1</sup>. Nessa fase, as concentrações de Na, Ca, K e Mg foram de aproximadamente de 3,7, 67,6, 270,7 e 1,12 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto Fe, Ni, Co, Zn, Mn e Cu exibiram concentrações de 1,56; 0,04; 0,21; 0,17; 0,15 e 0,05 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 27 e 28).

Embora as concentrações dos macronutrientes Sódio e Magnésio tenham diminuído do afluente para efluente neste estudo, as remoções de ambos foram baixas, sendo máximas de 12 e 20%, respectivamente, na fase II de operação, em que a PEM foi ligeiramente maior (Tabela 21). Esses macronutrientes participam ativamente da síntese de ATP e atividade enzimática principalmente dos microrganismos metanogênicos (Schlegel e Muller, 2013; Takashima et al., 2009), sendo, portanto, indispensáveis no processo de digestão anaeróbia. Além disso, o sódio também é essencial no metabolismo dos microrganismos anaeróbios por regular o equilíbrio osmótico e o transporte de nutrientes (Ferry, 2020), impactando diretamente a eficiência na produção de biogás, já o magnésio, por constituir um sal inorgânico, apresenta características de fertilizante (Fukushima, 2019).

Neste estudo, as maiores concentrações de Ca e K foram observadas na fase II da digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo sacarino, em que foi constatada maior alcalinidade e PVM ligeiramente maior (Tabelas 20 e 22). Segundo Yang et al. (2021), esses macronutrientes são essenciais à digestão anaeróbia, uma vez que atuam no tamponamento e estabilidade do processo, contribuindo, conseqüentemente para melhor da produção de hidrogênio e metano. As concentrações de K observadas no afluente na digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo sacarino se aproximam dos observados nos estudos de Souza (2022) e Santana Júnior (2018) na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores horizontais de alta taxa, cujos valores máximo correspondem a 185 e 111 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente,. De acordo com Chen (2008), concentrações de potássio menores que 400 mg L<sup>-1</sup> melhoram o desempenho em reatores anaeróbios termofílicos e mesofílicos.

No que diz respeito aos micronutrientes, Araújo et al. (2013) avaliaram os efeitos da suplementação dos micronutrientes Ferro, Níquel e Cobalto, na digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reatores UASB termofílicos operados em série. Os resultados mostraram que a adição desses elementos aumentou a produção volumétrica de metano, corroborando os observados neste estudos para a digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo

sacarino, em que as maiores concentrações Fe, Ni e Co ocorreram na fase II de operação, com maior PVM.

De acordo com Patidar e Tare (2006) e Wang et al. (2018), os metais Zinco e Cobre são essenciais para microrganismos anaeróbios, pois atuam diretamente nas etapas de hidrólise e acidogênese da digestão anaeróbia. Neste estudo, as maiores concentrações de ambos os micronutrientes no afluente foram observadas na fase II, sendo estas de 0,17 e 0,05 mg L<sup>-1</sup>. Nesta mesma fase, também foi constatada maior concentração média de AVT, de 938 mg L<sup>-1</sup> e PVM ligeiramente maior, de 0,112 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup> (Tabelas 21 e 22). Wang et al. (2015) relataram um aumento de 70% na atividade metabólica metanogênica ao adicionar 1,1 mg Zn /g DQO à digestão anaeróbia de resíduo de caixa de gordura. Já Wang et al. (2017), relataram que ao adicionar 5 g CuSO<sub>4</sub> /kg esterco suíno, o rendimento de biogás de um digestor de esterco suíno aumentou entre 16 e 33%.

Em se tratando da eficiência de remoção, exceto para Ni e Cu, que apresentaram ligeiro aumento entre as fases de operação, ainda que sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ), estas tanto para macro quanto para micronutrientes, foram baixas. Reatores UASB, embora apresentem eficiência na remoção de matéria orgânica, apresentam limitações na remoção de nutrientes, sobretudo em estágio único, sendo necessário para isso, a utilização de etapas de pós-tratamento (Rajeshwari et al., 2000; Van Lier et al., 2008). Segundo Barros et al. (2016) e Wilkie et al. (2000), durante a degradação anaeróbia de certos substratos orgânicos, a maior parte da matéria orgânica é removida, mas os nutrientes e alguns compostos orgânicos recalcitrantes de difícil degradação tendem a se acumular no efluente.

**Tabela 27.** Valores médios e coeficiente de variação (C.V) de macronutrientes no afluente e efluentes e suas respectivas eficiências de remoção reator R1 durante as fases de operação.

| Parâmetros                            |          | Fases   |          |           | CV (%) | Teste F            |                   |
|---------------------------------------|----------|---------|----------|-----------|--------|--------------------|-------------------|
|                                       |          | Partida | I        | II        |        |                    |                   |
| Tempo de operação (dias)              |          | 1 - 91  | 92 - 160 | 161 - 204 |        |                    |                   |
| COV - R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 1,6 c   | 5,3 b    | 9,5 a     |        |                    |                   |
| Na<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 3,4 a   | 3,5 a    | 3,7 a     | 8      | 1,4 <sup>ns</sup>  |                   |
|                                       | R1       | 3,1 a   | 3,3 a    | 3,5 a     | 7      | 1,9 <sup>ns</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 7 a      | 12 a      | 3 a    | 91                 | 1,6 <sup>ns</sup> |
| Ca<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 15,7 b  | 6,5 b    | 61,6 a    | 95     | 25,2 <sup>**</sup> |                   |
|                                       | R1       | 13,8 a  | 4,1 b    | 67,1 a    | 114    | 33,4 <sup>*</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 27 a     | 21 a      | 11 a   | 95                 | 1,9 <sup>ns</sup> |
| K<br>(mg L <sup>-1</sup> )            | Afluente | 78,7 b  | 135,1 ab | 270,7 a   | 97     | 5,1 <sup>*</sup>   |                   |
|                                       | R1       | 75,5 b  | 102,2 ab | 244,9 a   | 59     | 4,2 <sup>*</sup>   |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 10 a     | 19 a      | 16 a   | 139                | 0,3 <sup>ns</sup> |
| Mg<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,12 b  | 0,67 ab  | 1,12 a    | 97     | 10,8 <sup>**</sup> |                   |
|                                       | R1       | 0,10 b  | 0,54 b   | 1,3 a     | 103    | 14,1 <sup>**</sup> |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 14 a     | 20 a      | 7 a    | 88                 | 1,1 <sup>ns</sup> |

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

**Tabela 28.** Valores médios e coeficiente de variação (C.V) de macronutrientes no afluente e efluentes e suas respectivas eficiências de remoção do reator R1 durante as fases de operação.

| Parâmetros                            |          | Fases   |          |           | CV (%) | Teste F            |                   |
|---------------------------------------|----------|---------|----------|-----------|--------|--------------------|-------------------|
|                                       |          | Partida | I        | II        |        |                    |                   |
| Tempo de operação (dias)              |          | 1 - 91  | 92 - 160 | 161 - 204 |        |                    |                   |
| COV - R1 (g DQO (L d) <sup>-1</sup> ) |          | 1,6 c   | 5,3 b    | 9,5 a     |        |                    |                   |
| Fe<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 1,52 a  | 1,49 a   | 1,56 a    | 37     | 0,01 <sup>ns</sup> |                   |
|                                       | R1       | 1,38 a  | 1,52 a   | 1,68 a    | 31     | 0,3 <sup>ns</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 8 a      | 3 a       | 7 a    | 130                | 0,4 <sup>ns</sup> |
| Ni<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,02 a  | 0,03 a   | 0,04 a    | 48     | 1,8 <sup>ns</sup>  |                   |
|                                       | R1       | 0,02 a  | 0,01 a   | 0,03 a    | 66     | 2,4 <sup>ns</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 18 a     | 51 a      | 38 a   | 81                 | 1,8 <sup>ns</sup> |
| Co<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,12 a  | 0,20 a   | 0,21 a    | 44     | 2,8 <sup>ns</sup>  |                   |
|                                       | R1       | 0,13 a  | 0,22 a   | 0,22      | 44     | 3,3 <sup>ns</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 1 a      | 1 a       |        | 171                | 0,9 <sup>ns</sup> |
| Zn<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,13 a  | 0,12 a   | 0,17 a    | 38     | 1,0 <sup>ns</sup>  |                   |
|                                       | R1       | 0,10 a  | 0,09 a   | 0,15 a    | 45     | 1,6 <sup>ns</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 21 a     | 27 a      | 31 a   | 61                 | 0,5 <sup>ns</sup> |
| Mn<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,09 a  | 0,07 a   | 0,15 a    | 74     | 0,8 <sup>ns</sup>  |                   |
|                                       | R1       | 0,11 ab | 0,07 b   | 0,23 a    | 90     | 3,6 <sup>**</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 10 a     | 6 a       | 5 a    | 149                | 0,2 <sup>ns</sup> |
| Cu<br>(mg L <sup>-1</sup> )           | Afluente | 0,03 ab | 0,01 b   | 0,05 a    | 48     | 2,4 <sup>ns</sup>  |                   |
|                                       | R1       | 0,02 a  | 0,01 a   | 0,04 a    | 66     | 1,3 <sup>ns</sup>  |                   |
| Eficiência de remoção (%)             |          | R1      | 19 a     | 51 a      | 38 a   | 78                 | 1,7 <sup>ns</sup> |

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

#### 5.4. Rendimento energético do biogás e etanol de sorgo sacarino

O potencial estimado de geração de energia elétrica do sistema composto pelos reatores UASB R1 e R2 no tratamento do caldo de sorgo sacarino, foi de 0,155, 0,161 e 0,3 kW d<sup>-1</sup> nas fases I, II e III, respectivamente (Tabela 29). Esses valores são superiores aos obtidos por Santana Junior et al. (2019) e Quintanilha (2020) tratando vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de cervejaria em reatores UASB em série, respectivamente e também aos observados por Nunes (2022) tratando vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios horizontais (RALF).

O sistema em estágio único (UASB R1) tratando a vinhaça de sorgo sacarino, apresentou potencial estimado de geração de energia elétrica significativamente mais baixo que o do caldo no sistema UASB em série, bem como do etanol, sendo em média 18 vezes menor que o primeiro e 15 vezes menor que o segundo (Tabelas 29 e 30).

Os tratamentos de fertilização em campo afetaram a produção de energia. O sorgo tratado com adubação de cobertura com a vinhaça biodigerida, apresentou melhor rendimento energético de etanol, em relação ao controle e foi estatisticamente igual aos tratamentos somente com adubo mineral (Tabela 29). No entanto, apresentou valores mais baixos de rendimento de energia elétrica, quando comparado ao biogás produzido da mesma matéria prima em reatores UASB, sendo em média 15 vezes menor.

Portanto, é essencial destacar, que a avaliação das implicações ambientais ressalta a importância de otimizar os rendimentos de conversão e o balanço energético para alcançar uma produção sustentável de bioenergia. O bioetanol e o biogás são considerados biocombustíveis alternativos com potencial para reduzir a dependência de combustíveis fósseis e mitigar os impactos ambientais das fontes de energia atuais. No entanto, a produção de biogás no sistema UASB com caldo de sorgo apresenta vantagem sobre a produção de etanol da mesma matéria-prima, pois elimina a geração de vinhaça de sorgo, um resíduo potencialmente poluidor gerado em grande volume, sem comprometer a geração de energia.

**Tabela 29.** Estimativa teórica de energia elétrica no sistema composto pelos reatores UASB R1 e R2 no tratamento do caldo de sorgo sacarino e pelo reator UASB convencional R1 no tratamento da vinhaça de sorgo sacarino.

|                                                 | Fases                         |         |         | CV (%) | Teste F           |
|-------------------------------------------------|-------------------------------|---------|---------|--------|-------------------|
|                                                 | I                             | II      | III     |        |                   |
| Digestão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino   |                               |         |         |        |                   |
|                                                 | Energia (kW d <sup>-1</sup> ) |         |         |        |                   |
| R1                                              | 0,108 a                       | 0,062 b | 0,111 a | 47     | 51**              |
| R2                                              | 0,047 c                       | 0,099 b | 0,189 a | 67     | 316**             |
| R1+R2                                           | 0,155                         | 0,161   | 0,300   | -      | -                 |
| Digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo sacarino |                               |         |         |        |                   |
| R1                                              | 0.015 a                       | 0.017 a | -       | 76     | 0.4 <sup>ns</sup> |

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

**Tabela 30.** Estimativa teórica de energia elétrica do etanol de sorgo sacarino baseada nos teores alcóolicos conseguidos no processo fermentativo da variedade IPA 467 com a levedura FT 858 e fermento prensado.

| Tratamentos | FT 858             |                               | Fermento prensado  |                               |
|-------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------------|
|             | Teor alcoólico (%) | Energia (kW d <sup>-1</sup> ) | Teor alcoólico (%) | Energia (kW d <sup>-1</sup> ) |
| Controle    | 3,97 Bc            | 0,016 Bc                      | 3,70 Ba            | 0,014 Ba                      |
| VB          | 5,36 Aab           | 0,021 Aab                     | 3,57 Ba            | 0,014 Ba                      |
| VB+U        | 5,08 Aab           | 0,020 Aab                     | 3,79 Ba            | 0,015 Ba                      |
| VB+NPK      | 4,95 Aabc          | 0,019 Aabc                    | 3,82 Ba            | 0,015 Ba                      |
| U           | 4,31 Bbc           | 0,017 Bbc                     | 3,71 Ba            | 0,015 Ba                      |
| NPK         | 5,53 Aa            | 0,022 Aa                      | 3,38 Ba            | 0,013 Ba                      |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Além disso, a produção de biogás do caldo de sorgo, além da possibilidade de proporcionar melhorias no rendimento energético das destilarias de bioetanol, gera durante o processo, efluente com potencial de reúso, para complementar o suprimento nutricional de plantas, com provável redução da adubação química, que por sua vez, representa solução sustentável que reduz o consumo de energia na produção e processamento de culturas energéticas.

Nesse contexto, o plantio de sorgo sacarino na entressafra da cana-de-açúcar para a produção de biogás configura decisão mais rentável e sustentável do que para a produção de etanol, pois o primeiro biocombustível apresenta

potencial teórico de energia elétrica maior que o do segundo, e essa energia pode ser usada diretamente nas atividades das próprias destilarias. É indispensável ressaltar, portanto que, os benefícios econômicos e ambientais da produção de biocombustíveis são amplificados quando todos os recursos disponíveis são utilizados de forma eficaz.

## 6. CONCLUSÃO

O uso de vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida efluente de reatores anaeróbios horizontais de leito fixo da produção de biogás, não apresentou efeito significativo nas características biométricas das plantas de sorgo sacarino. No entanto, mostrou potencial de incremento nas características fermentativas e, portanto, de produção de etanol a partir desta cultura. Apesar disso, mais estudos são desejáveis para compreender os benefícios desta prática com outras concentrações do efluente biodigerido, com diferentes culturas energéticas e mais ciclos fermentativos na etapa de produção do etanol.

A digestão anaeróbia em reatores UASB em série, contribuiu para a elevada conversão anaeróbia do caldo de sorgo sacarino. Com altas COV aplicadas em R1 (22,3 g DQO (L d)<sup>-1</sup>) e R2 (8,8 g DQO (L d)<sup>-1</sup>), foi obtida remoção média de DQO total superior a 50%, com produções satisfatórias de metano.

O biochar do bagaço de sorgo sacarino, remanescente da extração do caldo para a produção de etanol e biogás, apresentou potencial para melhora da estabilidade do sistema de digestão anaeróbia, a partir do consumo considerável de AVT. Além disso, possibilitou a colonização de microrganismos metanogênicos, e favoreceu a produção de metano, sendo possível obter produções volumétricas de até 1,28 L CH<sub>4</sub> (L d)<sup>-1</sup>, com concentrações de metano de até 58%.

Os filos bacterianos mais abundantes no sistema UASB (R1 e R2) no tratamento do caldo de sorgo sacarino, foram Bacteroidota, Firmicutes e Actinobacteriota. Para as arqueias metanogênicas, as ordens mais abundantes foram Methanobacteriales e Methanosarcinales. O gênero *Methanobacterium* foi predominante, indicando que a principal via de produção de metano a partir da digestão anaeróbia do caldo de sorgo, foi a hidrogenotrófica.

O biogás produzido a partir da digestão anaeróbia da vinhaça de sorgo sacarino no reator UASB convencional, apresentou baixa concentração e produção volumétrica de metano. No entanto, o tratamento anaeróbio garantiu adequada destinação deste resíduo, que constitui grande preocupação no aspecto econômico e ambiental.

O caldo de sorgo sacarino submetido ao tratamento anaeróbio em reatores UASB, apresentou potencial estimado de geração de energia elétrica superior ao do etanol e da vinhaça, denotando, portanto, a vantagem do estabelecimento da cultura na entressafra da cana de açúcar para a produção de biogás, em detrimento do etanol, sem prejuízo na geração de energia. Além disso, esta prática possibilita a agregação de valor ao efluente, bem como ao bagaço enquanto subproduto, a partir da produção e aplicação do biochar na digestão anaeróbia, contribuindo para uma economia circular, com menor dependência em recursos, ao mesmo tempo em que elimina o desperdício e garante uma matriz energética cada vez mais sustentável.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah B, Syed Muhammad SAF, Shokravi Z, Ismail S, Kassim KA, Mahmood AN, Aziz MMA (2019) Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. **Sustainable Energy Reviews** 107:37–50.

Adekunle KF, Okolie JA (2015) A review of biochemical process of anaerobic digestion. **Advances in Bioscience and Biotechnology** 6: 205.

Adeleye AT, Bahar MM, Megharaj M, Rahman MM (2023) Recent developments and mechanistic insights on adsorption technology for micro-and nanoplastics removal in aquatic environments. **Journal of Water Process Engineering** 53: 103777.

Afroze N, Nakhla G, Kim M, Yazdanpanah A (2023) Effects of trace elements on digester performance and microbial community response in anaerobic digestion systems. **Environmental Technology** 44:4157-4172.

Ahmad Dar R, Ahmad Dar E, Kaur A, Gupta Phutela U (2018) Sweet sorghum- a promising alternative feedstock for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 82:4070-4090.

Alhraishawi AA, Alani WK (2018) The co-fermentation of organic substrates: A review performance of biogas production under different salt content. In **Journal of Physics: Conference Series** 1032:012041.

Alcalá-Delgado AG, Lugo-Lugo V, Linares-Hernández I, Martínez-Miranda V, Fuentes-Rivas RM, Ureña-Nuñez F (2018) Industrial wastewater treated by galvanic, galvanic Fenton, and hydrogen peroxide systems. **Journal of Water Process Engineering** 22:1–12.

Ali Mubarak Alqahtani (2024). Sweet sorghum and bagasse: a comprehensive review of feedstock traits, conversion processes, and economic viability for bioethanol and biogas production. **Biofuels** 15: 575-585.

Alloul A, Ganigué R, Spiller M, Meerburg F, Cagnetta C, Rabaey K, Vlaeminck SE (2018) Capture–ferment–upgrade: a three-step approach for the valorization of sewage organics as commodities. **Environmental Science & Technology** 52: 6729-6742.

Almodares A, Hadi MR(2009) Production of bioethanol from sweet sorghum: a review. **African Journal of Agricultural Research** 4: 772–780.

Ambaye TG, Rene ER, Nizami AS, Dupont C, Vaccari M, Van Hullebusch ED (2021) Beneficial role of biochar addition on the anaerobic digestion of food waste: a systematic and critical review of the operational parameters and mechanisms. **Journal of Environmental Management** 290: 112537.

Amorim HV, Basso LC, Lopes LM (2009) Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: **The alcohol**

**textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries.** 5th ed, 1: 139–146. Nottingham: Nottingham University Press.

Amorim HV, Lopes ML (2013) Ciência e tecnologia na seleção de fermentos para produção de etanol. In: **Microorganismos em Agroenergia: da Prospeção aos Bioprocessos**, Embrapa Agroenergia, 42–59. Brasília.

ANEEL (2023b) **Unidades com Geração Distribuída**. Agência Nacional de Energia Elétrica, Brasília. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoieY2VmMmUwN2QtYWFiOS00ZDE3LWI3NDMtZDk0NGI4MGU2NTkxliwidCI6IjQwZDZmOWI4LWVjYTctNDZhMi05MmQ0LWVhNGU5YzAxNzBIMSIsImMiOjR9>>. Acesso em: 15 mar. 2024.

ANP RenovaBio (2020a) Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/renovabio>>. Acesso em: 10 de janeiro 2024.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2016) **Boletim anual de preços**: preços do petróleo, gás natural e combustíveis nos mercados nacional e internacional. Rio de Janeiro.

APHA (2017) **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 23nd.ed. American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation. American Public Health Association, Washington DC, USA.

Appiah-Nkansah NB, Li J, Rooney W, Wang DA (2019) Review of sweet sorghum as a viable renewable bioenergy crop and its techno-economic analysis. **Renewable Energy** 143:1121-1132.

Arantes MK, Alves HJ, Sequinel R, Silva EA da (2017). Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy** 42: 26243-26256.

Araújo DM (2013). **Digestão anaeróbia de vinhaça em reatores UASB termofílicos, em série, com adição de Fe, Ni e Co**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal

Ariunbaatar J, Scotto Di Perta E, Panico A, Frunzo L, Esposito G, Lens PNL, Pirozzi F (2015) Effect of ammoniacal nitrogen on one-stage and two-stage anaerobic digestion of food waste. **Waste Management** 38: 388-398.

Assumpção SMN (2015) **Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Barbosa JC, Maldonado JRW (2011) AgroEstat – Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos, Versão 1.1.0.626, Jaboticabal: FCAV/UNESP.

Basso LC, Henrique VA, Antonio JO, Mario LL (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research** 8: 1155–1163.

Barcelos LM, Fernandes FO, Lopes C, Emygdio BM, Valgas R, Carvalho IF, Rosa APS (2019) Biology and nutritional indexes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in saccharine sorghum. **Journal of Agricultural Science** 11:126–135.

Bardi MJ, Vinardell, Astals S, Koch K (2023). Opportunities and challenges of micronutrients supplementation and its bioavailability in anaerobic digestion: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 186:113689.

Barros VG, Duda RM, Vantini JS, Omori WP, Ferro MIT, 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** 244: 371-381.

Barros VG, Duda RM, Oliveira RA (2016) Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology** 47: 628-639.

Basavaraj G, Rao PP, Basu K, Reddy CR, Kumar AA, Rao PS, Reddy BVS (2013) Assessing viability of bio-ethanol production from sweet sorghum in India. **Energy policy** 56:501-508.

Batista VAP, Batista VZP, Pimentel LD, Barros AF, Moreira TS, Dias LAS (2018) Produção de açúcares no caldo de sorgo sacarino avaliado em duas épocas de corte. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 17:263-273.

Berenji J, Dahlberg J, Sikora V, Latkovic D (2011) Origin, history, morphology, production, improvement, and utilization of broomcorn (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in Serbia. **Economic Botany** 65:190–208.

Bilhalva N, Leite LT, Almeida Lansana W de, Costa AB, Silveira MS da, Bandeira (2016) Avaliação biométrica de genótipos de sorgo sacarino no município de Alegrete. In: **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão** 8.

Bisio W, Bulanti L (2012) Sorgo Dulce Industrialización. In: **Workshop Internacional Agroindustrial Sobre Sorgo Sacarino**.

Borém A (2005) Melhoramento de espécies cultivadas. UFV - VIÇOSA.

Botelho TT, Leite PSS, Costa RAP, Nunes JAR (2021) Strategies for multi-trait selection of sweet sorghum progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 21.

Botello Suárez WA, Vantini JS, Duda RM, Giachetto PF, Cintra LC, Tiraboschi Ferro MI, 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** 268: 158-168.

Brandão LM, Borges ID, Franco AAN, Kondo MK, Moreira TDS, Souza VD (2016) Acúmulo de macronutrientes secundários, na safra e rebrota em plantas de sorgo forrageiro. In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**.

Brasil (2006) Resolução CONAMA nº 498. **Ministério do Meio Ambiente, Brasil**. Disponível em: [https://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=797](https://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=797) Acesso em: 22 de março de 2023.

Bruno M, Oliveira RA (2013) Performance of UASB Reactors in Two Stages Followed By Post-Treatment With Activated Sludge in Wastewater Batch of WetProcessed Coffee. **Engenharia Agricola**, 33: 808–819.

Bryan WL (1990) Solid state fermentation of sugars in sweet sorghum. **Enzyme Microb.Technol** 12:437-442.

Buffière P, Dooms M, Hattou S, Benbelkacem, H (2018) The hydrolytic stage in high solids temperature phased anaerobic digestion improves the downstream methane production rate. **Bioresource Technology** 259: 111-118.

Bursztyn, M (2018) A difícil sustentabilidade: política energética e conflitos ambientais. [S.l.]: Garamond.

Cabezas A, Araujo JC, Callejas C, Galès A, Hamelin J, Marone A, Sousa DZ, Trably E, Etchebehere C (2015) How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? **Rev Environ Sci Biotechnol** 14: 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** 183: 1127-1145.

Cai Y, Hua B, Gao L, Hu Y, Yuan X, Cui Z, Zhu W, Wang X (2017) Effects of adding trace elements on rice straw anaerobic mono-digestion: Focus on changes in microbial communities using high-throughput sequencing. **Bioresource Technology** 239:454-463.

Castellano-Hinojosa A, Armato C, Pozo C, González-Martínez A, González-López J (2018) New concepts in anaerobic digestion processes: recent advances and biological aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology** 102: 5065-5076.

Cavalcanti PFF, Medeiros EJS, Silva JKM, Van Haandel A. (1999) Excess sludge discharge frequency for UASB reactors. **Water Science and Technology**, 40: 211–219.

Ceccon G, Makino PA, Alves VB, Fachinelli R, Luz RA (2018) Produtividade de cultivares de sorgo sacarino em diferentes épocas de semeadura e tipos de solo. **Journal of Neotropical Agriculture** 5: 69–75.

Cecen G, Makino PA, Alves VB, Fachinelli R, Luz RA (2018) Produtividade de cultivares de sorgo sacarino em diferentes épocas de semeadura e tipos de solo. **Journal of Neotropical Agriculture**, 5:69–75.

Cecen G, Sanchez-Delgado S, Ruiz-Rivas U, Santana D (2013) Bioenergy production in Central America: integration of sweet sorghum into sugar mills. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 25:529–542.

Centro de Tecnologia Canavieiro (2011) Métodos Analíticos. In: **Manual de Controle Químico da Fabricação de Açúcar**, Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieiro, 2: 49.

Cheng D, Ngo HH, Guo W, Chang SW, Nguyen DD, Zhang X, Liu Y (2020) Feasibility study on a new pomelo peel derived biochar for tetracycline antibiotics removal in swine wastewater. **Science of The Total Environment** 720:137662.

Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A Review. **Bioresour Technol**. 99:4044-4064.

Chen J, Zhang P, Zhang J, He Y, Tong YW (2022) Micro–nano magnetite-loaded biochar enhances interspecies electron transfer and viability of functional microorganisms in anaerobic digestion. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** 10: 2811-2821

Chernicharo, C.A. de L. (2016) Reatores anaeróbios. 2 ed. v. 5. Belo Horizonte: Editora UFMG.

Chiappero, M., Norouzi, O., Hu, M., Demichelis, F., Berruti, F., Di Maria, F., Mašek, O., Fiore, S. (2020) Review of biochar role as additive in anaerobic digestion processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 131: 110037.

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

Chuenchart W, Logan M, Leelayuthayotin C, Visvanathan C (2020) Enhancement of food waste thermophilic anaerobic digestion through synergistic effect with chicken manure. **Biomass and Bioenergy** 136: 105541.

Coelho JC (2021) **Potencial de produção de etanol em sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Tocantins.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2023) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF, 11.

Disponível em: < [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/50386\\_66eb66936a5d73a592e5fb25bc9cb71b](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/50386_66eb66936a5d73a592e5fb25bc9cb71b)>. Acesso em: 12 de janeiro de 2024

Cooper TG (1992) Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cutc L, Sanchez-Delgado S, Ruiz-Rivas U, Santana D (2013) Bioenergy production in Central America: integration of sweet sorghum into sugar mills. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 25:529–542

Cuz L, Sanchez-Delgado S, Ruiz-Rivas U, Santana D (2013) Bioenergy production in Central America: integration of sweet sorghum into sugar mills. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 25: 529-542.

Dashti A, Raji M, Harami HR, Zhou JL, Asghari M (2023) Biochar performance evaluation for heavy metals removal from industrial wastewater based on machine learning: application for environmental protection. **Separation and Purification Technology** 312: 123399

Davila-Gomez FJ, Chuck-Hernandez C, Perez-Carrillo E, Rooney WL, Serna-Saldivar SO (2011) Evaluation of bioethanol production from five different varieties of sweet and forage sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Industrial Crops and Products** 33: 611–616.

de Almeida, LGF, PARRELLA RDC, SIMEONE M, RIBEIRO PDO, BARBOSA G, BRITO P, dos SANTOS AS (2019) Characterization of cell wall polysaccharides and cellulosic ethanol potential in genotypes of sorghum biomass. **International Journal of Development Research** 9: 1-11.

de Francisci D, Kougias PG, Treu L, Campanaro S, Angelidaki I (2015) Microbial diversity and dynamism of biogas reactors due to radical changes in the composition of the raw material. **Bioresource Technology** 176: 56-64.

Delforno TP, Lacerda Jr GV, Sierra-Garcia IN, Okada DY, Macedo TZ, Varesche MBA, Oliveira VM (2017) Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of the Total Environment** 587: 389-398.

Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, Basso LC, Gombert AK (2013) What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology** 97: 979–991.

Del Nery V, Alves I, Damianovic MHRZ, Pires EC (2018). Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy** 119: 411-417.

Dengler L, Meier J, Grünberger F, Bellack A, Rachel R, Grohmann D, Huber H (2022) *Methanofollis propanolicus* sp. nov., a novel archaeal isolate from a Costa Rican oil well that uses propanol for methane production. **Archives of Microbiology** 204: 554.

Deng C, Lin R, Kang X, Wu B, Wall DM, Murphy JD (2021) What physicochemical properties of biochar facilitate interspecies electron transfer in anaerobic digestion: A case study of digestion of whiskey by-products. **Fuel** 306: 121736

Deng Y, Xia J, Zhao R, Xu J, Liu X (2022) Iron-coated biochar alleviates acid accumulation and improves methane production under ammonium enrichment conditions. **Science of The Total Environment** 809: 151154.

Dias MF, Colturato LF, de Oliveira JP, Leite LR, Oliveira G, Chernicharo CA, de Araújo JC (2016) Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. **Bioresource Technology** 205: 58-66.

Dias MF (2015) **Análise da comunidade microbiana em sistema de tratamento de biogás com elevadas concentrações de sulfeto**. 75 f. Dissertação (Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Dilallo R, Albertson OE (1961) Volatile Acids by Direct Titration. **Water Pollution Control Federation** 33: 356–365.

Diniz GMM (2010) **Produção de sorgo** (*Sorghum bicolor* L. Moench): aspectos gerais. 97 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramentos Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Doll MMR, Foresti E (2010) Effect of the sodium bicarbonate in the treatment of vinasse in AnSBBR operated at 55 and 35 degrees C. **Engenharia Sanitaria e Ambiental** 15: 275–282.

Dong Z, Guo H, Zhang M et al (2022) Enhancing biomethane yield of coal in anaerobic digestion using iron/copper nanoparticles synthesized from corn straw extract. **Fuel** 319:123664.

Duda RM, Oliveira RAD (2011) Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reator UASB e filtro anaeróbio em série seguidos de filtro biológico percolador. **Engenharia Sanitária e Ambiental** 16: 91-100.

Dupont FH, Romitti L, Grassi F (2015) Energias renováveis: buscando por uma matriz energética sustentável. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** 19:70-81.

Durães, FOM (2011) **Sorgo sacarino: tecnologia agrônômica e industrial para alimentos e energia**.

Eculica GC, Oliveira PCER, Oliveira AIBE, Parrella NANLD, Leite PSS, Parrella RAC (2019) Adaptability and stability of saccharine sorghum cultivars. **African Journal of Agricultural Research** 14 (31): 1432–1442.

El-Naggar A, Mosa A, Amin AEE, Yang X, Yousaf B, El-Naggar AH, Chang SX (2022) Biochar for remediation of alkaline soils contaminated with toxic elements. In **Biochar in Agriculture for Achieving Sustainable Development Goals**: 223-240.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2012) **Embrapa mostra potencial do sorgo durante evento sobre bioenergia**. Sete Lagoas-MG. a. 06. ed.34.

Emygdio BM, Afonso AAS, Barneche AAB, Parrella R, Schaffert RE, May A (2011) Desempenho de cultivares de sorgo sacarino para a produção de etanol sob diferentes densidades de plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/952657/1/Boletim156.pdf>> f Acesso em 14 de dezembro de 2023

Eng F, Fuess LT, Bovio-Winkler P, Etchebehere C, Sakamoto IK, Zaiat M (2022) Optimization of volatile fatty acid production by sugarcane vinasse dark fermentation using a response surface methodology. Links between performance and microbial community composition. **Sustainable Energy Technologies and Assessments** 53:102764.

Engineering Toolbox. **Fuels** - Higher and Lower Calorific Values. Disponível em: <[https://www.engineeringtoolbox.com/fuels-higher-calorific-values-d\\_169.html](https://www.engineeringtoolbox.com/fuels-higher-calorific-values-d_169.html)>. Acesso em: 20 maio 2024.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética (2023) **Análise de conjuntura dos biocombustíveis - ano base 2022**. Brasília. Disponível em: <[https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-756/NT-EPE-DPG-SDB-2023-01\\_Analise\\_de\\_Conjuntura\\_dos\\_Biocombustiveis\\_Ano2022.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-756/NT-EPE-DPG-SDB-2023-01_Analise_de_Conjuntura_dos_Biocombustiveis_Ano2022.pdf)>. Acesso em: 07 fev. 2024.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética. (2023) **Balanço energético nacional. Brasília**. Disponível em: <[https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-681/BEN\\_S%C3%ADntese\\_2023\\_PT.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-681/BEN_S%C3%ADntese_2023_PT.pdf)>. Acesso em: 03 de março de 2024

Estação Agroclimatológica Departamento de Ciências Exatas (EMC) da FCAV/UNESP–Campus de Jaboticabal (2022)

Feng K, Li H, Zheng C (2018) Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. **Bioresource Technology** 270:180-188.

Fernandes G, Braga TG, Fischer J, Parrella RAC, Resende MM, Cardoso VL, (2014) Evaluation of potential ethanol production and nutrients for four varieties of sweet sorghum during maturation. **Renewable Energy** 71:518-524.

Fernandes AC (2011). **Cálculos na Agroindústria da Cana-de-açúcar**, 3<sup>a</sup> ed. Sociedade dos Técnicos Açúcareiros e Alcooleiros do Brasil – STAB, 240. Piracicaba.

Ferraz Jr ADNA, Koyama MH, De Araújo Júnior MM, Zaiat M (2016) Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy** 89:245–252.

Ferreira OE, Silva AF da, Costa GHG, Roviero JP, Mutton MJR (2021) Ethanol fermentation of Sweet Sorghum Broth: Effects of Genotypes, Harvest System and Enzymatic Treatment. **Sugar Tech** 23:634–642.

Ferreira OE (2015) **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático**. 79 f. Tese (doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Ferry JG (2020) Methanosarcina acetivorans: a model for mechanistic understanding of acetoclastic and reverse methanogenesis. **Frontiers in Microbiology** 11:1806.

Florio C, Giudicianni P, Pirozzi D, Pasquale V, Ragucci R, Dumontet S (2020) Biochar as improver of methane production in anaerobic digestion of food waste. **Journal of Environmental Accounting and Management** 8: 267-279.

Foresti, E (1994) **Fundamentos do processo de digestão anaeróbia**. In: **Anais III Taller y Seminario Latinoamericano: tratamiento anaeróbico de aguas residuales**. Montevideo, Uruguay, p. 97-110.

Fornasieri Filho D, Fornasieri JL (2009) **Manual da cultura do sorgo**. Jaboticabal: Funep.

Freita LA (2017) **Produção de etanol de segunda geração utilizando bagaço de sorgo sacarino, forrageiro e biomassa**. 179 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

Fuess LT, Kiyuna LSM, Júnior ADNF, Persinoti GF, Squina FM, Garcia ML, Zaiat M (2017) Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, 189: 480-491.

Fuess LT, Klein BC, Chagas MF, Rezende MCAF, Garcia ML, Bonomi A, Zaiat M (2018) Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and environmental approach. **Renewable Energy** 122: 674-687.

Fukushima NA, Palacios-Bereche MC, Nebra AS (2019). Energy analysis of the ethanol industry considering vinasse concentration and incineration. **Renewable Energy**. 142:96-109.

Fu X, Wang P, Wu J, Zheng P, Wang T, Li X, Ren M (2022) Hydrocotyle vulgaris derived novel biochar beads for phosphorus removal: static and dynamic adsorption assessment. **Journal of Environmental Chemical Engineering** 10: 108177

Gab L, Sowinski J, Bough R, Dayan FE (2017) Allelopathic potential of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in weed control: a comprehensive review. **Advances in Agronomy** 145:43–95.

Garcia-Peña E, Parameswaran P, Kang DW, Canulhan R, Krajmalnik B (2011) Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: process and microbial ecology. **Bioresource Technology** 102: 9447-9455.

Garofalo P, D'andrea L, Vonella AV, Rinaldi M, Palumbo AD (2015) Energy performance and efficiency of two sugar crops for the biofuel supply chain. Perspectives for sustainable field management in southern Italy. **Energy** 93:1548–1557.

Gerardi MH (2003) **The Microbiology of Anaerobic Digesters**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Giacomini I, Pedroza MM, Siqueira FLT, Mello SQS, Cerqueira FB, Salla, L (2013) Uso potencial de sorgo sacarino para a produção de etanol no estado do Tocantins. **Revista Agrogeoambiental** 5.

Gomes SCMP (2014) **Produção de etanol utilizando mix de sorgo sacarino e cana-de-açúcar em processo de maturação**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

Grabovskyi M, Kucheruk P, Pavlichenko K, Roubík H (2023) Influência de macronutrientes e micronutrientes em híbridos de milho para produção de biogás. **Ciência Ambiental e Pesquisa sobre Poluição** 30: 70022-70038.

Greses S, Gaby JC, Aguado D, Ferrer J, Seco A, Horn SJ (2017) Microbial community characterization during anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. under mesophilic and thermophilic conditions. **Algal Research** 27: 121-130.

Guo X, Fang G, Li G, Ma H, Fan H, Yu L, Ma C, Wu X, Deng D, Wei M, Tan D, Si R, Zhang S, Li J, Sun L, Tang Z, Pan X, Bao X (2014) Direct, nonoxidative conversion of methane to ethylene, aromatics, and hydrogen. **Science** 344: 616-619

Gutjahr S, Clément-Vidal A, Soutiras A, Sonderegger N, Braconnier S, Dingkuhn, M, Luquet D (2013) Grain, sugar and biomass accumulation in photoperiod-

sensitive sorghums. II. Biochemical processes at internode level and interaction with phenology. **Functional Plant Biology** 40: 355–368.

Gustavsson J, Svensson BH, Karlsson A (2011) The feasibility of trace element supplementation for stable operation of wheat stillage-fed biogas tank reactors. **Water Science and Technology**. 64:320–325.

Harihastuti N, Yuliasni R, Djayanti S, Handayani NI, Rame R, Prasetyo A, Kadier A (2021) Full-scale application of up-flow high rate anaerobic reactor with substrate modification and effluent recirculation for sugarcane vinasse degradation and biogas generation. **Journal of Ecological Engineering** 22.

Hejnfelt A, Angelidaki I (2009) Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. **Biomass and Bioenergy** 33:1046–1054.

Hendrik ATWM, Van Lier JB, De Kreuk MK (2018) Growth media in anaerobic fermentative processes: The underestimated potential of thermophilic fermentation and anaerobic digestion. **Biotechnology Advances** 36: 1-13.

Huang ZW, Niu QY, Nie WK, Li X, Yang CP (2022) Effects of heavy metals and antibiotics on performances and mechanisms of anaerobic digestion. **Bioresource Technology** 361.

Hu Y, Wang X, Zhang S, Liu S, Hu T, Wang X, Hu F (2023) Microbial response behavior to powdered activated carbon in high-solids anaerobic digestion of kitchen waste: Metabolism and functional prediction analysis. **Journal of Environmental Management** 337: 117756.

IEA, International Energy Agency, 6<sup>a</sup> ed. Global Public Policy Institute (2009). Disponível em: [https://www.files.ethz.ch/isn/109115/GPPIPP6\\_IEA\\_final.pdf](https://www.files.ethz.ch/isn/109115/GPPIPP6_IEA_final.pdf) Acesso em: 18 de março de 2024.

International Commission For Uniform Methods Of Sugar Analysis- ICUMSA (2011) Method Book. Bartens, Berlin

Jabari L, Gannoun H, Khelifi E, Cayol JL, Godon JJ, Hamdi M, Fardeau ML (2016). Bacterial ecology of abattoir wastewater treated by an anaerobic digester. **Brazilian Journal of Microbiology** 47: 73-84.

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** 217: 10-20.

Jankowski KJ, Dubis B, Budzyński WS, Bórawski P, Bułkowska K (2016) Energy efficiency of crops grown for biogas production in a large-scale farm in Poland. **Energy** 109: 277-286.

Joppert CL, Santos MM dos, Costa HKM, SANTOS EM dos, Moreira Simões JR (2017) Energetic shift of sugarcane bagasse using biogas produced from

sugarcane vinasse in Brazilian ethanol plants. **Biomass and Bioenergy** 107: 63-73.

Júnior ADN, Koyama MH, de Araújo Júnior MM, Zaiat M (2016). Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy** 89: 245-252.

Juntupally S, Begum S, Anupoju GR (2023) Impact of additives (macronutrient and nanoparticles of micronutrients) on the anaerobic digestion of food waste: Focus on feeding strategy for improved performance. **Biomass and Bioenergy** 172:106751.

Kadnikov VV, Mardanov AV, Podosokorskaya OA, Gavrilov SN, Kublanov LV, Bonch-Osmolovskaya EA, Ravin NV (2013) Genomic analysis of *Melioribacter roseus*, facultatively anaerobic organotrophic bacterium representing a novel deep lineage within. **PLoS One** 8: e53047.

Kanjanarong J, Giri BS, Jaisi DP, Oliveira FR, Boonsawang P, Chaiprapat S, Khanal SK (2017) Removal of hydrogen sulfide generated during anaerobic treatment of sulfate-laden wastewater using biochar: Evaluation of efficiency and mechanisms. **Bioresource Technology** 234: 115-121.

Karakashev D, Batstone DJ, Trably E, Angelidaki I (2006) Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. **Applied and Environmental Microbiology** 72: 5138-5141.

Karp SG, Medina JDC, Letti LAJ, Woiciechowski AL, Carvalho JC, Schmitt CC, Penha RO, Kumlehn GS, Soccol CR (2021) Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 15: 899–912.

Kee WC, Wong YS, Ong SA, Lutpi NA, Sam ST, Chai A, Ng HH (2022) Insights into modified sequencing batch reactor for the treatment of sugarcane vinasse: role of recirculation process. **International Journal of Environmental Science and Technology** 19: 12289-12302.

Khalil SRA, Abdelhafez AA, Amer EAM (2015) Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. **Annals of Agricultural Sciences** 60: 317-324.

Khanal, S.K. (2008) **Anaerobic biotechnology for bioenergy production**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 306p.

Kong Z, Li L, Kurihara R, Kubota K, Li YY (2018) Anaerobic treatment of N, N-dimethylformamide-containing wastewater by co-culturing two sources of inoculum. **Water research** 139: 228-239.

Kougias PG, Campanaro S, Treu L, Zhu X, Angelidaki I (2017) A novel archaeal species belonging to *Methanoculleus* genus identified via de-novo assembly and metagenomic binning process in biogas reactors. **Anaerobe** 46: 23-32.

Kougias PG, Campanaro S, Treu L, Tsapekos P, Armani A, Angelidaki I (2018) Spatial distribution and diverse metabolic functions of lignocellulose-degrading uncultured bacteria as revealed by genome-centric metagenomics. **Applied and Environmental Microbiology**, 84: e02602-17.

Kumar M, Dutta S, You S, Luo G, Zhang S, Show PL, Sawarkar AD, Singh L, Tsang DCW (2021) A critical review on biochar for enhancing biogas production from anaerobic digestion of food waste and sludge. **Journal of Cleaner Production** 305:127143.

Kythreotou N, Tassou SA, Florides G (2012) An assessment of the biomass potential of Cyprus for energy production. **Energy** 47: 253–261.

Lee CG, Baba Y, Asano R, Fukuda Y, Tada C, Nakai Y (2020) Identification of bacteria involved in the decomposition of lignocellulosic biomass treated with cow rumen fluid by metagenomic analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 130

Lee DH, Zo YG, Kim SJ (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology** 62: 3112-3120.

Lee J, Koo T, Yulisa A, Hwang S (2019) Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition. **Journal of Environmental Management** 241: 418-426.

Lee JT, Dutta N, Zhang L, Tsui TT, Lim S, Tio ZK, Tong YW (2022) Bioaugmentation of *Methanosarcina thermophila* grown on biochar particles during semi-continuous thermophilic food waste anaerobic digestion under two different bioaugmentation regimes. **Bioresource technology** 360: 127590.

Lee SH, Park JH, Kang HJ, Lee YH, Lee TJ, Park HD (2013). Distribution and abundance of *Spirochaetes* in full-scale anaerobic digesters. **Bioresource Technology** 145: 25-32.

Lee SS, Robson FM, Wang HY (1981) Rapid determination of yeast viability. In: **Biotechnology Bioengineering Symposium**, ed University of Michigan, 641–649. Ann Arbor.

Leite PFAF (2019) **Tratamento de águas residuárias da suinocultura em reator anaeróbio com pós-tratamento aeróbio/anóxico**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

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

Le TS, Bui XT, Nguyen PD, Ngo HH, Dang BT, Le Quang DT, Diels L (2024) Bacterial community composition in a two-stage anaerobic membrane bioreactor

for co-digestion of food waste and food court wastewater. **Bioresource Technology** 391: 129925.

Li D, Sun M, Xu J, Gong T, Ye M, Xiao Y, Yang T (2022) Effect of biochar derived from biogas residue on methane production during dry anaerobic fermentation of kitchen waste. **Waste Management** 149: 70-78.

Lima IH, do Anjos D (2022) Seleção de cultivares de sorgo sacarino para produção de etanol. **PesquisAgro** 5: 41-53.

Lima VO (2022) **Codigestão anaeróbia de vinhaça e lodo de decantador de ETA aumenta a estabilidade de reatores UASB e a produção de metano**. 74 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

Lin C, Wu P, Liu Y, Wong JW, Yong X, Wu X, Zhou J (2019) Enhanced biogas production and biodegradation of phenanthrene in wastewater sludge treated anaerobic digestion reactors fitted with a bioelectrode system. **Chemical Engineering Journal** 365: 1-9.

Lin Q, De Vrieze J, Li J, Li X (2016) Temperature affects microbial abundance, activity and interactions in anaerobic digestion. **Bioresource Technology** 209: 228-236.

Linton, J. A., Miller, J. C., Little, R. D., Petrolia, D. R., & Coble, K. H. (2011). Economic feasibility of producing sweet sorghum as an ethanol feedstock in the southeastern United States. **Biomass and Bioenergy** 35, 3050-3057.

Liu Y, Li X, Wu S, Tan Z, Yang C (2021) Enhancing anaerobic digestion process with addition of conductive materials. **Chemosphere** 278:130449.

Liu Y, Whitman WB (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1125: 171-189.

Lü F, Luo C, Shao L, He P (2016) Biochar alleviates combined stress of ammonium and acids by firstly enriching *Methanosaeta* and then *Methanosarcina*. **Water research** 90: 34-43.

Luo G, De Francisci D, Kougias PG, Treu L, Zhu X, Angelidaki I (2015) New steady-state microbial community compositions and process performances in biogas reactors induced by temperature disturbances. **Biotechnology for Biofuels** 8.

Lou T, Yin Y, Wang J (2024) Promotion of medium-chain fatty acids and long-chain alcohols production by zero-valent iron: Effect of particle sizes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 12: 111652.

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

Machado NS, da Silva Alves DJ, Otsuka MYF, Freire AAM, da Silva KA, da Trindade Lessa BF, de Oliveira FF (2023) Produção de biogás a partir da fermentação de sorgo sacarino in natura, resíduos de frutas e dejetos de animais: Production of biogas from the fermentation of green sweet sorghum, fruit residues and animal waste. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research** 6: 612-631.

Magalhães JR, Fernandes MS (1990) Absorção e metabolismo de nitrogênio sob condições de stress. In: **Simpósio brasileiro de nitrogênio em plantas**, 249–262.

Magalhães PC, Durães FO (2000) **Fisiologia da planta do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.

Magalhães RT, Gonçalves LC, Borges I, Rodrigus JAS, Fonseca, JF (2010) Produção e composição bromatológica de vinte e cinco genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arq.Bras.Med. Vet Zoo** 62: 747-751.

Magasanik B (1992) Regulation of nitrogen utilization. In: **Jones, E.W., Pringle, J.R., & Broach, J.R.** (eds). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, gene expression, Cold Spring Harbor, 283–317.

Ma H, Hu Y, Kobayashi T, Xu KQ (2020) O papel da adição de biocarvão de casca de arroz na digestão anaeróbica de sorgo sacarino sob condições de alta carga. **Relatórios de Biotecnologia** 27: 00515.

Mahmood A, Ullah H, Ijaz M, Javaid M, Shahzad AN, Honermeier B (2013) Evaluation of sorghum hybrids for biomass and biogas production. **Australian Journal of Crop Science** 7: 1456-1462.

Ma J, Mungoni LJ, Verstraete W, Carballa M (2009) Maximum removal rate of propionic acid as a sole carbon source in UASB reactors and the importance of the macro-and micro-nutrients stimulation. **Bioresource Technology** 100: 3477-3482.

Marenco RA, Lopes NF, (2009) **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa, MG: Editora UFV, 486p.

Martínez BLK, Gil BG, Nava MAF, Rueda PA, Lozano MB (2020). A metagenomic assessment of microbial communities in anaerobic bioreactors and sediments: Taxonomic and functional relationships. **Anaerobe**, 68: 102296.

Martins F, Mamede MEO, Silva AFD, Guerreiro J, Lima STDC (2017) Ultraestrutura celular e expressão de proteínas de leveduras *hanseniaspora* sob efeito do estresse etanólico. **Brazilian Journal of Food Technology**, 20.

Masson IS, Costa GHG, Roviero JP, Freita LA, Mutton MA, Mutton, MJR (2015) Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, 45: 1695–1700.

Matsakas L, Sterioti AA, Rova U, Christakopoulos P (2014) Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. **Industrial Crops and Products** 62: 367-372.

May A, de Albuquerque Filho MR, Rodrigues JAS, Landau EC, Parrella RDC, Massafera R (2011) **Cultivares de sorgo para o mercado brasileiro na safra 2011/2012**.

May A, Mendes S, da Silva DD, Parrella RDC, de Miranda RA, da Silva AF, Schaffert R (2013) **Cultivo de sorgo sacarino em áreas de reforma de canaviais**. Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E).

MCCARTY, PERRY L (1964) Anaerobic Waste Treatment Fundamentals - part one - Chemistry and Microbiology. **Public Works** 95:107–112.

Mehariya S, Patel KA, Obulisamy PK, Punniyakotti E, Wong JWC (2018). Codigestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. **Bioresource Technology** 265: 519-531.

Menezes TJB (1980) Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Editora Agronômica Ceres.

Meng X, Zhang Y, Li,Q, Quan X (2013) Adding Fe<sub>0</sub> powder to enhance the anaerobic conversion of propionate to acetate. **Biochemical engineering jornal** 73:80-85.

Menzel T, Neubauer P, Junne S (2020) Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. **Energies** 13: 5555.

Metcalf, L., Eddy, H. (2016) **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5ed. – Porto Alegre: AMGH, 1980p.

Michel Junior RJS (2010) **Obtenção do álcool etileno hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo**: validação de um processo de batelada. 146 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Mohan SV, Agarwal L, Mohanakrishna G, Srikanth S, Kapley A, Purohit HJ, Sarma PN (2011) Firmicutes with iron dependent hydrogenase drive hydrogen production in anaerobic bioreactor using distillery wastewater. **International journal of hydrogen energy** 36: 8234-8242.

Molaverdi M, Karimi K, Khanahmadi M, Goshadrou A (2013) Enhanced sweet sorghum stalk to ethanol by fungus *Mucor indicus* using solid state fermentation followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Industrial Crops and Products** 49: 580-585.

Morais JM, (2019) **ODS 7 - Assegurar o Acesso Confiável, Sustentável, Moderno e a Preço Acessível à Energia Para Todos**. IPEA. Disponível em: <[http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9205/1/Cadernos\\_ODS\\_Objetivo\\_7.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9205/1/Cadernos_ODS_Objetivo_7.pdf)>. Acesso em: 14 janeiro 2024.

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** 146: 494–503.

Mueller LP, Saraiba DT, Cardoso, CA, Batistote M (2019) O potencial associado das fontes renováveis e *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol. **Educação Ambiental em Ação**, 18.

Nascimento D (2012) Dublê da cana. **Idea News: Cana e Indústria** 11, n.136.

Neto ABF, Corrêa WLR, Perobelli FS (2016) Consumo de Energia e Crescimento Econômico: uma Análise do Brasil no período 1970-2009. **Análise Econômica** 34.

Ngo T, Ranlaul K., Ball AS (2024) Enhanced methane production during the anaerobic digestion of chicken manure through the addition of pristine and recovered biochar. **Cleaner Waste Systems** 7: 100126.

Nie W, He S, Lin Y, Cheng JJ, Yang C (2023). Functional biochar in enhanced anaerobic digestion: Synthesis, performances, and mechanisms. **Science of the Total Environment** 906:167681.

Nunes JOS (2022) **Efeito da recirculação de vinhaça biodigerida em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) submetida ao processo oxidativo avançado fenton**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

OECD/FAO (2023) **OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032**. OECD Publishing, Paris. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en> Acesso em: 28 de janeiro de 2024.

OECD/FAO (2021) **Perspectivas agrícolas OCDE-FAO 2021-2030**. OECD, Paris, 337 p.

O’Flaherty V, Collins G, Mahony T (2006) The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology** 5: 39-55.

Oh ST, Kang SJ, Azizi A (2018). Electrochemical communication in anaerobic digestion. **Chemical Engineering Journal** 353: 878-889.

Okabe S, Ariesyady HD, Ito T (2007) Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. **Water Research** 41: 1554-1568.

Okiemute SA, Smarte IM, Jeremiah A, Lewis KS (2022) Biochar development as a catalyst and its application. In B. Dr. Mattia, G. Dr. Mauro, & T. Prof. Alberto (Eds.), **Biochar - Productive Technologies, Properties and Application** (Cap. 25).

Oliveira RA, Duda RM (2009) Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reator anaeróbio operado em batelada sequencial. **Engenharia Sanitária e Ambiental** 14: 533-542.

Oliveira RA, Foresti E (2004) Balanço de massa de reatores anaeróbicos de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) tratando águas residuárias de suinocultura. **Engenharia Agrícola** 24: 807–820.

Olugbenga OS, Adeleye PG, Oladipupo SB, Adeleye AT, John KI (2023) Biomass-derived biochar in wastewater treatment-a circular economy approach. **Waste Management Bulletin**.

Onodera T, Sase S, Choeisai P, Yoochatchaval W, Sumino H, Yamaguchi T, Ebie Y, Xu K, Tomioka N, Mizuochi M, Syutsubo K (2013) Development of a treatment system for molasses wastewater: The effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. **Bioresource Technology** 131: 295-302.

O'Reilly J, Lee C, Chinalia F, Collins G, Mahony T, O'Flaherty V (2010) Microbial community dynamics associated with biomass granulation in low-temperature (15°C) anaerobic wastewater treatment bioreactors. **Bioresource Technology** 101: 6336-6344.

Ortegón GP, Arboleda FM, Candela L, Tamoh K, Valdes-Abellan J (2016) Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of The Total Environment** 539: 410–419.

Pan, J., Ma, J., Liu, X., Zhai, L., Ouyang, X., Liu, H., 2019. Effects of different types of biochar on the anaerobic digestion of chicken manure. **Bioresource Technology** 275: 258–265

Parsaee M, Kiani MKD, Karimi K (2019) Uma revisão da produção de biogás a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. **Biomassa e Bioenergia** 122: 117-125.

Parrella RDC, Simeone MLF, Parrella NNLD, Schaffert R (2021) **Cultivares de sorgo para produção de bioenergia**.

Patidar SK, Tare V (2006) Effect of nutrients on biomass activity in degradation of sulfate laden organics. **Process Biochemistry** 41:489-495.

Cavalcanti PFF, Medeiros EJS, Silva JKM, van Haandel A (1999) Excess sludge discharge frequency for UASB reactors. **Water Science and Technology**, 40: 211-219.

Pinto MCO, (2017) **Uma história de dois PACS: a gestão dos investimentos públicos em infraestrutura a partir do Programa de Aceleração do Crescimento.**

Pramanik SK, Suja FB, Zain SM, Pramanik BK (2019) The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. **Bioresource Technology Reports** 8: 100310.

Prask H, Fugol M, Dyjakon A, Głab L, Sowiński J, Whitaker A (2023) The Impact of Sewage Sludge-Sweet Sorghum Blends on the Biogas Production for Energy Purposes. **Energies** 16: 2105.

Purcino AAC (2011) Sorgo Sacarino na Embrapa: histórico, importância e usos. **Agroenergia em Revista** 3: 52.

Qi L, Liu X, Miao Y, Chatzisyneon E, Yang P, Lu H, Pang L (2021) Response of cattle manure anaerobic digestion to zinc oxide nanoparticles: methane production, microbial community, and functions. **Journal of Environmental Chemical Engineering** 9: 106704.

Qin Y, Yin X, Xu X, Yan X, Bi F, Wu W (2020) Specific surface area and electron donating capacity determine biochar's role in methane production during anaerobic digestion **Bioresource Technology** 303: 122919-127683.

Qiu L, Deng YF, Wang F, Davaritouchaee M, Yao YQ (2019) A review on biochar-mediated anaerobic digestion with enhanced methane recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 115: 109373.

Queiróz MVB (2014) **Balanço energético da produção de sorgo sacarino em cultivo irrigado e sequeiro.** 49 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.

Quilhó LFTL (2011) Produção de bioetanol a partir de materiais lenho-celulósicos de sorgo sacarino: revisão bibliográfica. **PQDT-Global**.

Quintanilha AS (2020) **Adição de ferro nas águas residuárias de cervejaria visando aumento da produção de metano e a estabilidade de reatores UASB em dois estágios.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

Raij BV, Cantarella H, Quaggio, JA, Furlani AMC (1997) Recommendations for catem and fertilization for the state of São Paulo. **Instituto Agrônomo de Campinas.**

Rainey FA (2010) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Ed. Volume 4, p. 585.

Rajeshwari KV, Balakrishnan M, Kansal A et al (2000). State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and sustainable energy reviews** 4:135-156.

Rajkovich S, Enders A, Hanley K, Hyland C, Zimmerman AR, Lehmann, J (2011) Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. **Biology and Fertility of Soils** 48: 271-284.

Ramos LR, Lovato G, Rodrigues JAD, Silva EL (2021) Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: Process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. **Journal of Cleaner Production**: 128066.

Ratnavathi CV, Suresh K, Kumar BV, Pallavi M, Komala VV, Seetharama N (2010) Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice. **Biomass and Bioenergy** 34: 947– 952.

Redas TH, Wortmann CS (2014) Sweet sorghum as a bioenergy crop: literature review. **Biomass and Bioenergy** 64:348–355.

Reddy BVS, Ramesh S, Reddy PS, Ramaiah B, Salimath PM, Kachapur R (2005) Sweet sorghum – a potential alternate raw material for bioethanol and bioenergy. **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT)**.

Regassa TH, Wortmann CS (2014) Sweet sorghum as a bioenergy crop: literature review. **Biomass and Bioenergy** 64:348-355.

Reis ALS, Damilano ED, Menezes RSC, de Moraes Jr MA (2016) Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products** 92:255-262.

Ren LT, Wei TY, Xie GH (2012) Evaluation of energy input and output of sweet sorghum grown as a bioenergy crop on coastal saline-alkali land. **Energy** 47:166–173.

Rezende ML, Richardson JW (2017) Risk analysis of using sweet sorghum for ethanol production in southeastern Brazil. **Biomass and Bioenergy** 97:100–107.

Rezes TL, Richardson JW (2017) Risk analysis of using sweet sorghum for ethanol production in southeastern Brazil. **Biomass and Bioenergy** 97: 100-107.

Ribeiro Filho NM, Florêncio IM, Rocha AS, Dantas JP, Florentino ER, Silva FLH (2008) Aproveitamento do caldo do sorgo sacarino para produção de aguardente. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais** 10: 9–16

Ripley LE, Boyle WC, Converse JC (1986) Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation** 59: 406-411.

Ripoli, TCC, Ripoli, MLC (2009) **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Monografia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Riviere D, Desvignes V, Pelletier E, Chaussonnerie S, Guermazi S, Weissenbach J, Sghir A (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **The ISME journal** 3: 700-714.

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** 58: 1486-1499.

Romero V, Acevedo S, Marco P, Giménez J, Esplugas S (2016) Enhancement of Fenton and photo-Fenton processes at initial circumneutral pH for the degradation of the b-blocker metoprolol. **Water Research** 88: 449–457.

Salimbeni A (2013) Sweet Sorghum Biogas Plant in Temperate Regions (Belgium) - Demonstration Plant for Biogas and High Value Biofertilizer Production. **21st European Biomass Conference and Exhibition**.

Samani Majd S, Abdoli MA, Karbassi A, Pourzamani HR, Rezaee M (2017) Effect of physical and chemical operating parameters on anaerobic digestion of manure and biogas production: A review. **Journal of Environmental Health and Sustainable Development** 2: 235-247.

Sampaio RR (2022) **Tratamento anaeróbio e aeróbio de águas residuárias da bovinocultura leiteira em reatores de alta taxa**. 235 . Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Santana-Junior AE, Duda RM, Oliveira RA (2019) Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in twostage anaerobic reactors. **Journal of Cleaner Production** 238: 1–11.

Santos FG, Casela CR, Waquil JM (2005) Melhoramento de Sorgo. In: BORÉM, A. (org). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. UFV - VIÇOSA.

Santos FS, Ricci BC, Neta LSF, Amaral MC (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** 245: 342-350.

Schlegel K, Müller V (2013) Evolution of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> bioenergetics in methanogenic archaea. **Biochemical Society Transactions** 41.

Senna PP, Ansanelli SLM (2016) Etanol de primeira ou de segunda geração? Uma comparação entre os ciclos produtivos. **Blucher Proceedings** 3.

Shaaban M, Abid M (2021) Biochar as a sorbent for organic and inorganic pollutants. In A. Núñez-Delgado (Ed.). **Sorbents Materials for Controlling Environmental Pollution**: 189-208.

Sharma P, Melkania U (2017) Biochar-enhanced hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Enterobacter*

*aerogenes* and *E. coli*. **International Journal of Hydrogen Energy** 42:18865-18874.

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

Si B, Liu Z, Zhang Y, Li J, Shen R, Zhu Z, Xing X (2016). Towards biohythane production from biomass: influence of operational stage on anaerobic fermentation and microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy** 41: 4429-4438.

Song Y, Ma M, Su Q, Du Y, Du D (2024) The new strategy of using pine-cone biochar to enhance anaerobic digestion of liquor wastewater for methane production. **Journal of Cleaner Production**, 438: 140748.

Sousa LOS, Parrella RDC (2018) **Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de sorgo sacarino**.

Sousa SR (2022) **Digestão anaeróbia da vinhaça em reatores horizontais de alta taxa: desempenho do processo e composição da microbiota**. 208 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)- Unesp, Jaboticabal.

Stieb M, Schink B (1985) Anaerobic oxidation of fatty acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. **Archives of microbiology** 140:387-390.

Sun L, Toyonaga M, Ohashi A, Matsuura N, Turlousse DM, Meng XY, Sekiguchi Y (2016) Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class Anaerolineae in the phylum Chloroflexi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 66: 988-996.

Sun Z, Feng L, Li Y, Han Y, Zhou H, Pan J (2022). The role of electrochemical properties of biochar to promote methane production in anaerobic digestion. **Journal of Cleaner Production** 362: 132296.

Tian Y, Zhang H, Chai Y et al (2017) Biogas properties and enzymatic analysis during anaerobic fermentation of *Phragmites australis* straw and cow dung: influence of nickel chloride supplement. **Biodegradation** 28:15–25

Tian W, Li J, Zhu L, Li W, He L, Gu L, Deng R, Shi D, Chai H, Gao M (2021) Insights of enhancing methane production under high-solid anaerobic digestion of wheat straw by calcium peroxide pretreatment and zero valent iron addition. **Renewable Energy** 177: 1321-1332.

Tinôco D, Genier HLA, da Silveira WB (2021) Technology valuation of cellulosic ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 from sweet sorghum bagasse at elevated temperatures. **Renewable Energy** 173: 188-196.

Toledo-Cervantes A, Guevara-Santos N, Arreola-Vargas J, Snell-Castro R, Méndez-Acosta HO (2018) Desempenho e dinâmica microbiana em reatores de leito compactado durante o tratamento anaeróbio de longo prazo em dois estágios de vinhaça de tequila. **Revista de Engenharia Bioquímica**, 138: 12-20.

Van Lier JB (1995) Thermophilic anaerobic wastewater treatment: Temperature aspects and process stability. **Wageningen**: Wageningen Agricultural University.

Van Lier JB, Mahmoud N, Zeeman G (2008) Anaerobic wastewater treatment. **Biological wastewater treatment: principles, modelling and design** 415-456.

Vanwonterghem I, Jensen PD, Ho DP, Batstone DJ, Tyson GW (2014) Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. **Current Opinion in Biotechnology** 27: 55-60.

Viana RS, Figueiredo PAM, Lisboa LAM, Magalhães AC (2016) Morphoanatomical aspects and technological quality of saccharine sorghum submitted to plant regulators. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 15:175–183.

Vieira, HG, Polli, HQ (2022) O biogás como fonte alternativa de energia. **Interface Tecnológica** 17: 388-400.

Vieira, AC, Rocha LLN, Chaves MRM, Cesarino I, Leão AL (2017) Production of second-generation ethanol from saccharine sorghum bagasse. **Molecular Crystals and Liquid Crystals** 655:236-242.

Vikromvarasiri N, Koyama M, Kurniawan W, Pisutpaisal N, Nakasaki K (2023) Enhancing methane recovery by intermittent substrate feeding and microbial community response in anaerobic digestion of glycerol. **Renewable Energy** 204: 106-113.

Villa-Montoya AC, Ferro MIT, de Oliveira RA (2016) Removal of phenols and methane production with coffee processing wastewater supplemented with phosphorous. **International Journal of Environmental Science and Technology** 1–14.

Volpi MPC, Brenelli LB, Mockaitis G, Rabelo SC, Franco TT, Moraes BS (2022) Utilização de resíduo lignocelulósico da produção de etanol de segunda geração para aumentar a produção de metano por meio de co-digestão. **Pesquisa em BioEnergia** 15: 602-616.

Von Sperling, M. (2014) **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: UFMG, v1, 472p.

Vos P, Garrity G, et al (2009) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Volume 3: The Firmicutes (2nd ed.). Springer-Verlag, New York.

Wang C, Liu Y, Gao X, Chen H, Xu X, Zhu L (2018) Role of biochar in the granulation of anaerobic sludge and improvement of electron transfer characteristics. **Bioresource technology** 268: 28–35.

Wang D, Ai J, Shen F, Yang G, Zhang Y, Deng S, Zhang J, Zeng Y, Song C (2017) Improving anaerobic digestion of easy-acidification substrates by promoting buffering capacity using biochar derived from vermicompost. **Bioresource technology** 227: 286–296.

Wang F, Liu C (2009) Development of an economic refining strategy of sweet sorghum in the Inner Mongolia Region of China. **Energy & Fuels** 23: 4137-4142.

Wang M, Zhao Z, Zhang Y (2021) Magnetite-contained biochar derived from Fenton sludge modulated electrontransfer of microorganisms in anaerobic digestion. **Journal of Hazardous Materials** 403:123972.

Wang W, Li, Z, Du, Z, Han, R (2024) Optimization of the anaerobic digestion process and the metabolic pathway of methanogenesis of Jerusalem artichoke straw with the mixed addition of iron filings and biochar. **Industrial Crops and Products** 220:119424.

Whitman W, Bowen T, Boone D (2006) The methanogenic bacteria. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), **The Prokaryotes**: 165-207. Springer, New York.

Wilkie A, Riedesel K, Owens J (2000) Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy** 19: 63-102.

Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. **Biotechnology for biofuels** 5: 1-16.

Wu S, Shen Z, Yang C, Zhou Y, Li X, Zeng G, Ai S, He H (2017) Effects of C/N ratio and bulking agent on speciation of Zn and Cu and enzymatic activity during pig manure composting. *Int. Biodeterior.* **Biodegradation** 119: 429–436.

Xiao H, Zhang D, Tang Z, Li K, Guo H, Niu X, Yi L (2022) Comparative environmental and economic life cycle assessment of dry and wet anaerobic digestion for treating food waste and biogas digestate. **Journal of Cleaner Production** 338: 130674.

Xu S, Bu J, Li C, Tiong YW, Sharma P, Liu K, Tong YW (2024) Biochar enhanced methane yield on anaerobic digestion of shell waste and the synergistic effects of anaerobic co-digestion of shell and food waste. **Fuel** 357: 129933.

Wu X, Staggenborg S, Propheter JL, Rooney WL, Yu J, Wang D (2010) Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. **Industrial Crops and Products** 31:164-170.

Xu S, Bu J, Li C, Tiong YW, Sharma P, Liu K, Tong YW (2024) Biochar enhanced methane yield on anaerobic digestion of shell waste and the synergistic effects of anaerobic co-digestion of shell and food waste. **Fuel** 357: 129933.

Yamada T, Sekiguchi Y, Hanada S, Imachi H, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y (2006) *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae classis* nov. and *Caldilineae classis* nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 56: 1331-1340.

Yang X, Li M, Liu H, Ren L, Xie G (2018) Technical Feasibility and Comprehensive Sustainability Assessment of Sweet Sorghum for Bioethanol Production in China. **Sustainability** 10: 731.

Yan Y, Yan M, Ravenni G, Angelidaki I, Fu D, Fotidis IA (2022) Biochar enhanced bioaugmentation provides long-term tolerance under increasing ammonia toxicity in continuous biogas reactors. **Renewable Energy** 195: 590-597.

Yao JQ, Liu JQ, Zhang YJ, Xu S, Hong Y, Chen YG (2019). Adding an anaerobic step can rapidly inhibit sludge bulking in SBR reactor. **Scientific Reports** 9: 10843.

Yin J, Yu X, Zhang Y, Shen D, Wang M, Long Y, Chen T (2016) Enhancement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste: effect of redox potential and inoculum. **Bioresource Technology** 216: 996-1003.

Yu B, Shan A, Zhang D, Lou Z, et al (2015) Dosing time of ferric chloride to disinhibit the excessive volatile fatty acids in sludge thermophilic anaerobic digestion system. **Bioresource Technology** 189:154-161.

Yuan J, Zhu Y, Wang J, Liu Z, He M, Zhang T, Qiu F (2021) Facile modification of biochar derived from agricultural straw waste with effective adsorption and removal of phosphorus from domestic sewage. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials** 31: 3867-3879.

Zabranska J, Pokorna D (2018) Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens. **Biotechnology Advances** 36: 707-720.

Zamanzadeh M, Hagen LH, Svensson K, Linjordet R, Horn SJ (2016). Anaerobic digestion of food waste—effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. **Water Research** 96: 246-254.

Zhang H, Chen Q, Zhang H, He P, Li S, Lü F (2024) Leaching of biochar at different stages of anaerobic digestion: Leaching behaviors, leachate chemodiversity and effects. **Journal of Cleaner Production** 435: 140531.

Zhang J, Lü F, Luo C, Shao L, He P (2014) Humification characterization of biochar and its potential as a composting amendment. **Journal of Environmental Sciences** 26: 390-397.

Zhang M, Li J, Wang Y, Yang C (2019) Impacts of different biochar types on the anaerobic digestion of sewage sludge. **RSC Advances** 9: 42375-42386.

Zhang W, Wu S, Guo J, Zhou J, Dong R (2015) Performance and kinetic evaluation of semi-continuously fed anaerobic digesters treating food waste: role of trace elements. **Bioresource technology** 178: 297-305.

Zhang W, Zhang L, Li A (2015) Enhanced anaerobic digestion of food waste by trace metal elements supplementation and reduced metals dosage by green chelating agent [S,S]-EDDS via improving metals bioavailability. **Water research** 84:266-277.

Zhang X, Tu B, Dai LR, Lawson PA, Zheng ZZ, Liu LY, Cheng L (2018) *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateiclostridiaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 68: 3197-3211.

Zhang Z, Zhang G, Li W, Li C, Xu G (2016) Enhanced biogas production from sorghum stem by co-digestion with cow manure. **International Journal of Hydrogen Energy**, 41: 9153-9158.

Zhao J, Hou T, Lei Z, Shimizu K, Zhang Z, (2020) Efeito da estratégia de recirculação de biogás na melhoria do biogás e estabilidade do processo de digestão anaeróbica de lodo de esgoto sob condições ligeiramente alcalinas. **Bioresource technology** 308:123293.

Zhao HW, Viraraghavan T (2004) Analysis of the performance of an anaerobic digestion system at the Regina wastewater treatment plant. **Bioresource technology** 95: 301–307.

Zhao Z, Zhang Y, Li Y, Quan X, Zhao Z (2018) Comparing the mechanisms of ZVI and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for promoting waste-activated sludge digestion. **Water Research** 144: 126-133.

Zhou S, Liu M, Shi Y, Jia Y, Sun L, Lu H (2024) Enhancing anaerobic digestion performance of oxytetracycline-laden wastewater through micro-nano bubble ozonation pretreatment. **Bioresource Technology** 394: 130239.

Zhuang H, Shi J, Shan S, Ping L, Zhang C (2020) Enhanced anaerobic treatment of azo dye wastewater via direct interspecies electron transfer with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/sludge carbon. **International Journal of Hydrogen Energy** 45: 28476–28487.

Zhu Y, Zhu N, Sun E, Wang X, Jin H (2023) Potential of hydrochar/pyrochar derived from sawdust of oriental plane tree for stimulating methanization by

mitigating propionic acid inhibition in mesophilic anaerobic digestion of swine manure. **Heliyon** 9:13984.

Ziemiński K, Frąc M (2012) Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. **African Journal of Biotechnology** 11: 4127-4139.

Zinder SH, Sowers KR, Ferry JG (1985) *Methanosarcina thermophila* sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 35: 522-523.