

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA EM REATORES
HORIZONTAIS DE ALTA TAXA: DESEMPENHO DO
PROCESSO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA**

Stella Rubim de Sousa

Bacharela em Aquacultura

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA EM REATORES
HORIZONTAIS DE ALTA TAXA: DESEMPENHO DO
PROCESSO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA**

Discente: Stella Rubim de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Rose Maria Duda

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

2022

S725d	Sousa, Stella Rubim de Digestão anaeróbia da vinhaça em reatores horizontais de alta taxa : desempenho do processo e composição da microbiota / Stella Rubim de Sousa. -- Jaboticabal, 2022 208 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Roberto Alves de Olivera Coorientadora: Rose Maria Duda 1. Biogás. 2. Fenton. 3. Recirculação de efluente. 4. Sistema RAHLF. 5. Tratamento de efluentes. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

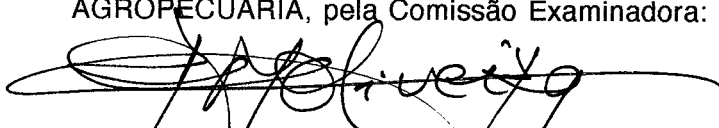
TÍTULO DA TESE: DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA EM REATORES HORIZONTAIS DE ALTA
TAXA: DESEMPENHO DO PROCESSO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA

AUTORA: STELLA RUBIM DE SOUSA

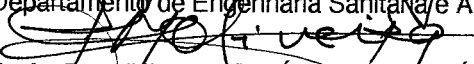
ORIENTADOR: ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

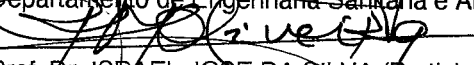
COORIENTADORA: ROSE MARIA DUDA

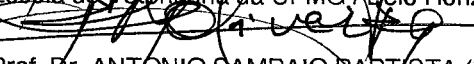
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Rural / FCAV UNESP Jaboticabal/SP


Prof. Dr. VALDERI DUARTE LEITE (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental / Universidade Estadual da Paraíba / Campina Grande/PB


Profa. Dra. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental / UFMG-Belo Horizonte/MG


Prof. Dr. ISRAEL JOSE DA SILVA (Participação Virtual)
Escola de Veterinária da UFMG / Belo Horizonte/MG


Prof. Dr. ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA (Participação Virtual)
Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ) / Piracicaba/SP

Jaboticabal, 27 de janeiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Stella Rubim de Sousa – Filha de Washington Rubim de Sousa e Cleonice Aparecida de Souza, nascida em Goiânia, no Estado de Goiás, no dia 26 de setembro de 1990. Graduada em Aquacultura pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em dezembro de 2014. Em 2015, deu início ao curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Minas Gerais, no Laboratório de Aquacultura (LAQUA), defendendo sua dissertação em fevereiro 2017. Em março de 2017, ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária em nível de Doutorado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, no Laboratório de Saneamento Ambiental, Departamento de Engenharia Rural, atuando na área de pesquisa de tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar por meio da digestão anaeróbia e também pela combinação do tratamento anaeróbio e processo oxidativo avançado (Fenton).

***“O correr da vida embrulha tudo,
A vida é assim: esquentada e esfria, aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta.***

O que ela quer da gente é coragem!

O que Deus quer é ver a gente

Aprendendo a ser capaz

De ficar alegre a mais,

No meio da alegria.

E ainda mais alegre,

Ainda no meio da tristeza.

A vida inventa!

A gente principia as coisas,

No não saber por quê,

E desde aí perde o poder de continuação,

Porque a vida é mutirão de todos,

Por todos remexida e temperada.

O mais importante e bonito, do mundo, é isto:

Que as pessoas não estão sempre iguais,

Ainda não foram terminadas,

Mas que estão sempre mudando.

Afinam ou desafinam. Verdade Maior.

Viver é muito perigoso; e não é não.

Nem sei explicar estas coisas.

Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor”.

Guimarães Rosa

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Cleonice e Washington; agradeço imensamente pela educação e valores que me foram ensinados. Vocês foram os pais perfeitos para me ajudarem a ser quem eu sou hoje. Obrigada por todo amor e cuidado! Espero poder retribuir tudo o que vocês me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Bruno e Matheus; agradeço pela amizade, apoio, compreensão, amor e incentivo. Sou muito grata a Deus por tê-los em minha vida. Amo vocês, imensamente!

À minha avó, Dona Ivone; obrigada pelas palavras de amor, conselhos, incentivo e pelas nossas tardes acompanhadas de um cafézinho.

À minha madrinha Rita; obrigada por todo amor e presença.

Aos meus queridos tios, obrigada pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar para os caminhos necessários para o meu crescimento, sempre me dando forças para continuar.

Ao meu querido e respeitado orientador, professor Dr. Roberto Alves de Oliveira, obrigada pela oportunidade e pela confiança. Agradeço por todo aprendizado, pelo incentivo, por todas as contribuições e carinho. Todo conhecimento adquirido foi de grande valia para minha formação profissional e crescimento pessoal. Agradeço também por estimular o senso crítico de todo o grupo do laboratório, e pelos grandes conselhos, que muitas das vezes, foram conselhos de um pai. Sempre lembrarei do senhor com muito carinho e respeito.

À minha querida coorientadora, professora Dra. Rose Maria Duda, agradeço pelos grandes e valiosos ensinamentos, pelos conselhos, contribuições, críticas construtivas, pelas orientações, disposição em ensinar, pela compreensão e paciência. Sou muito grata pelos anos de convivência e por ter tido uma coorientadora tão presente e disposta em ajudar. Sua força e determinação é admirável! Será sempre um exemplo para mim. Obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Luciano, obrigada por abrir as portas do laboratório de saneamento ambiental durante o período de graduação para mim. Agradeço pela oportunidade recebida, de poder ter participado dos projetos de Iniciação Científica e de Extensão Rural durante minha trajetória. As oportunidades fornecidas fizeram com que eu me apaixonasse pela área ambiental, contribuindo para o início de uma longa caminhada. Agradeço também por todo o carinho e orientações, pela disponibilidade em ajudar, por tudo o que me foi ensinado e pela amizade. Sua simplicidade e humildade é encantadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, pela minha formação e por todo conhecimento adquirido.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), ao Laboratório de Saneamento Ambiental e o Departamento de Engenharia Rural, disponibilizando de todos os recursos e instalações para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC), por todo auxílio.

Às Usinas Pitangueiras e Santa Fé pelo fornecimento do material necessário para realização deste trabalho.

À Juliana Vantini, ao Rafael Correia e Fernanda Zaneli pelas grandes contribuições nas análises de biologia molecular.

Aos amados amigos de laboratório do Saneamento Ambiental, agradeço por toda ajuda, companheirismo, pela amizade e por todos os momentos alegres que passamos, sempre muito unidos. Deixo meu grande abraço para Valciney, Jorge, Dênis, Wilmar, Eliane, Michel, Vivian, Áureo, Alexandra, Amanda, Aderbal, e um recado, em especial, para Renata e Kleber: agradeço imensamente por tudo o que vivemos, de maneira íntima. Vocês fizeram com que a caminhada até aqui se tornasse mais leve. Aprendemos uns com os outros o significado real de amizade, empatia, resiliência e trabalho em equipe. Levarei a amizade de vocês por todo sempre.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Rural: Ailton, Davi, João, Marcos, agradeço por toda contribuição e amizade.

À seção técnica da Pós-Graduação, por todo auxílio e atenção.

Aos membros da comissão examinadora do Exame Geral de Qualificação, José Tavares de Sousa, Luciano dos Santos Rodrigues, Leonardo Lucas Madaleno e Marcelo Bruno, agradeço pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa (processo 11045-0, 2015).

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

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 Cana-de-açúcar.....	6
3.2 Bioetanol.....	8
3.3 Produção de etanol e açúcar.....	15
3.4 Vinhaça de cana-de-açúcar.....	20
3.5 Digestão anaeróbia e sustentabilidade.....	26
3.6 Digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar.....	34
3.7 Reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa.....	38
3.8 Aplicação da biologia molecular em lodo de reatores anaeróbios.....	45
3.9 Processo fenton.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Instalações experimentais.....	51
4.2 Lodo de inóculo.....	55
4.3 Características do afluente.....	56
4.4 Condições operacionais dos reatores RAHLF (R1-R4).....	60
4.5 Exames e determinações.....	61

4.6 Perfil longitudinal dos reatores horizontais.....	63
4.7 Amostras do lodo dos reatores para extração do DNA genômico.....	63
4.8 Sequenciamento e análise de dados – Illumina.....	65
4.9 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	65
4.10 Teste Fenton.....	67
4.11 Análise estatística.....	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1 Temperatura.....	74
5.2 pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal.....	77
5.3 Demanda química de oxigênio (DQO total e DQO dissolvida).....	91
5.4 Produção de metano (CH ₄).....	100
5.5 Macro e micronutrientes.....	106
5.6 Sulfato, sulfeto e fenóis totais.....	118
5.7 Sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV).....	126
5.8 Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV).....	128
5.9 Bioestabilização do lodo.....	131
5.10 Perfil longitudinal do sistema RAHLF.....	135
5.11 Diversidade microbiana nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa.....	139
5.12 Quantificação da microbiota (q-PCR).....	164
6. CONCLUSÕES.....	168
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
8. APÊNDICES.....	194

Apêndice A. Correlação da comunidade microbiana com metano e correlação das comunidades microbianas com os reatores horizontais....	195
Apêndice B. Rotas metabólicas correlacionadas à posição no reator e rotas metabólicas correlacionadas à produção de metano.....	196

DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA EM REATORES HORIZONTAIS DE ALTA TAXA: DESEMPENHO DO PROCESSO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA

RESUMO – A recuperação de recursos tem sido extremamente abordada nos tempos atuais, trazendo uma nova consciência coletiva dos aspectos ambientais, sociais e governamentais (ESG). A produção de biogás a partir da vinhaça de cana-de-açúcar possui um grande potencial para as questões supracitadas para o setor sucroenergético. O emprego de reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) para a digestão anaeróbia e produção de biogás a partir de resíduos apresenta grandes vantagens em virtude a sua robustez, facilidade construtiva, operacional e econômica. No entanto, esta conformação de sistema para a biodigestão da vinhaça ainda foi pouco estudada. Neste estudo foi avaliado o efeito do aumento progressivo da carga orgânica volumétrica (COV) sobre o desempenho do sistema RAHLF e sobre a microbiota presente no lodo, durante três períodos de safra da cana consecutivos (810 dias). O experimento foi dividido em fase de partida e fases de 1 a 9, sendo a última fase distinguida pela combinação da digestão anaeróbia com o processo Fenton. Foram aplicadas COV de até 27,9 g de DQO L.d⁻¹ nos RAHLF apresentando estabilidade durante todo período experimental, e remoções de DQO total acima de 60%, sendo as melhores remoções atingidas na fase 9 (85%), sem suplementação nutricional. Na fase 9 promoveram-se a redução de sulfato, sulfeto e fenóis no afluente, o que favoreceu a produção volumétrica de metano (0,28 L CH₄ (L d)⁻¹) em relação à fase anterior para condições de COVs similares. No entanto as médias de produção específica de metano, para ambas as fases, apresentaram-se semelhantes. O sequenciamento de nova geração (Illumina) realizado no lodo dos reatores em diferentes fases do experimento demonstrou uma comunidade microbiana diversa, com elevada abundância de bactérias dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Cloacimonetes e Bacteroidetes, que contribuíram para a eficácia do sistema. A qPCR realizada apresentou alterações na composição microbiana, indicando que houve tendência dos microrganismos a realizarem a metanização pelas vias hidrogenotróficas.

Palavras-chave: Biogás; fenton; recirculação de efluente; sistema RAHLF; tratamento de efluentes.

ANAEROBIC DIGESTION OF VINASSE IN HIGH-RATE HORIZONTAL REACTORS: PERFORMANCE PROCESS AND MICROBIOTA COMPOSITION

ABSTRACT – The recovery of resources has been extremely addressed nowadays, bringing a new collective awareness of environmental, social and governmental aspects (ESG). The production of biogas from sugarcane vinasse has great potential for the aforementioned issues for the sugar-energy sector. The use of HARFB reactors for anaerobic digestion and biogas production from residues has great advantages due to its robustness, ease of construction, operation and economics, however, this conformation of a system for biodigestion of vinasse has been little studied. In this sense, this study evaluated the effects of the progressive increase in OLR on the performance of the HARFB system and on the microbiota present in the sludge, during three consecutive sugarcane harvest periods (810 days). The experiment was divided into a starting phase and phases from 1 to 9, the last phase being distinguished by the combination of anaerobic digestion with the Fenton process. The system reached OLR of up to 27.9 g of COD Ld⁻¹, showing stability throughout the experimental period, and total COD removals above 60%, with the best removals achieved in phase 9 (85%), without nutritional supplementation during the entire experiment. Phase 9 promoted the reduction of sulfate, sulfide and phenols in the influent and favored the volumetric methane production (0.28 L CH₄ (L d)⁻¹) compared to the previous phase for similar OLR conditions. However, the specific methane production averages for both phases were similar. The next generation sequencing (Illumina) carried out in the reactor sludge at different stages of the experiment showed a diverse microbial community, with a high abundance of bacteria from the phyla Firmicutes, Proteobacteria, Cloacimonetes and Bacteroidetes, which contributed to the efficiency of the system. The qPCR performed showed changes in the microbial composition, indicating that there was a tendency for microorganisms to carry out methanization by hydrogenotrophic pathways.

Keywords: Biogas; fenton; effluent recirculation; HARFB system; wastewater treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	- Alcalinidade Intermediária
AP	- Alcalinidade Parcial
AT	- Alcalinidade Total
AVT	- Ácidos Voláteis Totais
COV	- Carga Orgânica Volumétrica
CV	- Coeficiente de Variação
DQO	- Demanda Química de Oxigênio
DQOdiss	- Demanda Química de Oxigênio Dissolvida
N-am	- Nitrogênio Amoniacal
NTK	- Nitrogênio Total Kjeldal
PEM	- Produção Específica de Metano
P-T	- Fósforo Total
PVM	- Produção Volumétrica de Metano
pH	- Potencial Hidrogeniônico
POA	- Processos Oxidativos Avançados
RAHLF	- Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo
SST	- Sólidos Suspensos Totais
SSF	- Sólidos Suspensos Fixos
SSV	- Sólidos Suspensos Voláteis
ST	- Sólidos Totais
STF	- Sólidos Totais Fixos
TDH	- Tempo de Detenção Hidráulica

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma simplificado e adaptado da produção de açúcar e etanol na indústria sucroenergética. Adaptado de Christofolletti et al. (2013).....	17
Figura 2. Alternativas para o uso da vinhaça de cana-de-açúcar. Adaptado de Christofolletti et al. (2013).....	21
Figura 3. Fluxograma simplificado das etapas da digestão anaeróbia e rotas metabólicas adaptado de Chernicharo (2016).....	30
Figura 4. Representação esquemática do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF), em série.....	52
Figura 5. Sistema de tratamento composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF) – R1, R2, R3 e R4...	53
Figura 6. Sistema de tratamento composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF) – R1, R2, R3 e R4, e gasômetros.....	53
Figura 7. Material de meio suporte (anel de eletroduto corrugado) utilizado nos reatores anaeróbios de leito fixo e alta taxa – RAHLF.....	54
Figura 8. Reservatório para armazenamento do efluente do sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa – RAHLF.....	54
Figura 9. Tanques para armazenamento temporário de vinhaça de cana-de-açúcar.....	56
Figura 10. Recipientes utilizados para a coleta da vinhaça de cana-de-açúcar nas usinas sucroenergéticas.....	57

Figura 11.	Amostra de vinhaça de cana-de-açúcar.....	57
Figura 12.	Diagrama esquemático do sistema RAHLF (R1, R2, R3 e R4) com as cargas orgânicas volumétricas (COV) em g DQO total (L d) ⁻¹ aplicadas aos reatores (R1, R2, R3 e R4); valores médios da demanda química de oxigênio total (DQO total) da vinhaça de cana-de-açúcar em g L ⁻¹ e taxas de recirculação do efluente do R4 (vinhaça : efluente) em % vol. aplicados ao R1 nas diferentes fases experimentais.....	58
Figura 13.	Combinação de tratamento biológico com processo oxidativo avançado Fenton.....	67
Figura 14.	Desenho esquemático do Jar-Teste utilizado nos ensaios do processo oxidativo Fenton.....	70
Figura 15.	Aplicação do teste Fenton em vinhaça biodigerida pelo sistema RAHLF no Jar-Test durante o experimento.....	70
Figura 16.	Amostra da vinhaça biodigerida após aplicação do teste Fenton em processo de decantação.....	71
Figura 17.	Temperaturas (máxima, média e mínima) do ar diárias estimadas pela Estação Agroclimatológica da UNESP/Jaboticabal durante a operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, no período experimental (Anos de 2017, 2018 e 2019 e 2020).....	75
Figura 18.	Valores de pH no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	78
Figura 19.	Valores de Alcalinidade Total (AT) no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	80

Figura 20.	Valores de Alcalinidade Parcial (AP) no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	81
Figura 21.	Valores de AVT para afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	85
Figura 22.	Relações de Al/AP e AVT/AT para os efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	86
Figura 23.	Valores de concentrações de nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	89
Figura 24.	Demanda química de oxigênio (DQO total) do afluente versus carga orgânica volumétrica (COV) aplicadas ao R1 em relação ao tempo de operação dos reatores anaeróbios de leito fixo (RAHLF).....	91
Figura 25.	Valores de demanda química de oxigênio (DQO _{total}) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo (RAHLF), em série.....	94
Figura 26.	Eficiência de remoção da demanda química de oxigênio total (DQO _{total}) para o sistema composto pelos reatores horizontais de leito fixo (RAHLF - R1+R2+R3+R4) em série, versus a carga orgânica volumétrica aplicada no R1 no período de partida e fases de 1 a 9.....	97
Figura 27.	Produção volumétrica de CH ₄ dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar durante diferentes fases de operação (partida e fases de 1-9).....	104

Figura 28.	Valores da relação DQO/SO_4^{2-} nos afluentes e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.....	121
Figura 29.	Valores médios de DQO total, DQO dissolvida, Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4), instalados em série, durante a fase de partida e fases de 1 a 9.....	130
Figura 30.	Concentração de sólidos voláteis e sólidos totais do lodo nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF – R1, R2, R3 e R4) em série nos pontos de coleta P1 a P6 durante a partida e fases 1 a 9.....	133
Figura 31.	Relação de sólidos voláteis e sólidos totais (SV/ST) determinados no período de partida (P) e fases de 1 a 9 do experimento, nos 6 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4, P5 e P6 dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF – R1, R2, R3 e R4), em série.....	134
Figura 32.	Perfil longitudinal de Alcalinidade Total (AT), Alcalinidade Parcial (AP), Alcalinidade Intermediária (AI) e relação AI/AP do sistema RAHLF.....	137
Figura 33.	Perfil de potencial hidrogeniônico (pH); Ácidos Voláteis Totais (AVT); Nitrogênio Amoniacal (N. Am.); e Demanda Química de Oxigênio Total (DQO) do sistema RAHLF.....	138
Figura 34.	Afiliações taxonômicas bacterianas e abundância relativa dos filos, classes, ordem e gênero verificados nas amostras de lodo dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF): R1, R2, R3 e R4, coletados no lodo de inóculo e nas fases 2 e 6, correspondentes à primeira e segunda safra da cana-de-açúcar, respectivamente. D: domínio; fil: filo; g: gênero; f: família; o:	

ordem. Outros: Abundância relativa de microrganismos abaixo dos 10 principais identificados.....	142
Figura 35. Afiliações taxonômicas de arqueias e abundância relativa de classes e gêneros verificadas em amostras de lodo dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF: R1, R2, R3 e R4), coletados no lodo de inóculo e nas fases 2 e 6, correspondentes à primeira e segunda safra da cana-de-açúcar, respectivamente.....	158
Figura 36. Árvore de calor: Comparação da comunidade microbiana verificada no lodo presente no sistema (RAHLF-R1+R2+R3+R4), em diferentes períodos experimentais, correspondentes às fases 2 (primeira safra da cana-de-açúcar) e 6 (segunda safra da cana-de-açúcar). Os microrganismos cujo nome está exposto, possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). C: classe; d: domínio; f: família; g: gênero; p: filo; o: ordem.....	160
Figura 37. Árvore de calor: Comparação da comunidade microbiana verificada no lodo presente no sistema (RAHLF-R1+R2+R3+R4), em condições de ambiente com baixas e elevadas concentrações de Cobalto. Os microrganismos cujo nome está exposto, possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). C: classe; d: domínio; f: família; g: gênero; p: filo; o: ordem.....	161
Figura 38. Árvore de calor: Visualização da comunidade microbiana verificada no lodo presente no sistema (RAHLF-R1+R2+R3+R4), em condições de alta e de baixa produção volumétrica de metano. Os microrganismos cujo nome está exposto, possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). C: classe; f: família; g: gênero; p: filo.....	162

Figura 39.	Microbioma core realizado para amostras de lodos coletados no sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF - R1+R2+R3+R4). C: classe; d: domínio; f: família; g: gênero; p: filo, o: ordem.....	163
Figura 40.	Quantificação (qPCR) do número de cópias do gene 16S rDNA (cópias/gSV) dos principais microrganismos metanogênicos do lodo dos reatores anaeróbios horizontais (R1, R2, R3 e R4) em série, coletado no lodo de inóculo. P1, P2, P3, e P4 – Pontos de coleta correspondentes aos lodos coletados, de maneira composta, para cada reator.....	166
Figura 41.	Quantificação (qPCR) do número de cópias do gene 16S rDNA (cópias/g SV) dos principais microrganismos metanogênicos do lodo dos reatores anaeróbios horizontais (R1, R2, R3 e R4) em série. (A): lodo coletado ao final da primeira safra da cana-de-açúcar (fase 2); (B): lodo coletado ao final da segunda safra da cana-de-açúcar (fase 6). P1, P2 e P3: Pontos de coleta das amostras do lodo ao longo de cada reator.....	167
Figura 1A.	Correlação da comunidade microbiana com metano.....	195
Figura 2A.	Correlação da comunidade microbiana com os reatores R1, R2, R3 e R4.....	196
Figura 1B.	Rotas metabólicas correlacionadas à posição no reator. (*) significativos a 0,95 pela correlação de Spearman. Metabólitos preditos usando o pipeline do PICRUST2. Os nomes completos das rotas estão expressos na tabela 1B.....	197
Figura 2B.	Rotas metabólicas correlacionadas a produção de metano. (*) Significativos a 0,95; (**) significativos a 0,99 pela correlação de Spearman. Metabólitos preditos usando o pipeline do PICRUST2. Os nomes completos das rotas estão expressos na tabela 2B.....	203

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estimativas da produção nacional de açúcar proveniente da cana-de-açúcar e da produção de etanol de primeira geração a partir da cana e do milho.....	14
Tabela 2. Classificação dos tipos de produção do etanol em relação à matéria-prima, desvantagens e vantagens.....	15
Tabela 3. Características da vinhaça de cana-de-açúcar.....	23
Tabela 4. Características de diferentes tipos de vinhaças geradas a partir de diferentes fontes de matéria-prima para a produção de etanol.....	24
Tabela 5. Famílias de bactérias e arqueias verificadas em sistemas de tratamento anaeróbios.....	32
Tabela 6. Valores de volume total e útil, comprimento e tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicados nos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RAHLF), em série, R1, R2, R3 e R4.....	55
Tabela 7. Valores de SV e ST do lodo de inóculo, em g.L ⁻¹ , contido nos reatores R1, R2, R3 e R4, analisados por pontos de coletas (P1, P2, P3, P4, P5 e P6).....	55
Tabela 8. Valores médios e desvios padrões de pH, Demanda Química de Oxigênio Total (DQO total), Ácidos Voláteis Totais (AVT) Demanda Química de Oxigênio Dissolvida (DQOdiss), Nitrogênio Amoniacal (N. Am.), Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e Fósforo Total (P-T) obtidos na caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada no sistema de tratamento composto	

	Página
pelos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo - RAHLF, em diferentes fases experimentais.....	59
Tabela 9. Condições operacionais do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RAHLF), em série, R1, R2, R3 e R4, na partida e fases 1 a 8...	61
Tabela 10. Exames e determinações, frequência e fontes das metodologias utilizadas.....	62
Tabela 11. Valores de sólidos voláteis das amostras de lodo compostas dos reatores R1, R2, R3 e R4, coletado para avaliação da composição microbiana (Illumina) no lodo de inóculo e nas fases 2 e 6 do experimento.....	64
Tabela 12. Valores de sólidos voláteis em cada ponto do lodo coletado para a quantificação em PCR em tempo real.....	64
Tabela 13. Condições experimentais para o teste Fenton.....	69
Tabela 14. Análises físico-químicas avaliadas nas amostras expostas à reação Fenton.....	71
Tabela 15. Proporções das concentrações de H_2O_2 e $FeCl_3$ avaliados nos testes preliminares do Fenton aplicados à vinhaça biodigerida em pH de 3,0, 4,0 e 9,0, em tempo de reação de 30 minutos e valores dos parâmetros analisados.....	73
Tabela 16. Médias das temperaturas (Temp.) diárias máxima, média e mínima estimadas durante o período de operação do conjunto de reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF - R1+R2+R3+R4).....	76
Tabela 17. Valores médios e coeficientes de variação (cv) de pH e ácidos voláteis totais (AVT) no afluente e efluentes dos reatores	

horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF- R1, R2, R3 e R4), instalados em série.....	83
Tabela 18. Valores médios e coeficientes de variação (cv) de alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP) e alcalinidade intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF - R1, R2, R3 e R4).....	84
Tabela 19. Valores médios e coeficientes de variação (cv) de nitrogênio amoniacal (N-am) e relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial (AI/AP) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) instalados em série.....	90
Tabela 20. Valores médios e coeficientes de variação (cv) da carga orgânica volumétrica (COV) aplicada aos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF) (R1, R2, R3 e R4), e demanda química de oxigênio (DQO) obtidas nos afluentes e efluentes dos RAHFLs.....	95
Tabela 21. Valores médios e coeficientes de variação da DQO e eficiências de remoções obtidas nos afluentes e efluentes aos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF) (R1, R2, R3 e R4).....	96
Tabela 22. Valores médios e coeficientes de variação da DQOdiss e eficiências de remoções obtidas nos afluentes e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série.....	99
Tabela 23. Conteúdo de CH ₄ (%) no biogás contido nos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4), valores médios da produção volumétrica e específica de metano e	

coeficientes de variação (cv) em diferentes fases do experimento.....	105
Tabela 24. Relação DQO: N: P no afluente do sistema RAHLF (R1), coeficientes de variação (cv) e valores médios de concentrações de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e fósforo total (P-T), em mg.L ⁻¹ , no afluente e efluente dos reatores anaeróbicos horizontais de leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) e eficiência de remoção para o sistema (R1 + R2 + R3 + R4)....	109
Tabela 25. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos micronutrientes K, Co e Fe, em mg L ⁻¹ , no afluente e efluente dos reatores horizontais (R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).....	114
Tabela 26. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos micronutrientes Mg, Na e Cu, em mg L ⁻¹ , no afluente e efluente dos reatores horizontais (R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).....	115
Tabela 27. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos micronutrientes Mg, Na e Cu, em mg L ⁻¹ , no afluente e efluente dos reatores horizontais (R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).....	116
Tabela 28. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações do micronutriente Zn, em mg L ⁻¹ , no afluente e efluente dos reatores horizontais (R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).....	117
Tabela 29. Valores médios e coeficiente de variação (cv) das concentrações de sulfato, sulfeto e fenóis totais no afluente e	

	efluentes dos reatores horizontais R1, R2, R3 e R4 tratando vinhaça de cana-de-açúcar.....	120
Tabela 30.	Relações de DQO/SO ₄ ²⁻ nos afluentes e efluentes dos reatores horizontais R1, R2, R3 e R4 em diferentes fases experimentais.	121
Tabela 31.	Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV), em mg L ⁻¹ , no afluente e efluentes dos reatores horizontais (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) em série e eficiências de remoção do sistema (%).....	127
Tabela 32.	Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV), em mg L ⁻¹ , no afluente e efluentes dos reatores horizontais (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção do sistema (%).....	129
Tabela 33.	Composição bacteriana e classificação dos 10 principais membros verificados no lodo do sistema RAHLF.....	143
Tabela 34.	Percentuais de abundância relativa de microrganismos verificados no lodo dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) no período de partida (lodo de inóculo) e nas fases 2 e 6 do experimento.....	146
Tabela 35.	Composição e classificação dos principais membros de arqueias verificadas no lodo do sistema (R1, R2, R3 e R4).....	159
Tabela 1B.	Lista de rotas metabólicas correlacionadas às posições nos reatores (R1, R2, R3 e R4). (*) significativos a 0,95 pela correlação de Spearman.....	198
Tabela 2B.	Listas de rotas metabólicas correlacionadas à produção de metano.....	204

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, muito cultivada no mundo e com um grande potencial para a produção de açúcar e etanol, representando uma importante fonte de mão de obra no meio rural e na agroindústria (Basanta et al., 2003; Parsaee et al., 2019). O Brasil lidera a produção de etanol e açúcar de cana-de-açúcar com a produção de 35,7 bilhões de litros e 29,8 milhões de toneladas, respectivamente, na safra de 2019/2020 (Conab, 2020). Na safra de 2019/2020 atingiu-se o recorde na produção do etanol, mas os volumes de produção nas safras subsequentes poderão ser afetadas pela pandemia da Covid-19, pois ocorreu a priorização das indústrias sucroenergéticas para a produção de açúcar (Conab, 2021). No entanto, o etanol continua sendo uma importante fonte de energia limpa e renovável.

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, assim como outras fontes alternativas de energia, para substituir os combustíveis fósseis, surgiram como uma solução para a escassez de energia e para a redução de adversidades ambientais relacionadas à poluição do ar (Alkimim and Clarke, 2018). As empresas que adotam práticas de *Environmental, Social, Governance* (ESG) apresentam maior tendência à lucratividade, aumentando desta forma o seu valor de mercado e sendo atraídas, consequentemente, por grandes investidores (Umar et al., 2020). De acordo com Manochio et al. (2017), o uso do etanol proveniente da cana-de-açúcar pode reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) em torno de 40 a 60%, apresentando custos relativamente menores de produção em relação aos combustíveis derivados do petróleo.

Nas etapas do processo da fabricação do etanol e do açúcar são geradas grandes quantidades de subprodutos industriais como o bagaço da cana, cinzas, torta de filtro, melaço e a vinhaça de cana-de-açúcar (Moraes et al., 2014; Parsaee et al., 2019). Para cada litro de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar são gerados de 10 a 15 L de vinhaça (España-Gamboa et al., 2011). A vinhaça da cana-de-açúcar é um subproduto complexo. Apesar de conter grandes quantidades de sólidos dissolvidos em sua composição, possui característica líquida e de coloração escura.

Apresenta também nutrientes e minerais, valores de pH reduzido (3,5 a 5,0) demonstrando características ácidas e corrosivas, possui elevados valores de demanda química de oxigênio (DQO) (30 a 150 g L⁻¹), presença de compostos fitotóxicos e antibacterianos como fenóis, polifenóis e metais pesados, além de concentrações de sulfatos que podem variar (Parsaee et al., 2019).

A composição da vinhaça varia conforme as características intrínsecas do processamento da cana-de-açúcar do processo produtivo, e dos produtos finais desejáveis da indústria sucroenergética (Fuess e Garcia, 2014). Apesar de ser um subproduto complexo, a vinhaça possui características consideradas interessantes para a fertirrigação do solo, pois é abundante em água, rica em matéria orgânica, e nutrientes como o potássio, nitrogênio, fósforo e cálcio (Espanha-Gamboa et al., 2011; Silva et al., 2011; de Souza et al., 2013; Buller et al., 2021).

Atualmente, a grande maioria das usinas sucroenergéticas situadas no Brasil, principalmente no Estado de São Paulo, onde encontram-se a maioria das usinas sucroenergéticas do país, tem promovido a aplicação, em larga escala, da vinhaça bruta no solo como fertilizante (Fuess and Garcia, 2014). Apesar de haver o controle da fertirrigação da vinhaça ao solo, sabe-se que quando esta aplicação ocorre de forma contínua e exacerbada, a vinhaça pode contribuir com a salinização do solo, se tornando também uma possível fonte de poluição para as águas superficiais e subterrâneas (Campos et al., 2014). Sendo assim, o gerenciamento da vinhaça representa um sério problema ambiental para as destilarias de etanol (Nakashima e Junior, 2020).

As tecnologias relacionadas à digestão anaeróbia vêm sendo aplicadas como alternativa para a redução do potencial poluidor da vinhaça gerando o gás metano, produto de valor, que pode ser utilizado como biocombustível, melhorando o potencial energético das indústrias sucroenergéticas (Parsaee et al., 2019; Peiter et al., 2019). Além disto, a recuperação de energia da vinhaça por meio da digestão anaeróbia pode contribuir para a redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) contribuindo com impactos positivos nos níveis socioeconômicos regionais e locais (Buller et al., 2021).

Diversas configurações de reatores anaeróbios para conversão da matéria orgânica em biogás vêm recebendo a atenção de pesquisadores no intuito de

aprimorar o processo do tratamento biológico (Döll e Foresti, 2010), inclusive para o tratamento da vinhaça (Del Nery et al., 2018). Dentre os reatores utilizados na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar, por exemplo, destacam-se os reatores UASB em série, com COVs aplicadas variando de 8 a 45 g DQO L.d⁻¹ (Barros et al., 2017); reatores em série composto por reator de leito fluidizado anaeróbio acidogênico (AFBR-A) e reator de leito fluidizado anaeróbio metanogênico sequencial (AFBR-S) com COVs aplicadas variando de 5 a 10 g DQO L.d⁻¹ (Ramos e Silva, 2020); e reator anaeróbio de leito fixo empacotado (APBR) seguido de reator anaeróbio de leito fixo estruturado (ASTBR) com COVs aplicadas de 15 a 30 g DQO L.d⁻¹ (Fuess et al., 2017). No entanto, os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF), instalados em série, apresentam-se como novidade para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

O sistema RAHLF tem a capacidade de manter altas concentrações de biomassa aderida ao meio suporte, apresentando boas características hidrodinâmicas e tempo de detenção hidráulica relativamente curto para elevadas cargas orgânicas (Santos e Oliveira, 2011). Esta configuração de reator foi proposta por ZAIAT e colaboradores em 1994, e apresentaram resultados promissores para o tratamento de água residuária da indústria do papel reciclado (Zaiat et al., 1997), águas residuárias da suinocultura (Duda et al., 2015) e na codigestão de águas residuárias de suinocultura com resíduos vegetais (Mazareli et al., 2016).

No processos de digestão anaeróbia da vinhaça em reatores anaeróbios, o uso da recirculação do efluente tratado para a correção do pH da vinhaça *in natura* é viável, pois propicia a alcalinidade desejável e que pode ser reintroduzida ao sistema, evitando desta forma, o uso de alcalinizantes químicos que elevam o custo do tratamento. Deste modo, a recirculação do efluente da vinhaça tratada torna-se uma importante opção para a redução de custos do tratamento anaeróbio, além de auxiliar na manutenção das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas aos reatores (Barros et al., 2016; Guerreiro et al., 2016).

A vinhaça de cana-de-açúcar contém em sua composição alguns compostos denominados recalcitrantes, como sulfatos, fenóis e melanoidinas que são difíceis de serem degradados. A recirculação do efluente, em alguns casos, pode proporcionar o acúmulo destes compostos recalcitrantes dentro do sistema, dificultando a

anaerobiose. Desta maneira, a combinação do tratamento biológico aliado a processos de oxidação química avançada pode ser uma opção interessante para a digestão anaeróbia da vinhaça, visando a degradação de compostos recalcitrantes (Espanha-Gamboa et al., 2011).

Os processos oxidativos avançados (POAs), como o processo Fenton, tem a capacidade de degradar os recalcitrantes em águas residuárias. O processo Fenton é caracterizado por possuir elevado potencial de oxidação, provocando a quebra de moléculas complexas a compostos simplificados. A vinhaça previamente biodigerida em reatores anaeróbios pode apresentar uma redução significativa do material orgânico contido em sua composição, e o efluente dos reatores anaeróbios submetidos ao processo Fenton pode apresentar resultados importantes quanto à remoção dos compostos recalcitrantes Guerreiro et al., (2016).

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do aumento progressivo da carga orgânica volumétrica (COV) no desempenho do sistema RAHLF e na microbiota, e verificar estratégias para melhorias do processo anaeróbio e produção do biogás, aplicando-se a recirculação do efluente e a integração da digestão anaeróbia com o processo fenton.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar um sistema de tratamento constituído por quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF), dispostos em série e em condições mesofílicas para a produção de biogás a partir da vinhaça de cana-de-açúcar, buscando-se as melhores condições para a produção de metano.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da utilização de quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF), em série (R1, R2, R3 e R4), quanto a remoção de material orgânico e a produção de biogás da vinhaça de cana-de-açúcar.

- Avaliar o efeito do aumento gradual da COV (5,6 a 27,9 g DQO (L d)⁻¹) e da recirculação do efluente, a longo prazo, sobre o pH, alcalinidade e ácidos voláteis totais e demais parâmetros de estabilidade do sistema.

- Avaliar o efeito da integração do tratamento anaeróbio da vinhaça com o processo oxidativo avançado, Fenton, sobre a produção de biogás.

- Avaliar a quantidade e a composição de bactérias e arqueias presentes em amostras de lodo extraídas em diferentes fases experimentais através da PCR quantitativa em tempo real (q-PCR) e pelo sequenciamento de última geração (Illumina).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, uma das principais culturas mais cultivadas do mundo. A produção da cana-de-açúcar abrange um mercado altamente competitivo (Jena e Poggi, 2013), possuindo um grande potencial para a produção de etanol, sendo considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis. Além da produção de etanol, a cana-de-açúcar também pode ser utilizada para produção de açúcar (Conab, 2017). Durante o processamento da cana, são gerados subprodutos que podem ser utilizados para a cogeração de energia elétrica, auxiliando na redução de custos das unidades de produção (Conab, 2017). O bagaço da cana-de-açúcar, por exemplo, um resíduo fibroso resultante do processo de moagem da cana, tem sido bastante utilizado, produzindo eletricidade e vapor, que são resultantes do processo de queima em caldeiras. Além disto, o bagaço ainda pode ser utilizado para a produção do etanol de segunda geração ou etanol celulósico (Thai et al., 2012).

O Brasil é um dos principais produtores de cana no mundo possuindo uma grande relevância no mercado mundial (Basant et al., 2003). Na produção de cana-de-açúcar o Brasil ocupa o primeiro lugar, seguido da Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Colômbia, Indonésia, Filipinas e Estados Unidos, com a contribuição média em torno de 739.000, 341.200, 124.500, 100.100, 63.800, 61.200, 34.900, 33.700, 31.900 e 27.900 megatoneladas (Mt) por ano, respectivamente (Parsaee et al., 2019).

Dentre as regiões do Brasil, a região Centro-Sul é considerada a principal produtora de cana no país (Conab, 2017). O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional e é o estado que possui a maior área com o vegetal (Novacana, 2019). Na região sul, o Paraná é o principal produtor da cana-de-açúcar (Conab, 2020).

O período da safra da cana-de-açúcar correspondente à safra 2020/21, apresentou um aumento da área destinada ao cultivo da cana em relação à safra

anterior. O ciclo 2020/21 destinou aproximadamente 8.616,1 mil hectares à produção de cana-de-açúcar, enquanto que no ciclo 2019/20 a área cultivada foi de aproximadamente 8.422 mil hectares colhidos (Conab, 2021). Isto representou uma variação percentual de 2,1% (ou 174,1 mil hectares).

Em contrapartida, na safra atual (2021/2022), foi estimada redução da área cultivada em 4,3% em relação à safra 2020/21, ficando em 8.243,1 mil hectares previstos para a produção de cana-de-açúcar na atual temporada. Na região Centro-Sul, a variação de área em produção apresenta uma tendência a ser ainda mais expressiva em virtude do seu grande volume de área cultivada. Para esta safra a estimativa para a região Centro-Sul é de uma redução de 4,6% em comparação a 2020/21, prevendo-se 7.364,5 mil hectares em produção, com grande concentração dessas áreas em São Paulo, Estado que também apresentou maior redução de área em produção em relação ao ciclo passado (Conab, 2021). De acordo com a Conab (2021), nas regiões Norte/Nordeste também há perspectiva de redução na área em produção entre essas duas últimas temporadas, devendo sair de 895,4 mil hectares em 2020/21 para 878,6 mil hectares na safra atual (2021/2022). Esta redução da área de cultivo da cana-de-açúcar possui relação com a grande concorrência de cultivos anuais, tais como a como soja e milho, que ganharam ótima rentabilidade nos últimos anos e influenciando diretamente na destinação de área para cana-de-açúcar. Vale ressaltar também que alterações climáticas geram impactos importantes em diversas regiões produtoras, inviabilizando em alguns casos a colheita em lavouras em decorrência de fortes geadas e demais alterações de clima (Conab, 2021).

Em relação à produção de cana-de-açúcar para a safra atual, estima-se para o ciclo 2021/2022, a colheita de 592.031,3 mil toneladas, o que representa uma redução de 9,5% ao resultado obtido na última safra. Esta redução seria resultante da diminuição em áreas de produção e das possíveis perdas do potencial produtivo pelas oscilações climáticas registradas. Os principais estados de destaque para a maior região de produção, Região Centro-Sul, envolvem São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, que representam a primeira, segunda, terceira e quarta posição em termos de contribuição produtiva da cana-de-açúcar. Já a região Norte/Nordeste, que promove a colheita da maior parte do volume produzido nos períodos entre agosto e março e com dinâmicas diferentes de produção, pode atingir produção em torno de

53.254 mil toneladas de cana-de-açúcar, representando aumento de 2,5% em comparação ao resultado regional obtido pela safra anterior (Conab, 2021).

O planejamento operacional da produção de cana, visando a quantidade e qualidade da cana colhida e também a redução máxima de todos os custos envolvidos, é de grande importância para a obtenção da lucratividade no mercado comercial. O lucro está fortemente associado ao teor de açúcar contido na cana. Desta forma, a escolha do período de colheita da cana é uma decisão importante, sendo desejável ser realizada no auge do seu teor de açúcar (Jena e Poggi, 2013).

3.2. Bioetanol

No setor de biocombustíveis, o Brasil também lidera a produção de etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima, sendo esta uma fonte renovável com alta produtividade em relação às demais existentes (Moraes et al., 2014).

Para a obtenção do etanol, hidratado ou anidro, a cana-de-açúcar passa por uma série de procedimentos desde o campo até os processos industriais. É de conhecimento que o processamento da cana-de-açúcar gera subprodutos que possuem grande potencial para cogeração de energia. As indústrias sucroenergéticas buscam alternativas para o aproveitamento desses subprodutos gerados durante o processamento, que vão desde adubação e fertirrigação, a alternativas para geração de energia.

A cana-de-açúcar é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis em virtude do elevado potencial na produção de etanol e dos seus respectivos subprodutos, e a agroindústria sucroalcooleira nacional opera numa conjuntura positiva visando cada vez mais a sustentabilidade (Conab 2021).

Em virtude do aumento populacional mundial, consequentemente, a demanda de energia vem se acrescentando. Uma das principais fontes de energia utilizadas na atualidade são os combustíveis fósseis, provenientes de fontes não renováveis como o petróleo, gás natural e carvão (Gupta e Verma, 2015). O cenário energético mundial tem enfrentado uma grande crise em virtude do consumo abundante e à extração

indiscriminada desses combustíveis fósseis, gerando uma depleção dos mesmos, contribuindo também com a degradação do meio ambiente (Azevedo et al., 2017). O uso frequente do petróleo e de seus derivados para a obtenção de energia vem gerando uma progressiva preocupação quanto à escassez desses produtos, levando em consideração também o aumento dos gases de efeito estufa na atmosfera, que consequentemente, contribuem fortemente para mudanças climáticas (Alkimin e Clarke, 2018).

Atualmente, a expansão da produção de biocombustíveis provenientes de fontes renováveis, é resultante das consequências ambientais positivas em relação aos combustíveis fósseis e, principalmente, em virtude das flutuações do preço do petróleo (Moraes et al., 2014). O etanol produzido a partir da matéria prima de cana-de-açúcar, bem como outras fontes alternativas de energia com baixo teor de carbono surgiram então como uma solução para a escassez de energia e para a redução de problemas ambientais relacionadas à poluição do ar (Alkimin e Clarke, 2018).

De acordo com Azhar et al. (2017), o etanol pode ser utilizado em veículos automotores de maneira direta ou adicionado à gasolina. O etanol possui algumas vantagens sobre a gasolina, tais como: toxicidade inferior, maior biodegradabilidade e menos emissão de poluentes após a combustão (Azhar et al., 2017).

O etanol é produzido, principalmente, a partir de materiais ricos em amido e açúcares. Os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil, maiores produtores de bioetanol no mundo, produzem este biocombustível a partir do milho e da cana-de-açúcar, respectivamente (Morales et al., 2015). Os EUA e o Brasil contribuem em torno de 85% da produção mundial de etanol (Azhar et al., 2017).

Dentre as culturas mais comuns para a produção de etanol, como o milho, beterraba, mandioca e trigo, a cana-de-açúcar é considerada uma excelente fonte (Alkimin e Clarke, 2018).

De acordo com Grassi e Pereira (2019), o Brasil foi o primeiro país a usar o bioetanol em grandes volumes na década de 70 para enfrentar a crise do petróleo. A década de 70 foi marcada por uma crise no setor de petróleo devido à alta dos preços e escassez do produto no mercado mundial. A crise do petróleo foi desencadeada principalmente devido a uma série de conflitos envolvendo os produtores árabes pertencentes à Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP). No ano

de 1973, um conflito envolvendo Israel, Egito e Síria (Guerra do Yom Kippur), países situados próximos a países produtores de petróleo, gerou graves problemas de alcance internacional, ficando conhecida como primeiro choque do petróleo (Fares, 2007).

A crise do petróleo acabou se instalando após países árabes integrantes da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) se negaram a vender petróleo aos países que apoiavam o governo israelense, contribuindo para a elevação dos preços no mercado e nos efeitos sobre os custos, visto que as importações do petróleo e demais produtos provenientes dele, também foram elevados. Desta forma, vários países iniciaram buscas por fontes de energia que reduzissem a dependência do petróleo e seus derivados (Swoboda et al., 1976). A partir desta crise, o Brasil criou algumas políticas de incentivo à produção do etanol, como o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que visava o desenvolvimento das técnicas e aperfeiçoamento dos insumos para a produção de álcool etílico (Andrade et al., 2009). Com este programa, o governo buscava formas alternativas para reduzir a dependência do país ao combustível fóssil, amenizando desta forma, os efeitos da crise sobre a economia brasileira, pois o preço do petróleo estava inflacionado (Michellon et al., 2008). Conforme Filho et al. (2006), a partir dos anos 2000 houve uma renovação do programa Proálcool por meio de ações corporativas promovendo a inserção no mercado dos veículos *flex fuel* visando grandes possibilidades de ampliação nas exportações de etanol. O desenvolvimento de veículos movidos a etanol incluiu o biocombustível na matriz energética brasileira, garantindo a sua demanda.

Nos Estados Unidos e na Europa o etanol passou a ser utilizado em maior escala no início do século XX. No período pós Segunda Guerra Mundial, seu uso foi negligenciado em virtude do elevado custo produtivo comparado ao petróleo, até o momento da crise do petróleo da década de 70 (Azhar et al., 2017).

O Brasil possui um baixo custo de produção do etanol quando comparado à cadeia de petróleo, pois utiliza-se a cana-de-açúcar como principal matéria-prima e a mão de obra na fase agrícola são consideradas baratas. Além disto, a cana possui um alto rendimento devido ao alto teor de açúcar. Países que utilizam matérias-primas ricas em amido para a produção do etanol, como os EUA, tem um maior custo devido

à necessidade da quebra da molécula de amido para a produção do etanol. No caso da cana, não é necessário nenhum tipo de quebra (Ipea et al., 2010).

Atualmente, o Brasil apresenta grandes contribuições em pesquisas envolvendo o cultivo de cana-de-açúcar, sendo referência em nível internacional. Os ganhos em relação à produtividade no setor sucroalcooleiro geram uma maior segurança ao setor, além de promover interesse das grandes indústrias automotivas pelos carros movidos a biocombustíveis (Ipea et al., 2010). Nesse sentido, é possível afirmar que a agroindústria sucroenergética é favorável para a produção de etanol devido ao esgotamento das jazidas petrolíferas e ao elevado preço da extração do petróleo. Além disto, a conscientização da população mundial em relação ao meio ambiente sobre os efeitos indesejáveis da utilização de combustíveis fósseis no balanço de carbono na atmosfera e aos efeitos danosos do aquecimento da superfície terrestre contribui para o interesse do uso do etanol.

Embora o etanol tenha sido um substituto promissor para a gasolina, essa produção de biocombustíveis é capaz de substituir apenas uma porção mínima do consumo mundial de combustíveis fósseis (Azevedo et al., 2017). A energia consumida a partir de combustíveis fósseis representa cerca de 80% da energia global consumida (Jimenez et al., 2015).

Com o intuito de expandir a produção de biocombustíveis no Brasil baseado na previsibilidade, sustentabilidade ambiental, econômica e social, foi instituída a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) pela Lei nº 13.576/17. O atual programa governamental apresenta como objetivos: a contribuição para o atendimento de compromissos acordados no 'Acordo de Paris sob a 'Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima'; a contribuição com a adequada relação de eficiência energética e de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa na produção, na comercialização e no uso de biocombustíveis, levando em consideração mecanismos de avaliação de ciclo de vida; a promoção da expansão da produção e do uso de biocombustíveis adequados na matriz energética nacional, enfatizando a regularidade do abastecimento de combustíveis; e também a colaboração com a previsibilidade para a participação competitiva dos diversos biocombustíveis no mercado nacional de combustíveis (Brasil, 2017).

A RenovaBio estabelece metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis com a finalidade de incentivar o aumento da produção e da participação de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país. Essas metas foram definidas pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) por meio da Resolução CNPE nº15, de 24 de junho de 2019. Além disto, a RenovaBio permite que os produtores de biocombustíveis recebam títulos financeiros, denominados créditos de descarbonização (CBIOs), na proporção do volume de produção e eficiência do biocombustível, na condição de respeitar a legislação ambiental. O programa determina que os distribuidores de combustíveis deverão comprar estes CBIOs para compensar as emissões além de seus mandatos, sendo que os CBIOs também estarão disponíveis para qualquer investidor interessado. Desta forma, espera-se que haja um aumento na produção sustentável de biocombustíveis no Brasil, principalmente o etanol, que pode se tornar uma *commodity* mundial para abastecer os mercados internacionais (Grassi e Pereira, 2019).

Diversos países possuem políticas com a finalidade de aprimorar a utilização da biomassa para cobrir as demandas de energia com a finalidade de atender às metas de redução de dióxido de carbono conforme foi estabelecido no Protocolo de Kyoto, garantindo também a redução da dependência do fornecimento de combustíveis fósseis (Gupta e Verma, 2015).

Na safra de 2018/19, referente ao período entre abril a novembro de 2018, o Brasil exportou em torno de 1,3 bilhão de litros de etanol, apresentando um crescimento de 18% em relação ao volume exportado no mesmo período da safra anterior (2017/2018). Os principais destinos da exportação foram Estados Unidos, Coreia do Sul, Japão, Holanda e Colômbia (Conab, 2018). Para os valores de produção do etanol a partir da cana, para a safra atual, foi estimado 25,8 bilhões de litros, contra 29,7 bilhões de litros da safra anterior (redução de 13,1%). Os níveis de precipitação abaixo da média afetaram o desenvolvimento da cana-de-açúcar e a ocorrência de geadas contribuiu para que a moagem da cana, especialmente na Região Centro-Sul, atingisse um dos menores níveis dos últimos anos. Como consequência, acredita-se que o preço do etanol atinja patamares mais elevados, refletindo também no repasse dos preços para a gasolina (Conab, 2021).

A contribuição do milho para a produção do etanol no Brasil tem sido significativa. A tabela 1 demonstra que a produção do etanol a partir do milho tem sido crescente, mesmo em tempos de pandemia. Observou-se um aumento na produção do etanol total do milho a partir da safra de 2019/2010, período em que a Companhia Nacional de Abastecimento passou a disponibilizar informações mais detalhadas sobre o grão para o mercado. Antes deste período, boletins de acompanhamento da safra brasileira realizavam levantamentos períodos voltados para a cana-de-açúcar. Hoje em dia, os boletins apresentam dados de produção para ambos.

De acordo com a Conab (2020), as condições que viabilizaram o sucesso do etanol de milho no Brasil foi a matéria-prima barata e abundante, além da localização concentrada da produção e da demanda pelos seus subprodutos. Além disto, o mercado do milho enfrenta menos problemas com a sazonalidade da safra, influências climáticas e menores dificuldades no armazenamento. Neste sentido, espera-se que os estados participem na ampliação da oferta do biocombustível a partir do etanol de milho. A Região Centro-Oeste é a que mais se destaca na produção de etanol à base de milho, ao contrário da cana-de-açúcar, onde a produção se concentra mais na Região Centro-Sul.

Sendo que o etanol do milho tem apresentado excelentes resultados no mercado, conseqüentemente, cresce no país os investimentos em unidades de produção que operam com o milho para a fabricação do bicomcombustível (unidades denominadas “full”), especialmente nas regiões onde a produção do grão é relevante, como a Centro-Oeste. Sendo assim, espera-se que nos próximos anos o etanol de milho na região irá crescer de maneira expressiva, não somente pelo aumento na oferta do cereal, como também pela melhoria na infraestrutura de armazenagem. As regiões entre Mato Grosso e Goiás, atualmente, representam cerca de 97% da oferta nacional do etanol de milho (Conab 2021).

Tabela 1. Estimativas da produção nacional de açúcar proveniente da cana-de-açúcar e da produção de etanol de primeira geração a partir da cana e do milho.

Matérias-primas								
	Cana e milho	Milho			Cana-de-açúcar			
Safras	Etanol Total	Etanol Total	Etanol Anidro	Etanol Hidratado	Etanol Total	Etanol Anidro	Etanol Hidratado	Açúcar
2017-2018	28,5 bi.L	521,6 mi. L	90,39 mi L	431,1 mi. L	27,76 bi. L	11,09 bi. L	16,67 bi. L	37,87 mi. Ton
2018-2019	33,1 bi. L	791,4 mi. L	234,2 mi L	557,1 mi. L	33,14 bi. L	9,56 bi. L	23,58 bi. L	29,04 mi. Ton
2019-2020	35,6 bi. L	1,68 bi. L	390,7 mi L	1,25 bi. L	34 bi. L	10,1 bi. L	23,9 bi. L	29,8 mi. Ton
2020-2021	32,8 bi. L	3,02 bi. L	932,95 mi L	2,09 bi. L	29,7 bi. L	9,32 bi. L	20,42 bi. L	41,25 mi. Ton
2021-2022	29,2 bi. L	3,4 bi. L	1,02 bi. L	2,3 bi. L	25,9 bi. L	9,8 bi. L	16,02 bi. L	36,9 mi. Ton

Notas: bi.L: bilhões de litros; mi.L: milhões de litros; mi.Ton: milhões de toneladas. Fonte: Conab (2017; 2018; 2019; 2020; 2021).

3.3. Produção de etanol e açúcar

O etanol pode ser classificado como sendo de primeira, de segunda, terceira ou quarta geração (Tabela 2) conforme a matéria-prima utilizada para sua produção (Morales et al., 2015).

Tabela 2. Classificação dos tipos de produção do etanol em relação à matéria-prima, desvantagens e vantagens.

Geração	Matéria-prima	Desvantagens	Vantagens
1 ^a	Oleaginosas, cana-de-açúcar, beterraba sacarina, sorgo sacarino, etc.	Compete diretamente com alimentos.	Tecnologias estabelecidas.
2 ^a	Resíduos agrícolas e florestais de baixo custo, biomassa ligno-celulósica.	Elevado custo na remoção da lignina para a produção.	Não compete com a alimentação.
3 ^a	Algas	Maior consumo de energia, aplicada no cultivo das algas.	Requer pequenas áreas para o cultivo, não compete com os alimentos e tem ciclos de produção curtos.
4 ^a	Algas geneticamente modificadas.	Elevado custo	Alto rendimento e menor emissão de CO ₂ para a atmosfera.

Adaptado de Silva e Silva (2019).

O bioetanol de primeira geração é o biocombustível produzido a partir de matérias-primas que, comumente, são utilizadas para alimentação e produção de ração, como por exemplo as plantas de alto teor de açúcar, cereais, tubérculos, e coprodutos de processamento da agroindústria. Já o de segunda geração, é o etanol produzido a partir de matérias-primas não alimentares, tais como resíduos de colheita,

papel, madeira, e outros materiais lignocelulósicos (Bmelv et al., 2006; Morales et al., 2015).

O etanol de terceira e quarta geração são obtidos a partir de algas e vem se destacando como uma fonte de biocombustível promissora, pois trata-se de microalgas fotossintéticas que podem se desenvolver em ambientes diversos (Chen, 2011; Silva e Silva, 2019).

De modo geral, as principais matérias-primas voltadas para a produção do etanol são classificadas em três principais tipos: açúcares, amidos e materiais celulósicos. A vantagem de utilizar o açúcar (proveniente da cana, sorgo sacarino ou melaço) é que os açúcares já estão prontamente disponíveis e podem ser utilizados de forma direta para a produção do etanol pelos microrganismos fermentativos. Todavia, amidos (provenientes de milho, mandioca, dentre outros tubérculos) inicialmente devem ser hidrolisados em açúcares fermentáveis por ação de enzimas do malte ou bolores. A celulose (de resíduos agrícolas, da madeira e outros materiais celulósicos) também necessitam serem convertidos em açúcares, normalmente, por meio da ação de enzimas celulolíticas (Saini et al., 2015).

No Brasil, o etanol é obtido principalmente por meio da via fermentativa a partir dos açúcares presentes no caldo do colmo da cana, e este caldo ao ser extraído, pode também ser direcionado para a produção de açúcar, passando por procedimentos envolvendo, em suma, o tratamento do caldo e processo de evaporação e cristalização, onde a sacarose gera o açúcar comercial. Durante o processo da produção do açúcar é gerado o subproduto melaço, que por sua vez também pode ser utilizado na fabricação do etanol (Figura 1) (Lopes et al., 2011).

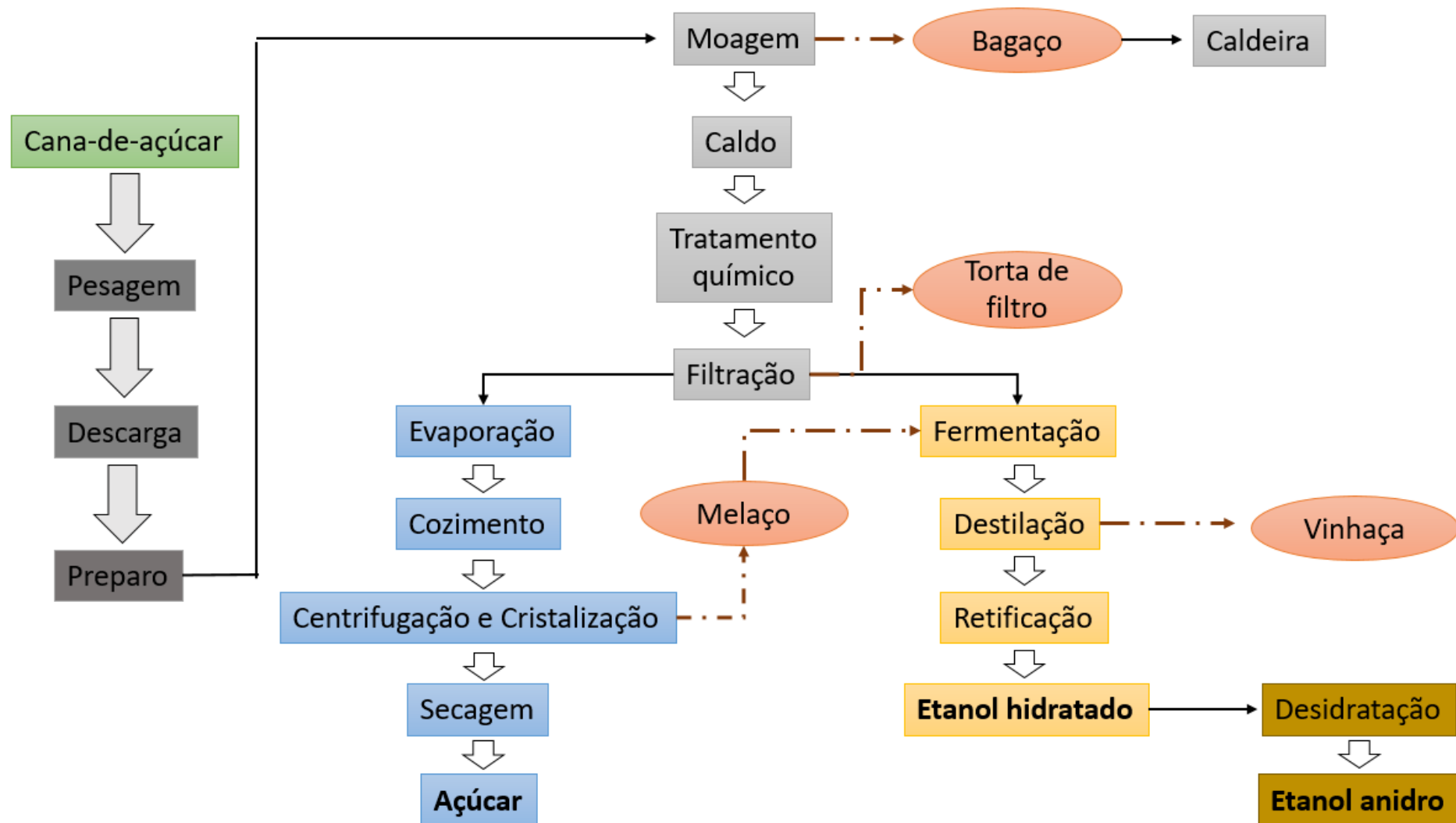


Figura 1. Fluxograma simplificado e adaptado da produção de açúcar e etanol na indústria sucroenergética. Adaptado de Christofolletti et al. (2013).

Atualmente, a cana-de-açúcar é a matéria-prima predominante para produção do etanol pelas usinas sucroenergéticas brasileiras, todavia, o milho também participa como uma fonte de obtenção do etanol, principalmente na região Centro-Oeste, sendo os maiores estados produtores deste biocombustível a partir do milho: Mato Grosso, Goiás, São Paulo, Paraná e Rondônia, apresentando uma estimativa de produção de total 3,5 bilhões de litros para a safra de 2021/2022 (Conab, 2021).

Em relação ao etanol obtido a partir da cana, é de grande importância a qualidade da matéria-prima para obtenção de bons rendimentos do processo da produção do biocombustível. De acordo com Andrade (2009), fatores de qualidade influenciam a cadeia produtiva do etanol, como por exemplo o estágio de maturação da cana, as condições climáticas do plantio, tempo do corte da cana ao processamento, altura de despoite, dentre outros diversos fatores.

As indústrias sucroenergéticas no Brasil, em sua grande maioria, possuem destilarias de etanol anexas às usinas de açúcar, pois as produções simultâneas tanto do açúcar quanto do etanol apresentam grandes vantagens para a tomada de decisões para atender as demandas do mercado. Conforme Melo e Sampaio (2016), a oferta e a demanda do etanol são dependentes do preço do etanol e do açúcar no mercado, sendo a matéria-prima destinada à produção de maior atratividade para o comércio. Deste modo, há grandes vantagens para as indústrias manterem configurações industriais que permitam a flexibilidade da produção de açúcar e etanol.

Para a obtenção do etanol, a cana passa por diversas etapas, desde o plantio no campo até o produto final. Dentre elas, podemos citar como as principais atividades: colheita e recepção da cana-de-açúcar; pesagem, preparo da cana, moagem, tratamento do caldo, fermentação alcoólica, destilação, e armazenamento do álcool (Andrade et al., 2009). Após o processo da extração do caldo, são geradas grandes quantidades de bagaço da cana, normalmente, destinados à cogeração de energia ou ainda para a produção do etanol de segunda geração (2G) (Gupta e Verma et al., 2016). Após a etapa de destilação, também são geradas grandes quantidades de vinhaça de cana-de-açúcar (Parsaee et al., 2019).

Para o tratamento do caldo, algumas etapas são imprescindíveis, pois o caldo sem nenhum tratamento pode conter a presença de microrganismos do ambiente indesejáveis, que podem prejudicar o rendimento do etanol. Portanto, alguns

procedimentos devem ser utilizados para a esterilização do meio como a adição de antibióticos, ácidos (H_2SO_4), elevação da temperatura do caldo e posterior correção de pH por meio do processo de calagem e decantação (Lopes et al., 2011) para que, dessa forma, as leveduras inoculadas (*Saccharomyces cerevisiae*) estejam em ambientes nas condições ideais para que desempenhem o seu papel de fermentação do caldo.

Na etapa de decantação, conhecida também como etapa de clarificação do caldo, normalmente são adicionados polímeros e ácido fosfórico que facilitam este processo. O material decantado é removido do decantador na forma de lodo, passando por um processo de filtração gerando a torta-de-filtro, subproduto destinado às lavouras servindo como uma fonte alternativa de fertilizante (Cortez et al., 1992; Lopez et al., 2015).

Para o tratamento do caldo da cana para a produção do açúcar, existe uma peculiaridade, a etapa de sulfitação, responsável pela remoção da cor escurecida, ocorrida por meio da adição de gás sulfuroso (SO_2). O gás sulfuroso é proveniente da queima do enxofre elementar, e reage quimicamente com os principais compostos orgânicos contidos no caldo, impedindo principalmente a formação de caramelos e melanoidinas (Engenovo, 2018). Basicamente, as etapas subsequentes para a obtenção do açúcar após o tratamento são: evaporação, cozimento, centrifugação e cristalização. Como já mencionado, após a etapa de centrifugação, é gerado o melaço, produto também utilizado para a produção do etanol devido ao seu elevado teor de açúcar (Figura 1).

Segundo a Conab (2020), a safra de 2019/2020 atingiu um recorde na produção do etanol, alcançando 35,7 bilhões de litros visto que houve uma priorização da produção de biocombustível pelas indústrias sucroenergéticas para esta safra. Já a safra de 2020/2021 o cenário foi alterado em virtude da pandemia, e como resultado, as indústrias priorizaram a atividade açucareira. O isolamento social promoveu a intensa redução da circulação de pessoas, e consequentemente houve quedas no consumo tanto de etanol quanto de gasolina. Desta forma, estima-se que a safra atual (2021/2022) atinja 29,2 bilhões de litros de etanol, considerando a cana e o milho como matérias-primas, apresentando desta forma, uma redução de 10,8% em relação à safra anterior (2019/2020) (Conab, 2020).

3.4. Vinhaça de cana-de-açúcar

No processo de produção do etanol, são geradas grandes quantidades de subprodutos, que dependendo da forma de disposição final, podem acarretar em graves problemas ambientais (Moraes et al., 2014).

Dos principais subprodutos industriais gerados pelas usinas sucroenergéticas no Brasil, tais como: cinzas, bagaço da cana, torta de filtro, melaço e a vinhaça, resíduo líquido removido das colunas de destilação, esta última é considerada a maior fonte de poluição da indústria de etanol, possuindo uma elevada demanda química de oxigênio (Santos et al., 2013). Para cada litro de etanol produzido, são gerados, aproximadamente, 10 a 15 L de vinhaça (Cortez et al., 1992., Parsaee et al., 2019). Desta forma, uma destilaria em escala relativamente grande (produzindo 365 milhões de litros de etanol por ano), poderia gerar anualmente cerca de 4,7 bilhões de litros de vinhaça (Fuess et al, 2015).

O termo “vinhaça” pode ser empregado também para subprodutos obtidos a partir de sólidos solúveis da beterraba sacarina, do sorgo sacarino, uva e agave para a produção de etanol. Entretanto, a vinhaça da cana-de-açúcar é mais rica em termos de matéria orgânica em relação às outras mencionadas. As propriedades da vinhaça dependem principalmente das matérias-primas e das condições operacionais da planta de produção de álcool (Parsaee et al., 2019.) Sendo assim, os subprodutos oriundos da produção de etanol das usinas sucroenergéticas variam quanto à sua composição química, sendo o melaço mais concentrado em material orgânico, e em nutrientes como o potássio, cálcio e magnésio (Christofolletti et al., 2013). A vinhaça é um líquido obtido da destilação do etanol, e possui em sua composição uma grande quantidade de água, nutrientes minerais, compostos orgânicos, que o torna uma matéria-prima para recuperação de recursos. A vinhaça também apresenta a presença de compostos fitotóxicos e antibacterianos, como fenóis, polifenóis e metais pesados (Parsaee et al., 2019; Peiter et al., 2019).

Existem algumas alternativas para o aproveitamento da vinhaça de cana-de-açúcar, dentre elas, podemos citar: a fertirrigação em larga escala; o seu uso como suplemento alimentar na formulação de ração animal; aplicação das cinzas da vinhaça

ao solo após processo de incineração se tornando uma interessante fonte potássio, e também o uso da vinhaça como substrato na digestão anaeróbia para a produção de biogás. O biogás obtido da fermentação do substrato, após o adequado tratamento, ainda pode ser utilizado para geração de energia elétrica e para auxiliar no processo de secagem de leveduras. Além disto, o biogás contendo em sua composição o gás metano, após o processo de purificação, poderia substituir os caminhões e máquinas agrícolas movidos a biodiesel. Estudos envolvendo a aplicação da vinhaça na construção civil, principalmente na fabricação de placas pré-moldadas de concreto, também vem sendo realizados (Christofolletti et al., 2013) (Figura 2).

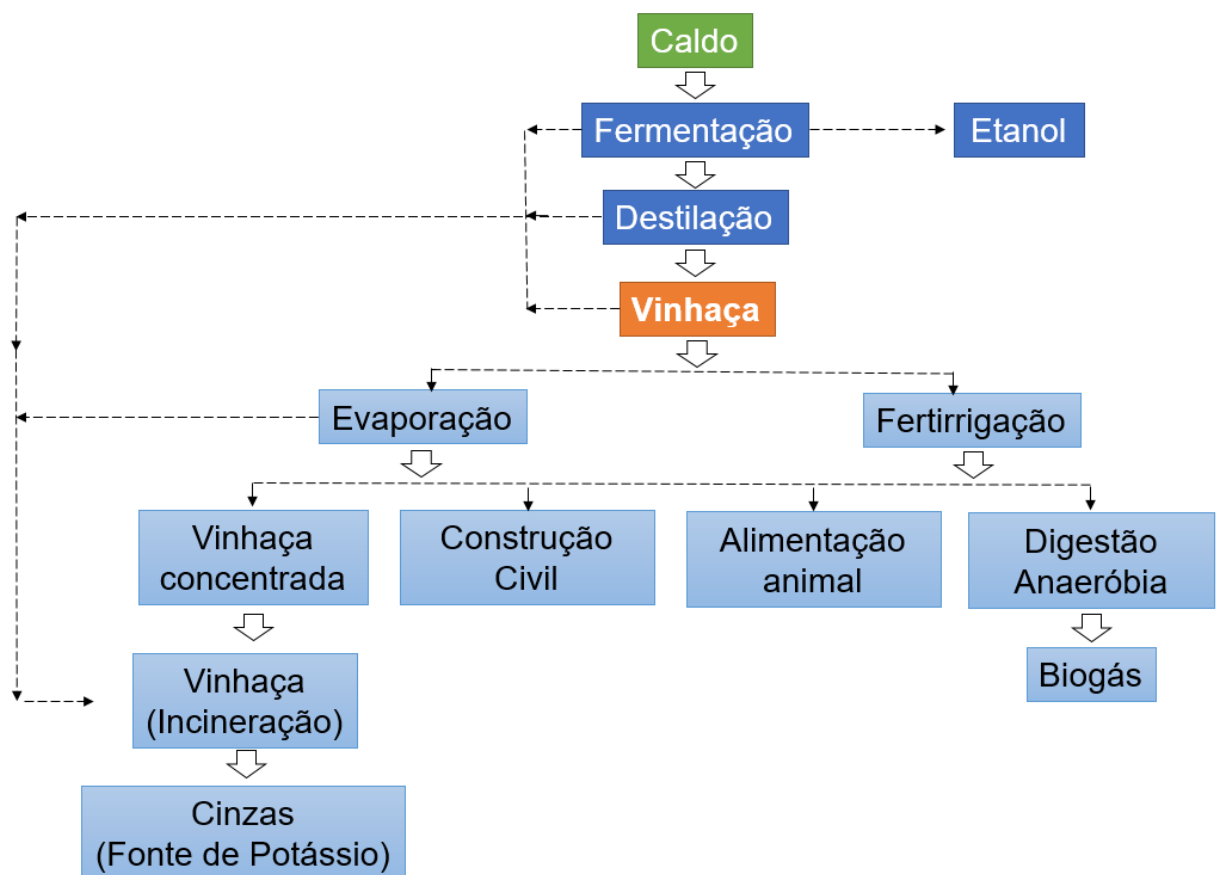


Figura 2. Alternativas para o de uso da vinhaça de cana-de-açúcar. Adaptado de Christofolletti et al., (2013).

De acordo com Christofolletti et al. (2013), uma das alternativas interessantes para o aproveitamento da vinhaça seria a concentração da vinhaça por evaporação, onde o produto obtido neste processo pode ser utilizado na formulação de ração para gado, e a água condensada, após evaporação, ainda pode ser reutilizada pelas indústrias. Entretanto, para isto é necessária uma alta demanda de energia, tornando a sua aplicação de elevado custo.

Com o Brasil sendo o maior produtor mundial no complexo sucroalcooleiro, exercendo a liderança nos segmentos de produção de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar (Doll e Foresti, 2010), consequentemente, o país contribui de forma significativa com a geração de resíduos de alta carga orgânica e altamente poluente como a vinhaça (Cabello et al., 2009), havendo uma crescente preocupação com a aplicação contínua deste subproduto em campos agricultáveis e os seus efeitos sobre o meio ambiente (Christofolletti et al., 2013).

A vinhaça é comumente aplicada ao solo para o cultivo de cana-de-açúcar, sendo utilizada como fertilizante devido o seu alto teor de nutrientes, tais como potássio, nitrogênio, fósforo e cálcio, e também por possuir um alto teor de matéria orgânica (Souza et al 2013; España-Gamboa et al., 2011).

De uma forma geral, a vinhaça é composta basicamente por água (93%) e sólidos e minerais orgânicos (7%) (Laime et al., 2011). Suas características (Tabelas 3 e 4) também dependem da composição da matéria-prima utilizada para a produção de bioetanol (Espana-Gamboa et al., 2011).

A vinhaça possui um pH baixo, variando de 3,5 a 5,0, coloração escura, e valores de demanda química de oxigênio (DQO) entre 50-150 g L⁻¹ (Espana-Gamboa et al., 2011; Christofolletti et al., 2013). Este subproduto também pode conter substâncias antibacterianas, fitotóxicas, e compostos recalcitrantes, como polifenóis, fenóis, e metais pesados (Espana-Gamboa et al., 2011).

Tabela 3. Características da vinhaça de cana-de-açúcar

Parâmetro	Valores (mg L ⁻¹)	Referências
pH	3,3	
DQO	58.533	
DBO	23.182	
Ácido butírico	468	Santos et al. (2019)
Ácido láctico	4.200	
Etanol	15.848	
Metanol	594	
Fenóis	1.706	
SSV	5.553	
Ácido acético	1.722	
Ácido propiônico	127	Fuess et al. (2019)
Carboidrato total	7.275	
Glicerol	3.914	
Sulfato	2.993	Correia et al. (2017)
pH	4,0	
DQO	109.700	
DBO	87.700	Moraes et al. (2015)
Fenóis	12,4	
ST	5,8	
pH	4,5	
DQO	44.500	
NTK	430	
Fósforo Total	26	
Potássio	149	
Cobre	5	Barros et al. (2017)
Cálcio	16	
Zinco	2	
Magnésio	14	
Sódio	16	
Manganês	75	
Ferro	7	

*DQO: Demanda química de oxigênio; DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; SSV: Sólidos suspensos voláteis; ST: Sólidos Totais; pH: Potencial hidrogeniônico; NTK: Nitrogênio Total Kjeldhal. Adaptado de Barros et al. (2017) e Ordaz-Díaz et al. (2020).

Tabela 4. Características de diferentes tipos de vinhaças geradas a partir de diferentes fontes de matéria-prima para a produção de etanol.

Tipos de vinhaça	Parâmetro	Valores (mg L ⁻¹)	Referências
Beterraba Sacarina	pH	5,1	Robertiello (1982)
	DBO	78.300	
	DQO	81.200	
	DQO	57.600	
Melaço de cana-de-açúcar	Ácido Acético	616	Bories et al. (1988)
	Ácido Propiônico	90	
	Ácido Butírico	290	
	Sulfato	3.820	
	pH	4,78	
Melaço de cana-de-açúcar	DQO Total	8.720	Vilela et al. (2017)
	DQO solúvel	7.880	
	DBO	3.992	
	Alcalinidade Total	37	
	N. Amoniacal	67	
	N. Total Kjeldahl	269	
	Nitrato	295	
	Nitrito	0,10	
	Sulfato	70	
	Sulfeto	0,190	
	Fenol	0,082	

*DQO: Demanda química de oxigênio; DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; pH: Potencial hidrogeniônico; NTK: Nitrogênio Total Kjeldhal. Adaptado de Barros et al. (2017) e Ordaz-Díaz et al. (2020).

Em comparação com esgoto doméstico, os valores das demandas bioquímicas e demandas químicas de oxigênio (DBO e DQO) podem ser 100 vezes maiores na vinhaça. Seu alto conteúdo de matéria orgânica é formado de, principalmente, compostos facilmente degradáveis e resultantes da fração orgânica remanescente não consumida durante a fermentação, tais como a matéria orgânica não convertida (frações residuais de açúcares redutores e sacarose), compostos formados em vias metabólicas fermentativas concorrentes (glicerol e ácidos orgânicos) e frações não recuperadas de etanol bem como os ácidos orgânicos voláteis gerados em vias fermentativas paralelas (Fuess et al., 2011, Fuess et al., 2015).

Conforme Santos et al. (2019), características intrínsecas do processamento da cana de acordo com os produtos finais, como etanol (destilaria autônoma), açúcar e etanol (destilaria anexa) e cachaça ou aguardente de cana (alambique), podem

gerar diferenças qualitativas na vinhaça tais como: variações nas concentrações de sulfato, etanol e níveis de açúcar residual, cor (concentrações de melanoidinas), concentrações de fenóis e teor de sólidos.

A vinhaça aplicada ao solo como fertilizante pode promover a melhoria de sua fertilidade, sendo amplamente utilizadas em áreas agrícolas, principalmente para produção da cana-de-açúcar. Todavia, a sua aplicação em longos prazos vem sendo questionada pelos seus efeitos adversos no solo, visto que, de acordo com a tipologia do solo, este resíduo pode promover alterações de suas características, ocasionando a salinização do solo, além de apresentarem possíveis fontes de contaminações de águas subterrâneas e superficiais (Silva et al, 2007). A aplicação da vinhaça diretamente ao solo também pode promover a lixiviação de metais presentes para as águas subterrâneas, alterações da composição do solo e na biota em geral devido ao desequilíbrio de nutrientes, principalmente manganês (Agrawal e Pandey, 1994, Christofolletti, 2013).

No estado de São Paulo, a disposição da vinhaça em solo agrícola foi regulamentada por meio da norma técnica P4.231/2005, estabelecida pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), e um dos objetivos desta norma foi determinar os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça de cana-de-açúcar no solo (Cetesb, 2015). No ano de 2020, esta norma foi regulamentada por meio da Decisão n.º 023/2020/P, onde foi permitido que as usinas optassem pela escolha da entrega de um 'Plano de Aplicação de Vinhaça' (PAV) simplificado ao invés do 'Plano de Aplicação da Vinhaça' completo. Esta nova modalidade foi desenvolvida levando em consideração aos avanços técnicos do setor sucroenergético nos últimos anos, que por sua vez tem trabalhado para aproveitar o máximo dos benefícios da vinhaça. Desta forma, o PAV simplificado considera as especificidades da aplicação da vinhaça na sua forma biodigerida através de equipamentos com controle vazão a uma lâmina máxima de 30 m³/ha. Desta forma, há um estímulo para as indústrias do açúcar e álcool a adotarem tecnologias de digestão anaeróbia.

A digestão anaeróbia pode ser aplicada como uma alternativa para a redução do potencial poluidor da vinhaça, gerando produtos de elevado valor econômico como o gás metano, que pode ser utilizado como biocombustível. Além disto, o efluente da digestão anaeróbia estabilizado pode ser aplicado ao solo como fertilizante, em maior segurança, pois a sua carga orgânica após o processo de tratamento é reduzida (Doll

e Foresti, 2010). De acordo com Parsaee et al. (2019), a produção de biogás a partir da vinhaça gera benefícios econômicos e ambientais. Atualmente são gerados cerca de 22,4 gigalitros de vinhaça no mundo, com potencial para produção de 407,68 gigalitros de biogás (Parsaee et al., 2019).

Segundo Fuess et al. (2015), os desafios associados à disponibilidade de combustíveis fósseis nas últimas décadas intensificaram a busca por fontes alternativas de energia. Levando em consideração as propriedades da vinhaça, esta pode ser melhor aproveitada sendo aplicada, primeiramente, em tecnologias da digestão anaeróbia, contribuindo na obtenção de bioenergia, visto que é gerado o biogás resultante da conversão da fração orgânica contida na vinhaça.

A digestão anaeróbia da vinhaça, além de contribuir para suprir as demandas energéticas das plantas industriais, também auxilia para o controle de poluição ambiental, visto que o efluente biodigerido possui carga orgânica reduzida. Desta forma, o efluente biodigerido pode ser, finalmente, aplicado ao solo em maior segurança. Grande parte dos nutrientes contidos na vinhaça, como potássio, nitrogênio e fósforo, são levemente removidos pelo metabolismo assimilativo para manutenção celular dos microrganismos anaeróbios. Ou seja, a vinhaça biodigerida ainda apresenta características nutricionais interessantes para o uso como fertilizante (Moraes et al., 2014).

Segundo Moraes et al. (2014), o potencial energético da vinhaça de uma única biorrefinaria de cana-de-açúcar, que geralmente é perdido devido à sua aplicação em solo sem tratamento, é considerado comparável à demanda de fornecimento de eletricidade de uma cidade de aproximadamente 130.000 habitantes ou ao excedente de energia da queima do bagaço que é exportado por algumas usinas de cana-de-açúcar no Brasil. Em nível nacional, essa energia é comparável à eletricidade gerada por algumas hidrelétricas, chegando a 7,5% da eletricidade gerada pela maior hidrelétrica do mundo.

3.5. Digestão Anaeróbia e sustentabilidade

A geração e o descarte de efluentes industriais têm gerado preocupações em escala mundial. Deste modo, regulamentações ambientais forçam indústrias a

aplicarem tecnologias de tratamento eficientes que sejam econômicas e ecologicamente corretas capazes de garantir a capacidade de gerenciar águas residuárias de maneira sustentável (Kamali et al., 2019). Um dos grandes desafios do século XXI é desenvolver novas fontes de energia renováveis, capazes de substituir combustíveis fósseis, causando o mínimo de danos possíveis para a sociedade e ao meio ambiente (Jimenez et al., 2015).

Cada vez mais empresas se esforçam para adoção de critérios, práticas e fatores ambientais que contribuam para a redução de emissões de gases de efeito estufa, bem como a gestão eficaz de resíduos e uso de fontes de energia renováveis juntamente com critérios sociais e de governança (ESG). Empresas que adotam práticas de ESG apresentam maior tendência à lucratividade aumentando o seu valor de mercado sendo atraídas, conseqüentemente, por grandes investidores (Umar et al., 2020). A adoção de critérios ambientais, sociais e de governança (ESG) no processo de investimento é uma tendência internacional e, recentemente, o termo tem sido bastante abordado por empresas brasileiras.

Os critérios de ESG compreendem um conjunto de normas relativas às operações das empresas, que fazem com que os investidores possam avaliá-las para a seleção de potenciais investimentos. De acordo com Umar et al (2020), os critérios do ESG abordam: os fatores ambientais, onde as empresas evidenciam os seus esforços para enfrentar as mudanças climáticas, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa, a gestão eficaz de resíduos, o uso de fontes de energia renovável, etc.; os fatores sociais como direitos humanos, normas trabalhistas, combate ao trabalho infantil ilegal e adesão às normas de saúde e segurança no local de trabalho; e os fatores de governança, que se referem a regras que definem os direitos, responsabilidades e expectativas de diferentes *stakeholders* na governança da empresa. Ao permitir que atributos não financeiros influenciem investimentos, o investimento socialmente responsável oferece benefícios como retorno superior, menor risco durante períodos turbulentos como crises e influencia positivamente a reputação da empresa, havendo também maior probabilidade de estabilidade.

A Europa é responsável pela maior concentração de ativos ESG em todo o mundo, totalizando US\$ 14,1 trilhões no ano de 2018, seguida pelos EUA, com US\$ 12 trilhões. Já o Japão é o terceiro maior mercado de investimento sustentável depois da Europa e dos EUA, com ativos gerenciados subindo de 3% para 18% no mesmo

período. A Austrália também tem demonstrado uma alta proporção de ativos sustentáveis em relação ao total de ativos sob gestão (Umar et al 2020).

A tecnologia utilizada nas indústrias sucroenergéticas permite que as empresas possam valorizar os subprodutos residuais gerados durante o processamento do etanol ou açúcar, implementando desta maneira, o conceito de economia circular. O termo “Economia Circular”, também tem sido amplamente discutido, visto que ele associa o desenvolvimento econômico das empresas a um melhor uso de recursos naturais através de novos modelos de negócios e da otimização nos processos de fabricação, com menor dependência de matérias-primas virgens, priorizando insumos mais duráveis, recicláveis e renováveis, gerando o mínimo de descarte possível, contribuindo também para redução dos impactos ambientais. Todavia, muitas questões ambientais ainda precisam ser resolvidas e adequadas.

De acordo com Formann et al. (2020), os seis subprodutos mais significativos gerados nas indústrias sucroalcooleiras são: palha, bagaço, torta de filtro, vinhaça, melaço e o CO₂. Os autores ainda afirmam que muitas áreas de plantação ainda sofrem práticas de queimadas, contribuindo para a poluição do ar local, causando doenças respiratórias e contribuindo para as emissões de gases de efeito estufa (GEE). Embora as cinzas remanescentes desse processo de queima possam melhorar ou preservar a qualidade do solo, os compostos formados durante a incineração também contribuem para a contaminação do solo e das águas subterrâneas (como exemplo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos).

Sabe-se que o bagaço é utilizado principalmente em caldeiras ou em unidades de cogeração para fornecer calor e energia para o processo de moagem e destilação, todavia, principalmente em fábricas menores, apenas uma fração do bagaço é utilizada e o restante causa problemas de destinação, e mesmo que a venda do bagaço excedente seja uma opção, a destinação dependerá muito da situação do mercado e do custo de transporte considerando a distância de entrega entre a usina de cana e os potenciais usuários do bagaço (Formann et al., 2020). Ainda, em muitas das atuais usinas de cana-de-açúcar, o CO₂ da combustão do bagaço e da fermentação do caldo da cana é simplesmente liberado para a atmosfera. No entanto, a capturação do CO₂ pode ser uma fonte valiosa e renovável de carbono para aplicações materiais em várias indústrias (Formann et al., 2020). O subproduto melaço derivado da produção de açúcar, que tem alto valor energético, é frequentemente

utilizado como substrato para a produção de etanol, como aditivo ou ingrediente alimentar, e o subproduto vinhaça normalmente é destinada à fertirrigação, entretanto possui um elevado potencial para produção de biogás por meio de processos biológicos (digestão anaeróbia).

A digestão anaeróbia é um processo biológico que converte resíduos orgânicos biodegradáveis em biogás, atraindo cada vez mais a comunidade científica e comercial, visto que ela se trata não só de tratamento de resíduos orgânicos, mas também de uma alternativa para produção de energia renovável e reciclagem de nutrientes (Mata-Alvarez et al., 2000; Li et al., 2014; Chen et al., 2015). Esta tecnologia de digestão é uma alternativa bastante eficiente para o tratamento de resíduos agrícolas e de processamento de alimentos, águas residuárias urbanas e industriais, e até mesmo para tratamento de resíduos sólidos, como detritos de frutas e vegetais (Cabezas et al., 2015; Mazareli et al., 2016). Conforme Ingrao et al. (2019), os descartes da biomassa proveniente de atividades agropecuárias em aterros sanitários geram altos custos para o produtor rural causando altos impactos ambientais que poderiam ser evitados se estes fossem direcionados para geração de energia elétrica e térmica.

A digestão anaeróbia é capaz de converter o carbono orgânico, por meio de reações de oxidação-redução, para seu estado mais oxidado (CO_2), ou na forma reduzida (CH_4) (Jimenez et al., 2015). O biogás gerado na digestão anaeróbia é uma mistura de metano (CH_4), CO_2 e outros compostos, como sulfeto de hidrogênio (H_2S), monóxido de carbono (CO) e hidrogênio (H_2) (Ingrao et al., 2019). O metano produzido no processo de digestão anaeróbia pode ser valorizado como fonte de energia, calor e biocombustível (Jimenez et al., 2015). Desta forma, o processo de digestão anaeróbia ao gerar o biogás, pode compensar os custos de energia de indústrias e atividades rurais (Janke et al., 2019).

O tratamento anaeróbio envolve alguns processos metabólicos complexos, que dependem principalmente de três grupos distintos de microrganismos, tais como bactérias fermentativas ou acidogênicas, bactérias sintróficas ou acetogênicas, e microorganismos metanogênicos (Aquino e Chernicharo 2005) (Figura 3). As bactérias que participam da digestão anaeróbia são classificadas como anaeróbias obrigatórias e facultativas (Pilarska, 2018).

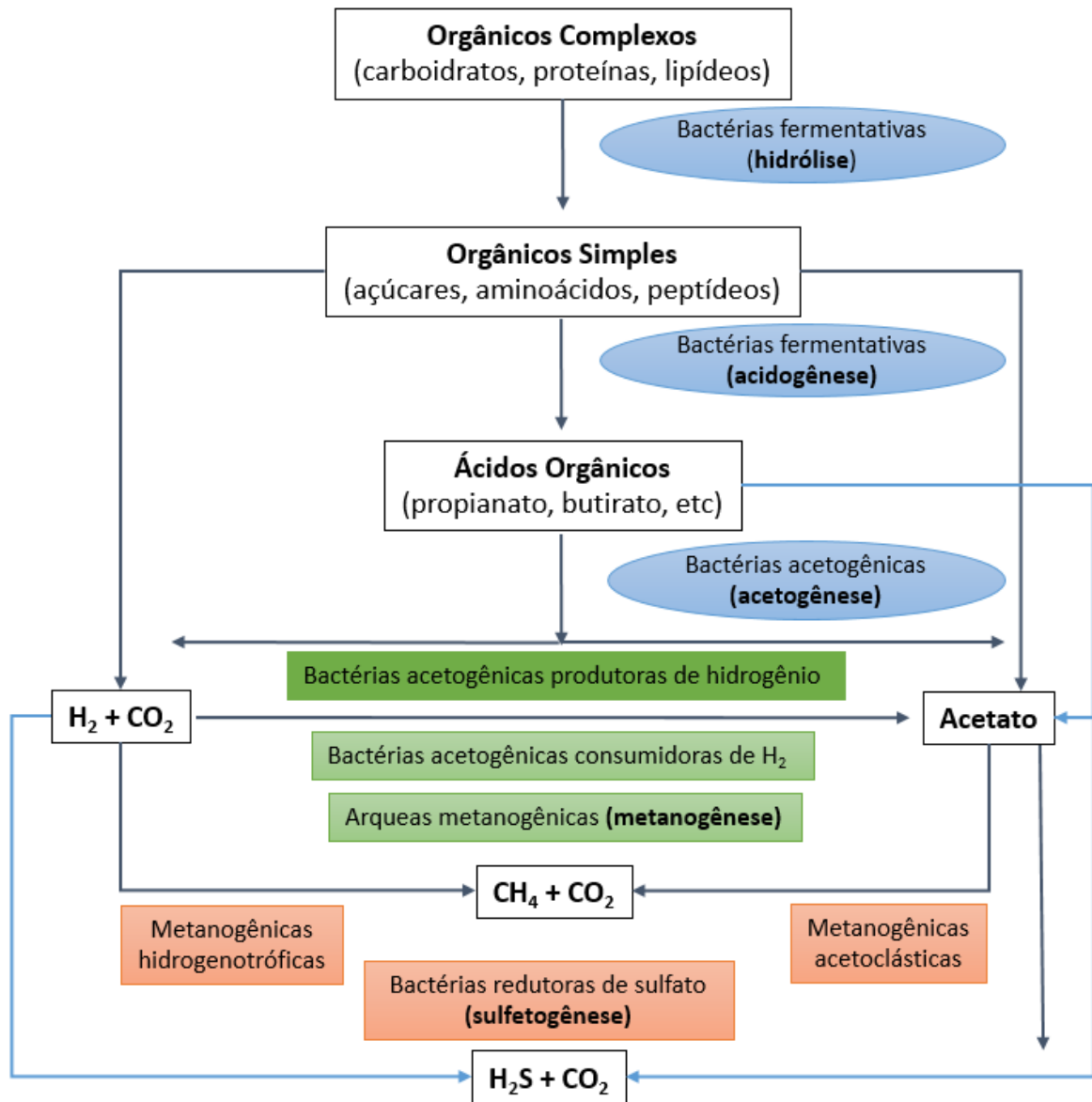


Figura 3. Fluxograma simplificado das etapas da digestão anaeróbia e rotas metabólicas adaptado de Chernicharo (2016).

A hidrólise de compostos complexos a acidogênese são efetuadas principalmente por saprófitas das espécies *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, e em menor grau, *Streptococcus* e *Enterobacterium* (Pilarska, 2018).

O grupo de microrganismos acidogênicos fermentam açúcares, aminoácidos e ácidos graxos resultantes do processo de hidrólise da matéria orgânica complexa, e produzem ácidos orgânicos, álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio. Os microrganismos acidogênicos atuam na primeira etapa sequencial de degradação do substrato, sendo o grupo que mais se beneficiam energeticamente, entretanto, a etapa acidogênica será limitante do processo de degradação, se o material a ser degradado não for facilmente hidrolisado (Aquino e Chernicharo, 2005).

Os ácidos orgânicos, álcoois e cetonas podem ser formados no processo de acidogênese na presença de espécies bacterianas *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*, e estes compostos são posteriormente processados em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio na etapa de acetogênese (Appels et al., 2011; Pilarska, 2018).

A etapa final de digestão anaeróbia consiste, principalmente, na conversão de acetato a CH_4 , H_2O e H_2 na presença de arqueias, como as espécies de *Methanosarcina*, *Methanobacterium* e *Methanococcus* (Knittel e Boetius, 2009; Pilarska, 2018). Na tabela 5 estão descritos alguns microrganismos relatados em sistemas de tratamento anaeróbio.

Tabela 5. Famílias de bactérias e arqueias verificadas em sistemas de tratamento anaeróbios.

Famílias	Função	Filo, Classe	Características metabólicas	Referências
Erysipelotrichaceae	Acidogênese	Firmicutes, Erysipelotrichia	Algumas espécies fermentam glicose, os principais produtos metabólicos finais: butirato, lactato e formiato	(Maesschalck et al., 2014)
Clostridiaceae	Acidogênese	Firmicutes, Clostridia	Glicose de fermentação; produtos metabólicos finais: hidrogênio, butirato, acetato e lactato	(Cheng et al., 2013; Lin et al., 2007)
Bacteroidaceae	Acidogênese	Bacteroidetes, Bacteroidia	Algumas espécies fermentam glicose, produtos finais metabólicos: acetato, CO ₂ e hidrogênio	(Khan et al., 1980)
Veillonellaceae	Acidogênese	Firmicutes, Negativicutes	Algumas espécies fermentam glicose, os produtos finais metabólicos: acetato, propionato, isobutirato, butirato e isovalerato	(Carlier et al., 2002)
Synergistaceae	Acidogênese	Synergistetes, Synergistia	Algumas espécies fermentam glicose e ácidos orgânicos, produtos finais metabólicos: acetato, CO ₂ e hidrogênio, co-cultura com os metanógenos hidrogenotróficos	(Honda; Fujita; Tnonouchi, 2013; Mavromatis et al., 2013)
Syntrophaceae	Acetogênese	Proteobacteria, Deltaproteobacteria	Bactérias que utilizam propionato e butirato, bactérias sintróficas por co-cultura com metanógenos hidrogenotróficos	(Moertelmaier et al., 2014; Ren et al., 2014)
Syntrophomonadaceae	Acetogênese	Firmicutes, Clostridia	Algumas espécies utilizam butirato; associação sintrófica com metanógenos hidrogenotróficos	(Djao et al., 2010; Sousa et al., 2007)
Thermotogaceae	Acidogênese	Thermotogae, Thermotogae	Capaz de fermentar carboidratos e peptídeos	(Hao; Wang, 2015)
Porphyromonadaceae	Acidogênese	Bacteroidetes Bacteroidia	Algumas espécies envolvidas na hidrólise e acidogênese	(Hahnke et al., 2015)
Rikenellaceae	Acidogênese	Bacteroidetes, Bacteroidia	Bactéria produtora de hidrogênio e fermentadora de carboidratos	(Su et al., 2014)
Ruminococcaceae	Acidogênese	Firmicutes, Clostridia	Glicose de fermentação; produtos metabólicos finais são hidrogênio e VFAs	(Liu et al., 2015)
Desulfovibrionaceae	Acetogênese	Proteobacteria, Deltaproteobacteria	Algumas espécies utilizam lactato e piruvato; os principais produtos metabólicos finais são acetato, hidrogênio e CO ₂	(Zhao et al., 2012)
Christensenellaceae	Acidogênese	Firmicutes, Clostridia	Algumas espécies fermentam glicose, os principais produtos finais metabólicos são acetato e butirato	(Motoromi; Nagai; Watanabe, 2012)
Sphingobacteriaceae	Acidogênese	Bacteroidetes, Sphingobacteriia	Algumas espécies fermentam glicose, os principais produtos finais metabólicos são AGVs	(Pankratov et al., 2007)
Spirochaetaceae	Oxidante de Acetato	Spirochaetae, Spirochaetes	Os principais produtos finais metabólicos são hidrogênio e CO ₂	(Pankratov et al., 2007)
Anaerolineaceae	Acidogênese	Chloroflexi, Anaerolineae	Algumas espécies fermentam glicose, os principais produtos finais metabólicos são AGVs e hidrogênio	(Yamada et al., 2006)
Methanosaetaceae	Metanogênese	Euryarchaeota, Metanomicrobia	Metanógenos acetoclásticos	(Liu; Whitman, 2008)
Methanobacteriaceae	Metanogênese	Euryarchaeota, Methanobacteria	Metanógenos hidrogenotróficos	(Liu; Whitman, 2008)
Methanospirillaceae	Metanogênese	Euryarchaeota, Metanomicrobia	Metanógenos hidrogenotróficos	(Liu; Whitman, 2008)

Adaptado de Si et al (2016).

A digestão anaeróbia, além de possuir elevado potencial para a produção de combustível, é benéfica devido à pequena área útil exigida para a estabilização de matéria orgânica, gerando baixa produção de lodo quando comparada aos outros métodos de tratamento de efluentes (Chong et al., 2012). Conforme Mojiri et al. (2012), biorreatores surgiram como uma nova e promissora tendência no gerenciamento de efluentes e resíduos sólidos.

Nos últimos anos um grande número de reatores anaeróbios foram construídos e estudados, e novas tecnologias de diferentes configurações de reatores vêm sendo testadas em escala laboratorial (Chong et al., 2012), contribuindo para que diversas empresas de engenharia desenvolvam projetos e instalações de reatores biológicos em escala real (Cabezas et al., 2015).

Dentre os digestores anaeróbios existentes, os reatores anaeróbios de alta taxa são os mais utilizados no tratamento de esgoto. Diferente dos digestores anaeróbios de baixa taxa convencionais, como tanques sépticos e lagoas anaeróbias, os reatores anaeróbios de alta taxa são projetados para operar em tempos de detenção hidráulicos curtos e tempo de retenção de sólidos longos, sendo capazes de incorporar uma elevada quantidade de biomassa de alta atividade, e desta forma, permitem uma melhor estabilização do lodo e maior capacidade de cargas (Von Sperling e Chernicharo, 2005; Chong et al., 2012).

Existem sistemas de tratamento anaeróbios que possuem os microrganismos na forma de flocos que se movem livremente no líquido do reator. Estes tipos de sistemas podem apresentar algumas desvantagens, tal como o arraste da biomassa para fora do reator em tempos de detenção hidráulica baixos e até mesmo o acúmulo de ácidos graxos voláteis e outros produtos intermediários que as populações metanogênicas são incapazes de processar de maneira rápida (Echiegu, 2015, Lerm et al., 2012, Lodoño et al., 2019).

As tecnologias relacionadas à digestão anaeróbia da vinhaça vêm sendo aplicadas como alternativa para a redução do seu potencial poluidor gerando o metano, produto de valor, que pode ser utilizado como biocombustível, melhorando o potencial energético das indústrias sucroalcooleiras (Parsaee et al., 2019). Diversas configurações de reatores anaeróbios para conversão da matéria orgânica em biogás vêm recebendo a atenção de pesquisadores no intuito de aprimorar o processo do tratamento biológico (Doll e Foresti, 2010).

Reatores anaeróbios com diferentes conformações e escalas foram relatadas para o tratamento da vinhaça (Del Nery et al., 2018). Dentre eles destacam-se os reatores UASB em série para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar com COV variando de 8 a 45 g DQO L.d⁻¹ (Barros et al., 2017); reatores em série composto por reator de leito fluidizado anaeróbio acidogênico (AFBR-A) e reator de leito fluidizado anaeróbio metanogênico sequencial (AFBR-S) com COV aplicada variando de 5 a 10 g DQO L.d⁻¹ (Ramos e Silva, 2020); e reator anaeróbio de leito fixo empacotado (APBR) seguido de reator anaeróbio de leito fixo estruturado (ASTBR) com COV aplicada de 15 a 30 g DQO L.d⁻¹ (Fuess et al., 2017). No entanto os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) e alta taxa instalados em série, se apresenta como novidade para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar

3.6. Digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-áçúcar

Nos estudos verificados na literatura envolvendo a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar, diversos aspectos são avaliados, como a remoção de material orgânico e dos demais compostos presentes da vinhaça, parâmetros de estabilidade, variação de cargas orgânicas volumétricas, parâmetros operacionais, rendimentos de biogás, combinações de reatores, custos operacionais, dentre outras questões importantes.

Del Nery et al. (2018) testaram um reator de manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) em escala piloto (120 L) operado para a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da vinhaça. O reator foi operado por 700 dias usando uma taxa de recirculação de 1:3 com cargas orgânicas volumétricas variando de 0,5 a 32,4 kgCOD.m⁻³.d⁻¹, as velocidades de fluxo ascendente variaram de 0,008 a 0,292 m h⁻¹ (alimentação adicionada com recirculação) e o tempo de detenção hidráulica variou de 33,33 a 0,86 dias. O reator demonstrou um desempenho estável em todas as COVs aplicadas. As eficiências de remoção de DQO ao longo do experimento foram 87,5 ± 5,3 e 90,5% para DQO total e solúvel, respectivamente. O conteúdo de metano alcançado no biogás foi 68,8% e o rendimento de metano de 0,299 LCH .g⁻¹ DQO correspondente a 76,4% do rendimento teórico de metano, demonstrando um resultado muito promissor para a geração de energia na indústria sucroenergética.

De acordo com Junior et al. (2016), a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar tem se tornado uma opção viável permitindo a recuperação de energia na forma de produção de hidrogênio e metano por meio de um sistema composto por dois estágios (acidogênico e metanogênico), sem a interferência da sua qualidade como biofertilizante. Conforme Fuess et al. (2018) a ampliação de um sistema de digestão anaeróbia em duas fases, ou seja, sistemas acidogênicos e metanogênicos, pode ser economicamente viável para usinas sucroenergéticas e ainda apresentar melhores resultados para a geração de energia em comparação à sistemas de fase única. Estudos da digestão anaeróbia da vinhaça estão sendo avaliados baseados em diferentes estratégias de utilização do biogás, não só do gás metano proveniente da metanogênese, como também do biogás rico em hidrogênio (biogás- H_2) gerado durante a acidogênese (Liu et al., 2013., Fuess et al., 2018).

Mota et al. (2013), avaliaram um sistema de tratamento composto por reator anaeróbio de membrana submersa em dois estágios (2-SAnMBR) para o tratamento da vinhaça da cana-de-açúcar. Os reatores possuíam volumes de 6,7 L e 24,0 L, respectivamente. Neste experimento, o sistema foi operado em fluxo contínuo e a separação das etapas (acidogênese e metanogênese) foi observada durante todo o período operacional a uma COV aplicada de $2,5 \text{ g DQO (L d)}^{-1}$ por um período de dois anos. Os autores relataram que o sistema apresentou estabilidade e atingiu eficiências de remoção de DQO total de até 0,7% no reator acidogênico (SAnMBR-1) e de 97% no reator metanogênico (SAnMBR-2) com teores de metano no biogás de 4,6 e de 70,1%, respectivamente.

Fuess et al. (2018) avaliaram aspectos técnicos, econômicos e ambientais da implementação da digestão anaeróbia em dois estágios para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar, baseando em diferentes estratégias de utilização do biogás rico em hidrogênio (biogás- H_2) gerado pela via acidogênica. Os autores verificaram que a separação de fases aumentou de maneira significativa a bioenergia recuperada da vinhaça em comparação com sistemas monofásicos. Além disso, os resultados deste estudo indicaram que a ampliação de sistemas da digestão anaeróbia em duas fases é economicamente viável para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, apresentando um desempenho econômico melhor ou equivalente aos alcançados em comparação com sistemas de fase única. Relataram também que a otimização da alcalinização dos reatores metanogênicos afetou fortemente o desempenho

econômico e ambiental do processo, com melhores resultados observados com o uso de baixas dosagens de hidróxido de sódio ($4 \text{ g NaOH kg}^{-1} \text{ DQO}$). De maneira geral, o estudo destacou que a digestão anaeróbia em dois estágios pode aumentar a produção de energia da vinhaça em 20-30% sem prejudicar a lucratividade da biorrefinaria, apresentado também contribuições para melhorias no desempenho ambiental da cadeia de produção do etanol por meio do uso de uma estratégia de alcalinização otimizada.

Santos et al. (2014) testaram dois reatores anaeróbicos contínuos de leito fluidizado (AFBRs) operados simultaneamente sob temperatura termofílica (55°C) por 150 dias para investigar o efeito da fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar diluída (AFBR-1) e *in natura* (AFBR-2) para a produção de H_2 como fonte de energia renovável. Foram utilizados no sistema argila expandida como material de suporte para imobilização e adesão de biomassa. O estudo demonstrou viabilidade da produção de H_2 a partir das águas residuárias orgânicas ricas em carboidratos. Além disto, os autores concluíram que, para o AFBR-1, um baixo TDH de apenas 6 h e uma carga orgânica volumétrica elevada de $40,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ foram determinados como as condições operacionais ótimas para o sistema que foi alimentado com vinhaça diluída, obtendo um rendimento de H_2 de $2,86 \text{ mmol H}_2 \text{ gDQO adicionado}^{-1}$.

Albuquerque et al. (2019), avaliaram reatores anaeróbios termofílicos contendo biomassa imobilizada (AnSBBR) para o tratamento da vinhaça para produção de metano em três fases. Na primeira fase, a biomassa foi adequadamente adaptada à condição termofílica (55°C) e alimentada em batelada com substrato contendo vinhaça e melaço como co-substrato. Na segunda fase, o reator foi alimentado com vinhaça e a carga orgânica volumétrica aplicada foi elevada de 6,5 a $25,9 \text{ gDQOtotal L}^{-1}\text{d}^{-1}$, resultando em uma produtividade molar de metano de $304 \text{ mol CH}_4.\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e um rendimento de metano por matéria orgânica removida próximo de $331 \text{ NmL-CH}_4.\text{gDQO}^{-1}$. Na terceira fase, foi testada uma estratégia de alimentação em batelada alimentada em uma COV mantida de $25,1 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, sendo possível alcançar uma produtividade ótima de metano de $352 \text{ molCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ com eficiências de remoção DQO e de carboidratos de aproximadamente 80% e 90%, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que um AnSBBR termofílico pode ser aplicado como uma alternativa tecnológica eficiente para a produção de metano por meio da digestão anaeróbia da vinhaça.

Junior et al. (2016), avaliaram o desempenho de reatores metanogênicos termofílicos de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) operando continuamente nos sistemas de vinhaça de estágio único (UASB I) e de dois estágios (UASB II) durante a safra da cana-de-açúcar (180 dias). Os rendimentos máximos de metano foram $251 \text{ NmL-CH}_4\text{.g}^{-1} \text{ DQO removida}$ e $316 \text{ NmL-CH}_4\text{.g}^{-1} \text{ DQO removida}$ para UASB I e II, respectivamente, correspondendo a 71,7% e 90,3% do rendimento máximo do valor teórico de metano ($350 \text{ NmL-CH}_4\text{.g}^{-1} \text{ DQO removida}$). Além disso, os autores verificaram que a produção energética do sistema em dois estágios foi 25,7% maior do que do sistema de um único estágio, indicando a necessidade de uma fase acidogênica para melhorar a remoção de matéria orgânica e a extração de energia da vinhaça da cana-de-açúcar.

Barros et al. (2016) testaram a conversão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em biometano com aumento gradual na carga orgânica volumétrica um sistema composto por UASB em dois estágios, R1 e R2, com volumes de 40,5 e 21,5 L na faixa de temperatura mesofílica. Os reatores UASB operaram por 230 dias com um tempo de detenção hidráulica de 2,8 dias (R1) a 1,8 dias (R2). Os valores de COV aplicados nos reatores variaram de 0,2 a 7,5 g DQO total $(\text{L d})^{-1}$ no R1 e de 0,2 a 11,5 g DQO total $(\text{L d})^{-1}$ no R2. As eficiências de remoção da demanda química de oxigênio total variaram de 49% a 82% e as eficiências médias da conversão da DQO total a metano foram de 48-58% para o R1 e de 39-65% para o R2. Para este experimento a recirculação do efluente foi utilizada para COVs acima de 6 g DQO total $(\text{L d})^{-1}$ no R1 e de 8 g DQO total $(\text{L d})^{-1}$ para o R2, sendo capaz de manter o pH dos afluentes acima de 6,5. Todavia, a recirculação reduziu em 53-39% a eficiência de conversão do DQO total removido a metano no R2 devido ao aumento da DQO recalcitrante no afluente. Os maiores valores de rendimento de metano foram de 0,181 e 0,185 $\text{LCH}_4 (\text{g DQO total removida})^{-1}$ no R1 e R2, respectivamente. Esses valores foram alcançados após 140 dias de operação com um COV aplicada de 5,0 a 7,5 gDQO total $(\text{L.d})^{-1}$ e eficiências de remoção de DQO total em torno de 70 e 80%.

Fuess et al. (2017) verificaram a aplicação da digestão anaeróbia da vinhaça em dois sistemas combinados acidogênico-metanogênicos termofílicos (55 °C), formados por um único reator acidogênico (APBR) em escala de bancada (2,3 L), seguido por dois reatores metanogênicos operados em paralelo, sendo estes um reator UASB convencional (3,5 L) e um ASTBR de fluxo ascendente (2,5 L). As cargas orgânicas volumétricas aplicadas aos reatores variaram de 15-30 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os

autores relataram que o sistema composto pelo ASTBR na etapa metanogênica atingiu uma eficiência de remoção global de DQO superior a 80%, apresentando estabilidade por um longo período (240 dias). Em contrapartida, para condições semelhantes de operação, o sistema UASB apresentou graves perdas de desempenho, levando ao acúmulo de ácidos a cada aumento da COV, sendo necessário o fornecimento de alcalinizante químico para a recuperação do sistema. Desta forma, é de grande importância estudos que avaliem a robustez de sistemas para a digestão anaeróbia da vinhaça, substrato de grande complexidade.

Ramos e Silva (2020) avaliaram a viabilidade da produção de H_2 e CH_4 na digestão anaeróbia termofílica ($55\text{ }^\circ\text{C}$) da vinhaça de cana-de-açúcar por um sistema composto por um reator anaeróbio acidogênico de leito fluidizado (AFBR-A) com um TDH de 4 h e um AFBR metanogênico (AFBR-S) com TDHs de 24-10 h. Para a comparação da digestão anaeróbia em dois estágios em relação ao de um único estágio, um terceiro reator metanogênico (AFBR-M) com um TDH de 24 h foi também alimentado. Os autores relataram que o AFBR-M produziu um teor de metano de 68,4 % e um rendimento máximo de $0,30\text{ L }CH_4.g\text{ DQO}^{-1}$, uma taxa de produção de $3,78\text{ L }CH_4.dia^{-1}\text{ L}^{-1}$ e uma remoção de DQO de 73,2% a uma COV de $7,5\text{ kg DQO.m}^{-3}.dia^{-1}$. Em contrapartida, o sistema AFBR-A de dois estágios produziu um conteúdo de hidrogênio de $23,9 \pm 5,6\%$, uma taxa de produção de $1,30 \pm 0,16\text{ L }H_2.dia^{-1}.L^{-1}$ e um rendimento de $0,34 \pm 0,08\text{ mmol }H_2.g\text{ DQO adicionada}^{-1}$. Além disso, a redução no TDH no AFBR-S favoreceu uma maior produção de metano, melhorando o teor máximo de metano (74,5%), taxa de produção ($5,57\text{ L }CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$) e rendimento ($0,26\text{ }CH_4.g\text{ DQO}^{-1}$) a uma COV de $21,6\text{ kg DQO.m}^{-3}\text{ dia}^{-1}$ (TDH de 10 h) com uma remoção de DQO total de 70,1%. Os resultados encontrados pelos autores demonstraram que, em relação a um sistema de estágio único, os sistemas de digestão anaeróbia de dois estágios são capazes de produzir mais hidrogênio e metano.

3.7. Reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa

Os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF), modelo utilizado nesta pesquisa, têm a capacidade de manter altas concentrações de

biomassa aderida ao meio suporte, apresentando boas características hidrodinâmicas e tempos de detenção hidráulica relativamente curtos para elevadas cargas orgânicas (Santos e Oliveira, 2011).

Os reatores anaeróbios de leito fixo são constituídos de sistemas contendo material de enchimento, normalmente tubos de poliuretano, brita, argila expandida, anéis de eletroduto corrugado (PVC) ou outros materiais inertes, propiciando a formação de um leito fixo com a finalidade de promover maior tempo de retenção celular para a obtenção de um contato prolongado entre a biomassa ativa e o efluente a ser tratado (Chernicharo, 2016). De acordo com Galavoti (2003), o meio suporte deve apresentar resistência à degradação biológica e às forças mecânicas e, se possível, os métodos de imobilização devem ser simplificados e de baixo custo para que a operação do sistema de tratamento possa ser viável e aplicado em escala industrial.

Os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo foram amplamente estudados para efluentes domésticos, efluentes industriais, efluente contendo compostos tóxicos, e recentemente, essa conformação vem sendo estudada também para o tratamento de efluentes da agroindústria e de práticas agrícolas (Colin et al., 2007, Duda et al., 2015).

Foresti et al. (1995) testaram um reator RAHLF contendo lodo imobilizado em matrizes de espuma de poliuretano para o tratamento de águas residuárias da indústria de papel. O reator foi operado à temperatura ambiente por um período de 26 dias e com um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 9,2 horas, com um valor médio de carga orgânica volumétrica (COV) de $2,0 \text{ Kg DQO.m}^3 \text{ d}^{-1}$. Os autores relataram um período de partida curto e constataram que o reator atingiu estabilidade no oitavo dia. A eficiência média de remoção da demanda química de oxigênio total foi de 82% a uma temperatura média de 23°C .

Zaiat et al. (1997) realizaram o tratamento de um substrato sintético composto de glicose como a principal fonte de carbono ($\text{DQO } 2090 \text{ mg L}^{-1}$) em reatores horizontais de leito fixo em dois testes experimentais, avaliando diferentes porosidade do meio suporte (0,4 e 0,24 ϵ) em tempos de detenção hidráulicas de 8,0 e 4,8 h, respectivamente, em condições mesofílicas (30°C). Os autores demonstraram para ambos os testes um período curto para a fase de partida (6 dias) demonstrando que este modelo de reator pode fornecer condições ambientais favoráveis para rápida aclimação, crescimento e retenção da biomassa. As eficiências máximas de

remoção de DQO alcançadas no primeiro teste foi de 98% (ϵ de 0,4), já no segundo teste (ϵ de 0,24), a eficiência máxima de remoção de DQO foi de 80%.

Catoony et al. (2005), avaliaram a operação de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo sob condições de redução de sulfato, operado com diferentes quantidades de etanol e tolueno. O sistema foi inoculado com lodo retirado de reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) tratando rejeitos de um matadouro de aves. O reator RAHLF era composto por uma biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, e soluções de sulfato ferroso e sulfato de sódio foram utilizadas (91 e 550 mg L⁻¹, respectivamente) para promover um ambiente de redução de sulfato. O reator horizontal foi alimentado com uma solução denominada 'meio basal Zinder' e foi adicionada solução vitamínica para estimular o crescimento de bactérias sulforedutoras. O tolueno foi adicionado em uma concentração inicial de 2,0 mg L⁻¹ seguido por um aumento gradual das concentrações (5, 7 e 9 mg L⁻¹). O etanol também foi adicionado de maneira gradual a uma concentração inicial de 170 mg L⁻¹ a 960 mg L⁻¹. O reator foi operado em condições mesofílicas (30 °C) com tempo de detenção hidráulica de 12 h. A eficiência de remoção da DQO total verificada pelos pesquisadores foi próxima a 90% e a redução de sulfato foi superior 99%. A caracterização microscópica do biofilme revelou uma diversidade de morfologias microbianas e o perfil de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) mostrou uma variação das populações de bactérias e bactérias redutoras de sulfato (BRS), que foram significativamente associadas com aditivos de tolueno. A diversidade de arqueias permaneceu inalterada durante as diferentes fases do experimento. O estudo demonstrou que unidades compactas de reatores RAHLF, em condições redutoras de sulfato, podem ser uma alternativa para a biorremediação de aromáticos *in situ*.

Baraldi et al. (2012) avaliaram o tratamento biológico de pentaclorofenol (PCP) e metanol em um reator horizontal anaeróbio de leito fixo em condições mesofílicas (30 °C) durante um período experimental de 220 dias e tempo de detenção hidráulica de 24 h. O material de meio suporte para o crescimento da biomassa era composto por espuma de poliuretano. A concentração de PCP afluyente foi elevada de 2 mg L⁻¹ para 13 mg L⁻¹ a uma taxa de carga orgânica constante de 1,15 g DQO L⁻¹ por dia, por um período de 148 dias. O reator reduziu em 97% a demanda química de oxigênio e removeu 99% do PCP. As comunidades da biomassa microbiana do reator com PCP, sem aclimação prévia, foram caracterizados por

reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) com primers oligonucleotídicos específicos de *Archaea*. A técnica ARDRA proporcionou uma análise adequada da comunidade, revelando o perfil da população selecionada ao longo do reator. As atividades de biomassa no reator RAHLF no final do experimento indicaram o desenvolvimento de degradadores de PCP e a manutenção da população de arqueias metanogênicas, garantindo uma alta eficiência do sistema de tratamento de PCP com metanol adicionado como co-substrato. Os autores alegaram que uso do método ARDRA simplificado permitiu monitorar a população microbiana com a adição de altas concentrações de compostos tóxicos, destacando uma seleção de microrganismos no biofilme.

Duarte et al. (2010) avaliaram a remoção do surfactante alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) em um reator anaeróbio horizontal de leito fixo compacto (2L). O LAS é um amplamente utilizado na fabricação de detergentes e encontrado em águas residuárias domésticas e industriais. O sistema foi preenchido com espuma de poliuretano e inoculado com lodo retirado de um reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente (UASB) que tratava águas residuárias de suínos. O reator, mantido a uma temperatura em torno de 30 °C, foi alimentado com uma mistura de substratos facilmente degradáveis (extrato de carne, amido, sacarose, bicarbonato de sódio e solução salina) com uma DQO média de 750 mg L⁻¹. O sistema, inicialmente foi operado sem a adição de LAS por um período de 27 dias, e posteriormente foram realizadas adição do surfactante com aumentos graduais de sua concentração, até o momento da última fase do tratamento, onde foram testados somente a alimentação com a solução de LAS. O período operacional do sistema foi de 313 dias e o tempo de detenção hidráulica aplicado foi de 12 h. O sistema sem a presença de detergente, resultou na redução de 94% da demanda química de oxigênio, apresentando melhor eficiência de remoção do material orgânico durante esta fase. Após adição do LAS no sistema, o balanço de massa demonstrou que a eficiência de remoção de LAS foi de 45% após 180 dias de operação. Do 109º ao 254º dia, observou-se uma eficiência de remoção de 32%. A remoção de LAS foi de aproximadamente 40% quando 1500 mg de LAS foram aplicados na ausência de co-substratos, sugerindo que as moléculas de LAS foram utilizadas de maneira seletiva. As análises microscópicas do biofilme revelaram diversas morfologias microbianas e o perfil de eletroforese em gel de gradiente desnaturante demonstrou variações nas populações de bactérias totais e de bactérias redutoras de sulfato. O sequenciamento do rRNA 16S e as análises

filogenéticas demonstraram que os membros da ordem Clostridiales foram os principais componentes da comunidade bacteriana na última etapa da operação do reator.

Santos e Oliveira (2011) avaliaram o desempenho de um sistema composto por quatro reatores horizontais com volumes totais de 49,5 L, seguido por tratamento aeróbio (RBS) no tratamento de águas residuárias de suinocultura. Dos reatores horizontais, um possuía manta de lodo (RAHML) e os demais reatores continham leito fixo (RAHLF). Nos RAHLF, foram utilizados como meio suporte anéis de bambu, anéis plásticos de eletroduto corrugado e anéis de bucha (*Luffa cylindrica*), respectivamente. Os tempos de detenção hidráulica (TDH) e as cargas orgânicas volumétricas aplicadas no RAHML foram de 12 e 10 h e 53 e 61 g DQO (L d)⁻¹, respectivamente. O RBS foi operado com ciclo de 24 h e COV de 0,34 e 0,50 g DQO (L d)⁻¹. As eficiências médias de remoção de DQO_{total} e sólidos suspensos totais para o conjunto de reatores anaeróbios horizontais, em série, foram de 96 e 99%, e de 96 e 95%, respectivamente. As maiores produções volumétricas de metano ocorreram nos RAHLF, com valores médios de até 0,744 m³ CH₄ (m³ reator d)⁻¹. Os autores demonstraram que a inclusão do RBS permitiu o alcance de melhores resultados da qualidade do efluente e a estabilidade de todo o sistema, atingindo eficiências de remoção de DQO total e SST de 99 e 99%, e de 98 e 99%, respectivamente. No RBS, ocorreu nitrificação e desnitrificação, com remoções de N-amoniacoal de até 65%.

Duda et al. (2015) utilizaram quatro RAHLFs, instalados em série, para tratar águas residuárias da suinocultura e relataram estabilidade para os parâmetros de pH, alcalinidade, e ácidos voláteis, e remoção de demanda química de oxigênio (DQO) de até 68%, com uma produção média específica de metano de até 0,30 L CH₄ (g DQO total removida)⁻¹. Além disto, análises de PCR em tempo real permitiram a identificação de microrganismos produtores de metano. Foi relatado ainda que 94% da diversidade microbiana do lodo dos reatores pertenciam às Bactérias e Archeas, indicando um bom equilíbrio de microrganismos. Os autores observaram que até 12% da diversidade do lodo pertencia às ordens produtoras de metano, tais como Methanosarcinales e Methanobacteriales. No experimento, as taxas médias de COVs aplicadas para o R1, R2, R3 e R4 foram de 12, 11, 18 e 33 g DQO total (L d)⁻¹, e os TDHs de 12,0, 6,72, 3,60 e 1,68 horas, respectivamente.

Mazareli et al. (2016) avaliaram a remoção de matéria orgânica, produção de metano e remoção de coliformes em processo anaeróbio de codigestão em sistema RAHLF, instalados em série, utilizando afluentes líquidos com altas concentrações de sólidos suspensos ($2-10 \text{ g L}^{-1}$). No experimento foram utilizadas diferentes proporções de águas residuárias de suínos e resíduos vegetais (banana e tomate) (90:10, 80:20, e 70:30) e as COVs aplicadas ao sistema variaram de 4 a $11 \text{ g DQO total (L d)}^{-1}$. Foram observadas taxas de remoção de matéria orgânica de até 98%, e taxas de remoção de 99% para coliformes totais e termotolerantes, e além disto, foi verificado produção volumétrica de metano de até $1,08 \text{ L CH}_4 \text{ (L d)}^{-1}$ para as maiores proporções de resíduos vegetais e água residuária de suíno.

Oliveira et al. (2019) avaliaram parâmetros cinéticos relacionados à remoção de sulfametazina (SMZ) utilizando um reator anaeróbio de biomassa imobilizada de fluxo horizontal preenchido com espuma de poliuretano. A SMZ é um antibiótico da classe das sulfonamidas amplamente utilizado na medicina veterinária e relatado em águas residuárias e esgotos. O biorreator foi operado em condição mesofílica (30°C) com tempo de detenção hidráulica de 12 h a uma taxa de COV aplicada de $1,0 \text{ kg O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ por um período de 252 dias. O substrato utilizado para alimentação do sistema foi preparado em laboratório (amido, celulose, sacarose, extrato de carne, solução salina, óleo de soja, detergente, NaHCO_3 , e $\text{K}_2 \text{ HPO}_4$). A remoção de SMZ foi avaliada em três concentrações diferentes: 200 ng L^{-1} (fase I), 400 ng L^{-1} (fase II) e 600 ng L^{-1} (fase III). A SMZ foi removida com eficiências de remoção de 56,0% (fase I); 62,0% (fase II) e 62,0% (fase III), respectivamente e a DQO presente no efluente feito em laboratório foi removida com uma eficiência de 91,0%. Sete produtos de transformação química foram detectados, sendo que um deles foi relatado pela primeira vez. Os autores comprovaram que o reator horizontal tem um grande potencial para auxiliar no tratamento de águas residuárias para remover contaminantes no nível de concentração de ng L^{-1} .

Atualmente, este tipo de conformação de reatores horizontais (RAHLF) também vem sendo utilizado para o tratamento de resíduos provenientes do processo de produção do etanol, como a vinhaça de cana-de-açúcar, visando o aproveitamento do biogás gerado no processo de digestão anaeróbia.

A composição do biogás pode variar em torno de 50 a 70% de metano, 20 a 40% de dióxido de carbono, e seu valor calorimétrico pode atingir de 23 a 25 MJ/m^3 (Appels et al., 2008). Conforme Li et al. (2018), o biogás quando queimado para

produção combinada de calor e energia pode atender às exigências dos digestores, além de proporcionar renda extra a partir da energia residual. Este gás é considerado inflamável quando a concentração de biometano é superior a 40% (Parsaee et al., 2019).

Junior et al. (2018) realizaram o primeiro trabalho avaliando reatores horizontais de leito fixo e alta taxa, dipostos em série, na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar. No experimento as cargas orgânicas volumétricas foram crescentes, variando de 5 até 45 g DQO_{total} (L d)⁻¹ no R1 e com o uso da recirculação do efluente do R4. Também foram realizados a suplementação de nitrogênio na vinhaça, com uréia. Os autores relataram estabilidade do sistema durante o experimento e após a retomada do sistema de tratamento após a primeira entressafra com aumento gradual da COV até valores elevados. Entretanto, a partida do sistema com COV elevada na segunda entressafra provocou acidificação dos reatores, havendo a necessidade da redução da COV e adição de alcalinizantes químicos (NaOH) para a recuperação do sistema. As maiores remoções de DQO total e produções de metano ocorreram no R1 e R2, no entanto, o R3 e R4 auxiliaram na melhoria da estabilidade do sistema, contribuindo para o aumento da eficiência de remoção de DQO (60%) e conversão a metano (0,24 L CH₄ (g DQO removida)⁻¹) em condições de COV elevadas. As maiores produções volumétricas de metano ocorreram no R1, em COV de 20,0 g DQO_{total} (L d)⁻¹, alcançando valor de 1,07 L CH₄ (L d)⁻¹ e percentual de metano no biogás de 80%. Nestas condições verificaram-se concentrações similares de micro-organismos dos domínios Bacteria e Archaea (10⁸ a 10⁹ cópias do gene 16S rDNA/g SV) indicando situação favorável para o processo anaeróbio. Os autores verificaram que nesta etapa do experimento predominaram arqueias metanogênicas acetotróficas e mixotróficas da ordem Methanosarcinales (10⁷ a 10⁹ cópias do gene 16S rDNA/g SV) seguidas das hidrogenotróficas da ordem Methanomicrobiales (10⁴ a 10⁷ cópias do gene 16S rDNA/g SV) demonstrando que a produção de metano ocorreu por ambas as vias.

Esta conformação de sistema composto por reatores horizontais de leito fixo e alta taxa dispostos em série para digestão anaeróbia, especificamente da vinhaça, ainda é pouco estudada e possui um futuro promissor para o tratamento de compostos complexos provenientes da indústria sucroalcooleira devido a sua robustez, gerando grandes expectativas para aplicação em larga escala e no aproveitamento do biometano resultante deste processo. As estratégias de retomada de reatores

anaeróbios após entre-safra da cana-de-açúcar são escassas visto que a característica sazonal da cana-de-açúcar é limitada (Santana Junior et al., 2019). Os requisitos nutricionais, retomada das atividades dos reatores após certo período em repouso, aplicação de alcalinizantes de baixo custo e estudos sobre a comunidade microbiana são sempre interessantes para estabelecer estratégias para o bom desempenho da digestão anaeróbia. Portanto, o presente trabalho utilizando o sistema RAHLF, em série, para digestão anaeróbia da vinhaça, sem adição de nutrientes e alcalinizantes químicos, pode ser considerado inédito na literatura ao avaliar as questões supracitadas.

3.8. Aplicação da biologia molecular em lodo de reatores anaeróbios

Informações sobre a diversidade e a identidade dos microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, além dos processos físico-químicos que ocorrem, é de grande importância para o entendimento do funcionamento de um biorreator, especialmente quando se trata de novos processos metabólicos (Cabezas et al., 2015). De acordo com Duda et al. (2015), a combinação de métodos de sequenciamento genético e PCR quantitativa em tempo real (q-PCR) e o conhecimento de processos anaeróbios envolvidos no tratamento de águas residuárias podem contribuir para a quantificação de grupos microbianos reprodutíveis, e consequentemente, contribuir nos avanços para soluções de questões ambientais, tais como gestão de resíduos e produção de bioenergia.

A técnica mais utilizada para atribuir a identidade dos micro-organismos em uma comunidade microbiana é baseada na análise do gene 16S rRNA, comumente utilizado como marcador genético para estudo de filogenia e taxonomia de bactérias e arqueias, pois este gene está presente em quase todas elas, e é grande o suficiente (aproximadamente 1500 pares de bases) para conter informações de sequências estatisticamente relevantes (Patel, 2001; Cabezas et al., 2015). De acordo com Cabezas et al. (2015), atualmente é possível determinar o gênero e a espécie de uma bactéria ou arqueia sequenciando o gene do rRNA 16S e comparando a sequência com os bancos de dados disponíveis.

É importante quantificar alguns grupos de microrganismos no processo de digestão anaeróbia, principalmente a densidade e a proporção de organismos

metanogênicos devido à sua relevância para assegurar a metanogênese, e para isto, existem técnicas adequadas, tais como hibridação fluorescente *in situ* (FISH) ou PCR quantitativa (q-PCR), que quantificam diferentes grupos de microrganismos em uma comunidade complexa (Cabezas et al., 2015).

As vias metabólicas e relações interespecies envolvidas no processo anaeróbio geralmente são desconhecidas, especialmente quando processos difíceis estão acontecendo, como por exemplo, a degradação de compostos recalcitrantes. Desta forma, descobrir funções específicas em comunidades microbianas anaeróbicas é um grande desafio para microbiologistas e ecologistas moleculares nos últimos anos (Cabezas et al., 2015). A produção de gás metano é resultante das últimas etapas da digestão anaeróbia, entretanto, a quantidade de metano produzida também pode indicar o desequilíbrio deste processo, pois a comunidade metanogênica não é tão diversa como os outros microrganismos presentes em digestores, possuindo um metabolismo especializado, e portanto, são mais propensas a serem inibidas. Desta forma, a quantidade de microrganismos metanogênicos viáveis pode ser considerada um importante indicador de um sistema estável e eficaz (Alvarado et al., 2014). Sendo assim, é de grande relevância o entendimento das interações microbianas e dos processos bioquímicos decorrentes nas etapas do tratamento de um resíduo para se obter uma produção de metano elevada e manter as melhores condições para o crescimento e o bom desempenho da biomassa em um sistema de tratamento biológico.

De acordo com Lee et al. (2017), tecnologias moleculares mais tradicionais como clonagem, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (RFLP) tem sido utilizadas para distinguir a comunidade microbiana, entretanto, eles apenas identificam os grupos mais abundantes. Já metodologias mais atuais, consideradas 'sequenciamento de nova geração' ou de 'segunda geração' tais como: sequenciador de DNA 454 GS Junior (Roche), Illumina MiSeq ou o Ion Torrent PGM (Life Technologies), apresentam um quadro mais abrangente, pois o sequenciamento permite esclarecer as relações sintróficas que ocorrem dentro de uma comunidade microbiana. Contudo, ainda existem algumas barreiras que impedem a aplicação e disseminação de sequenciamento de nova geração para o uso conjunto com o monitoramento de sistemas de tratamento anaeróbios, como por exemplo, o alto custo e dificuldades de entendimento. Dentre as metodologias de nova geração

mencionadas, a Illumina possui um rendimento significativamente alto e é relativamente mais econômica, e além disto, está sendo utilizada para o estudo de uma variedade de comunidades microbianas complexas (Lee et al., 2017).

Conforme Theuerl et al. (2018) o uso de ferramentas de sequenciamento de última geração, incluindo as bibliotecas de amplicons de gene 16S rRNA e análises de metagenoma, metatranscriptoma e metaproteoma para o estudo de comunidades microbianas resultou em inúmeras descobertas de vida microbiana que antes eram incompreendidas em sistemas de digestão anaeróbicos. Estas novas tecnologias de sequenciamento ampliaram o conhecimento sobre as funções da microbiota e da dinâmica de comunidades.

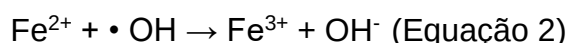
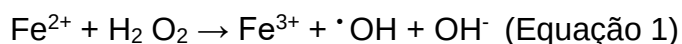
3.9. Processo Fenton

O tratamento anaeróbico da vinhaça é amplamente utilizado de uma forma eficaz, possuindo grandes eficiências de remoção de DQO, onde é possível a recuperação de energia como biogás (Pant e Adholeya 2007). Todavia, a vinhaça possui níveis elevados de metais pesados, sulfatos, fenóis, potássio, e presença de melanoidinas que são difíceis de serem degradadas em tratamentos anaeróbios (Wilkie et al., 2000; Kannan et al., 2006; España-Gamboa, 2011). Segundo Kamali et al. (2019), o tratamento biológico pode ser limitado na presença de compostos tóxicos em efluentes.

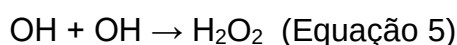
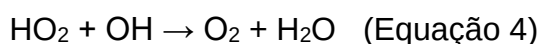
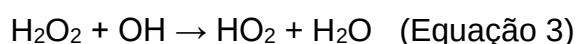
O processo Fenton é considerado um processo oxidativo avançado (POA), e para realizá-lo, peróxido de hidrogênio e o ozônio são produtos químicos comumente utilizados. POAs são conhecidos por serem capazes de oxidar substratos orgânicos de alta complexidade (Romero et al., 2016), e também compostos inorgânicos, ou substratos (Pilli et al., 2015).

A reação Fenton utiliza a decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio por íons ferrosos em meio ácido, com o intuito de produzir radicais hidroxila (OH), (Sun et al., 2007), caracterizado por possuir elevado potencial de oxidação, provocando desta maneira a quebra de moléculas complexas em compostos quimicamente mais simples (Paulino et al., 2015).

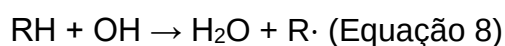
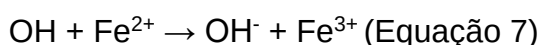
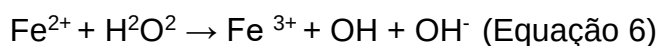
Conforme Nogueira et al. (2007), o radical hidroxila é a espécie oxidante neste processo, oxidando várias classes de compostos orgânicos em uma reação espontânea, que ocorre em ausência de luz (Equação 1). O radical hidroxila formado pode oxidar outro íon Fe (II) (Equação 2), na ausência de um substrato. Os íons férricos gerados podem decompor H_2O_2 cataliticamente a H_2O e O_2 , porém estes processos são dependentes do pH do meio.



Embora o H_2O_2 seja necessário para produzir íons OH^- , não é recomendado o uso de uma alta concentração de H_2O_2 , pois o H_2O_2 residual transforma-se em sequestrador de OH (Equação 3, 4 e 5) (Pilli et al., 2015).



De acordo com Pili et al. (2015), durante a reação do processo Fenton, o peróxido de hidrogênio oxida o catalisador de ferro (Fe^{2+}) para Fe^{3+} (equação 6). O íon ferroso (Fe^{2+}) inicia e catalisa a decomposição de H_2O_2 , resultando na geração de radicais hidroxila e ânions hidroxila. Os radicais hidroxila irão reagir com Fe^{2+} , levando à terminação da cadeia (equação 7), produzindo Fe^{3+} e ânion hidroxila. Na presença de orgânicos (RH), os radicais hidroxila irão reagir e formar radicais orgânicos ($\text{R}\cdot$). Este processo é referido como propagação de corrente (equação 8), que é iniciada quando os radicais hidroxilas oxidam os orgânicos (RH) por abstração de radicais orgânicos produtores de prótons ($\text{R}\cdot$), que são altamente reativos e podem ser mais oxidados.



A reação de Fenton é um processo oxidativo avançado (POA) que consiste numa reação redox, na qual o Fe (II) é oxidado a Fe (III) por peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , o qual é por sua vez reduzido ao íon hidroxila e à radical hidroxila. A eficiência da reação de Fenton é limitada à presença de compostos que reagem com o ferro, reduzindo a concentração dos catalisadores (íons de ferro livre) da solução, inibindo ou até mesmo parando completamente a reação de Fenton (Friedrich et al., 2017). Contudo, o pH do meio é determinante na eficiência de reação de Fenton. Sendo que a faixa ótima para a ocorrência da reação fenton situa-se entre 3 e 5, pH superiores a esta faixa reduzem a eficiência da reação. O resultado da diminuição da eficiência da reação deve-se à transição de íons Fe^{2+} hidratados para espécies coloidais férricas – $Fe(OH)_3$. Estas espécies coloidais são capazes de decompor cataliticamente o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, impedindo a formação de radicais hidroxila. Além deste efeito, a precipitação do Ferro na forma de hidróxido reduz a quantidade de catalizador disponíveis para a produção de radicais hidroxila (Nogueira et al., 2017).

Muitos tipos de águas residuárias industriais, como efluentes gerados em destilarias de etanol, contêm um alto nível de poluentes orgânicos e alta demanda química de oxigênio (DQO) (Arimi et al., 2016). Para estes tipos de resíduos, a digestão anaeróbia é aplicada principalmente devido à sua alta eficiência energética pela recuperação de biogás (Chan et al., 2009). A aplicação de POAs é uma boa alternativa para se tratar águas residuárias tóxicas ou com compostos recalcitrantes (Arimi et al., 2016), entretanto, o uso de POAs tornam-se caros quando são aplicados para tratar águas residuais com alta DQO (Cañizares et al., 2009). Segundo Arimi et al. (2016), o uso de POAs antes de processos biológicos também é possível quando o efluente é biodegradável, mas que possuam recalcitrante elevados e requerem aprimoramento da biodegradabilidade antes da biodigestão. Uma das estratégias para reduzir esta limitação de alto custo para o tratamento de efluentes com POA, poderia ser a combinação de POAs com métodos biológicos.

A vinhaça de cana-de-açúcar ao ser biodigerida pode apresentar um efluente com concentrações de DBO e DQO reduzidas, entretanto, compostos recalcitrantes e inibitórios da atividade biológica podem ainda estar presentes, sendo indesejável ao processo de tratamento anaeróbio, visto que a vinhaça biodigerida é comumente recirculada a reatores anaeróbios com a finalidade de aproveitar a alcalinidade do efluente gerado, reduzindo assim, a utilização de produtos químicos, tais como NaOH

para a neutralização (Barros et al., 2016; Guerreiro et al., 2016). A digestão anaeróbica da vinhaça não é capaz de remover melanoidinas contida na vinhaça. Esse composto é constituído de polímeros de alto peso molecular e são formados quando açúcares e aminoácidos se combinam por meio de reações de Maillard em altas temperaturas e baixa atividade de água. Todavia, a melanoidina pode ser removida por meio de tratamentos físico-químicos, ou com a integração de tratamento biológico com processos oxidativos avançados (Parsaee et al., 2019).

Acredita-se que o consórcio da digestão anaeróbia com o processo fenton possa aumentar a biodegradabilidade da vinhaça previamente biodigerida, auxiliando desta forma, a degradação dos compostos recalcitrantes, a estabilização da matéria orgânica e consequentemente, maior produção de metano (Guerreiro et al., 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalações experimentais

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Saneamento Ambiental, Departamento de Engenharia e Ciências exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal, Brasil, cujas coordenadas geográficas são: latitude de 21°15'22" S; 48°18'58" W e altitude de 575 m. O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é CWA (subtropical úmido, seco no inverno e com chuvas no verão), apresentando temperatura média anual de 22,2 °C e precipitação média anual de 1425 mm.

O sistema de tratamento consistiu em um reservatório de armazenamento do afluente com 500 L, quatro reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF – R1, R2, R3 e R4) em escala piloto, construídos em tubos de policloreto de vinila (PVC) (Figuras 4, 5 e 6) instalados em série, de acordo com Duda et al. (2015). Para a construção do leito fixo para propiciar a formação de um meio suporte para a biomassa microbiana, os reatores foram totalmente preenchidos com anéis de eletroduto corrugado (conduíte), com 87% de índice de vazios. Os conduítes apresentavam comprimento de 0,043 m, diâmetro externo de 0,020 m; diâmetro interno de 0,019 m e área superficial específica de 135 m²/m³ (Figura 7). Também foi instalado um reservatório para armazenamento do efluente do reator R4 com volume de 150 L (Figura 8).

Os reatores RAHLF possuíam 6 m de comprimento. Os R1 e R2 apresentavam volumes úteis similares de 149 L e o R3 e R4, volumes de 96 e 45 L, respectivamente (Tabela 6). Esta configuração de sistema permite tempos de detenções hidráulicas (TDHs) menores nos reatores R3 e R4, mantendo elevadas concentrações de matéria orgânica em todo sistema.

O R1 foi alimentado, com o afluente preparado, por meio de uma bomba hidráulica para a regularização das vazões no R1 e, conseqüentemente para todo o sistema (R1, R2, R3, R4).

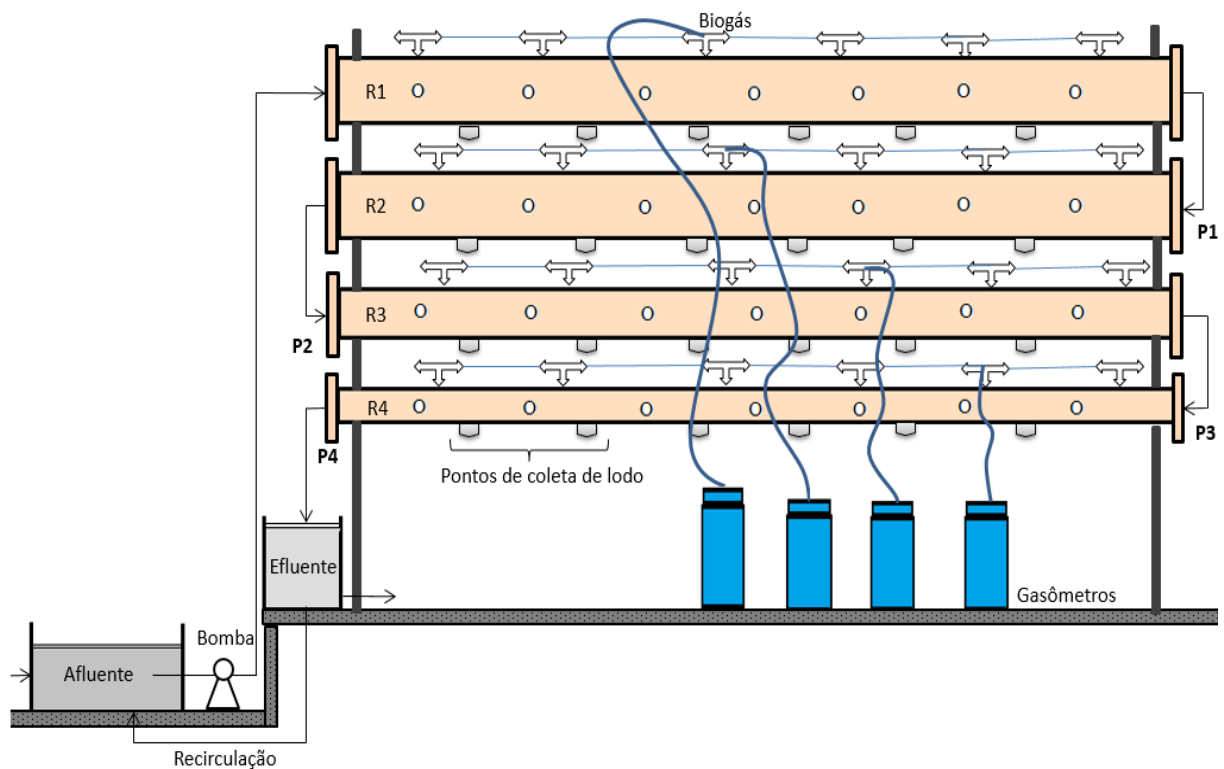


Figura 4. Representação esquemática do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF), em série.

Para a coleta de amostras de monitoramento dos efluentes, o sistema foi equipado com registros acoplados próximos à saída de cada um dos reatores (P1, P2, P3 e P4) (Figura 4). Ao longo dos reatores também possuíam sete registros na região central dos tubos para retirada de amostragens para a avaliação do perfil longitudinal. Na porção inferior dos quatro reatores RAHLF, foram instalados seis registros para a coleta de lodo, localizados a 0,50; 1,50; 2,50; 3,50; 4,50 e 5,50 m da entrada dos reatores (Figura 4 – pontos de coleta de lodo). Foram projetadas quatro saídas de biogás equidistantes na parte superior dos reatores horizontais, interligadas e acopladas a um gasômetro de fibra de vidro para armazenar o biogás produzido diariamente e para a monitorização da produção dos volumes gerados (Figura 6).

As informações específicas sobre os reatores e os parâmetros operacionais estão descritas na tabela 6.



Figura 5. Sistema de tratamento composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF) – R1, R2, R3 e R4.

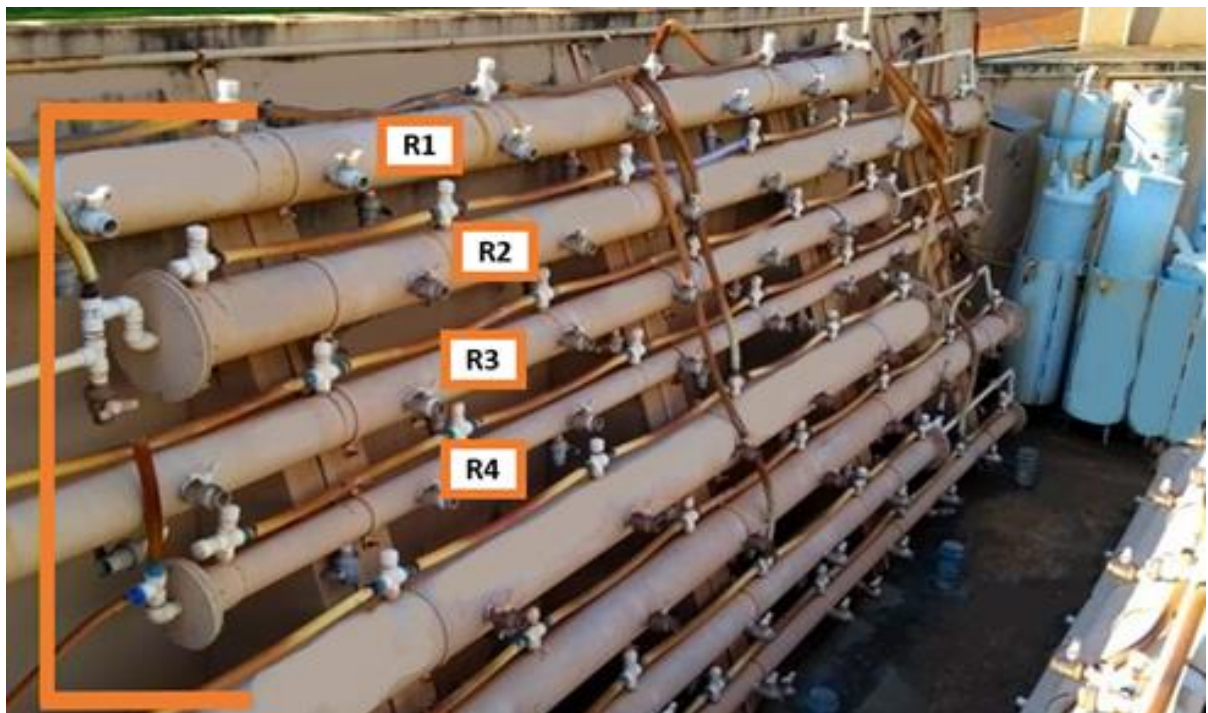


Figura 6. Sistema de tratamento composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF) – R1, R2, R3 e R4, e gasômetros.



Figura 7. Material de meio suporte (anel de eletroduto corrugado) utilizado nos reatores anaeróbios de leito fixo e alta taxa - RAHLF.



Figura 8. Reservatório para armazenamento do efluente do sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa - RAHLF.

Tabela 6. Valores de volume total e útil, comprimento e tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicados nos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RAHLF), em série, R1, R2, R3 e R4.

Reatores	Diâmetro (m)	Comprimento (m)	Volume Total (L)	Volume útil (L)	TDH (d)
R1	0,200	6,0	172	149	1,23
R2	0,200	6,0	172	149	1,23
R3	0,160	6,0	110	96	0,79
R4	0,110	6,0	52	45	0,37

4.2 Lodo de inóculo

O lodo utilizado como inóculo foi proveniente de um experimento realizado anteriormente empregando os reatores no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar para a produção de biogás (Junior, 2018). Portanto, não foi necessário realizar o preenchimento dos reatores com lodo, pois este já estava presente no sistema. Os valores de sólidos voláteis (SV) e sólidos totais (ST) do lodo de inóculo estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Valores de SV e ST do lodo de inóculo, em g.L⁻¹, contido nos reatores R1, R2, R3 e R4, analisados por pontos de coletas (P1, P2, P3, P4, P5 e P6).

Pontos de coleta		R1	R2	R3	R4
P1	ST	52,76	52,12	48,68	47,48
	SV	40,90	32,57	7,69	30,23
P2	ST	64,54	44,22	52,29	48,16
	SV	36,98	25,32	15,66	34,12
P3	ST	70,41	60,76	53,13	70,41
	SV	43,76	42,42	13,27	43,76
P4	ST	70,76	51,24	52,33	72,80
	SV	49,08	30,88	16,54	48,19
P5	ST	49,21	74,12	40,22	51,24
	SV	31,02	42,65	10,04	30,88
P6	ST	41,99	92,31	26,99	19,74
	SV	15,65	40,02	14,67	14,08

ST:sólidos totais, SV: sólidos voláteis.Unidades g.L⁻¹. Pontos de coleta de lodo: P1, P2, P3, P4, P5 e P6.

4.3 Características do afluente

Para a alimentação dos reatores RAHLF, foi utilizada a vinhaça *in natura* proveniente de duas usinas sucroenergéticas localizadas na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. A coleta da vinhaça era realizada após as colunas de destilação do vinho, quinzenalmente, e armazenada temporariamente em recipientes fechados até o momento de uso (Figuras 9 e 10).

A vinhaça *in natura* possuía valores médios de demanda química de oxigênio total (DQO total) e de pH de aproximadamente 33 g L^{-1} e 3,6, respectivamente (Tabela 8). Portanto, foi necessário realizar a recirculação de parte do efluente do R4 para o ajuste e obtenção das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no experimento e para o aproveitamento da alcalinidade gerada no sistema para corrigir o pH do afluente para valores próximos à neutralidade. A taxa de recirculação (RR) aplicada durante o período de partida foi de 28:72, para as demais fases do experimento, as taxas de recirculação estão descritas na figura 12. A taxa de recirculação (RR) foi calculada como a razão da taxa de fluxo de efluente retornado pela taxa de fluxo de entrada (Zuo et al., 2013).

A carga orgânica volumétrica (COV) do sistema foi calculada pela razão entre a demanda química de oxigênio (DQO total) do afluente e o tempo de detenção hidráulica (TDH) do reator (R1, R2, R3 ou R4). Para a partida do sistema, foi utilizado o efluente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta lodo (UASB) que tratava vinhaça de cana-de-açúcar. As demais características da vinhaça utilizada no sistema RAHLF estão descritas na tabela 8. Durante todo o experimento não foi fornecida suplementação nutricional aos reatores RAHLF.



Figura 9. Tanques para armazenamento temporário de vinhaça de cana-de-açúcar.



Figura 10. Recipientes utilizados para a coleta da vinhaça de cana-de-açúcar nas usinas sucroenergéticas.



Figura 11. Amostra de vinhaça de cana-de-açúcar.

1ª Safra (2017) 238 dias				2ª Safra (2018) 269 dias				3ª Safra (2019) 303 dias		
Fases										
	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COV - R1	8,4	17	22,9	9	10,5	17,6	22	10,1	19,1	17,8
COV - R2	7,1	13,5	15,2	5,3	6,4	10,1	11,1	6,2	11,8	8,1
COV - R3	9,5	18	18,4	7	8,2	14,1	15,1	6,8	13,5	9,5
COV - R4	6,6	12,8	12,2	5,3	5,6	9,7	10,9	4,5	8,1	4,9
DQO vinhaça	37,50	35,56	33,06	31,66	31,46	35,23	28,00	36,80	31,66	32,10
Proporções (% vol) Vinhaça:efluente R4	28:72	59:41	85:15	35:65	41:59	61:39	97:03	40:81	93:28	93:28
Tratamento	Digestão Anaeróbia (DA)									DA+Fenton
Período operacional	810 dias									

Figura 12. Diagrama esquemático do sistema RAHLF (R1, R2, R3 e R4) com as cargas orgânicas volumétricas (COV) em g DQO total (L d)⁻¹ aplicadas aos reatores (R1, R2, R3 e R4); valores médios da demanda química de oxigênio total (DQO total) da vinhaça de cana-de-açúcar em g L⁻¹ e taxas de recirculação do efluente do R4 (vinhaça : efluente) em % vol. aplicados ao R1 nas diferentes fases experimentais.

Tabela 8. Valores médios e desvios padrões de pH, demanda química de oxigênio total (DQO total), ácidos voláteis totais (AVT), demanda química de oxigênio dissolvida (DQOdiss), nitrogênio amoniacal (N. Am.), nitrogênio total kjeldahl (NTK) e fósforo total (P-T) obtidos na caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada no sistema de tratamento composto pelos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo - RAHLF, em diferentes fases experimentais.

Parâmetros	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	3,0 ^a	4,1 ^b	4,2 ^b	3,6 ^a	3,9 ^{ab}	3,6 ^a	3,4 ^a	4,0 ^b	3,2 ^a	3,1 ^a
dp	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,6	0,5	0,6	0,1	0,5
DQOtotal	36005 ^f	36327 ^f	33122 ^d	32558 ^c	32221 ^c	34866 ^e	29053 ^a	36982 ^f	31667 ^b	32065 ^c
dp	276	861	151	788	1257	472	86	1909	5026	547
AVT	2578 ^b	3461 ^f	2782 ^c	2609 ^b	2665 ^b	3296 ^e	3105 ^d	1822 ^a	2413 ^b	2572 ^b
dp	92	197	6	73	150	247	148	82	139	40
DQOdiss	13287 ^e	13552 ^e	14398 ^f	8949 ^b	7444 ^a	10772 ^c	10037 ^c	13322 ^e	11442 ^d	10991 ^c
dp	375	149	375	1168	1884	776	1846	172	2360	1569
N. Am.	46 ^c	54 ^d	41 ^b	38 ^b	66 ^e	68 ^e	30 ^a	40 ^b	43 ^{bc}	41 ^b
dp	1	2	4	1	1	2	6	1	1	7
NTK	282 ^c	316 ^d	276 ^c	402 ^e	164 ^a	287 ^d	169 ^a	386 ^e	182 ^b	305 ^d
dp	6	8	1	28	75	16	63	36	55	10
P-T	39 ^b	65 ^d	44 ^c	36 ^b	34 ^b	42 ^c	27 ^a	34 ^b	33 ^b	28 ^a
dp	8	1	16	5	2	4	1	1	1	1

*Unidades: mg L⁻¹, exceto para pHdp: Desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

4.4 Condições operacionais dos reatores RAHLF (R1- R4)

Foram realizadas dez fases experimentais (partida e fases de 1 - 9) totalizando 810 dias de operação dos reatores. O experimento foi executado em períodos correspondentes a três safras consecutivas da cana-de-açúcar. Os períodos da partida e fases 1 e 2 foram realizadas durante a primeira safra, as fases de 3 a 6 na segunda safra, e as demais fases (7, 8 e 9) na terceira safra. As COVs aplicadas no R1 foram elevadas gradualmente, atingindo um valor máximo de 27,9 g DQO total (L d)⁻¹.

Nos períodos de entressafra as atividades dos reatores foram paralisadas, havendo o processo de retomada da operação dos reatores (fases 3 e 7) com sucessivos aumentos da COV. As condições operacionais de cada fase experimental estão descritas na tabela 9.

A fase 6 do experimento, correspondente ao final da segunda safra da cana-de-açúcar, foi a fase em que atingiu o maior valor de carga orgânica volumétrica (27,9 g DQO total (L d)⁻¹), portanto, nesta etapa do experimento, foi realizado o perfil longitudinal do sistema RAHLF para uma avaliação mais refinada do funcionamento e desempenho do sistema.

As fases de 7 a 8, compreenderam ao período de repartida do reator pela segunda vez consecutiva. Nestas fases foram realizados o aumento gradual da COV e estabilização do sistema para o início de uma nova etapa, caracterizada pela junção do tratamento anaeróbio com processo oxidativo avançado simples (Fenton) com a digestão anaeróbia para produção de metano. A carga orgânica volumétrica na fase 8 foi ajustada a valores próximos aos obtidos durante as fases 2 e 5, correspondentes às maiores produções volumétricas de biogás obtidas durante as safras iniciais da cana-de-açúcar (1ª e 2ª safra). Após o ajuste e estabilização do sistema, foi dado o início da aplicação da combinação do Fenton com a biodigestão, realizada durante a fase experimental 9.

Tabela 9. Condições operacionais do sistema de tratamento com os reatores anaeróbios horizontais de alta taxa com leito fixo (RAHLF), em série, R1, R2, R3 e R4, na partida e fases 1 a 8.

	Fases do Experimento	COV no R1 (g DQO (L d)⁻¹)	Dias de operação
1ª safra	Partida	5,6 a 12,5	58
	Fase 1	12,5 a 21,4	86
	Fase 2	21,4 a 26,1	94
2ª safra	Fase 3	5,3 a 11,1	65
	Fase 4	11,1 a 11,9	59
	Fase 5	11,9 a 24,8	61
	Fase 6	24,8 a 27,9	84
3ª safra	Fase 7	5,2 a 16,5	77
	Fase 8	16,5 a 27,4	190
	Fase 9	27,4 a 19,8	36
Experimento			810

4.5 Exames e determinações

Para avaliar o desempenho do sistema composto pelos reatores RAHLF (R1, R2, R3 e R4) foram realizadas amostragens compostas do afluente e efluentes. As análises e frequências realizadas no afluente e efluente dos reatores, do lodo, e as avaliações do biogás estão descritas na tabela 10.

A composição do biogás foi analisada quinzenalmente por cromatografia gasosa (Método 2720 – C), conforme descrito por APHA (2012). Os resultados da produção de metano foram corrigidos para a temperatura e pressão padrão (CNTP, 101,325 kPa, 273,15 K).

A temperatura média, mínima e máxima do ar no local do experimento foram mensuradas diariamente. Os elementos meteorológicos utilizados neste trabalho foram extraídos de um conjunto de dados pertencentes ao acervo da área de Agrometeorologia do Departamento de Ciências Exatas da UNESP/FCAV, câmpus de Jaboticabal.

Tabela 10. Exames e determinações, frequência e fontes das metodologias utilizadas.

Exames e Determinações	Frequência	Referências
Afluentes e efluentes		
pH	Diariamente	APHA; AWWA; WPCF (2012).
Demanda Química de Oxigênio (DQO total)	Duas vezes por semana	APHA; AWWA; WPCF (2012).
Alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI)	Duas vezes por semana	Ripley et al. (1986)
Ácidos voláteis totais (AVT)	Duas vezes por semana	Dilallo e Albertson (1961)
Nitrogênio amoniacal	Duas vezes por semana	APHA; AWWA; WPCF (2012).
Nitrogênio total Kjeldahl (NTK)	Uma vez por semana	APHA; AWWA; WPCF (2012).
Ferro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), sódio (Na)	Quinzenalmente	APHA; AWWA; WPCF (2012)
Sulfato e sulfeto	Quinzenalmente	APHA; AWWA; WPCF (2012)
Fenóis totais	Quinzenalmente	Singleton et al. (1998)
Sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF)	Uma vez por semana	APHA; AWWA; WPCF (2012)
Lodo		
SV e ST	Mensalmente	APHA; AWWA; WPCF (2012)
Biogás		
Produção	Diariamente	Oliveira (1997)
Composição	Quinzenalmente	APHA; AWWA; WPCF (2012)

4.6 Perfil longitudinal dos reatores horizontais

A determinação do perfil longitudinal em cada reator horizontal (R1, R2, R3 e R4) possibilita uma avaliação mais detalhada sobre o comportamento do processo de digestão anaeróbia ao longo de todo o sistema. Desta forma, foram realizadas amostragens compostas de cada um dos sete registros contidos na região central de cada reator (Figura 4) (Pontos de coleta - P1 a P24) ao final da fase 6.

Para avaliação do perfil, foram determinadas as análises de: nitrogênio amoniacal (N-am) (Método: 4500-NH₃-C); demanda química de oxigênio total (DQO total) (Método: 5220-B) e pH (Método: 4500 H⁺-B), conforme metodologias descritas por APHA (2012). Foram avaliadas também a alcalinidade total (AT), parcial (AP) e intermediária (AI), conforme metodologias descritas por Ripley et al. (1986). Análises de ácidos voláteis totais (AVT) também foram executadas, conforme a metodologia descrita por Dilallo e Albertson (1961).

4.7 Amostras do lodo dos reatores para extração do DNA genômico

As amostras de DNA genômico para o sequenciamento de segunda geração (Illumina) foram realizadas nos pontos de coleta presentes nos reatores (R1, R2, R3 e R4), conforme ilustrado na figura 4.

As amostras foram retiradas em cada ponto (P1 a P6), para cada reator, em diferentes etapas do experimento (lodo de inóculo e fases 2 e 6). As amostras de lodo retiradas em cada registro dos reatores foram homogeneizadas para se formar uma amostra composta por reator, de acordo com a metodologia realizada por Barros et al. (2017).

Os valores de sólidos voláteis das amostras compostas para o estudo da composição microbiana (Illumina) estão descritos na tabela 11.

Tabela 11. Valores de sólidos voláteis das amostras de lodo compostas dos reatores R1, R2, R3 e R4, coletado para avaliação da composição microbiana (Illumina) no lodo de inóculo e nas fases 2 e 6 do experimento.

Fases	R1	R2	R3	R4
Inóculo	39,02	29,31	21,40	29,59
Fase 2	22,18	26,83	20,70	14,39
Fase 6	19,95	21,62	12,68	8,13

Unidade: g L⁻¹ SV

Para PCR quantitativa em tempo real (q-PCR), também foram coletadas amostras do lodo de inóculo e do lodo presente nos reatores e ao final das fases 2 e 6 do experimento. A amostragem do lodo de inóculo foi realizada nos seis pontos de coletas de lodo em cada reator e foram homogeneizadas para se formar amostra composta (uma amostra composta para cada reator: R1=P1, R2=P2, R3=P3 e R4=P4). Para os lodos correspondentes às fases 2 e 6, as amostras foram coletadas em três pontos equidistantes (P1, P2 e P3) de cada reator (R1, R2, R3 e R4). O DNA genômico foi extraído a partir de 0,30 mg de lodo por meio do *DNeasy PowerSoil Kit* (QIAGEN), e estocados a -20°C. A qualidade foi analisada tanto pelo *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc.) quanto por gel de agarose a 1% com TAE 1x e a quantificação foi por meio do *Qubit® dsDNA HS Assay Kit 100 assays, 0.2–100 ng*, conforme as instruções do fabricante.

Os valores de sólidos voláteis das amostras verificados no lodo de inóculo e nos lodos retirados dos reatores nas fases 2 e 6 estão descritos na tabela 12.

Tabela 12. Valores de sólidos voláteis em cada ponto do lodo coletado para a quantificação em PCR em tempo real.

		R1	R2	R3	R4
Inóculo	(P1-P4)	19,9	21,6	12,68	8,3
Fase 2 (1ª safra)	P1	25,9	31,1	23,1	13,8
	P2	21,2	47,9	26,9	17,6
	P3	20,1	16,9	15,5	12,5
Fase 6 (2ª safra)	P1	28,4	28,5	12,2	10,4
	P2	20,2	18,6	9,5	8,8
	P3	15,2	20,0	20,2	6,2

P1, P2, P3 e P4: Pontos de coleta do lodo. Unidade: g L⁻¹.

4.8 Sequenciamento e análises de dados - Illumina

As leituras brutas do tipo *paired-end* saídas do sequenciamento Illumina MiSeq foram unidas utilizando o programa PEAR (Zhang et al., 2013) e em sequência, foi utilizado o programa USEARCH11 (Edgar, 2010). As sequências foram truncadas para 250 pares de bases, e foram removidos os adaptadores encontrados (19 bases à jusante e 20 bases à montante). As leituras foram filtradas com qualidade "Phred" $Q = 20$, que corresponde a 1 erro esperado a cada 100 bases (erros esperados: 2.10). As sequências passaram por desreplicação (contagem), seguido de remoção de "singletons": sequências que só ocorrem uma única vez.

As sequências biológicas verdadeiras ("Amplicon sequence variants", ASVs) foram determinadas usando o algoritmo UNOISE3 (Edgar, 2016), com as possíveis sequências quiméricas sendo removidas usando o algoritmo UCHIME (Edgar et al., 2011), restando 48 ASVs únicas. Para quantificação desses organismos por amostra, as leituras pré-processadas foram remapeadas contra as ASVs.

Para atribuição taxonômica foi usado o classificador de "Último Ancestral Comum" do preditor SINTAX (Edgar, 2016), usando como referência o banco de dados "SILVA132" (Yarza et al., 2014), com confiança de 90%.

As matrizes de quantificação e taxonomia foram analisadas tanto na plataforma online MicrobiomeAnalyst (Dhariwal et al., 2017) quanto no R (R Core Team, 2017) usando o pacote PhyloSeq (Mcmurdie; Holmes, 2013).

4.9 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada com as amostras de DNA genômico isoladas a partir do lodo coletado de três pontos diferentes de cada reator (Tabela 12).

Os domínios Archaea e Bacteria, as ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales, e duas famílias, Methanosarcinaceae e Methanosaetaceae foram quantificados por amplificações das regiões 16S rDNA, usando primers específicos (Song et al., 2010; Lee et al., 1996).

Os primers foram testados inicialmente usando o programa Silva TestPrime (<http://www.arbsilva.de/search/testprime/>). Em seguida, as regiões de interesse foram amplificadas por PCR convencional com iniciadores específicos e clonadas utilizando o pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Wisconsin, USA) e inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH10 β . Os clones positivos foram selecionados entre as células DH10 β transformadas.

O sequenciamento do DNA foi realizado no CREBIO (Centro de Biologia Genômica e Recursos Biológicos) da FCAV / UNESP, (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

As análises foram realizadas utilizando a ferramenta BLAST (Altschul et al., 1997), base de dados pública fornecida pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Um e-value inferior a 10^{-8} foi considerado aceitável. Os plasmídeos purificados contendo o inserto foram quantificados utilizando fluorometria.

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

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

4.10 Teste Fenton

O teste Fenton foi realizado na vinhaça biodigerida com a finalidade de recircular parte deste efluente, tratado com o processo oxidativo avançado, novamente ao sistema (Figura 13). Esta etapa do experimento foi conduzida com a finalidade de avaliar os efeitos do consórcio do processo oxidativo avançado e processo biológico sobre o desempenho do sistema e a produção de metano.

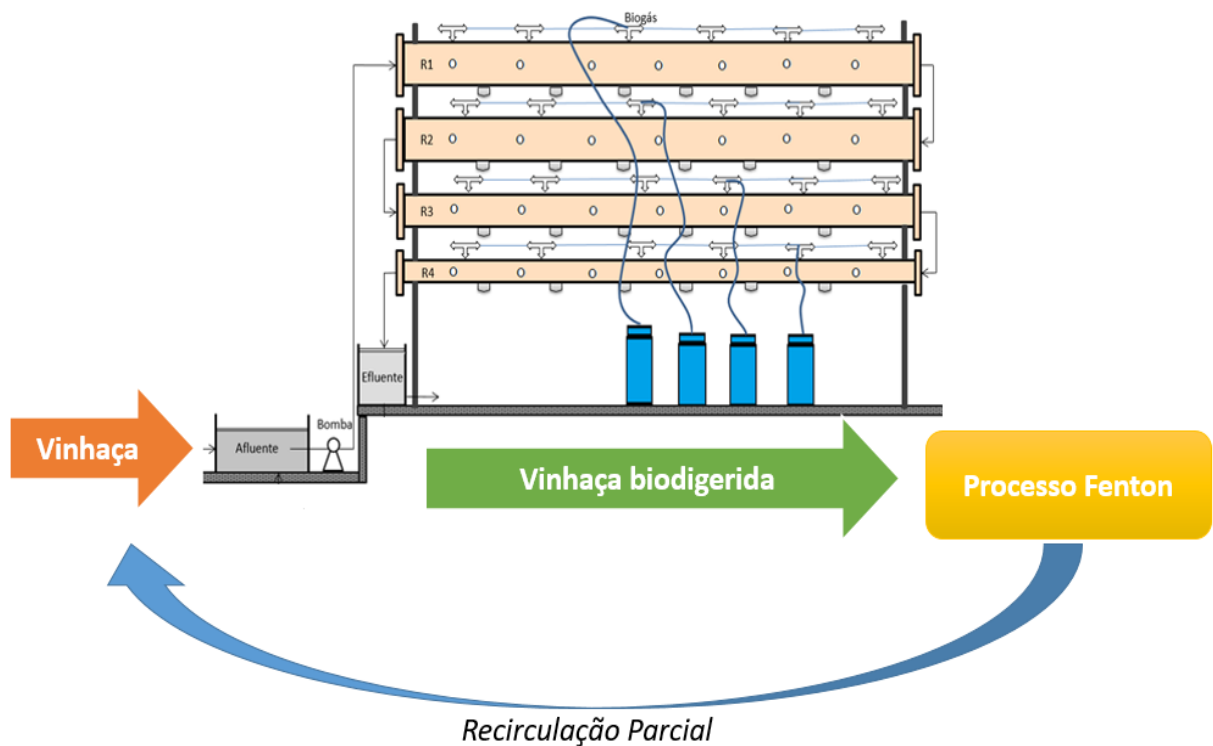


Figura 13. Combinação de tratamento biológico com processo oxidativo avançado Fenton.

A eficiência do processo Fenton depende de algumas variáveis, tais como o pH do substrato, temperatura, concentração de íons ferrosos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além do tempo de reação. Para a escolha da melhor forma de execução do processo, foi necessário a execução de testes prévios envolvendo estas variáveis.

Os testes prévios foram executados em duplicata. Parte de um grupo de amostras foram submetidos ao processo de decantação após o Fenton para a avaliação do sobrenadante, e para outro grupo em repetição, as amostras foram homogeneizadas após o Fenton para a avaliação do substrato como um todo. O efeito das proporções das concentrações de Fe e H_2O_2 , previamente determinados ($[\text{DQO}] : [\text{H}_2\text{O}_2] = 1:5,5 \text{ (m/m)}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] : [\text{Fe}^{2+}] = 5:1$), foram analisados em todas as amostras para a avaliação das melhores condições para a aplicação no teste definitivo.

O teste de Fenton realizado na vinhaça biodigerida foi baseado nas condições otimizadas de pH e temperatura encontradas por Guerreiro et al. (2016) e Kondo et al. (2010). Foram utilizados volumes de amostras de 0,3 L de vinhaça biodigerida, proveniente de coletas compostas do efluente do reator 4 (R4) do sistema RAHLF. Os ensaios de processo oxidativos foram executados em recipientes de vidro com capacidade para 1L (Figuras 14 e 15).

A princípio, para a realização do estudo de oxidação de Fenton, foi adicionado o ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em quantidade necessária à vinhaça biodigerida. Durante este processo, as propriedades ácidas do ferro reduzem o pH do meio, havendo a necessidade de correção do pH com NaOH. Para este estudo, foi utilizado NaOH 1 M para o ajuste do pH desejado das amostras (Tabela 13).

Para testes oxidativos de Fenton, o sulfato ferroso (FeSO_4) é comumente relatado na literatura como o sal de ferro. Todavia, ele foi substituído por cloreto férrico neste trabalho porque o sulfato pode ser reduzido a sulfeto de hidrogênio por bactérias anaeróbias em casos de aplicação subsequente ao processo da digestão anaeróbia. Além disto, o ácido sulfúrico pode ser formado à jusante na presença de oxigênio, induzindo possíveis complicações de corrosão no sistema (Guerreiro et al., 2016).

Após a adição de ferro e ajuste do pH, a reação Fenton nas amostras de vinhaça de cana-de-açúcar biodigeridas foram iniciados pela adição de H_2O_2 , e mantidas sob agitação constante (200 rpm) através do equipamento Jar-Test (Figura 15). A contagem do tempo de reação foi iniciada a partir da adição de peróxido de hidrogênio e foi estendida até 2 horas, com coleta das amostras para avaliação a cada 30 minutos.

Como dito anteriormente, testes preliminares foram executados para a determinação das melhores condições experimentais. Desta maneira, foram excluídos para o teste definitivo os tempos de reações de 1h, 1,5h e 2,0h em virtude da viabilidade do processo. Portanto, foram avaliadas variações das concentrações de

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e H_2O_2 e do pH em tempo de reação de 30 minutos, conforme descrito na tabela 13.

Após o tempo de reação, o pH das amostras foram elevados para valores próximos de 9,0 com adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O meio alcalino é necessário para encerrar o processo de reação Fenton. Encerrados os testes, as amostras foram submetidas a um período de decantação (2 horas).

O sobrenadante resultante do processo de decantação e a amostra homogeneizada (Figura 16) foram utilizados para análises físico-químicas, descritas na tabela 14.

Tabela 13. Condições experimentais para os testes preliminares de Fenton

pH	Proporções da concentração de H_2O_2 –
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ calculadas
3,0	100%
	75%
	50%
	25%
4,0	100%
	75%
	50%
	25%
5,0	100%
	75%
	50%
	25%

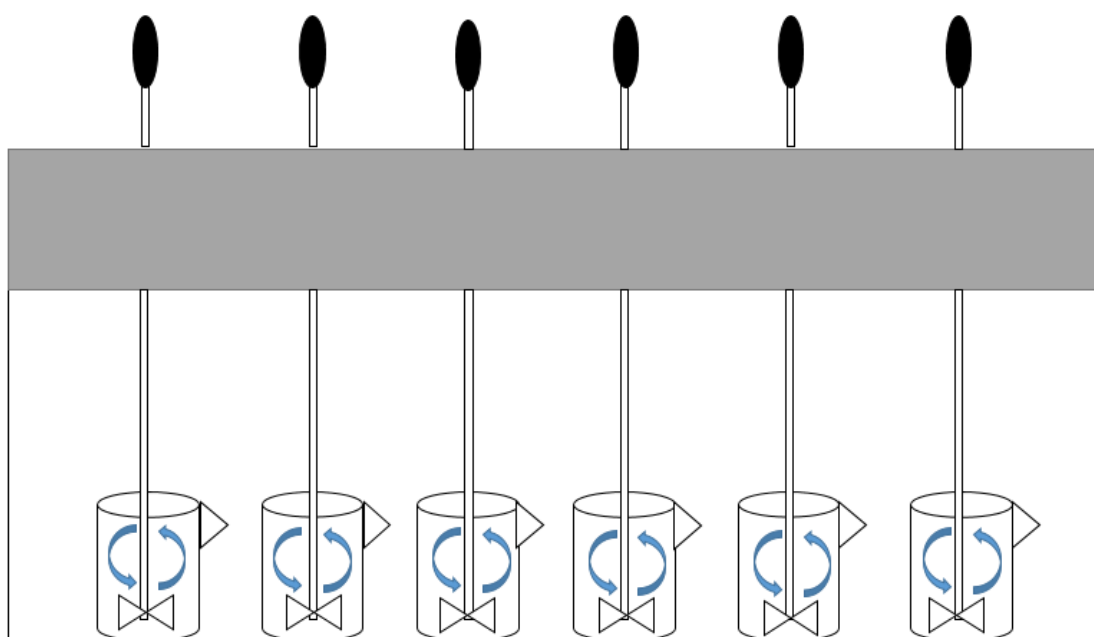


Figura 14. Desenho esquemático do Jar-Teste utilizado nos ensaios do processo oxidativo Fenton.

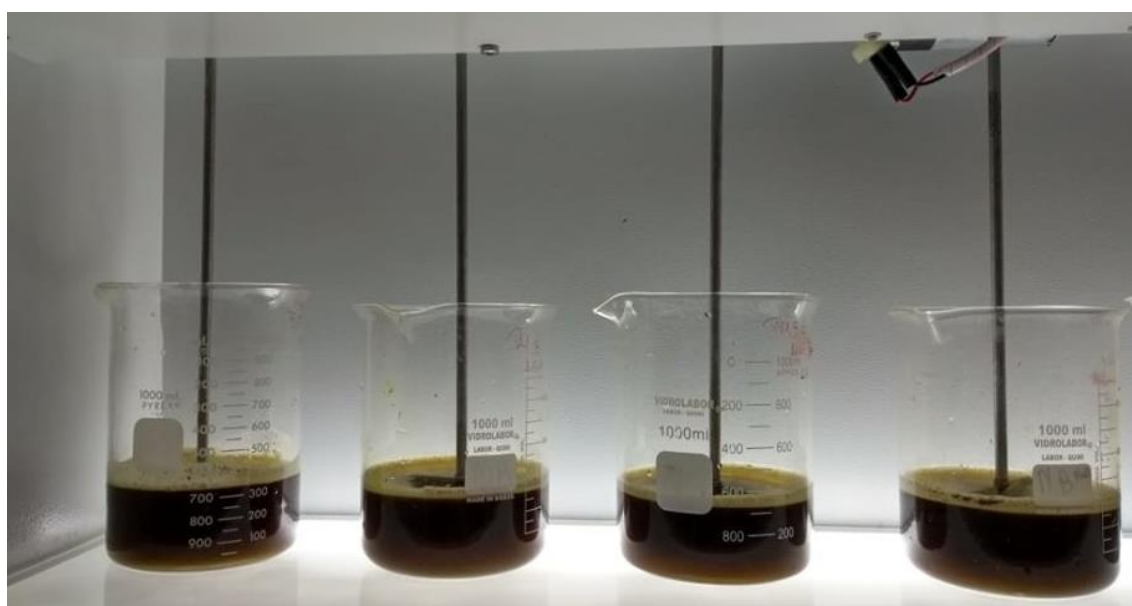


Figura 15. Aplicação do teste Fenton em vinhaça biodigerida pelo sistema RAHLF no Jar-Test durante o experimento.

Tabela 14. Análises físico-químicas avaliadas nas amostras expostas à reação Fenton.

Análises	Metodologia
pH	APHA; AWWA; WPCF (2012)
DQO total	APHA; AWWA; WPCF (2012)
DBO total	APHA; AWWA; WPCF (2012)
Turbidez	APHA; AWWA; WPCF (2012)
Ácidos Voláteis Totais	Dilallo e Albertson (1961)
Alcalinidade Parcial	Ripley (1985)
Alcalinidade Intermediária	Ripley (1985)
Alcalinidade Total	Ripley (1985)

*DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio.



Figura 16 - Amostra da vinhaça biodigerida após aplicação do teste Fenton em processo de decantação.

Depois de avaliados os resultados obtidos a partir dos testes preliminares com Fenton (Tabela 13), foi determinada o uso de 25% das concentrações de H_2O_2 e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ estimadas para a oxidação química da vinhaça biodigerida em um tempo de reação de 30 minutos, em um pH 4,0. A escolha das variáveis para o teste de Fenton definitivo foi decorrente dos resultados obtidos da biodegradabilidade (relação BDO/DQO) e ao baixo consumo de reagentes químicos apresentados (Tabela 15), que reduzem o custo do tratamento.

A escolha, apenas do sobrenadante, para a recirculação ao sistema foi descartada visto que apresentava baixa demanda química de oxigênio e a necessidade de um descarte para o lodo gerado durante o processo de decantação. Portanto, a mistura homogeneizada da vinhaça após o processo Fenton foi utilizada para a recirculação do sistema, junto à vinhaça *in-natura*, com objetivo de verificar a possibilidade de melhores resultados no desempenho do sistema anaeróbio para a produção de metano. Os valores das variáveis mensuradas para o teste prévio estão descritos na tabela 14.

4.11. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). 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 por meio do software Info Stat 16132013.

Tabela 15. Proporções das concentrações de H_2O_2 e FeCl_3 avaliados nos testes preliminares do Fenton aplicados à vinhaça biodigerida em pH de 3,0, 4,0 e 9,0, em tempo de reação de 30 minutos e valores dos parâmetros analisados.

pH Inicial	3				4				5			
Concentração H_2O_2 – $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
Vinhaça biodigerida após o Fenton – Mistura homogeneizada												
Solução de cal adicionada (mL)	82	75	52	41	67	39	36	32	44	45	35	14
pH (pós-reação)	8,1	8,0	8,2	8,0	7,2	7,2	7,4	8,3	7,9	7,6	7,8	7,4
Lodo sedimentado (mL)	168	100	95	62	170	98	80	67	150	122	92	77
DQO total	2400	2320	2412	1600	2340	2150	2530	1887	2473	2423	2907	2797
DBO total	664	826	642	557	1214	737	790	1036	1007	679	621	823
DBO/DQO	0,28	0,36	0,27	0,35	0,52	0,34	0,31	0,55	0,41	0,28	0,21	0,29
DQO removida	2483	2563	2471	3283	2543	2733	2353	2996	2410	2460	1976	2086
AVT	600	672	432	300	720	690	318	612	360	480	468	612
Alcalinidade Parcial (AP)	2255	2825	2943	2148	2417	2846	2911	2121	3061	2792	2524	967
Alcalinidade Intermediária (AI)	483	773	870	1031	553	832	714	1015	580	564	854	730
Alcalinidade Total (AT)	2739	3598	3813	3179	2970	3678	3625	3136	3641	3356	3378	1697
Vinhaça biodigerida após o Fenton - Sobrenadante												
Solução de cal adicionada (mL)	67	60	54	22	54	52	30	15	48	48	43	10
pH (pós-reação)	8,2	8,4	7,5	7,8	9,4	7,1	8,8	6,9	9,1	7,9	7,6	6,8
Lodo sedimentado	190	153	95	87	200	90	85	65	180	130	88	80
DQO total	785	798	813	1010	1023	1225	965	1327	873	1122	1197	1718
DBO total	360	418	480	305	351	781	704	291	618	413	460	452
DBO/DQO	0,46	0,52	0,59	0,30	0,34	0,64	0,73	0,22	0,71	0,37	0,38	0,26
DQO removida	4098	4085	4070	3873	3860	3658	3918	3556	4010	3761	3686	3165
AVT	150	192	180	240	156	162	192	198	180	192	138	228
Alcalinidade Parcial (AP)	322	349	644	601	376	360	644	295	403	387	634	628
Alcalinidade Intermediária (AI)	269	285	124	140	215	301	150	166	156	220	333	242
Alcalinidade Total (AT)	591	634	768	741	591	661	795	462	558	607	967	870

Unidades: mg L^{-1} para: DQO total, DBO total, AVT, AP, AI, AT.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Temperatura

Os reatores anaeróbios horizontais de leito fixo foram operados na área externa do Laboratório de Saneamento Ambiental e submetidos as variações ambientais de temperatura. As temperaturas médias do ar variaram de 18,9 a 24,4 °C durante períodos consecutivos de três safras da cana-de-açúcar, correspondentes aos anos de 2017, 2018, 2019 e 2020 (Figura 17).

Ao final de cada safra, houve a paralização dos reatores por um período aproximado de 60 dias. Após a entressafra da cana, foi necessário o processo de repartida dos reatores e estes retornaram a ser operados.

Na tabela 16 estão apresentados os valores das temperaturas máximas, médias e mínimas do ar verificadas durante a operação do sistema de tratamento anaeróbio na fase de partida e fases de 1 a 9.

As temperaturas foram mensuradas pela Estação Agroclimatológica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP/Jaboticabal e ficam a no máximo 500 metros do Laboratório de Saneamento Ambiental. A temperatura máxima estimada durante o experimento foi observada na fase 2 do experimento (31,8 °C), e a temperatura mínima atingida foi verificada na fase 1 (12,5 °C) (Tabela 16).

Conforme descrito por Chernicharo (2016), a temperatura é um dos fatores físicos que mais afetam o crescimento microbiano, sendo de grande importância para a seleção de espécies. Os dois níveis ótimos de temperatura associados à digestão anaeróbia são a faixa mesófila (30 a 38 °C) e faixa termófila (50 a 55°C). No entanto, a maioria de sistemas anaeróbios têm sido projetados dentro da faixa mesófila (Chernicharo, 2016) embora a operação de sistemas de tratamento na faixa termófila também apresentem bons resultados no processo de digestão.

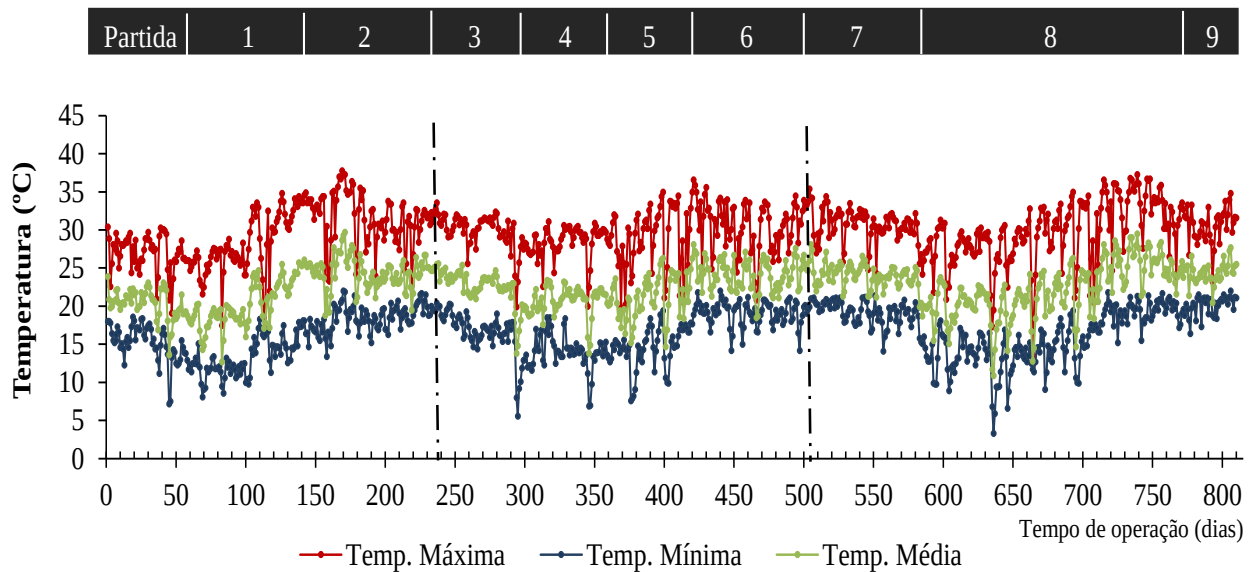


Figura 17. Temperaturas (Temp. máxima, média e mínima) do ar diárias estimadas pela Estação Agroclimatológica da UNESP/Jaboticabal durante a operação dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, no período experimental (Anos de 2017, 2018 e 2019 e 2020).

A vinhaça de cana-de-açúcar possui temperaturas elevadas, de aproximadamente 100 °C, na saída da coluna de destilação e poderia-se facilmente utilizar a faixa termofílica para a digestão anaeróbia da vinhaça. Mas de acordo com Van Haandel et al. (2014), considerando apenas o potencial da digestão anaeróbia, o tratamento em condições mesofílicas é mais vantajoso, pois a atividade metanogênica específica tende a ser maior no lodo mesofílico do que no termofílico. Além disso, segundo Vaccari et al. (2005) citado por Barros (2017) estão sendo instalados, em algumas indústrias, sistemas de aproveitamento da energia térmica da vinhaça, tornando interessante a digestão anaeróbia mesofílica.

Tabela 16. Médias das temperaturas (Temp.) diárias máxima, média e mínima estimadas durante o período de operação do conjunto de reatores anaeróbios horizontais de leito fido (RAHLF - R1+R2+R3+R4).

		Temp. Máxima	Temp. Média	Temp. Mínima
Partida	Média	27,0^a	20,4^c	15,2^b
	cv	8,9	9,2	15,2
Fase 1	Média	26,5^a	18,9^a	12,5^a
	cv	12,2	2,3	18,3
Fase 2	Média	31,8^e	24,4^{ef}	18,0^e
	cv	10,1	8,2	11,6
Fase 3	Média	29,5^{bcd}	22,3^d	16,2^d
	cv	7,8	10,3	17,8
Fase 4	Média	28,6^b	20,9^b	14,1^{bc}
	cv	7,7	9,0	15,2
Fase 5	Média	29,2^{bc}	21,5^{bc}	15,0^{cd}
	cv	15,2	15,1	19,8
Fase 6	Média	30,5^d	24,1^{ef}	19,2^e
	cv	10,6	8,2	8,4
Fase 7	Média	30,3^{cd}	24,0^{ef}	19,0^e
	cv	7,4	8,2	9,4
Fase 8	Média	29,8^{bcd}	22,2^{cd}	15,7^{2d}
	cv	14,1	16,1	22,6
Fase 9	Média	30,5^d	24,4^f	20,2^e
	cv	7,2	5,6	6,3
Teste F		12,21 ^{**}	59,10 ^{**}	37,11 ^{**}

c.v. – coeficiente de variação. Letras iguais na mesma coluna não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($p > 0,05$); * ($p < 0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($P < 0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

Os microrganismos formadores de metano, predominantes em digestores anaeróbios operados na faixa mesofílica de temperatura compreendem os gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevictor*, *Methanospirillum*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum*, sendo compostos por arqueias utilizadoras de hidrogênio. Já para as arqueias que utilizam preferencialmente o acetato para a formação do metano, os gêneros mais comuns em faixas mesófilas são *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Embora sejam desejáveis temperaturas elevadas para o aumento da taxa de crescimento específica máxima da população microbiana, também é interessante a manutenção da temperatura uniforme dentro do reator visto que o processo anaeróbio é considerado sensível a mudanças bruscas de temperatura, podendo provocar desta maneira, um desbalanceamento entre as populações microbianas, podendo interferir no processo de digestão (Chernicharo, 2016).

5.2. pH, alcalinidade, ácidos voláteis totais e nitrogênio amoniacal

Os valores médios de pH da vinhaça *in natura* utilizada para o preparo do substrato para a alimentação dos reatores variaram de 3,0 a 4,2 (Tabela 8). Portanto, para a partida dos reatores houve a necessidade de correção do pH para valores próximos a 7,0, utilizando o efluente de um reator anaeróbio (UASB) que tratava o mesmo tipo de resíduo (vinhaça de cana-de-açúcar). Após uma semana de operação do sistema RAHLF, foi utilizado o efluente do próprio sistema para a recirculação e correção do pH afluente.

Os valores das cargas orgânicas volumétricas (COVs) aplicados aos reatores foram crescentes durante o período experimental que compreenderam ciclos de três safras da cana-de-açúcar, consecutivas. Para as fases que abrangiam o período da primeira safra (partida, fases 1 e 2) as COVs variaram de 5,6 a 26,1 g DQO (L d)⁻¹ no R1. Para as fases de 3 a 6 (segunda safra) as COVs variaram de 5,3 a 27,9 g DQO (L d)⁻¹, e para as fases de 7 a 9 (terceira safra) foram utilizadas COVs de 5,2 a 19,8 g DQO (L d)⁻¹, conforme descrito na tabela 9.

Com o aumento dos valores médios da COV, foi observado uma redução do pH do afluente tanto nas fases executadas durante a primeira safra como nas fases da segunda e terceira safra da cana-de-açúcar, com o menor valor de 6,53 verificado

na fase 2 (Tabela 17). Este decréscimo de pH no afluente não afetou o pH do efluente do conjunto de reatores RAHLF, em virtude da capacidade de tamponamento do sistema, demonstrando a importância da recirculação do efluente. Por meio da figura 18, é possível visualizar que houve, no conjunto de reatores (R1, R2, R3 e R4), elevações de pH do afluente para o efluente em todas as fases experimentais.

A manutenção do pH próximos à neutralidade, nas faixas de 6 a 8 obtidos neste experimento (Tabela 17) é de extrema importância para se evitar a inibição da microbiota envolvida na degradação do material orgânico. De uma maneira geral, arqueias metanogênicas podem ser inibidas em ambientes com pH inferiores a 6,0, e isto pode acarretar no desbalanceamento das etapas da digestão anaeróbia (Dos Reis et al., 2015). De acordo com Metcalf e Eddy (2016), a maioria das bactérias não toleram níveis de pH acima de 9,5 ou abaixo de 4,0. Normalmente, o valor de pH ótimo para o crescimento de bactérias engloba a faixa entre 6,5 e 7,5.

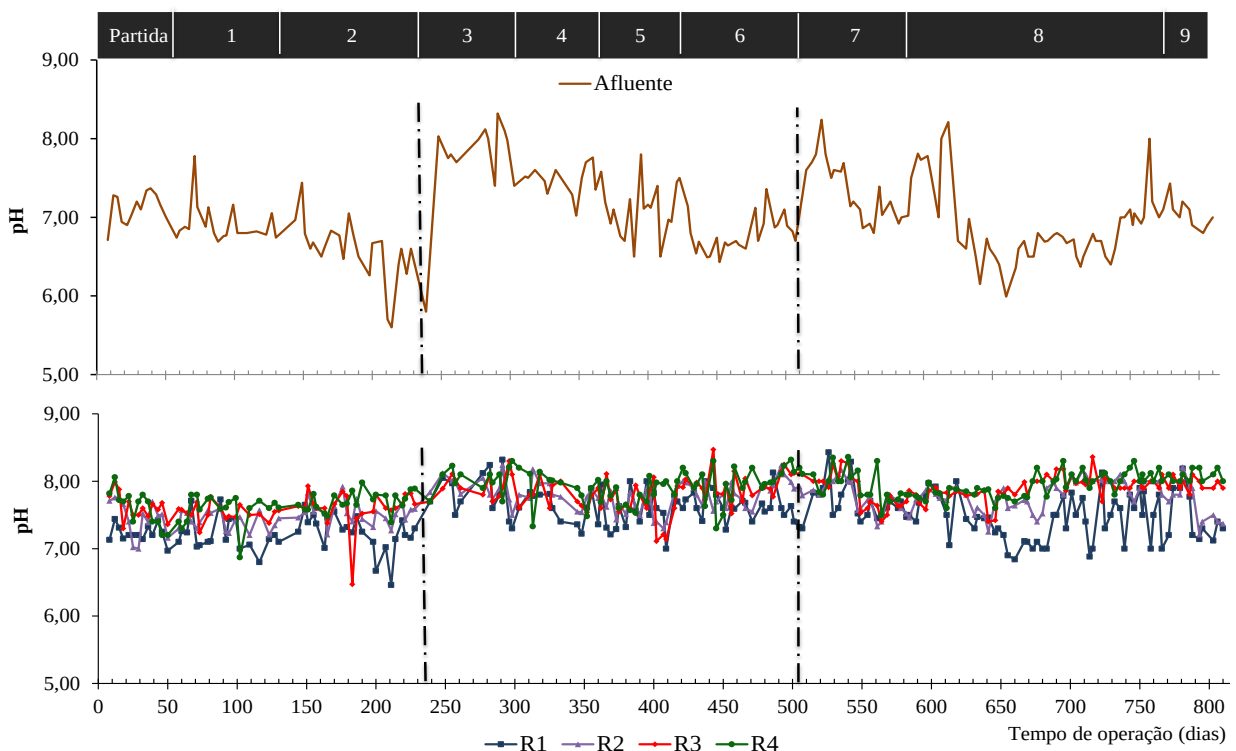


Figura 18. Valores de pH no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

De acordo com Zhang et al. (2011), produtos químicos podem ser adicionados ao efluente para o suplemento de alcalinidade no sistema, evitando variações de pH em virtude ao efeito de tamponamento no sistema. Todavia, estas suplementações químicas geram custos ao sistema de tratamento. Desta forma, o aproveitamento da alcalinidade gerada no processo de digestão anaeróbia por meio do processo de recirculação tem se tornado bastante útil, permitindo que a operação dos reatores seja economicamente mais viável (Suárez et al., 2018). Além disto, a recirculação de efluente é um recurso interessante para o ajuste de COV no sistema, principalmente em substratos contendo elevadas concentrações de material orgânico como a vinhaça de cana-de-açúcar (Barros al., 2016). A recirculação do efluente dos reatores também permite evitar o uso de água bruta ou potável para diluição do substrato.

Conforme Ganesh et al. (2013), a digestão anaeróbia pode ser afetada por alterações de valores de pH e aumento de cargas orgânicas volumétricas. No presente experimento foi observado que não houve alterações abruptas de pH no afluente dos reatores, e o sistema respondeu bem aos valores de pH verificados. Uma operação de reatores com pH reduzido acarretam problemas como acúmulo de ácidos graxos voláteis, inibição da metanogênese e consequentemente perda na produção de metano (Latif et al., 2017).

A digestão anaeróbia da vinhaça nos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa dipostos em série, resultou no aumento dos valores médios de alcalinidade total (AT) nos efluentes dos reatores (Figura 19), principalmente em virtude do aumento da alcalinidade parcial (AP) no sistema. Em contrapartida, foram observadas redução dos valores médios de alcalinidade intermediária (AI) do afluente para o efluente dos reatores, decorrente dos ácidos graxos de cadeia curta que foram consumidos pelos microrganismos anaeróbios (Tabela 18).

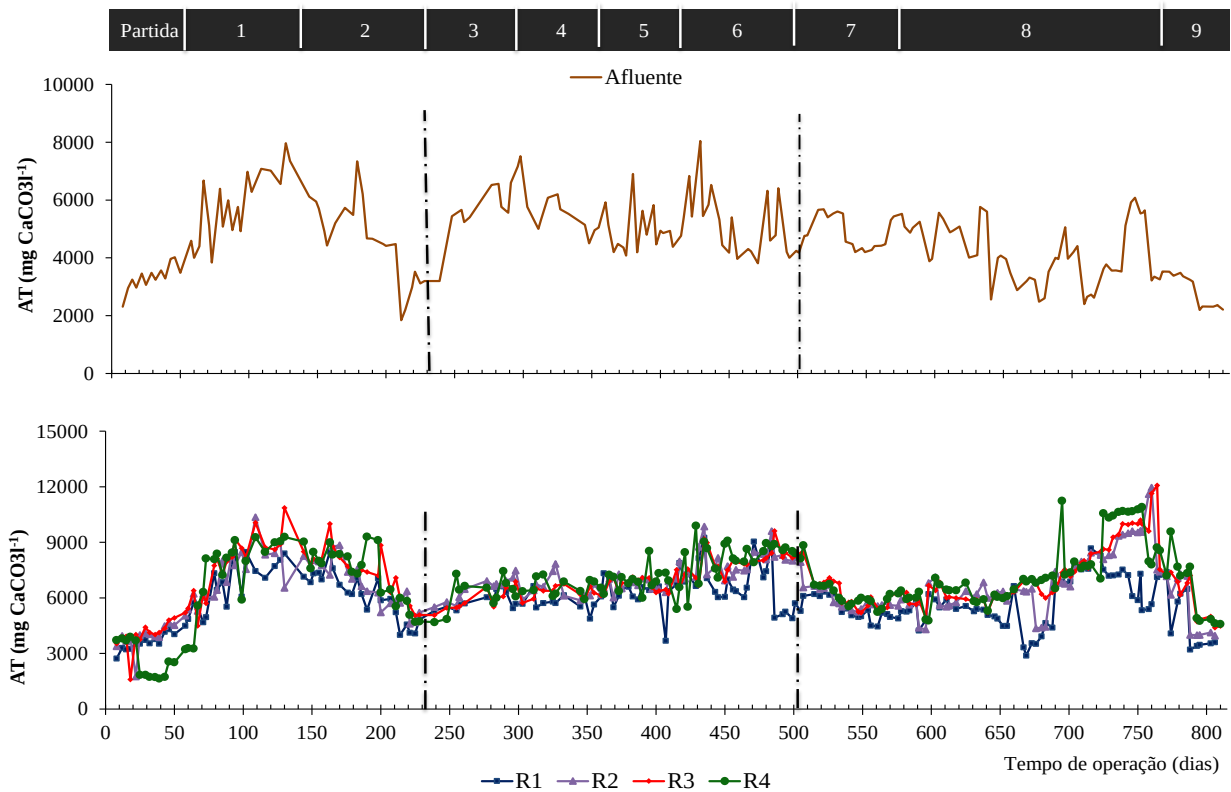


Figura 19. Valores de Alcalinidade Total (AT) no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

A alcalinidade parcial (AP), que é a capacidade de tamponamento gerada nos reatores anaeróbios em virtude dos bicarbonatos, aumentou do afluente para o efluente do R1 ao R4 (Tabela 18) em todas as fases, exceto no período de partida. Estes valores podem ser melhores visualizados através da figura 20.

O período de partida dos reatores, normalmente, é uma fase de instabilidade nos sistemas anaeróbios e requer atenção até a adaptação da microbiota às condições ambientais impostas.



Figura 20. Valores de Alcalinidade Parcial (AP) no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

A relação alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial (AI/AP) é uma ferramenta que pode ser utilizada para auxiliar a monitorização da digestão anaeróbia em reatores. Conforme Ripley et al. (1986), valores da relação AI/AP superiores a 0,3, para esgoto sanitário, podem indicar ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia. No R1 do sistema RAHLF foram verificados valores médios da relação AI/AP acima de 0,3 no período de partida (0,38), fase1 (0,37), fase 2 (0,38) e fase 9 (0,40) do experimento (Tabela 19). No entanto, é possível obter um processo de digestão anaeróbia estável com valores AI/AP acima de 0,3 (Foresti, 1994), o que ocorreu neste experimento (Figura 22), pois não houve o comprometimento da estabilidade nos parâmetros de pH e acúmulo de AVT nos reatores. Barros et al. (2017) também conseguiram manter estabilidade em um sistema anaeróbio composto por reatores UASB em dois estágios tratando vinhaça de cana-de-açúcar com suplementação de torta-de-filtro, aplicando elevadas COVs que variaram de 5 a 55 g DQOtotal (L d)⁻¹ e obtendo relações de AI/AP superiores a 0,5. Em contrapartida, para

este experimento os valores de Al/AP foram inferiores a 0,3 nos efluentes dos reatores R2, R3 e R4 para todas as fases, mesmo com a aplicação das maiores COVs ao sistema (Tabela 19).

Com o aumento gradual das COVs nas fases de partida à fase 2, de 3 a 6, e fases de 7 a 9, foram notados decréscimos da AP e do aumento da relação Al/AP nos efluentes dos reatores R1, R2, R3 e R4 (Tabela 19). Isto ocorreu em virtude do aumento da concentração de ácidos voláteis (AVT) com as maiores COVs aplicadas. Contudo, foi verificado que a alcalinidade parcial foi suficiente para neutralizar o efeito dos ácidos evitando queda do pH nos reatores RAHLF (Tabela 18).

Conforme Mazarelli et al. (2016), a microbiota presente em reatores horizontais de leito fixo e alta taxa dispostos em série são capazes de gerar alcalinidade contribuindo para o tamponamento de pH, favorecendo a conversão de AVT por microrganismos metanogênicos e acetogênicos. Nas fases 6 e 8, embora tenha sido observado acréscimos de AVT no afluente (Figura 21), o sistema foi capaz de gerar alcalinidade suficiente para neutralizar os efeitos dos ácidos no sistema, principalmente nos reatores R2, R3 e R4. O acúmulo de AVT, em especial propionato, acetato, e butirato, podem ocorrer em sistemas de tratamento anaeróbios, indicando condições de instabilidade em uma ou mais etapas do consórcio anaeróbio (Aquino e Chernicharo, 2005). Neste estudo os valores médios de AVT no afluente variaram de 1028 a 2805 mg L⁻¹. Os valores de AVT aumentaram no afluente com o acréscimo da COV (Figura 21). Porém, foram observados decréscimo dos valores médios de AVT nos efluentes dos reatores (R1, R2, R3 e R4) em todas as fases do experimento (Tabela 17). Além disto, a presença de ácidos no afluente não influenciou nos valores de pH, permanecendo próximo a 7,0.

Foi observado na fase 6, período em que foi apresentado maior valor médio da COV, teores altos de AVT (Figura 21), que por sua vez pode ter ocasionado o decaimento de AP no R1 (Figura 20). Foi observado, no entanto, que os ácidos foram consumidos e/ou neutralizados nos reatores subsequentes. Desta maneira, podemos ressaltar a importância da recirculação do efluente do sistema (R4) junto à vinhaça *in-natura*, permitindo o equilíbrio dos reatores sem a necessidade de introduzir alcalinizantes químicos. Embora a recirculação do efluente possa reintroduzir ácidos não consumidos durante o processo de digestão anaeróbia ao sistema de tratamento, a alcalinidade da vinhaça biodigerida auxilia no tamponamento do pH do afluente.

Tabela 17. Valores médios e coeficientes de variação (cv) de pH e ácidos voláteis totais (AVT) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF- R1, R2, R3 e R4), instalados em série.

Primeira Safra					Segunda Safra				Terceira Safra			Teste F
Fases	Partida	1	2		3	4	5	6	7	8	9	
COVs	5,6 a 12,5	12,5 a 21,4	21,4 a 26,1		5,3 a 11,1	11,1 a 11,9	11,9 a 24,8	24,8 a 27,9	5,2 a 16,5	16,5 a 27,4	27,4 a 19,8	
pH	Afluente	7,08 ^{bcd}	6,93 ^{abc}	6,53 ^a	7,88 ^e	7,47 ^d	7,11 ^{bcd}	6,78 ^{ab}	7,30 ^{cd}	6,9 ^{ab}	7,1 ^{bc}	17,39 ^{**}
	cv	3	4	6	4	3	5	3	0,4	7	3	
	R1	7,22 ^a	7,21 ^a	7,26 ^{ab}	7,8 ^d	7,64 ^{bcd}	7,56 ^{bcd}	7,61 ^{bcd}	7,70 ^{cd}	7,43 ^{abc}	7,48 ^{abcd}	7,68 ^{**}
	cv	2	3	4	4	3	4	3	4	5	5	
	R2	7,46 ^{ab}	7,42 ^a	7,55 ^{abc}	7,89 ^d	7,81 ^{cd}	7,67 ^{bcd}	7,84 ^d	7,76 ^{cd}	7,82 ^d	7,63 ^{abcd}	10,95 ^{**}
	cv	3	2	2	3	2	3	2	3	2	4	
	R3	7,61 ^{ab}	7,54 ^a	7,62 ^{ab}	7,93 ^{cd}	7,81 ^{bcd}	7,7 ^{abc}	7,96 ^d	7,83 ^{bcd}	7,90 ^{cd}	7,95 ^d	10,89 ^{**}
	cv	2	2	4	3	3	4	3	3	2	1	
	R4	7,57 ^a	7,61 ^a	7,73 ^{ab}	8,08 ^{cd}	7,86 ^{bc}	7,85 ^{bc}	7,99 ^{cd}	7,91 ^{bcd}	7,95 ^{bcd}	8,10 ^d	12,82 ^{**}
	cv	3	3	2	2	3	2	3	3	2	1	
AVT (mg L ⁻¹)	Afluente	1028 ^a	2460 ^{cd}	2692 ^d	1672 ^{bc}	1570 ^{ab}	2518 ^d	2590 ^d	1349 ^{ab}	2805 ^d	2334 ^{cd}	22,46 ^{**}
	cv	41	27	18	16	14	23	34	26	24	20	
	R1	1118 ^{ab}	2919 ^d	1987 ^c	818 ^a	926 ^a	1591 ^{bc}	1853 ^c	737 ^a	1725 ^{bc}	1106 ^{ab}	21,73 ^{**}
	cv	29	30	29	35	21	36	28	51	43	39	
	R2	693 ^{ab}	1769 ^d	905 ^{bc}	490 ^a	517 ^a	1005 ^{bc}	1295 ^c	385 ^a	824 ^{ab}	711 ^{ab}	18,23 ^{**}
	cv	37	33	54	22	35	35	45	45	46	58	
	R3	478 ^{abc}	1381 ^e	645 ^{bcd}	430 ^{abc}	548 ^{abc}	770 ^{cd}	1039 ^{de}	315 ^a	539 ^{abc}	405 ^{ab}	17,12 ^{**}
	cv	27	41	50	18	33	28	54	46	53	46	
	R4	439 ^{abc}	1182 ^e	600 ^{cd}	335 ^{ab}	396 ^{abc}	617 ^{ab}	887 ^{de}	275 ^{ab}	417 ^{abc}	249 ^a	15,19 ^{**}
	cv	54	34	51	16	26	29	69	55	64	46	

c.v. – coeficiente de variação. Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($p > 0,05$); * ($p < 0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($P < 0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 18. Valores médios e coeficientes de variação (cv) de alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP) e alcalinidade intermediária (AI) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF - R1, R2, R3 e R4).

		Primeira Safra			Segunda Safra				Terceira Safra			Teste F
	Fases COVs	Partida 5,6 a 12,5	1 12,5 a 21,4	2 21,4 a 26,1	3 5,3 a 11,1	4 11,1 a 11,9	5 11,9 a 24,8	6 24,8 a 27,9	7 5,2 a 16,5	8 16,5 a 27,4	9 27,4 a 19,8	
AT (mg L ⁻¹)	Afluente	3443 ^{ab}	6027 ^f	4504 ^{cd}	609 ^{ef}	5376 ^{def}	5026 ^{cdef}	4949 ^{cde}	4953 ^{cde}	4052 ^{bc}	3360 ^a	16,64 ^{**}
	cv	16	18	30	12	18	17	22	11	25	12	
	R1	3731 ^a	6861 ^d	6148 ^{cd}	5822 ^{cd}	5786 ^{cd}	6406 ^{cd}	6652 ^{cd}	5419 ^{bc}	5946 ^{cd}	4424 ^{ab}	11,49 ^{**}
	cv	15	15	21	8	8	8	19	11	23	30	
	R2	4041 ^a	7464 ^{de}	6711 ^{cde}	6489 ^{bcd}	6505 ^{bcd}	6803 ^{cde}	7985 ^e	5859 ^{bc}	7141 ^{cde}	5310 ^{ab}	15,63 ^{**}
	cv	16	18	19	10	9	6	9	8	24	30	
	R3	4141 ^a	7992 ^e	7193 ^{cde}	6000 ^b	6322 ^{bcd}	6836 ^{bcd}	8062 ^e	6063 ^{bc}	7461 ^{de}	5611 ^b	18,58 ^{**}
	cv	22	19	19	8	4	6	8	10	23	20	
	R4	2726 ^a	7820 ^{de}	7095 ^{bcd}	6389 ^{bc}	6579 ^{bcd}	6901 ^{bcd}	7048 ^e	6056 ^b	7671 ^{cde}	5960 ^b	26,39 ^{**}
	cv	34	21	21	11	7	12	19	7	24	24	
AP (mg L ⁻¹)	Afluente	2478 ^b	4100 ^{cde}	2595 ^b	4941 ^e	4171 ^{de}	3559 ^{cd}	3263 ^{bc}	3636 ^{cd}	2411 ^b	1240 ^a	28,65 ^{**}
	cv	18	19	30	12	12	26	13	12	39	12	
	R1	2740 ^a	4972 ^b	4540 ^b	5085 ^b	4965 ^b	5271 ^b	6954 ^b	4668 ^b	4782 ^b	3271 ^a	9,88 ^{**}
	cv	19	20	25	8	10	18	95	9	31	39	
	R2	3517 ^a	5888 ^{cd}	5676 ^c	5701 ^c	5726 ^{cd}	5852 ^{cd}	5852 ^d	5121 ^{bc}	6053 ^{cd}	4324 ^{ab}	12,07 ^{**}
	cv	23	18	21	7	9	8	10	8	28	33	
	R3	3738 ^a	6764 ^{de}	6321 ^{cde}	5380 ^{bc}	5625 ^{bcd}	6046 ^{cde}	7222 ^e	5270 ^{bc}	6323 ^{cde}	4641 ^{ab}	14,24 ^{**}
	cv	25	20	16	7	6	7	11	10	26	30	
	R4	2222 ^a	6564 ^{cd}	6378 ^{bcd}	5575 ^{bc}	5812 ^{bc}	6126 ^{bcd}	7379 ^d	5281 ^{bc}	6463 ^{bcd}	5151 ^b	21,36 ^{**}
	cv	38	23	20	11	7	15	8	6	27	32	
AI (mg L ⁻¹)	Afluente	965 ^a	1927 ^{cd}	2155 ^d	1157 ^{ab}	1205 ^{ab}	1466 ^{abc}	1686 ^{bcd}	1317 ^{ab}	1672 ^{bcd}	2120 ^{bc}	9,09 ^{**}
	cv	31	27	31	42	32	24	42	30	32	26	
	R1	3731 ^a	1889 ^c	1607 ^{bc}	737 ^a	820 ^a	1136 ^{ab}	1142 ^a	751 ^a	1164 ^{ab}	1153 ^{ab}	13,44 ^{**}
	cv	26	38	39	31	32	23	33	45	32	20	
	R2	525 ^a	1576 ^c	1034 ^b	788 ^{ab}	779 ^{ab}	939 ^b	1031 ^b	738 ^{ab}	1088 ^b	985 ^b	10,91 ^{**}
	cv	30	39	53	53	38	14	19	36	29	22	
	R3	403 ^a	1227 ^d	872 ^{bcd}	620 ^{ab}	697 ^{ab}	790 ^{abc}	897 ^{bcd}	794 ^{abc}	1138 ^{cd}	970 ^{bcd}	9,42 ^{**}
	cv	46	42	42	52	31	36	41	48	28	33	
	R4	504 ^a	1256 ^c	717 ^{ab}	814 ^{ab}	767 ^{ab}	775 ^{ab}	941 ^{bc}	775 ^{ab}	1209 ^c	808 ^{ab}	11,11 ^{**}
	cv	47	39	42	48	22	43	41	39	25	28	

c.v. – coeficiente de variação. Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($p > 0,05$); * ($p < 0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($P < 0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

A instabilidade dos reatores anaeróbios no tratamento de águas residuárias complexas como a vinhaça, normalmente está associada a uma produção e consumo desigual de ácidos graxos voláteis no sistema (Santana-Junior et al., 2019).

A redução de ácidos voláteis totais indica o consumo dos ácidos pelos microrganismos presentes no sistema anaeróbio. A maior concentração de AVT observada no sistema, foi de 2919 mg L⁻¹ no R1, na fase 1 do experimento.

De acordo com Zhao e Viraraghavan (2004), as relações AVT/AT superiores a 0,8 podem indicar a inibição das arqueias metanogênicas. Conforme a figura 22, a relação AVT/AT atingiu valores superiores a 0,8 apenas para o R1 durante a fase 8. No entanto, não foi verificada desequilíbrio no processo de digestão anaeróbia e acidificação do sistema RAHLF (R1, R2, R3 e R4).

Os valores de pH, AVT e de alcalinidade observados nos efluentes indicaram, a princípio, condições de estabilidade durante a operação do sistema em todo período experimental, inclusive durante a fase 9, caracterizada pela recirculação parcial do efluente (R4) biodigerido submetido ao processo Fenton em pH 4,0, com tempo de reação de 30 minutos e proporções de H₂O₂ e FeCl₃ de 25% das concentrações calculadas para a reação, conforme descrito na tabela 15.

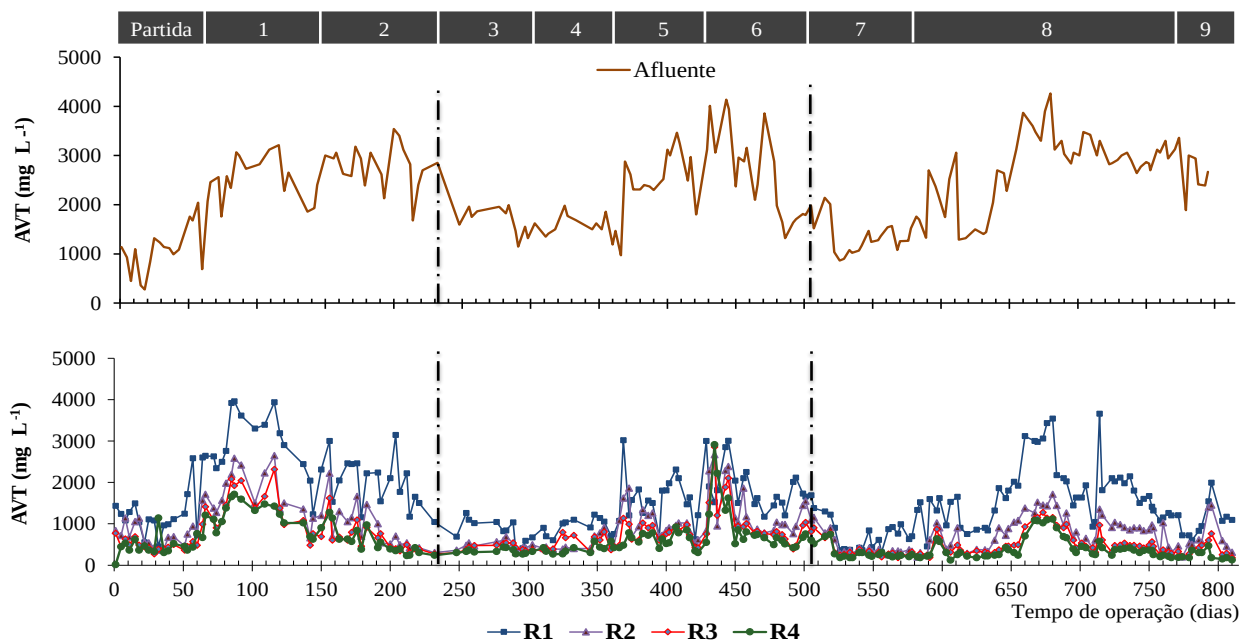


Figura 21. Valores de AVT para afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

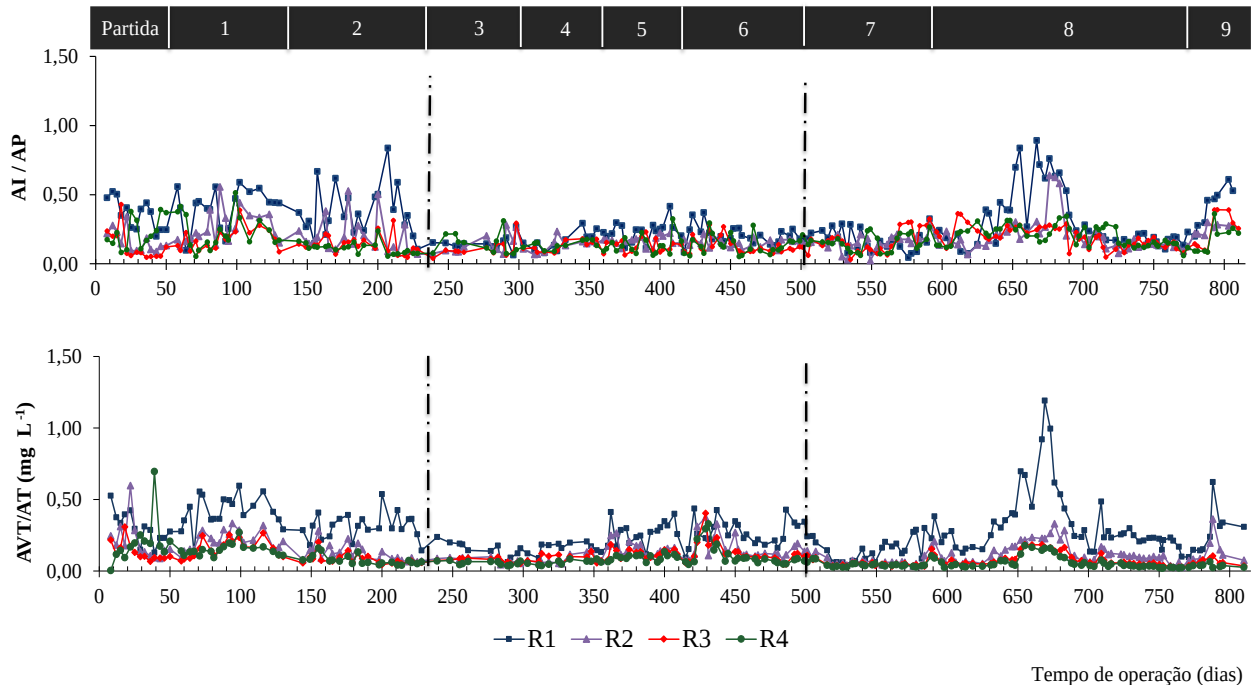


Figura 22. Relações de AI/AP e AVT/AT para os efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

Ressalta-se que neste experimento, a disposição dos reatores em série e a recirculação do efluente permitiram a operação do sistema sem a utilização de produtos químicos para a correção de pH e AP, contribuindo para a redução de custos, principalmente para a produção de biogás a partir vinhaça de cana-de-açúcar, permitindo a operação dos reatores mais economicamente viável. De acordo com Metcalf e Eddy (2016), condições como pH e temperatura, como já mencionado anteriormente, exercem efeito importante sobre a seleção, sobrevivência e crescimento de microrganismos responsáveis pelo tratamento biológico de substratos.

Além disto, a recirculação do efluente do R4 é uma alternativa para a redução do uso de água bruta ou tratada para a diluição de efluentes para ajustes de cargas orgânicas volumétricas em substratos de elevadas concentrações de material orgânico como a vinhaça de cana-de-açúcar (Barros et al., 2016), permitindo o uso sustentável dos recursos já existentes no processo de tratamento, reforçando o conceito de economia circular e que pode ser empregado nas usinas sucroenergéticas.

Com a expansão industrial, por muitos anos foi aplicado o modelo de economia linear, onde as matérias-primas utilizadas para dar origem a algum produto, e todos os subprodutos gerados nas etapas de produção eram descartados, sem grandes preocupações em reutilizar ou recuperar parte do resíduo gerado. Como consequência destes antigos hábitos, a geração e o acúmulo crescente de resíduos, contaminações, esgotamento de combustíveis fósseis e alterações climáticas tem sido cada vez mais presente no meio ambiente, surgindo conceitos importantes e bastante abordados recentemente sobre economia circular e bioeconomia (Tena et al., 2021).

De acordo com Tena et al. (2021) a economia circular baseia-se na recuperação dos subprodutos e sua reintrodução ao processo produtivo, além da valorização, onde novos recursos ou materiais são disponibilizados no mercado por períodos prolongados, reduzindo ao máximo o descarte de resíduos. Já a bioeconomia compreende recursos renováveis para a produção de alimentos, materiais e também de energia (Mak et al., 2020). Levando em consideração que as usinas sucroenergéticas geram grandes quantidades de subprodutos para a produção do etanol e açúcar, tal como a vinhaça, que possui elevado potencial para a produção de biogás, a digestão anaeróbia com a recirculação do efluente em sistemas de tratamento anaeróbios pode se tornar um complemento para um modelo circular de economia.

Os subprodutos do processamento industrial podem ser utilizados como componentes integrais para gerar diversos bioprodutos, bioquímicos e bioenergia, e seu uso em biorrefinarias associados a tecnologias pode ser uma grande estratégia para o alcance de desenvolvimento sustentável e de lucratividade (Tena et al., 2021).

No caso da junção dos processos de digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar com a recirculação do efluente, possivelmente haveria redução de custos para a manutenção do pH afluente e ganhos em termos de aproveitamento energético do biogás gerado. Além disto, questões ambientais e de sustentabilidade vem sendo bastante visadas e empreendimentos que aplicam as questões supracitadas juntamente com critérios sociais e governamentais estão sendo influenciados positivamente com relação à reputação da empresa e são atraídas por grandes investidores, aumentando desta maneira o seu valor no mercado (Umar et al., 2020).

Com relação ao Nitrogênio Amoniacal (N-Am) presente no afluente e efluente dos reatores, foi verificado que houve a amonificação nos RAHLF com o aumento

crescente das suas concentrações do R1 ao R4, e também à medida em que houve aumento das COV (Figura 23).

No afluente do sistema RAHLF, as concentrações de nitrogênio amoniacal variaram de 108 a 377 mg L⁻¹ no afluente nas diferentes fases experimentais, no R1 variaram de 112 a 347 mg L⁻¹, e para o R2, R3 e R4, as variações das concentrações de nitrogênio amoniacal variaram de 121 a 353 mg L⁻¹, de 122 a 388 mg L⁻¹ e de 122 a 420 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 19).

O processo de amonificação observado neste experimento pode ser decorrente da atividade de bactérias que hidrolisam proteínas e melanoidinas da vinhaça, seus principais compostos nitrogenados (Dos Reis et al., 2015).

O nitrogênio amoniacal é um nutriente essencial para a digestão microbiana e, além disto, contribui para o aumento da alcalinidade, se tornando um elemento de grande importância para a estabilidade do sistema (Ariunbaatar et al., 2015). Segundo Metcald e Eddy (2016), existem diferentes formas de nitrogênio, contudo, de uma maneira geral, quantidades insuficientes de nitrogênio podem exigir a sua adição para tornar o efluente tratável, biologicamente.

A fase 6 do experimento foi a fase em que foram observadas as maiores concentrações médias de nitrogênio amoniacal, onde variaram de 377 mg L⁻¹ no afluente a 420 mg L⁻¹ no efluente do R4 (Tabela 19).

De acordo com Hejnfelt e Angelidaki (2009), valores de nitrogênio amoniacal entre 1500 a 3000 mg L⁻¹ podem causar toxicidade em microorganismos metanogênicos, entretanto, os valores verificados neste estudo foram inferiores a esta faixa (Tabela 19).

Barros et al. (2017) avaliaram a codigestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar e torta de filtro da cana em reatores UASB em dois estágios com COVs elevadas em até 45 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e também constataram processo de amonificação do sistema, com valores médios de concentração de nitrogênio amoniacal abaixo de 205 mg L⁻¹ e valores similares aos verificados neste experimento.

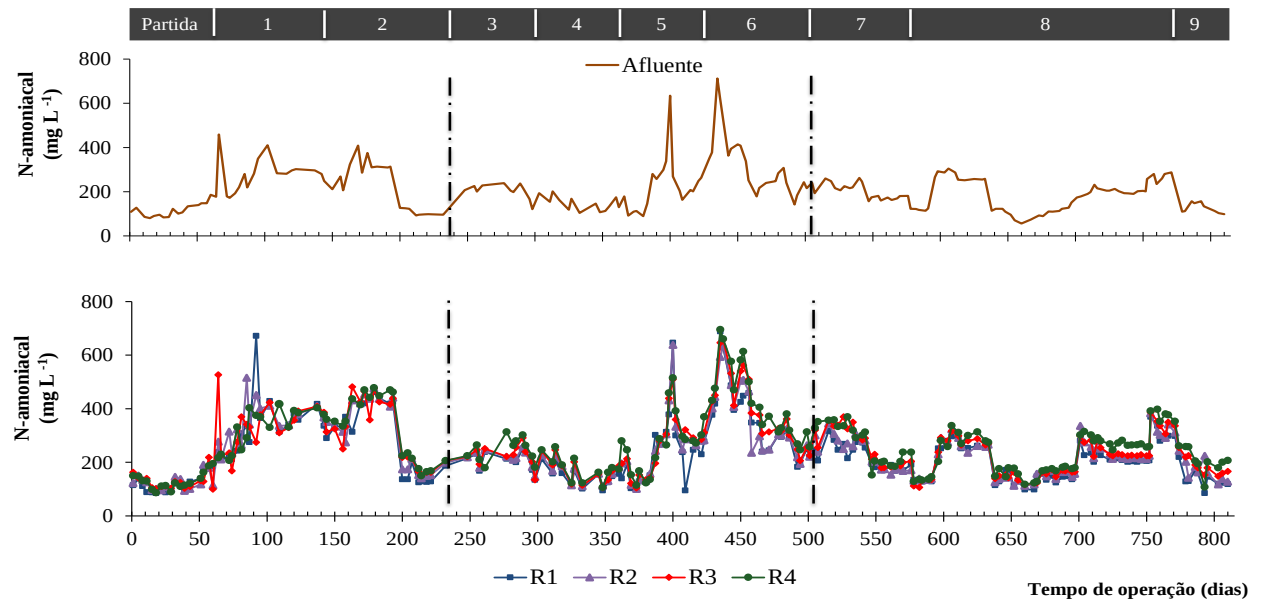


Figura 23. Valores de concentrações de nitrogênio amoniacal (N-amoniaco) no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

Tabela 19. Valores médios e coeficientes de variação (cv) de nitrogênio amoniacal (N-am) e relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial (AI/AP) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) instalados em série.

Primeira Safra					Segunda Safra				Terceira Safra			
Fases	Partida	1	2		3	4	5	6	7	8	9	Teste F
COVs	5,6 a 12,5	12,5 a 21,4	21,4 a 26,1		5,3 a 11,1	11,1 a 11,9	11,9 a 24,8	24,8 a 27,9	5,2 a 16,5	16,5 a 27,4	27,4 a 19,8	
N-am. (mg L ⁻¹)	Afluente	108 ^a	263 ^{de}	314 ^{cde}	226 ^{bcd}	202 ^{abc}	228 ^{cde}	377 ^e	248 ^{abcd}	265 ^{abcd}	157 ^{ab}	9,46**
	cv	20	32	1	15	15	55	36	18	27	15	
	R1	112 ^a	316 ^{de}	299 ^{cde}	226 ^{abc}	144 ^{ab}	242 ^{bcd}	347 ^e	209 ^{abc}	208 ^{abc}	131 ^a	13,31**
	cv	22	38	43	17	21	55	38	26	32	19	
	R2	121 ^a	326 ^c	309 ^{bc}	214 ^{ab}	159 ^a	261 ^{bc}	353 ^c	218 ^{ab}	219 ^{ab}	162 ^a	13,15**
	cv	22	31	40	15	22	49	36	30	32	22	
	R3	122 ^a	315 ^{cd}	314 ^{cd}	227 ^{bc}	167 ^{ab}	263 ^{bc}	388 ^d	240 ^{bc}	227 ^{bc}	180 ^{ab}	14,14**
	cv	15	32	37	17	25	42	34	35	31	15	
	R4	122 ^a	308 ^c	331 ^{cd}	246 ^{bc}	181 ^d	271 ^{bc}	420 ^d	247 ^{bc}	246 ^{bc}	201 ^{ab}	15,95**
	cv	18	27	36	23	29	41	31	33	31	22	
AI/AP	R1	0,38 ^{bc}	0,37 ^{bc}	0,38 ^{bc}	0,15 ^a	0,17 ^a	0,23 ^{ab}	0,20 ^a	0,16 ^a	0,29 ^{abc}	0,40 ^c	8,09**
	cv	30	38	48	34	41	34	29	47	70	29	
	R2	0,16 ^{ab}	0,27 ^c	0,19 ^{abc}	0,14 ^a	0,14 ^{ab}	0,16 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,20 ^{abc}	0,24 ^{bc}	4,25**
	cv	47	42	68	53	35	21	22	38	59	23	
	R3	0,13 ^{ab}	0,18 ^{abc}	0,13 ^{ab}	0,12 ^a	0,12 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,19 ^{bc}	0,25 ^c	4,69*
	cv	81	43	51	55	51	38	46	52	39	54	
	R4	0,25 ^c	0,21 ^{bc}	0,11 ^a	0,15 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,13 ^{ab}	0,16 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,19 ^{bc}	0,18 ^{abc}	6,01**
	cv	48	54	55	48	24	51	42	41	35	54	

Cv: coeficiente de variação. Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($p > 0,05$); * ($p < 0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($P < 0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

5.3. Demanda química de oxigênio (DQO total e DQO dissolvida)

Os valores de demanda química de oxigênio total do afluente aplicados ao R1 foram crescentes (Tabela 20), e consequentemente as COVs também foram elevadas, pois que não houve alteração do tempo de detenção hidráulica (TDH) durante todo o experimento (Figura 24).

As COVs aplicadas ao R1 (Tabela 21) variaram de 5,6 a 26,1 g DQO total (L d)⁻¹ durante o período de partida à fase 2 (primeira safra de cana-de-açúcar). Nas fases de 3 a 6, correspondentes à segunda safra, as COVs aplicadas variaram de 5,7 a 27,9 g DQO total (L d)⁻¹, e para as fases de 7 a 9 (terceira safra) as COVs variaram de 5,2 a 19,8 g DQO total (L d)⁻¹. Durante o período de entressafra correspondentes à primeira e segunda safra, os reatores não foram alimentados, o que possibilitou avaliar a retomada dos reatores.

Foi determinada para a terceira safra da cana-de-açúcar, o aumento gradual da COV em até 20 g DQO total (L d)⁻¹ com a finalidade de dar início à aplicação do Fenton na vinhaça biodigerida com a recirculação ao sistema de tratamento, executado na fase 9 do experimento. A escolha da manutenção dos valores médios da COV próximos de 20 g DQO total (L d)⁻¹ foi baseada na faixa das COVs aplicadas no sistema RAHLF para as fases 2 e 5. Estas fases apresentaram os melhores resultados de produção volumétrica de metano pelo sistema durante período experimental correspondentes às safras anteriores.

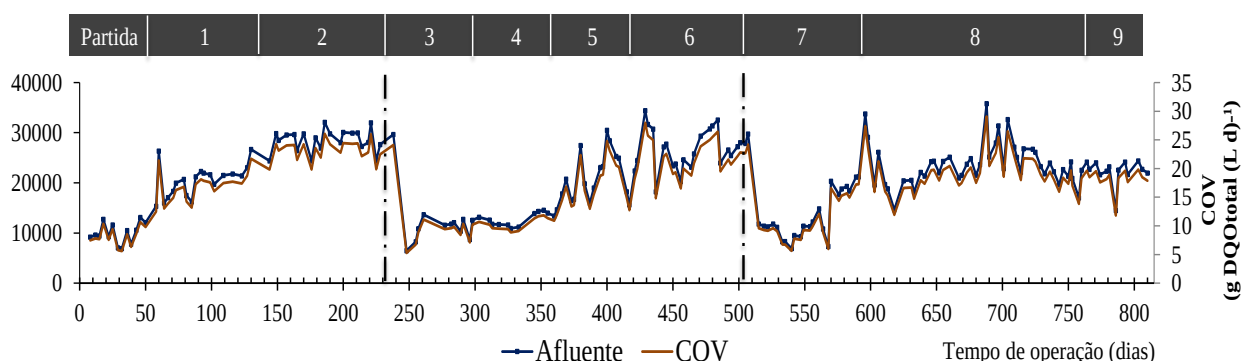


Figura 24. Demanda química de oxigênio (DQO total, em mg L⁻¹) do afluente versus carga orgânica volumétrica (COV) aplicadas ao R1 em relação ao tempo de operação dos reatores anaeróbios de leito fixo (RAHLF).

De acordo com os resultados obtidos nos efluentes dos reatores (R1, R2, R3 e R4), foi observada remoção da DQO total do afluente para o efluente (Figura 25). Estes resultados demonstram a estabilização da matéria orgânica promovida pelo sistema anaeróbio composto por reatores horizontais.

As maiores remoções de DQO total foram observadas no R1 e aumentaram com o acréscimo da COV (Tabela 21). Os valores de remoção de DQO total no R1 atingiram valores de 55% na fase 9, com valor médio de COV aplicado ao R1 de 17,8 g DQO total (L d)⁻¹ (Tabela 20), e temperaturas médias de 24,4 °C (Tabela 16). Para condições similares, estatisticamente, de COVs nas fases 1, 5, 6 e 8, foram observadas remoções de DQO total de 21, 41, 49 e de 55%, respectivamente. Estes valores de remoções, observados no R1, podem indicar que a retomada dos RAHLF, após a operação durante uma safra ocorreu adequadamente e permitiu obter remoções de DQO total no R1 superiores, para condições de cargas orgânicas similares. Todavia, sabe-se que a temperatura também influencia no processo da digestão anaeróbia, desta forma, comparando-se a fase 8 com a fase 9, que por sua vez apresentou COV similar e temperaturas média do ar superior, a fase 9 apresentou os melhores resultados de eficiência de remoção da DQO total para o sistema. Vale ressaltar que a fase 9 também recebeu tratamento especial, onde houve a integração do processo Fenton com o processo biológico. Desta forma, o efluente tratado com o processo Fenton pode ter removido parte dos compostos recalcitrantes presentes no sistema RAHLF, durante todo o período experimental, por meio da recirculação constante por tempo prolongado, resultando no aumento da eficiência de remoção da DQO total.

Guerreiro et al. (2016) realizaram testes de oxidação de Fenton diretamente em efluente de vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida em um sistema composto por UASB em dois estágios e em condições termofílicas (55 °C) com a finalidade de produzir efluentes que atendam os padrões de descarte, reduzir a sua biodegradabilidade e toxicidade. Os autores conseguiram reduzir o valor da concentração da DQO total da vinhaça biodigerida de 6836 mg L⁻¹ para 2516 mg L⁻¹, atingindo eficiência de remoção de 63,2%.

Botello et al. (2020) também testaram a oxidação de Fenton para a redução da concentração de compostos orgânicos recalcitrantes de água

residuíria do processamento do café (ARC) biodigerido em um reator UASB, com o intuito de melhorar a sua biodegradabilidade. Os autores conseguiram aumentar a biodegradabilidade (relação DBO/DQO) do substrato biodigerido de 0,34 para 0,44. Além disto, o processo Fenton removeu 55,7% da DQO total presente na ARC biodigerida, passando de 4263 mg L^{-1} para 1889 mg L^{-1} . Botello et al. (2020), sugeriram a aplicação do processo Fenton para a recirculação de efluentes biodigeridos, todavia, alegam que o efeito da recirculação da combinação do processo químico e biológico devem ser avaliados.

O processo Fenton consiste em decompor o peróxido de hidrogênio na presença de um catalisador, principalmente o Fe^{2+} , em valores de pH entre 2 e 5. Tais reagentes, quando adicionados a um sistema contendo um substrato orgânico em condições ácidas, promovem sua oxidação. No processo, os radicais hidroxila altamente oxidativos e não seletivos, oxidam tanto os orgânicos presentes no efluente inicial ou os compostos intermediários gerados. Em sequência, a oxidação prossegue até a formação de dióxido de carbono e água (mineralização completa) ou até a formação de subprodutos refratários (Guerreiro et al., 2016). No entanto, para o presente experimento, o intuito da aplicação do teste Fenton à vinhaça biodigerida foi, principalmente, remover os compostos recalcitrantes do efluente, melhorando a sua biodegradabilidade. Levando-se em consideração as elevadas cargas orgânicas volumétricas aplicadas ao sistema RAHLF para a produção do biogás, a oxidação completa do substrato não seria interessante, visto que o efluente biodigerido também auxilia no ajuste das cargas orgânicas.

Como pode ser observado na tabela 21, as remoções de DQO total no R2, R3 e R4 foram inferiores às observadas no R1, todavia contribuíram para obtenção de valores médios de remoções de DQO total no sistema ($\text{R1}+\text{R2}+\text{R3}+\text{R4}$) elevados, atingindo percentuais acima de 60%, principalmente nas fases 6, 7, 8 e 9 (Figura 26). Embora as eficiências médias de remoção da DQO total em cada reator tenham se apresentado relativamente baixas (Tabela 21), o conjunto de todo o sistema ($\text{R1}+\text{R2}+\text{R3}+\text{R4}$) promoveu eficiências de remoção interessantes (Tabela 21).

Comparando-se a fase 1 com a 5, com a aplicação de COV similares, observa-se eficiências de remoção de DQO total no sistema ($\text{R1}+\text{R2}+\text{R3}+\text{R4}$) superiores na fase 5 (Figura 25). Isto pode ter ocorrido em virtude das maiores

temperaturas médias do ar, observadas na fase 5, de 21,5 °C. Na fase 1, foram observadas as menores temperaturas médias do ar de todo o experimento, apresentando valor médio de 18,9 °C. A temperatura influencia o processo da digestão anaeróbia regulando a atividade enzimática intracelular microbiana, podendo afetar a atividade metabólica dos microrganismos e a eficiência da fermentação (Wang et al., 2019). De um modo geral, no conjunto de reatores (R1+R2+R3+R4) foram observadas eficiências médias de remoção da DQO total (Tabela 21) de 41, 45 e 64%, correspondentes às fases de partida, fases 1 e 2 (primeira safra da cana de açúcar, respectivamente; eficiências de remoção de 57, 60, 62 e 66% para as fases 3, 4, 5 e 6 (segunda safra); e de 73, 71 e 85% para as fases 7, 8 e 9 (terceira safra). Desta forma, a maior eficiência de remoção da DQO total ocorreu na última fase experimental (fase 9), onde a DQO do afluente passou de 21951 mg L⁻¹ para 3361 mg L⁻¹ (Tabela 20).

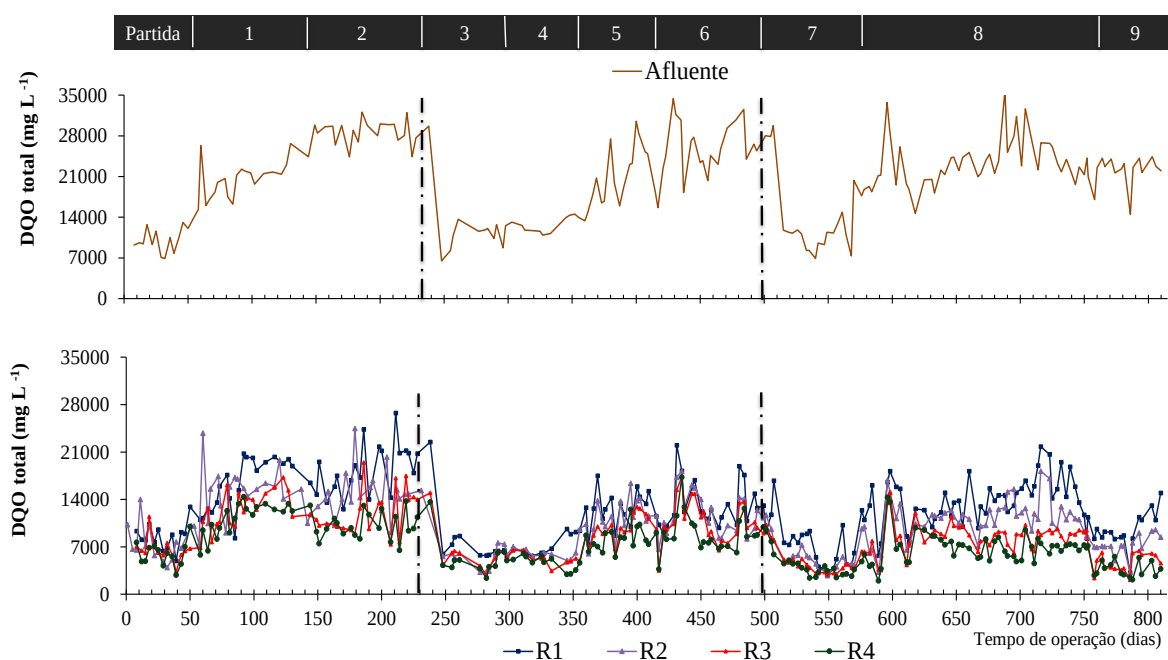


Figura 25. Valores de demanda química de oxigênio (DQO_{total}) no afluente e efluentes dos reatores horizontais de leito fixo (RAHLF), em série.

Tabela 20. Valores médios e coeficientes de variação (cv) da carga orgânica volumétrica (COV) aplicada aos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF) (R1, R2, R3 e R4), e demanda química de oxigênio (DQOtotal) obtidas nos afluentes e efluentes dos RAHFLs.

		Fases																				
		Primeira Safra						Segunda Safra						Terceira Safra								
Parâmetros	Partida	cv	1	cv	2	cv	3	cv	4	cv	5	cv	6	cv	7	cv	8	cv	9	cv	Teste F	
COV (gDQOtotal (L d) ⁻¹)	R1	8,4ab	23	17,0b	14	22,9d	7	9,0a	20	10,5a	21	17,6bc	21	22,0d	15	10,1a	33	19,1c	17	17,8bc	13	69,04**
	R2	7,1ab	22	13,5d	22	15,2d	20	5,3a	16	6,4ab	27	10,1c	20	11,1c	24	6,2ab	28	10,8c	28	8,1b	34	27,38**
	R3	9,5bc	36	18,0g	25	18,4fg	23	7,0ab	27	8,2ab	26	14,1de	22	15,1ef	25	6,8a	34	13,5cd	29	9,5ab	25	31,25**
	R4	6,6cd	25	12,8g	20	12,2fg	27	5,3abc	23	5,6bc	24	9,7e	26	10,9ef	26	4,5ab	30	8,1d	30	4,9a	30	33,75**
DQOtotal (mg L ⁻¹)	Afl.	10368a	23	20930b	14	28712d	7	11018a	20	21679a	21	21679bc	21	27119d	15	12477a	33	23549c	17	21951bc	13	69,04**
	R1	8708ab	22	16567d	22	18729d	20	6572a	16	7845ab	27	12417c	20	13676c	24	7652ab	28	13268c	28	9993b	34	27,38**
	R2	7530b	36	14967d	22	14648d	24	5593ab	27	6538ab	26	11235c	22	11984c	25	5383a	35	10732c	29	7584b	25	28,11**
	R3	6589bc	25	12775g	20	12178fg	27	5299ab	23	5565ab	23	9685de	24	10832ef	26	4449a	30	8089cd	30	4907ab	30	31,25**
	R4	5980cd	29	11491g	18	10202fg	20	4586abc	23	5075bc	31	8128e	24	9138ef	29	3782ab	25	6704d	34	3361a	33	33,74**

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($P > 0,05$); * ($p < 0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($p < 0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 21. Valores médios e coeficientes de variação da DQOtotal e eficiências de remoções obtidas nos afluentes e efluentes aos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF) (R1, R2, R3 e R4).

Features and analysis horizontal complete file (R1, R2, R3 e R4).															
		COVs	Afl.	cv	R1	cv	R2	cv	R3	cv	R4	cv	Sistema	cv	
DQOtotal (mg L ⁻¹)	1ª Safrá	Partida	5,6 a 12,5	10368 ^a	23	8708 ^{ab}	22	7530 ^b	36	6589 ^{bc}	25	5980 ^{cd}	29	-	-
		1	12,5 a 21,4	20930 ^b	14	16567 ^d	22	14967 ^d	22	12775 ^g	20	11491 ^g	18	-	-
		2	21,4 a 26,1	28712 ^d	7	18729 ^d	20	14648 ^d	24	12178 ^{fg}	27	10202 ^{fg}	20	-	-
	2ª safrá	3	5,7 a 11,1	11018 ^a	20	6572 ^a	16	5593 ^{ab}	27	5299 ^{ab}	23	4586 ^{abc}	23	-	-
		4	11,1 a 11,9	12875 ^a	21	7845 ^{ab}	27	6538 ^{ab}	26	5565 ^{ab}	23	5075 ^{bc}	31	-	-
		5	11,9 a 24,8	21679 ^{bc}	21	12417 ^c	20	11235 ^c	22	9685 ^{de}	24	8128 ^e	24	-	-
	6	24,8 a 27,9	27119 ^d	15	13676 ^c	24	11984 ^c	25	10832 ^{ef}	26	9138 ^{ef}	29	-	-	
	3ª safrá	7	5,2 a 16,5	12477 ^a	33	7652 ^{ab}	28	5383 ^a	35	4449 ^a	30	3783 ^{ab}	25	-	-
		8	16,5 a 27,4	23549 ^c	17	13268 ^c	28	10732 ^c	29	8089 ^{cd}	30	6704 ^d	34	-	-
		9	27,4 a 19,8	21951 ^{bc}	13	9993 ^b	34	7584 ^b	25	4907 ^{ab}	30	3361 ^a	33	-	-
Teste F			69,04 ^{**}		27,38 ^{**}		28,11 ^{**}		31,25 ^{**}		33,74 ^{**}		-	-	
Eficiência de Remoção (%)	1ª Safrá	Partida	5,6 a 12,5	-	-	18 ^a	52	22 ^a	73	17 ^b	84	21 ^{ab}	46	41 ^a	41
		1	12,5 a 21,4	-	-	21 ^a	70	16 ^a	10	19 ^b	106	19 ^{ab}	59	45 ^a	20
		2	21,4 a 26,1	-	-	35 ^b	37	23 ^{ab}	55	20 ^b	57	20 ^{ab}	57	64 ^{bc}	11
	2ª Safrá	3	5,7 a 11,10	-	-	38 ^b	45	27 ^b	59	13 ^a	55	15 ^a	65	57 ^b	25
		4	11,1 a 11,9	-	-	40 ^b	33	23 ^a	74	17 ^b	89	17 ^a	84	60 ^b	22
		5	11,9 a 24,8	-	-	41 ^{bc}	34	17 ^a	55	17 ^b	76	20 ^{ab}	59	62 ^b	15
	6	24,8 a 27,9	-	-	49 ^c	20	18 ^a	70	13 ^a	60	19 ^a	56	66 ^c	17	
	3ª Safrá	7	5,2 a 16,5	-	-	43 ^c	43	29 ^b	56	24 ^{bc}	38	24 ^b	45	73 ^c	19
		8	16,5 a 27,4	-	-	43 ^c	35	24 ^{ab}	37	27 ^c	54	22 ^b	50	71 ^c	14
		9	27,4 a 19,8	-	-	55 ^e	24	23 ^{ab}	55	30 ^c	47	32 ^c	63	85 ^d	5
Teste F					12,79 ^{**}		9,8 ^{**}		15,10 ^{**}		12,11 ^{**}		8,7 ^{**}		

Letras iguais na mesma coluna não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05); * (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

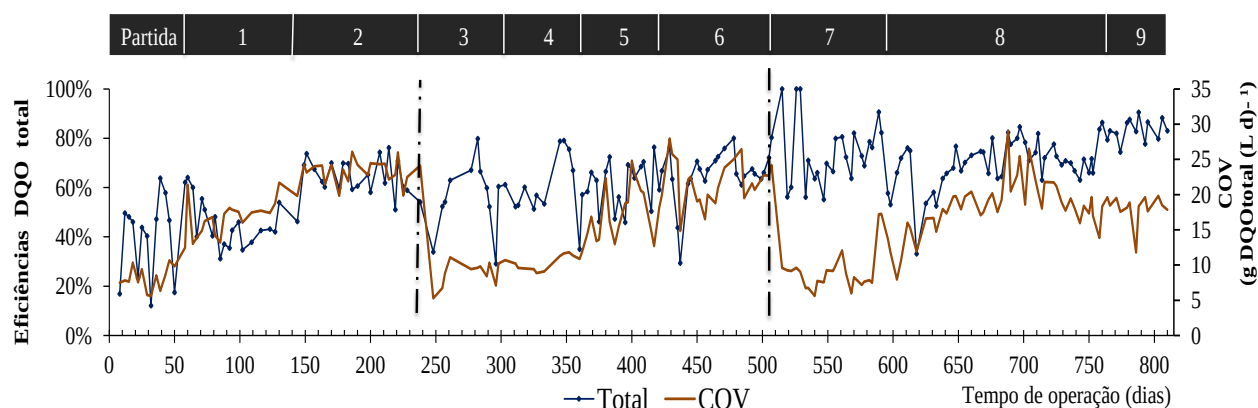


Figura 26. Eficiência de remoção da demanda química de oxigênio total (DQOtotal) para o sistema composto pelos reatores horizontais de leito fixo (RAHLF - R1+R2+R3+R4) em série, versus a carga orgânica volumétrica aplicada no R1 no período de partida e fases de 1 a 9.

Neste experimento, o sistema RAHLF (R1+R2+R3+R4) atingiu valores médios de remoção de DQO superiores de 60% com COVs aplicadas elevadas. Desta forma, a digestão anaeróbica da vinhaça em reatores horizontais de leito fixo dispostos em série podem gerar bons resultados de remoção da DQOtotal, assim como as demais conformações de reatores anaeróbios existentes.

Por exemplo, Siqueira et al. (2013) avaliaram um reator anaeróbio de leito fluidizado (AFBR) para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar. O AFBR foi operado a uma temperatura de 30 °C, com COVs variando de 3,33 a 26,19 g DQOtotal L⁻¹.d⁻¹ e TDH de 24 h. No afluente foram adicionados bicarbonato de sódio para auxiliar no efeito tampão e fosfato de sódio monobásico anidro e uréia para a suplementação de nitrogênio e fósforo. Os autores verificaram eficiências de remoção de DQOtotal de 51 a 70%. Já España-Gamboa et al. (2012) aplicaram COVs de 7,27 a 22,16 g DQOtotal (L d)⁻¹ em reator UASB em condições mesofílicas (30 °C) e alcançaram eficiências de remoção de DQO de 55 a 73%. Para a correção de pH para valores próximos da neutralidade foi adicionado bicarbonato de sódio. Os valores de remoção de DQOtotal foram similares aos observados neste trabalho, que ocorreu sem a suplementação de nutrientes.

Os sistemas onde as células microbianas formam biofilmes que são imobilizados a suportes sólidos, como os RAHLF apresentados neste trabalho, podem manter uma quantidade de microrganismos por volume de reator até uma magnitude maior do que os reatores que têm os microrganismos fluindo livremente no líquido do

reator (UASB). Além disto, as populações de biofilme microbiano e a proximidade física resultante entre as células imobilizadas podem permitir a troca rápida de nutrientes dentro do biofilme, favorecendo interações sinérgicas das comunidades para realizar a degradação de substâncias orgânicas complexas e simples (Londoño et al., 2019).

Na tabela 22, estão descritos os valores médios da demanda química de oxigênio dissolvida (DQO_{diss}) e eficiências de remoções obtidas nos afluentes e efluentes dos reatores (R1, R2, R3 e R4).

O parâmetro de DQO dissolvida é realizado para determinar a presença de compostos orgânicos dissolvidos presentes em amostras de efluentes (Chernicharo, 2016). As concentrações médias da DQO dissolvida verificadas no afluente durante o experimento variaram de 9671 a 10407 mg L⁻¹ durante a primeira safra da cana-de-açúcar (partida, fase 1 e fase 2), de 6217 a 9237 mg L⁻¹ durante a segunda safra (fases 3, fase 4, fase 5 e fase 6), e de 4403 mg L⁻¹ para 6753 mg L⁻¹ no período correspondente à terceira safra da cana (fase 7, fase 8 e fase 9).

Assim como ocorreu para o parâmetro de DQO total, foram observadas reduções da DQO dissolvida do afluente para o efluente do sistema de tratamento (Tabela 22). O sistema composto pelos reatores R1, R2, R3 e R4 apresentou as maiores eficiências de remoção no R1, de 40 e 39% para as fases 2 e 9, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si.

Em sistemas de tratamento de efluentes também é possível a ocorrência de mecanismos não biológicos de remoção da DQO dissolvida por meio da sua incorporação no lodo ou na fração particulada com o efluente. Os principais mecanismos que contribuem para tal ocorrência são: a precipitação, que usualmente ocorre como resultados de mudanças no pH ou da adição de compostos alcalinos, promovendo a precipitação e a sedimentação, passando a fazer parte do lodo ou serem levados para fora do sistema junto com a DQO afluente; e também a adsorção, resultante de reações onde a DQO solúvel é adsorvida nas superfícies das partículas de biomassa presentes no sistema de tratamento (Chernicharo et al., 2016).

Tabela 22. Valores médios e coeficientes de variação da DQOdiss e eficiências de remoções obtidas nos afluentes e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série.

Fatores analíticos: eficiência de remoção (R1, R2, R3, R4), CV e teste F													
			COV	Afl.	cv	R1	cv	R2	cv	R3	cv	R4	cv
DQOdiss (mg L ⁻¹)	1ª Safra	Partida	5,6 a 12,5	9671 ^b	6	7520 ^c	36	6271 ^{bc}	36	4703 ^{bcd}	30	4507 ^{bcd}	34
		1	12,5 a 21,4	9283 ^b	29	8668 ^c	30	6608 ^c	30	7100 ^e	34	6422 ^e	29
		2	21,4 a 26,1	10407 ^b	27	8784 ^c	30	6273 ^{bc}	30	5127 ^{bcde}	20	4500 ^{bcd}	33
	2ª Safra	3	5,3 a 11,1	6217 ^a	28	4136 ^{ab}	24	4139 ^{ab}	24	3710 ^{ab}	16	4587 ^{abc}	23
		4	11,1 a 11,9	7024 ^{ab}	22	6235 ^{abc}	15	6034 ^{bc}	15	5771 ^{cde}	17	5134 ^{cde}	16
		5	11,9 a 24,8	7946 ^{ab}	28	6898 ^{bc}	22	5787 ^{bc}	22	6104 ^{de}	28	6314 ^e	28
		6	24,8 a 27,9	9237 ^{ab}	25	7649 ^c	27	7150 ^c	27	5868 ^{cde}	16	5534 ^{de}	15
	3ª Safra	7	5,2 a 16,5	4403 ^a	24	3617 ^a	48	2694 ^a	48	2637 ^a	49	2209 ^a	41
		8	16,5 a 27,4	10106 ^b	28	7937 ^c	34	5441 ^{bc}	32	4498 ^{abcd}	32	4318 ^{bcd}	27
		9	27,4 a 19,8	6753 ^{ab}	39	6335 ^{abc}	75	4773 ^{abc}	54	3945 ^{abc}	56	3050 ^{ab}	25
Teste F				4,32*		3,98*		4,17*		5,69**		7,14**	
Eficiência de Remoção (%)	1ª Safra	Partida	5,6 a 12,5	-	-	11 ^a	67	26 ^c	9	21 ^b	118	19 ^b	20
		1	12,5 a 21,4	-	-	24 ^b	88	24 ^{bc}	52	19 ^b	62	24 ^{bc}	50
		2	21,4 a 26,1	-	-	40 ^d	79	30 ^d	52	21 ^{bc}	65	20 ^b	52
	2ª Safra	3	5,3 a 11,1	-	-	17 ^b	84	12 ^a	62	24 ^{bc}	55	24 ^{bc}	35
		4	11,1 a 11,9	-	-	20 ^b	81	18 ^b	65	11 ^a	73	21 ^c	64
		5	11,9 a 24,8	-	-	20 ^b	52	20 ^b	27	8 ^a	76	6 ^a	17
		6	24,8 a 27,9	-	-	24 ^b	84	14 ^a	66	28 ^c	43	10 ^a	74
	3ª Safra	7	5,2 a 16,5	-	-	33 ^c	90	37 ^e	65	6 ^a	95	20 ^b	57
		8	16,5 a 27,4	-	-	24 ^b	45	32 ^{de}	38	21 ^b	74	17 ^b	54
		9	27,4 a 19,8	-	-	39 ^{cd}	32	17 ^{ab}	133	17 ^b	13	35 ^d	42
Teste F				4,5**		6,1*		2,77**		8,11**			

COV: carga orgânica volumétrica (g DQOtotal (L d⁻¹)). Letras iguais na mesma coluna não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05);

* (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

5.4. Produção de metano (CH₄)

A digestão anaeróbia da vinhaça em reatores horizontais de leito fixo e alta taxa dispostos em série (RAHLF), resultou em produção de biogás em virtude da biodegradação da matéria orgânica. Foi observado que o aumento da COV proporcionou o aumento da produção volumétrica de CH₄, conforme demonstrado na figura 27.

A digestão anaeróbia da vinhaça neste estudo possibilitou valores médios de produção volumétrica de metano, no conjunto R1+R2+R3+R4 de 0,12, 0,27, 0,34, 0,12, 0,17, 0,31, 0,24, 0,16, 0,19 e 0,28 L CH₄ (L d)⁻¹ para a partida e fases de 1 a 9, respectivamente (Tabela 23). A baixa produção de biogás no período de partida se deve à baixa COV aplicada, mas também pode estar associada ao período de adaptação dos microrganismos presente no lodo dos reatores anaeróbios.

As maior produção volumétrica de metano para o sistema (R1+R2+R3+R4) foi observada durante a fase 2, seguida da fase 5 (Tabela 23), com valores de 0,34 e 0,31 L CH₄ (L d)⁻¹, respectivamente. Os maiores valores médios de produção volumétrica de CH₄ foram observadas no R1 e R2 e o maior percentual de metano contido no biogás foi verificado no R3 (Tabela 23). Este fato pode demonstrar que no R1 e R2 houve uma maior produção de CO₂, resultante dos processos de hidrólise e acidogênese.

As produções específicas de metano verificadas neste experimento, listadas na tabela 23, ficaram abaixo do valor teórico, obtido estequiometricamente, de 0,35 L CH₄ (g DQO total removida)⁻¹ nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP). No R1, a maior produção específica de metano verificada foi de 0,13 L CH₄ (g DQO total removida)⁻¹, ocorrida durante a fase 3. No entanto, foram observadas produções específicas de metano superiores no R2, exceto na fase 3, indicando possível divisão de etapas, com hidrólise e acidogênese no R1. Os maiores valores médios de produção específica de CH₄ observadas no R2 foram de 0,20 e 0,19 L CH₄ (g DQO removida)⁻¹, nas fases 4 e 5, respectivamente.

Os teores de metano no biogás dos RAHLFs verificados neste experimento, de 37 a 69%, foram superiores aos de Santana Junior et al. (2019) tratando vinhaça de cana-de-açúcar em um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) em dois estágios para a produção de metano. Já os valores de produção volumétrica e

produção específica foram semelhantes aos resultados obtidos neste experimento. Contudo, Santana Junior et al. (2019) trabalharam com COVs menores, de 0,15 a 7,0 g DQO total (L.dia⁻¹), e com o sistema em condições termofílicas (55 °C).

De acordo com Chernicharo (2016), a formação microbiana do metano pode ocorrer em faixas de temperaturas de 0 a 97 °C, entretanto, os níveis mesófilicos entre 30 a 35 °C são considerados níveis ótimos de temperatura para digestores anaeróbios. Sendo assim, a maior produção volumétrica de metano verificada neste experimento, na fase 2 (0,34 L CH₄ (L d)⁻¹), também pode estar associadas à maior temperatura média do ar ocorrida para este período (Tabela 16).

Para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar, utilizando reatores UASB, España-Gamboa et al. (2012) observaram uma produção volumétrica de 0,26 L CH₄ (g DQO total removida)⁻¹ com COVs aplicadas de 17,05 g DQO total (L d)⁻¹. Esses valores de produção são similares aos verificados neste experimento, para condições de COVs semelhantes. Isto indica que é possível obter produções de metano em sistemas RAHLF equiparados aos reatores UASB para estas condições, porém, com a facilidade construtiva dos RAHLF. Barros et al. (2016) atingiram um rendimento de produção volumétrica de 0,938 L CH₄ (L d)⁻¹ tratando o mesmo tipo de resíduo em um reator UASB, com COV de 11,5 g DQO total (L d)⁻¹. Os valores são superiores aos observados neste experimento, no entanto a vinhaça afluenta foi suplementada com o di-Hidrogenofosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) e uréia (CH₄N₂O). Para este experimento, não houve nenhum tipo de suplementação de nutrientes.

Santana-Junior et al. (2019) avaliaram a conversão anaeróbica termofílica da vinhaça de cana-de-açúcar em um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) em dois estágios, empregando melaço de cana na entressafra para a produção de metano, retornando a aplicação da vinhaça no período da safra seguinte. A digestão anaeróbica da vinhaça, com COVs aplicadas variando de 3,5 a 7,0 g DQO total (L d)⁻¹ durante o período de safra, permitiu ao sistema (R1+R2) uma produção volumétrica de metano de 0,058 L CH₄ (L d)⁻¹. Durante o período de entressafra da cana, a digestão anaeróbica do melaço promoveu uma produção volumétrica de 0,109 L CH₄ (L d)⁻¹ com COV aplicadas de 7,1 a 7,5 g DQO total (L d)⁻¹. Após o retorno com vinhaça, com COVs aplicadas variando de 7,6 a 12,5 g DQO total (L d)⁻¹, foi observada aumento da produção volumétrica para 0,205 L CH₄ (L d)⁻¹.

España-Gamboa et al. (2017) testaram um sistema composto por um Biorreator de Leito Fluidizado (FBR – 2,0 L) inoculados com pellets de *Trametes*

versicolor (fungo capaz de degradar e mineralizar uma ampla variedade de compostos recalcitrantes) e um reator UASB (4,2 L) em condições mesofílicas no tratamento anaeróbio de vinhaça. O sistema combinado, alimentado com COV de 1,2 kg DQO ($\text{m}^3 \text{d}^{-1}$), com um TDH de 6 dias e operado por um período de 26 dias, alcançou um teor de metano de 74% e rendimento de $0,18 \text{ m}^3 \text{CH}_4 (\text{kg DQO removida})^{-1}$, além de remover 67% de compostos fenólicos e 38% da DQO da vinhaça.

Lovato et al. (2019) testaram a viabilidade do uso da glicerina como co-substrato na digestão anaeróbia da vinhaça em reator AnSBBR, para aumentar a eficiência do processo e a produtividade do biogás. O efeito da estratégia de alimentação, concentração de afluente, duração do ciclo e temperaturas foram avaliadas para otimizar a produção de metano. A glicerina (1,53% v/v) provou ser um bom co-substrato, pois aumentou a produção geral de metano nos ensaios de codigestão. A produtividade de CH_4 aumentou exponencialmente conforme a concentração do afluente aumentou, todavia quando a temperatura foi elevada para 35°C , a produção de biogás foi prejudicada. A maior produtividade e rendimento de metano foram alcançados nas condições de 30°C e a uma COV de $10,1 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$: $139,32 \text{ mol CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{d}^{-1}$, $13,86 \text{ mol CH}_4.\text{kg DQOadicionada}^{-1}$ e $15,30 \text{ mol CH}_4.\text{kg DQOremovida}^{-1}$. Os autores alegaram que para o experimento, o metano foi produzido predominantemente pela rota hidrogenotrófica.

Cabrera-Diaz et al. (2017) avaliaram o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar bruta em um sistema combinado, composto por reator UASB (4,3 L) e um reator anaeróbio de leito fixo (APBR) (3,5 L) em diferentes COVs aplicadas, que por sua vez, variaram de 2,3 a $24 \text{ kg DQO m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ em TDHs variados de 8 a 1,2 dias. Para a COV aplicada de $24 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$ e TDH de 1,3 dias, os rendimentos de metano alcançados foram de $0,185 \text{ m}^3 \text{CH}_4 (\text{kg DQO removida})^{-1}$ para o reator UASB e de $0,265 \text{ m}^3 \text{CH}_4 (\text{kg DQO removida})^{-1}$ para o APBR, atingindo percentuais de metano de 32% e 58%, respectivamente. A melhor condição encontrada para o sistema combinado foi de $12,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$, com valores médios de rendimento de metano de $0,289 \text{ m}^3 \text{CH}_4 (\text{kg DQO removida})^{-1}$ para o reator UASB e de $4,4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$ com rendimentos de $0,207 \text{ m}^3 \text{CH}_4 \text{ kg DQO removida}^{-1}$ para o APBR.

Nery et al. (2018) avaliaram a digestão anaeróbia da vinhaça em reator UASB (120 L) em longo período de operação (700 dias) com taxa de recirculação do efluente de 1:3 e COVs aplicadas variando de 0,5 a $32,4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$ para produção de biogás. Os autores observaram estabilidade dos reatores em todo período operacional

do reator para todas as cargas aplicadas, apresentando eficiências de remoção de DQO total e DQO solúvel de até 87,5 e 90,5%, respectivamente. O conteúdo de metano no biogás foi de 68,8% e a produtividade do metano atingiu o maior valor de $8,059 \text{ L CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a $32,27 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Botello-Suárez (2018) avaliou diferentes estratégias para a remoção de poluentes de água residuária do processamento de café (ARC) previamente biodigerida. Para o experimento, foram avaliados o tratamento biológico utilizando um reator em batelada sequencial (SBR) com esquema anaeróbio/aeróbio/anóxico; processo Fenton; e o tratamento integrado do sistema SBR com o processo Fenton. Foi relatado que a estratégia biológica promoveu boas eficiências de remoção de NTK (80%), fósforo total (70%) e fenóis totais (95%). O processo Fenton também apresentou bons resultados para a remoção de demanda química de oxigênio (64%), fósforo total (75%), fenóis totais (99%) e de sólidos (83%). Contudo, foi relatado que para atender aos padrões de descarte, o processo integrado (SBR seguido de processo Fenton) mostrou-se a melhor alternativa, obtendo eficiências de remoção para DQO, NTK e PT de 91%, 86% e 87% respectivamente, sem compostos fenólicos detectáveis, representando uma alternativa adequada para o pós-tratamento de ARC. Por fim, para estabelecer uma possível estratégia de reúso, também foram analisados o desempenho de dois reatores anaeróbios distintos (UASB e RAHLF) tratando ARC submetidos à recirculação parcial do efluente Fenton. Os reatores UASB e RAHLF já estavam em operação, com COVs de 5,0 e 9,3 g DQO (L d)⁻¹, respectivamente. Deste modo, os reatores receberam a recirculação parcial do efluente Fenton, empregando-se uma proporção de ARC : Fenton de 3:2, por um período de 40 dias. Botello-Suárez relatou que a recirculação parcial do efluente Fenton apresentou um aumento significativo na produção de metano e remoção de DQO em ambos os reatores anaeróbios, sugerindo que, possivelmente, o teor residual de Fe, a alta biodegradabilidade apresentada (relação DBO/DQO = 0,5) e a redução de compostos recalcitrantes realizados no processo Fenton, podem ter favorecido a microbiota anaeróbia que colonizava esses sistemas.

No ponto de vista energético, a digestão anaeróbia da vinhaça é bastante atraente, todavia, a presença de compostos recalcitrantes, muitas das vezes relacionadas à presença de fenóis, pode ser tóxica ou inibitória para microrganismos anaeróbios (España-Gamboa et al., 2017). Todavia, a presença deste composto e demais compostos considerados inibitórios para o tratamento anaeróbio da vinhaça

pode reduzir a cinética de crescimento dos microrganismos e diminuir as taxas médias de produção de metano e dos coeficientes de rendimento (Espana-Gamboa et al., 2017).

O presente experimento apresentou boas eficiências de remoção de DQO total no afluente, produção de volumétricas de metano crescentes à medida em que houve o acréscimo das cargas orgânicas volumétricas, no entanto, a presença de compostos recalcitrantes presentes ao longo do experimento, aliado a outros fatores, podem ter contribuído para a baixa produção específica de metano.

De acordo com Mehariya et al. (2018) a presença de nitrogênio é de grande importância para o desenvolvimento dos microrganismos, e o fósforo é necessário para acelerar a taxa metabólica nos microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia. Sendo assim, a suplementação de nutrientes essenciais à microbiota no sistema de tratamento anaeróbio é de grande importância. O suplemento de nutrientes pode ser realizado por meio de adição de compostos químicos, embora alternativas como a codigestão anaeróbia de resíduos venha sendo explorada, demonstrando efeitos positivos quanto à disposição de nutrientes em relação à monodigestão de resíduos. Entretanto, neste último caso, a produção de metano também irá depender das características das matérias-primas introduzidas no processo de digestão (Mehariya et al., 2018). Ou seja, para a obtenção de maiores produções volumétricas e específicas de metano deve-se observar também as condições nutricionais do afluente.

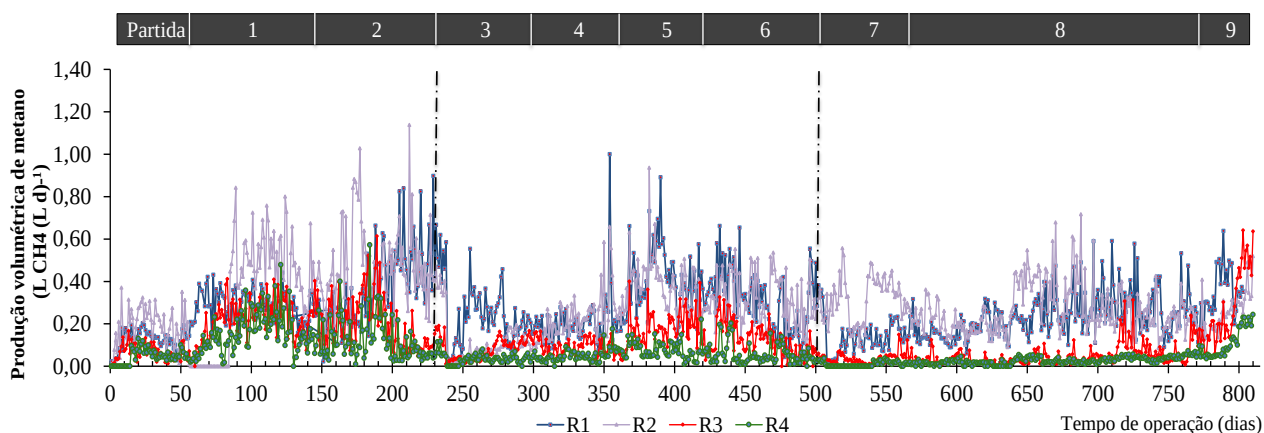


Figura 27. Produção volumétrica de CH_4 dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar durante diferentes fases de operação (partida e fases de 1-9).

Tabela 23. Conteúdo de CH₄ (%) no biogás contido nos reatores horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4), valores médios da produção volumétrica e específica de metano e coeficientes de variação (cv) em diferentes fases de experimento.

		Primeira Safra			Segunda Safra				Terceira Safra			Teste F
		Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
CH ₄ %	R1	38 ^a	37 ^a	35 ^a	64 ^e	64 ^e	64 ^e	61 ^d	58 ^c	55 ^c	45 ^b	40,55**
	cv	12	5	3	2	2	3	11	12	3	2	
	R2	59 ^b	58 ^b	55 ^b	55 ^b	55 ^b	55 ^b	54 ^{ab}	53 ^a	52 ^a	48 ^a	22,03**
	cv	11	6	4	12	2	2	3	11	2	2	
	R3	67 ^{cd}	68 ^{cd}	69 ^{cd}	69 ^{cd}	69 ^{cd}	69 ^{cd}	65 ^c	53 ^b	53 ^b	45 ^a	38,66**
	cv	4	2	3	13	5	5	9	5	3	2	
	R4	58 ^b	58 ^b	58 ^b	58 ^b	58 ^b	58 ^a	56 ^a	57 ^{ab}	55 ^a	51 ^a	77,19**
	cv	7	4	2	2	5	11	2	3	3	2	
Produção Volumétrica de Metano (LCH ₄ (L d) ⁻¹)	R1	0,13 ^a	0,29 ^c	0,38 ^{de}	0,21 ^b	0,21 ^b	0,41 ^e	0,31 ^c	0,13 ^a	0,24 ^b	0,35 ^d	49,43**
	cv	33	25	46	50	59	37	43	46	42	30	
	R2	0,18 ^b	0,34 ^{fg}	0,47 ^h	0,08 ^a	0,24 ^c	0,37 ^g	0,31 ^{ef}	0,30 ^{def}	0,27 ^{cde}	0,26 ^{cd}	38,69**
	cv	54	75	40	56	44	36	39	33	45	35	
	R3	0,07 ^{bc}	0,23 ^f	0,20 ^e	0,08 ^c	0,09 ^c	0,18 ^e	0,12 ^d	0,04 ^a	0,05 ^{ab}	0,28 ^g	82,34**
	cv	58	40	64	57	41	45	63	77	79	61	
	R4	0,06 ^{bcd}	0,16 ^g	0,12 ^f	0,03 ^{bc}	0,05 ^{cd}	0,08 ^e	0,05 ^d	0,01 ^a	0,03 ^b	0,11 ^f	67,56**
	cv	44	59	80	61	58	52	86	104	59	62	
Produção Específica de Metano (LCH ₄ (g DQO removida) ⁻¹)	Sistema	0,12 ^a	0,27 ^e	0,34 ^g	0,12 ^a	0,17 ^{bc}	0,31 ^f	0,24 ^d	0,16 ^b	0,19 ^c	0,28 ^e	93,51**
	cv	37	36	27	34	32	27	31	26	32	29	
	R1	0,10 ^{bc}	0,12 ^c	0,05 ^{ab}	0,13 ^c	0,07 ^b	0,08 ^b	0,03 ^a	0,03 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a	12,52**
	cv	59	66	85	102	134	73	68	73	87	42	
	R2	0,11 ^a	0,15 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,08 ^a	0,20 ^{bc}	0,19 ^{bc}	0,16 ^b	0,15 ^{ab}	0,11 ^a	0,16 ^{ab}	25,37**
	cv	74	35	69	13	56	40	65	62	59	50	
	R3	0,05 ^a	0,10 ^b	0,09 ^b	0,16 ^c	0,07 ^b	0,02 ^a	0,01 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a	0,10 ^b	33,41**
	cv	136	82	135	48	83	74	61	90	89	57	
	R4	0,02 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a	0,07 ^b	0,03 ^a	0,02 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,02 ^a	13,44**
	cv	89	67	117	104	211	114	125	72	70	83	
	Sistema	0,19 ^e	0,11 ^d	0,07 ^{abc}	0,08 ^{bc}	0,09 ^c	0,12 ^d	0,06 ^{ab}	0,07 ^{bc}	0,04 ^a	0,05 ^a	30,72**
	cv	87	47	35	56	32	122	83	47	48	27	

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05); * (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

Conforme proposto neste trabalho, o retorno do efluente após o tratamento de processo oxidativo avançado novamente ao sistema de tratamento biológico permitiu melhor produção volumétrica de metano para a fase 9 quando comparado à fase anterior (sem a aplicação do Fenton), com condições de COVs similares.

5.5. Macro e micronutrientes

Os requisitos ambientais, como a disponibilidade de macro e micronutrientes estão fortemente relacionados ao crescimento e ao consórcio microbiano em reatores anaeróbios. O fósforo e o nitrogênio são nutrientes considerados essenciais para o crescimento e sobrevivência de grupos específicos de microrganismos, e isso inclui os metanogênicos (Chernicharo, 2016).

Os valores médios de NTK no afluente variaram de 366 a 922 mg L⁻¹. Foi verificada redução dos teores de NTK do afluente para o efluente dos reatores R1, R2, R3 e R4 em todas as fases (Tabela 24). As eficiências médias de remoção de NTK pelo sistema (R1+R2+R3+R4) foram de 33, 32, 53, 56, 45, 57, 49, 39, 47 e 62% para o período de partida, e fases de 1 a 9, respectivamente. De acordo com Metcalf e Eddy (2016) o nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas, portanto, dados sobre o nitrogênio são necessários para a avaliação da tratabilidade de substratos por processos biológicos.

Os valores médios das concentrações de fósforo total também estão expressados na tabela 24. Para o afluente do sistema anaeróbio, as concentrações de fósforo total variaram de 15 a 40 mg L⁻¹. O conjunto de reatores promoveu eficiência de remoção de P-total de até 83%, durante a fase 3.

De acordo com Souza (1984), o resíduo a ser tratado necessita de concentrações adequadas de nitrogênio e fósforo para a digestão anaeróbia, e quando este resíduo não possui as quantidades necessárias, o N e P devem ser adicionados ao sistema. Sabe-se que as concentrações de nutrientes contidas na vinhaça de cana-de-açúcar podem variar conforme a característica da matéria-prima (cana-de-açúcar), o processo produtivo de geração de etanol, e também de usina para usina. Deste modo, é comum a variação da composição do substrato ao longo do período de safra.

Segundo Metcalf e Eddy, o fósforo contido no afluente pode ser incorporado no lodo biológico ou ser removido com a adição de produtos químicos. São vários os fatores que podem afetar a remoção química de fósforo em um substrato, como por exemplo: concentração e formas de fósforo no afluente, a presença de sólidos suspensos, alcalinidade, etc. Como pode ser observado na tabela 24, houve a redução das concentrações de fósforo total do afluente para o efluente dos reatores.

De acordo com Chernicharo (2016), a quantidade de nutrientes recomendada pode ser baseada na concentração da matéria orgânica do substrato. Os requisitos de nitrogênio baseiam-se na composição química empírica da célula dos microrganismos. O autor afirma que para a incorporação microbiana de fósforo para a digestão anaeróbia, a quantidade necessária deste nutriente deve ser de aproximadamente 1/5 a 1/7 da quantidade estabelecida para o nitrogênio, recomendando uma relação de DQO : N : P em proporções de 350 : 5 : 1.

Neste experimento, foi verificado no afluente do R1, valores de nitrogênio total kjeldahl superiores aos indicados na literatura. No entanto, os valores de fósforo foram menores que os recomendados (Tabela 24).

De acordo com Onodera et al. (2013), a redução das concentrações de NTK e P-total em reatores anaeróbios podem estar relacionados ao processo de síntese celular (Onodera et al., 2013).

Conforme Latif et al. (2017), o fósforo total também pode ser reduzido ao longo do sistema anaeróbio por meio da precipitação de fosfato de cálcio, ficando desta forma, retido no lodo. A precipitação não intencional de fósforo em um sistema de tratamento e em maneira descontrolada pode acarretar na redução do volume útil dos reatores anaeróbios e elevação de custos, visto que haverá necessidade da suplementação devido à inatividade do fósforo precipitado.

Janke et al. (2016) avaliaram os efeitos da suplementação de nitrogênio na forma de uréia, fosfato e micronutrientes, em um sistema UASB operado em modo semi-contínuo na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar para a produção de biogás. O fosfato adicionado (KH_2PO_4) induziu o acúmulo de ácidos graxos voláteis, provavelmente pelo efeito da inibição do potássio no processo da metanogênese. A uréia acrescentada ao sistema promoveu alcalinidade ao sistema, todavia, o nitrogênio foi acumulado a uma COV de 6,1 g DQO total $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ e TDH de 3,6 dias. Contudo, o sistema operado em condições estáveis, com COV de 9,6 g DQO

total $L^{-1} d^{-1}$ e TDH de 2,5 dias, apresentou percentual de metano elevado atingindo produção específica de metano estável de $239 mL g DQO^{-1}$.

De maneira geral, o processo de digestão anaeróbia exige tanto a presença de macronutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo, bem como micronutrientes, tais como Fe, Zn, Ni, Co e Mn em níveis suficientes para garantir um sistema eficiente e estável. Os elementos-traço podem melhorar a atividade dos microrganismos metanogênicos, pois estes desenvolvem funções essenciais na síntese de coenzimas das vias metabólicas da digestão anaeróbia (Choong et al, 2016). De acordo com Schmidt et al. (2014), a deficiência de micronutrientes pode causar a diminuição do desempenho e aumento das concentrações de AVT.

Demirel e Scherer (2011), também afirmam que a disponibilidade ou a falta de elementos traços como Fe, Co, Ni, Zn, Mo e outros micronutrientes, influenciam na manutenção do processo de digestão anaeróbia e na conversão estável e eficiente da matéria orgânica.

Desta forma, a suplementação de macro ou micronutrientes, quando necessário, são recomendadas para a realização da digestão anaeróbia em condições ótimas, visando a obtenção máxima de biogás por meio da estabilização do material orgânico contido na vinhaça de cana-de-açúcar (Choong et al., 2016).

A metanogênese é o estágio final e mais crítico da digestão anaeróbia, portanto, é importante a realização de estudos que compreendam os requisitos nutricionais dos microrganismos metanogênicos (Demirel e Scherer, 2011; Choong et al., 2016). Os resultados dos micronutrientes verificados no afluente e efluente dos reatores horizontais de leito fixo estão descritos nas tabelas 25, 26, 27 e 28.

Sabe-se que a vinhaça *in natura* é utilizada na fertirrigação em campos de produção de cana-de-açúcar, visto que ela é capaz de fornecer a água e nutrientes essenciais ao vegetal. Todavia, em virtude do grande volume de vinhaça gerada diariamente nas indústrias sucroalcooleiras, a aplicação da vinhaça no solo resulta em despesas significativas com relação ao transporte e aplicação nos campos (Parsaee et al., 2019).

Tabela 24. Relação DQO: N: P no afluente do sistema RAHLF (R1), coeficientes de variação (cv) e valores médios de concentrações de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) e fósforo total (P-T), em mg.L⁻¹, no afluente e efluente dos reatores anaeróbicos horizontais de leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) e eficiência de remoção para o sistema (R1 + R2 + R3 + R4).

		Primeira safra			Segunda safra				Terceira safra			Teste F
Relação DQO:N:P (350:5:1)	DQO N P	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
		350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	
		29	12,8	9,2	14,6	9,9	10,4	11,9	12,4	10,4	8,2	
NTK (mg L ⁻¹)	Afluente	0,8	0,7	0,4	0,9	0,5	0,6	0,3	0,4	0,4	0,4	
		861 ^a	764 ^{bc}	753 ^{abc}	461 ^{abc}	366 ^{ab}	643 ^{abc}	922 ^{cd}	443 ^{de}	704 ^f	513 ^e	
	cv	27	35	37	14	32	49	33	33	27	42	
	R1	405 ^a	585 ^{bc}	356 ^{bc}	129 ^{ab}	153 ^a	215 ^{abc}	419 ^c	313 ^{bc}	375 ^c	379 ^c	10,37**
		60	41	48	93	19	13	16	20	25	29	
	R2	463 ^a	582 ^{cde}	387 ^{cde}	140 ^{abc}	154 ^{ab}	369 ^{bcd}	366 ^{de}	294 ^{bcd}	414 ^e	354 ^{de}	11,08**
		57	31	63	73	98	66	20	29	20	24	
	R3	445 ^a	606 ^{cd}	377 ^{cd}	239 ^{abc}	249 ^{ab}	267 ^{bcd}	407 ^d	292 ^{bcd}	377 ^d	371 ^d	11,68**
		50	34	54	36	50	42	23	30	37	40	
	R4	419 ^f	554 ^h	439 ^g	262 ^c	228 ^b	285 ^d	444 ^g	270 ^{cd}	373 ^e	197 ^a	11,55**
		58	31	60	42	58	45	20	33	31	28	
	%	33 ^{ab}	32 ^{ab}	53 ^{bcd}	56 ^{bcd}	45 ^{bc}	57 ^{bcd}	49 ^{bc}	39 ^{bc}	47 ^c	62 ^e	1,89*
		32	17	16	14	24	18	14	60	46	25	
P-T (mg L ⁻¹)	Afluente	24 ^{abc}	40 ^{ab}	36 ^d	29 ^{abcd}	19 ^{ab}	38 ^{cd}	21 ^{ab}	15 ^a	30 ^{bcd}	28 ^{abcd}	7,99**
		18	18	45	50	66	17	40	31	28	18	
	R1	25 ^{bcd}	22 ^{abc}	28 ^{de}	9 ^a	29 ^{cde}	37 ^e	18 ^{abc}	14 ^{ab}	17 ^{abc}	15 ^{ab}	9,13**
		18	27	48	13	33	10	54	55	51	24	
	R2	25 ^{abcd}	23 ^{abc}	31 ^{cd}	9 ^a	30 ^{bcd}	40 ^d	23 ^{abcd}	11 ^a	14 ^{ab}	14 ^{ab}	7,71**
		15	23	58	16	25	38	80	35	61	26	
	R3	23 ^{bc}	25 ^{bc}	26 ^c	8 ^a	34 ^c	34 ^c	14 ^{ab}	12 ^{ab}	14 ^{ab}	14 ^{ab}	9,64**
		13	36	37	48	10	54	70	44	66	25	
	R4	24 ^{cd}	23 ^{bcd}	26 ^d	14 ^a	27 ^d	29 ^d	13 ^{abc}	8 ^a	12 ^{abc}	9 ^{ab}	10,22**
		26	19	38	18	52	43	52	41	43	35	
	%	65 ^e	42 ^{abc}	35 ^a	83 ^f	43 ^{abc}	39 ^a	52 ^c	60 ^d	68 ^e	66 ^e	2,33*
		6	44	92	8	136	46	32	8	37	19	

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05); * (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

Conforme Rabelo et al. (2015), a contínua aplicação de vinhaça nos campos e em grande volume podem resultar em danos ambientais, tais como a saturação do solo com minerais, reduzindo desta forma, seu potencial de fertilidade. Desta maneira, no plantio de cana, a deposição da vinhaça deve ser limitada pela capacidade do solo em absorver seus constituintes (Parsaee et al., 2019).

A digestão anaeróbia da vinhaça reduz o material orgânico contido no substrato, gerando um efluente ainda com presença de potássio e nutrientes, podendo ser utilizado como fertilizante de forma mais segura e adequada em campo, conforme o tipo do solo. Segundo Santos et al. (2019), a digestão anaeróbia tem sido destacada como a principal abordagem alternativa à fertirrigação da vinhaça *in natura* em um contexto de processamento mais sustentável a fim de alcançar tanto a conformidade ambiental quanto a geração de bioenergia via produção de biogás.

Araújo et al. (2017) testaram os efeitos da suplementação dos micronutrientes ferro, níquel e cobalto na digestão anaeróbia de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) termofílicos, em série. Foi verificado que a suplementação desses elementos promoveu o aumento da produção volumétrica de metano em 101%, redução de AVT e aumento na eficiência de remoção de DQO no primeiro reator (R1). Dentre os elementos avaliados, o ferro foi apontado como o principal componente pelos efeitos da precipitação de sulfeto nas fases de acetogênese e metanogênese da digestão anaeróbia.

Junior et al. (2018) avaliaram quatro reatores horizontais de leito fixo e alta taxa dispostos em série no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, com cargas orgânicas volumétricas variando de 5 a 45 g DQO_{total} (L d)⁻¹ no R1 e com o uso da recirculação do efluente do R4 e com suplementação de nutrientes. Foi observado pelos autores baixas remoções dos nutrientes avaliados (Ca, Fe, Zn, Mg, Cu e Mn), desta forma, grande parte dos elementos permaneceram presentes no efluente. Para este experimento, o afluente apresentou valores de concentrações similares de Fe, Mg, Cu e Mg aos valores relatados por Junior et al. (2018), todavia, para o Ca, os valores verificados para este experimento foram superiores, e para o Zn, valores inferiores.

Neste experimento, foi observado que o potássio (K) (Tabela 25), sódio (Na) e magnésio (Mg) (Tabela 26), permaneceram no efluente do sistema ou não foram removidos. Conforme Fukushima (2019), o potássio e o magnésio são sais inorgânicos que apresentam características de fertilizantes.

O cloreto férrico utilizado neste experimento como sal de ferro para o processo fenton é um dos compostos orgânicos mais comumente utilizados em processos de coagulação e precipitação no tratamento de efluentes (Metcalf e Eddy, 2016). De acordo com Nogueira et al (2017), estudos relatam a formação de complexos de ferro durante o processo de degradação com o processo Fenton, resultantes de reações entre o ferro e o composto alvo e/ou seus intermediários.

Para este experimento, na última fase correspondente à etapa da recirculação parcial do efluente Fenton, foi observado, pela avaliação de micronutrientes, a redução nas concentrações de Fe tanto no afluente quanto para os efluentes dos reatores (R1, R2, R3 e R4) (Tabela 25). Deste modo, podemos inferir que houve precipitação de parte do Fe disponível no efluente do sistema, após a aplicação do processo Fenton à vinhaça biodigerida para a remoção dos compostos recalcitrantes. Em contrapartida, durante todo o período experimental, exceto para a fase 1, foram observadas eficiências de remoção do Fe pelo sistema, que variaram de 30 a 78%.

Santanta Júnior (2013), observou a remoção de Fe na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar e melaço em reatores UASB termofílicos, e apesar de não ter realizado suplementação com Fe, atingiu percentuais de eficiências de remoção de 35 a 58%, atribuindo a remoção às necessidades de Fe na digestão anaeróbia.

Araujo (2017) realizou a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar testando os efeitos da suplementação de nutrientes (Fe, Ni e Co) sobre o processo de tratamento. Ao avaliar a suplementação do Fe, na concentração de 1 mg L^{-1} em reatores UASB termofílicos em dois estágios, operados com COV de $13 \text{ g DQO}_{\text{total}} \text{ L d}^{-1}$, observou que a eficiência de remoção deste elemento pelo sistema decaiu em relação ao período operacional em que não houve a suplementação do elemento-traço, associando os resultados à possível saturação do Fe pelos microrganismos. Para o período inicial do experimento (COV: $4,0 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$), operado sem a suplementação de nutrientes, a concentração de Fe verificada no afluente do sistema foi de $3,64 \text{ mg L}^{-1}$. Em contrapartida, para a fase em que houve a suplementação (COV $13 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$), a concentração de Fe determinado no afluente foi de $93,75 \text{ mg L}^{-1}$. No entanto, a autora relatou que a suplementação com os micronutrientes favoreceu a estabilidade do sistema e auxiliou nas eficiências de remoção da DQO total. Além disto, a adição do Fe teve efeito sobre a precipitação de sulfeto, também avaliado no experimento.

Demirel e Scherer (2011) avaliaram a influência de ferro, níquel e cobalto na produção de biogás em digestor mesofílico em escala laboratório (3 L) tratando resíduos de frutas, após adição de 4 kg/m^3 de FeCl_3 , e relataram aumento do teor de AGV's, porém, verificaram que houve aumento significativo sobre o rendimento de metano. Gustavsson et al. (2011) também testaram a digestão anaeróbia de vinhaça avaliando concentrações distintas de Fe, Ni e Co em digestores de bancada (5 L) operados com COV de $4 \text{ g DQO total L d}^{-1}$ dia. Os autores observaram que as concentrações ótimas foram de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Co e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni para a obtenção de melhores rendimentos de metano.

Karlsson et al. (2012) verificaram o efeito da adição de oligoelementos (Fe, Ni e Co) na digestão anaeróbia da codigestão de resíduos de matadouro (51%), esterco (38%), resíduo sólido urbano (6%), gordura (3%) e outros resíduos da indústria alimentícia (2%), e relataram efeitos positivos do acréscimo da adição dos micronutrientes, melhorando a degradação de acetato, propionato e na produção de metano. Martins et al., 2018 avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de elementos traço (Co, Mo, Fe e Ni), em separado e em conjunto, sobre a digestão anaeróbia de resíduos alimentares de restaurante. Os resultados demonstraram que a adição de ferro ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$), e níquel ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em separado e a adição da combinação de Co, Fe e Ni ($1,0$, $5,0$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) tiveram efeito positivo na digestão anaeróbia, resultando no incremento da produção de metano a partir da degradação do resíduo alimentar. Os resultados do sequenciamento mostraram que a adição dos elementos traço aumentou a abundância dos microrganismos metanogênicos, tanto acetoclásticas Methanosaeta, quanto hidrogenotróficas Methanospirillaceae.

Zhang et al. (2015) verificaram o efeito da adição de Fe, Ni, Co e Mo para a digestão anaeróbia de resíduos alimentares e relataram que concentrações de 1000 mg L^{-1} de Fe e 50 mg L^{-1} de Ni, causaram inibição em arqueias metanogênicas enquanto que concentrações de 100 mg L^{-1} de Fe, 1 mg L^{-1} de Co, 5 mg L^{-1} de Ni e 5 mg L^{-1} de Mo provocaram 35,5% de aumento na produção de metano, indicando que estes metais resultaram em efeito sinérgico na digestão anaeróbia. De acordo com Chernicharo (2016), o ferro, níquel, cobalto e molibdênio são os principais micronutrientes requeridos pelas bactérias que formam o metano a partir do acetato (Chernicharo, 2016). Porém, a presença de nutrientes não indica biodisponibilidade dos mesmos, pois, estes podem estar complexados com outros metais, impossibilitando que os microrganismos os utilizem (Speece, 2008).

Neste experimento, como relatado, a concentração de Fe na última etapa do experimento (fase 9) apresentou a menor concentração de Fe no afluente ($4,3 \text{ mg L}^{-1}$), podendo estar associado ao teste de Fenton aplicado no efluente utilizado para a recirculação. De acordo com Araujo et al. (2008), apesar das vantagens da aplicação do Fenton, o uso da reação de Fenton em escala industrial ainda tem sido visto com certo receio devido ao fato do processo apresentar um grande potencial para geração de lodo pela precipitação de íons Fe^{3+} como hidróxido. O hidróxido de ferro (II) ou hidróxido ferroso é um composto insolúvel. O ferro, quando disponível para a assimilação dos microrganismos presentes no sistema de tratamento anaeróbio, pode ser incorporado às células, e posteriormente, ser liberado na forma de estruvita. A presença de estruvita nos sistemas de tratamento pode causar incrustações nas tubulações e em equipamentos mecânicos presentes em ETEs (Morita et al., 2019).

Segundo Metcalf e Eddy (2016) a estruvita é resultante da formação de fosfato de amônia e magnésio hexahidratado ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Todavia, em sistemas de tratamento anaeróbio também são comuns a presença de outras formas de precipitado, incluindo o fosfato de cálcio ($\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), vivianita ($(\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$) e varicita ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). De acordo com Jahnen-Dechent e Ketteler (2012), como a estruvita contém magnésio em sua estrutura, isto faz com que essa substância apresente alta resistência para o estado de hidratação, conferindo a capacidade de se dissolver mais lentamente em água, e como consequência, possibilitando sua aplicação como fertilizante em dose única, uma vez que os nutrientes são liberados lentamente, acompanhando o processo de crescimento da planta.

Existem diferentes tecnologias, incluindo em estágios de desenvolvimento, para a remoção de nutrientes na forma de estruvita, sendo que o método mais utilizado envolve a remoção de amônia e fosfato na forma de cristais. A prática da formação de estruvita para a recuperação de nutrientes tem sido bastante considerada, visto que apresenta um grande potencial econômico, que possibilita a aplicação dos compostos recuperados tornando-os disponíveis para a aplicação em outras atividades, como por exemplo, o seu emprego como fertilizante (Castro et al., 2015).

Conforme Suela et al (2018) existe um grande potencial para a produção de estruvita aliado à recuperação de nitrogênio e fósforo em efluentes, tornando-se uma ótima oportunidade de geração de conhecimento científico sobre a produção de estruvita a partir de efluentes ricos em nutrientes, além de grandes possibilidades do seu aproveitamento de maneira sustentável.

Tabela 25. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos micronutrientes K, Co e Fe, em mg L⁻¹, no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).

Fases	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	cv	Teste F
K												
Afluente	185,4 ^d	121,2 ^c	101,7 ^{bc}	37,5 ^a	54,4 ^{ab}	53,3 ^{ab}	34,6 ^a	43,4 ^a	39,7 ^a	32,8 ^a	57	9,95 ^{**}
Efluente (R1)	77,6 ^a	54,2 ^{ab}	60,1 ^{ab}	55,0 ^{ab}	55,0 ^{ab}	22,9 ^{ab}	22,9 ^a	19,9 ^a	24,4 ^a	30,8 ^a	70	3,25 ^{**}
Efluente (R2)	83,5 ^d	63,4 ^{cd}	56,3 ^{bc}	42,5 ^{ab}	40,6 ^{ab}	57,5 ^{bc}	22,7 ^a	18,5 ^a	15,8 ^a	30,4 ^{ab}	56	8,53 ^{**}
Efluente (R3)	79,4 ^d	70,6 ^{cd}	55,8 ^{bc}	41,3 ^{ab}	43,1 ^{ab}	53,3 ^{bc}	21,7 ^a	20,3 ^a	21,6 ^a	34,5 ^{ab}	43	11,42 ^{**}
Efluente (R4)	85,0 ^d	50,6 ^{cd}	59,9 ^{bc}	57,5 ^c	33,1 ^{ab}	64,2 ^{cd}	23,3 ^a	16,6 ^a	17,8 ^a	26,3 ^{ab}	47	12,14 ^{**}
Eficiência (R1 +R4)	45 ^b	50 ^b	24 ^a	-	23 ^a	-	23 ^a	63 ^c	57 ^{bc}	29 ^a	12	7,7 ^{**}
Co												
Afluente	0,1 ^a	0,3 ^{ab}	9,7 ^c	0,5 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	0,4 ^b	0,3 ^{ab}	0,2 ^a	0,18 ^a	32	12,57 ^{**}
Efluente (R1)	0,1 ^a	0,1 ^a	3,8 ^c	0,3 ^b	0,3 ^b	0,3 ^b	0,1 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,05 ^b	23	9,53 ^{**}
Efluente (R2)	0,1 ^a	0,1 ^a	3,8 ^c	0,3 ^{ab}	0,3 ^{ab}	0,3 ^{ab}	0,1 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,04 ^b	55	10,11 ^{**}
Efluente (R3)	0,1 ^a	0,1 ^a	4,4 ^d	0,3 ^b	0,3 ^b	0,3 ^b	0,1 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,05 ^c	19	5,11 ^{**}
Efluente (R4)	0,1 ^a	0,1 ^a	4,4 ^d	0,3 ^b	0,3 ^b	0,3 ^b	0,2 ^b	0,1 ^a	0,1 ^a	0,05 ^c	12	21,12 ^{**}
Eficiência (R1 +R4)	-	39 ^b	37 ^b	49 ^c	36 ^b	21 ^a	60 ^{cd}	67 ^d	66 ^d	51 ^c	55	2,24 [*]
Fe												
Afluente	31,4 ^f	8,5 ^c	10,0 ^d	8,8 ^c	17,1 ^f	15,9 ^e	6,8 ^b	23,7 ^g	11,9 ^d	4,3 ^a	22	3,43 [*]
Efluente (R1)	6,7 ^b	6,0 ^b	6,4 ^b	6,3 ^b	4,9 ^a	7,1 ^c	6,2 ^b	6,3 ^b	11,1 ^d	3,1 ^a	51	3,73 ^{**}
Efluente (R2)	6,5 ^d	7,2 ^e	3,8 ^b	3,8 ^b	5,0 ^c	3,3 ^b	2,3 ^a	6,8 ^d	7,7 ^{de}	2,1 ^a	51	4,11 ^{**}
Efluente (R3)	6,9 ^c	8,5 ^d	46,0 ^e	2,8 ^a	3,8 ^{ab}	3,3 ^a	4,4 ^b	6,7 ^c	6,8 ^c	1,9 ^a	75	1,49 ^{**}
Efluente (R4)	6,9 ^c	8,5 ^d	9,2 ^d	6,3 ^c	4,4 ^b	5,0 ^b	1,5 ^a	4,8 ^b	7,1 ^c	1,5 ^a	93	13,40 ^{**}
Eficiência (R1 +R4)	36 ^b	-	46 ^{cd}	30 ^a	74 ^f	66 ^e	78 ^f	41 ^c	54 ^d	53 ^d	52	3,44 ^{**}

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($P>0,05$); * ($p<0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($p<0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 26. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos micronutrientes Mg, Na e Cu, em mg L⁻¹, no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).

Fases	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	cv	Teste F
Mg												
Afluente	34,0 ^c	22,8 ^b	19,0 ^{ab}	7,5 ^a	11,9 ^{ab}	13,3 ^{ab}	14,2 ^{ab}	8,0 ^a	18,3 ^{ab}	15,8 ^{ab}	45	3,98**
Efluente (R1)	13,9 ^b	10,9 ^b	15,8 ^b	15,0 ^b	15,6 ^b	15,4 ^b	15,6 ^b	4,0 ^a	9,7 ^{ab}	9,6 ^{ab}	41	3,48**
Efluente (R2)	13,6 ^{bcd}	13,0 ^{bcd}	9,8 ^{abcd}	8,8 ^{abc}	13,8 ^{cd}	15,8 ^{cd}	18,8 ^d	4,2 ^a	7,8 ^{ab}	7,6 ^{ab}	46	4,35*
Efluente (R3)	13,3 ^{cd}	13,5 ^{cd}	15,4 ^{cd}	10,0 ^{bc}	13,1 ^{cd}	17,5 ^d	16,7 ^{cd}	4,2 ^a	7,3 ^{ab}	6,4 ^{ab}	34	9,41**
Efluente (R4)	14,7 ^{bcd}	15,1 ^{bcd}	20,9 ^d	13,8 ^{bcd}	9,4 ^{abc}	17,5 ^{cd}	16,3 ^{bcd}	3,8 ^a	8,7 ^{ab}	6,5 ^{ab}	48	5,60**
Eficiência (R1 +R4)	31 ^a	83 ^d	-	-	18 ^a	-	-	44 ^b	50 ^c	55 ^c	34	3,22*
Na												
Afluente	209,4 ^b	187,5 ^b	117,2 ^a	265,0 ^c	340,6 ^d	366,7 ^d	335,0 ^d	103,8 ^d	103,4 ^a	75,4 ^a	18	76,61**
Efluente (R1)	106,6 ^c	98,1 ^c	65,2 ^b	297,5 ^e	340,0 ^f	367,5 ^g	168,5 ^d	51,1 ^{ab}	53,6 ^{ab}	36,7 ^a	18	185,92**
Efluente (R2)	101,9 ^b	98,4 ^b	56,6 ^{ab}	261,3 ^d	260,2 ^d	366,7 ^e	181,9 ^c	50,7 ^{ab}	52,6 ^{ab}	38,5 ^a	37	40,36**
Efluente (R3)	92,5 ^b	95,6 ^b	57,2 ^a	323,8 ^d	349,4 ^{de}	374,2 ^e	172,9 ^c	51,1 ^a	51,2 ^a	31,3 ^a	19	188,80**
Efluente (R4)	98,1 ^c	105,5 ^c	62,8 ^b	361,3 ^f	313,1 ^e	368,3 ^f	165,2 ^d	50,7 ^b	54,4 ^b	19,7 ^a	17	214,40**
Eficiência (R1 +R4)	25 ^b	27 ^b	18 ^a	-	10 ^a	-	51 ^c	51 ^c	48 ^c	71 ^d	26	11,20**
Cu												
Afluente	0,9 ^b	0,4 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,7 ^b	0,1 ^a	1,0 ^b	1,0 ^b	19	12,43**
Efluente (R1)	0,3 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,1 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,4 ^a	34	19,24**
Efluente (R2)	0,2 ^a	0,7 ^b	0,1 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,2 ^a	0,1 ^a	0,4	0,4 ^a	0,5 ^{ab}	32	9,32**
Efluente (R3)	0,2 ^a	0,4 ^b	0,1 ^a	0,3 ^{ab}	0,1 ^a	0,1 ^a	0,0 ^a	0,5 ^b	0,4 ^{ab}	0,5 ^{ab}	22	8,98**
Efluente (R4)	0,4 ^a	0,6 ^b	0,1 ^a	0,1 ^a	0,2 ^a	0,1 ^a	0,0 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	19	5,91**
Eficiência (R1 +R4)	41 ^a	41 ^a	37 ^a	93 ^d	38 ^a	78 ^c	93 ^d	-	64 ^b	64 ^b	-	11,48**

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05); * (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 27. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos micronutrientes Mg, Na e Cu, em mg L⁻¹, no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).

Fases	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	cv	Teste F
Ni												
Afluente	0,45 ^c	0,19 ^a	0,24 ^b	0,53 ^d	0,46 ^c	0,60 ^e	0,21 ^b	0,15 ^a	0,46 ^c	0,15 ^a	43	9,83*
Efluente (R1)	0,15 ^b	0,08 ^a	0,12 ^b	0,52 ^e	0,31 ^d	0,33 ^d	0,20 ^c	0,05 ^a	0,13 ^b	0,05 ^a	38	3,36*
Efluente (R2)	0,18 ^c	0,15 ^{bc}	0,13 ^b	0,29 ^d	0,27 ^d	0,27 ^d	0,13 ^b	0,05 ^a	0,11 ^b	0,05 ^a	22	11,47**
Efluente (R3)	0,17 ^c	0,12 ^b	0,10 ^b	0,26 ^d	0,27 ^d	0,26 ^d	0,26 ^d	0,03 ^a	0,06 ^a	0,03 ^a	35	12,87**
Efluente (R4)	0,25 ^c	0,13 ^b	0,10 ^b	0,28 ^c	0,28 ^c	0,28 ^c	0,28 ^c	0,05 ^a	0,05 ^a	0,03 ^a	25	14,65**
Eficiência (R1 +R4)	54 ^d	30 ^b	55 ^d	47 ^c	48 ^c	67 ^e	52 ^d	62 ^e	33 ^b	5 ^a	45	8,76**
Mn												
Afluente	4,7 ^b	3,1 ^a	7,5 ^d	5,3 ^b	5,8 ^{bc}	7,8 ^d	9,4 ^e	1,8 ^a	4,8 ^b	2,5 ^a	22	4,87**
Efluente (R1)	2,0 ^b	1,6 ^b	7,5 ^d	2,4 ^b	2,1 ^b	4,2 ^c	1,9 ^{ab}	0,5 ^a	2,8 ^b	1,1 ^b	12	13,98*
Efluente (R2)	2,2 ^b	1,6 ^{ab}	3,8 ^c	0,8 ^a	1,1 ^a	1,8 ^b	0,8 ^a	0,4 ^a	2,1 ^b	1,1 ^a	24	9,65**
Efluente (R3)	1,9 ^b	1,7 ^b	3,6 ^c	1,3 ^b	1,9 ^b	2,7 ^c	2,7 ^c	0,4 ^a	1,2 ^b	1,2 ^b	12	6,09**
Efluente (R4)	2,2 ^b	2,0 ^b	3,9 ^c	3,4 ^c	2,7 ^b	3,3 ^{bc}	2,7 ^b	0,3 ^a	1,2 ^a	0,7 ^a	36	23,65**
Eficiência (R1 +R4)	39 ^a	31 ^a	161	36 ^a	52 ^b	58 ^b	66 ^c	85 ^d	73 ^c	31 ^a	43	3,83**
Ca												
Afluente	21,0 ^b	8,5 ^a	9,1 ^a	38,8 ^d	27,5 ^c	42,5 ^d	43,8 ^d	12,0 ^a	28,9 ^c	18,0 ^a	43	22,92**
Efluente (R1)	6,8 ^a	4,9 ^a	4,6 ^a	28,8 ^d	27,5 ^{cd}	44,2 ^e	22,5 ^c	4,1 ^a	11,0 ^b	9,3 ^b	34	38,61**
Efluente (R2)	7,9 ^a	5,5 ^a	4,0 ^a	26,3 ^c	25,6 ^c	39,2 ^d	26,0 ^c	4,9 ^a	10,0 ^{ab}	7,6 ^a	56	6,50*
Efluente (R3)	9,5 ^b	5,9 ^a	3,7 ^a	36,3 ^d	27,5 ^c	41,7 ^d	33,5 ^{cd}	5,0 ^a	8,2 ^b	9,2 ^b	35	32,76**
Efluente (R4)	9,0 ^b	7,6 ^b	7,0 ^b	35,0 ^d	16,3 ^d	41,7 ^d	31,7 ^d	4,0 ^a	7,4 ^b	3,9 ^a	32	23,59**
Eficiência (R1 +R4)	54 ^c	30 ^b	25 ^b	10 ^a	63 ^d	9 ^a	27 ^b	63 ^d	67 ^d	78 ^e	54	8,52*

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05); * (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 28. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações do micronutriente Zn, em mg L⁻¹, no afluente e efluente dos reatores anaeróbios horizontais (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção (%) pelo sistema (R1+R2+R3+R4).

Fases	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	cv	Teste F
Zn												
Afluente	0,3 ^a	0,3 ^a	1,1 ^b	0,4 ^{ab}	0,6 ^b	0,3 ^a	0,3 ^a	1,1 ^b	1,5 ^b	1,4 ^b	23	12,01 ^{**}
Efluente (R1)	0,1 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,1 ^a	0,2 ^a	0,7 ^b	0,5 ^{ab}	43	14,32 ^{**}
Efluente (R2)	0,1 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,7 ^b	0,3 ^a	35	15,90 ^{**}
Efluente (R3)	0,1 ^a	0,1 ^a	0,2 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,8 ^b	0,1 ^a	0,4 ^a	0,7 ^b	0,3 ^a	29	23,10 ^{**}
Efluente (R4)	0,1 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,3 ^a	0,2 ^a	0,3 ^a	0,1 ^a	0,1 ^a	0,4 ^a	0,2 ^a	32	9,02 ^{**}
Eficiência (R1 +R4)	52 ^c	24 ^a	26 ^a	23 ^a	76 ^{de}	-	47 ^b	81 ^e	73 ^d	78 ^d	46	8,51 ^{**}

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% (P>0,05); * (p<0,05) significativo a 5% de probabilidade; ** (p<0,01) significativo a 1% de probabilidade.

5.6. Sulfato, sulfeto e fenóis totais

A vinhaça de cana-de-açúcar possui em sua composição quantidades significativas de sulfato, devido ao processo de sulfitação para a produção do açúcar e à adição de ácido sulfúrico para o controle de possíveis contaminações microbianas durante o processo da fermentação alcoólica.

Conforme Parsaee et al., (2019), o alto teor de enxofre presente na vinhaça também é considerado um dos desafios para produção de biogás, visto que pode causar efeitos indesejáveis na digestão anaeróbia, além de influenciar negativamente a biodisponibilidade de oligoelementos no interior dos biorreatores.

O teor de enxofre contido na vinhaça é de 4 a 10 vezes maior do que a concentração ideal para a produção de biogás, entretanto o enxofre é um nutriente necessário para microrganismos metanogênicos, em baixas concentrações (Parsaee et al., 2019). Contudo, quando atinge altos valores, se torna um interferente na composição do biogás. O sulfato contido na vinhaça é reduzido a sulfeto por bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Barrera et al., 2014; Parsaee et al., 2019). As BRS na ausência de oxigênio utilizam o sulfato como receptor de elétrons na oxidação do substrato, gerando o sulfeto de hidrogênio (H_2S). Efluentes com grandes quantidades de sulfato favorecem o crescimento de bactérias sulforedutoras, podendo ocasionar um desequilíbrio no processo de digestão anaeróbia visto que as BRS competem pelos mesmos substratos que as metanogênicas, tais como H_2 , CO_2 e acetato (Madden et al., 2014). Sendo assim, a redução de sulfato pode se tornar prejudicial à produção de metano em sistemas de tratamento de águas residuárias, e, além disto, grandes quantidades de H_2S podem gerar problemas de corrosão em tubulações do sistema de tratamento, acarretando no aumento de custo para o reparo do mesmo.

Normalmente, as concentrações de sulfato observadas em águas residuárias não são tóxicas, mas acabam se tornando quando são reduzidas a sulfeto, podendo inibir o processo anaeróbio não só pela competição entre BRS e microrganismos metanogênicos, mas também pela sua toxicidade, importante inibidor da metanogênese (Callado et al., 2017).

De acordo com Metcalf e Eddy (2016), a atividade metanogênica pode ser reduzida em até 50% ou mais para concentrações de H_2S variando de 50 a 250 mg L^{-1} , todavia o grau de toxicidade do H_2S também dependerá do tipo de biomassa (granular ou dispersa) presente no sistema e da população microbiana. Em relação às concentrações de sulfeto, Chen et al. (2008) alegam que concentrações entre 100 a 800 mg. L^{-1} podem causar uma inibição nos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia. As concentrações médias de sulfeto no afluente do sistema de tratamento neste estudo foram inferiores a 100 mg. L^{-1} somente durante a etapa de partida dos reatores e nas fases 1 e 9 (Tabela 29). As demais concentrações médias de sulfeto e de sulfato verificadas durante este experimento estão descritas na tabela 29. Foram verificados no afluente do sistema de tratamento, altos teores de sulfato. O sistema RAHLF de tratamento promoveu o decaimento das concentrações de sulfato durante as fases 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 visto que os efluentes dos reatores R1, R2, R3 e R4 apresentaram concentrações médias deste composto inferiores quando comparado aos do afluente. As maiores concentrações médias de sulfato no afluente foram observadas na fase 1, 2, 4, 5 e 6, apresentando valores médios de 1180, 1357, 1129, 1329 e 1386 mg L^{-1} , respectivamente (Tabela 29). De acordo com Chernicharo (2016), valores da relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ acima de 10 são sugeridas para o bom desempenho do processo da metanogênese, pois desta forma, é considerado que parte do H_2S (forma não dissociada e mais tóxica) é removido da fase líquida favorecendo a formação da espécie HS^- (forma dissociada, menos tóxica). Quando esta razão diminui, as bactérias redutoras de sulfato são favorecidas por sua maior afinidade ao substrato.

Os valores médios da razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ verificados neste estudo estão expressos na tabela 30. De maneira geral, os reatores RAHLF - R1, R2, R3 e R4 apresentaram valores da relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ acima 10 durante a fase 1 e fases 8 e 9 do experimento. O R4, com exceção das fases 1, 8 e 9, apresentaram valores <10 (Figura 28), indicando um ambiente favorável a produção de sulfeto. Lu et al. (2016) obtiveram resultados interessantes de remoção de DQO e sulfato em razões de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ acima de 2,0 no tratamento anaeróbio de águas residuárias de amido em reator UASB, mas verificou instabilidade no sistema quando a razão decresceu para 2,0, e acúmulo de AGV em razões de 1,0 e de 0,5.

Tabela 29. Valores médios e coeficiente de variação (cv) das concentrações de sulfato, sulfeto e fenóis totais no afluente e efluentes dos reatores horizontais R1, R2, R3 e R4 tratando vinhaça de cana-de-açúcar.

		2017			2018				2019			
Parâmetros		Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Teste F
Sulfato (mg L ⁻¹)	Afluente	800 ^b	1180 ^c	1357 ^c	695 ^b	1129 ^c	1329 ^c	1386 ^c	783 ^{ab}	747 ^b	500 ^a	16,60**
	cv	71	11	24	53	14	14	19	13	12	12	
	R1	950 ^c	1160 ^d	1143 ^d	1075 ^d	857 ^b	986 ^c	1229 ^d	692 ^b	612 ^b	360 ^a	11,43**
	cv	60	29	10	27	29	21	21	21	20	49	
	R2	700 ^b	1020 ^c	914 ^c	700 ^b	843 ^b	957 ^c	879 ^b	742 ^b	600 ^b	370 ^a	9,05**
	cv	81	4	24	31	18	13	30	16	24	31	
	R3	750 ^{cd}	880 ^d	1029 ^d	825 ^d	657 ^c	829 ^d	1093 ^d	708 ^{cd}	588 ^b	340 ^a	7,42**
	cv	104	26	9	27	21	22	13	13	21	26	
	R4	950 ^d	1020 ^e	1057 ^{de}	1000 ^{de}	1014 ^e	1186 ^e	971 ^d	767 ^c	603 ^b	320 ^a	12,83**
cv	22	25	16	29	28	15	32	15	24	48		
Sulfeto (mg L ⁻¹)	Afluente	44 ^b	20 ^a	140 ^c	246 ^d	192 ^d	222 ^d	157 ^c	153 ^c	145 ^c	42 ^b	5,22**
	cv	39	85	32	51	43	49	39	31	23	72	
	R1	52 ^a	154 ^{bc}	144 ^b	230 ^{cd}	246 ^d	200 ^{bcd}	193 ^{bcd}	192 ^{bcd}	191 ^{bcd}	56 ^a	4,48*
	cv	167	54	47	33	19	21	39	15	40	58	
	R2	68 ^a	96 ^a	143 ^{ab}	208 ^b	184 ^b	189 ^b	213 ^b	149 ^{ab}	149 ^{ab}	75 ^a	3,95*
	cv	25	65	34	54	9	33	39	27	32	14	
	R3	84 ^{ab}	64 ^a	152 ^{bcd}	240 ^e	167 ^{cde}	178 ^{cde}	229 ^{de}	235 ^{de}	134 ^{abc}	67 ^a	7,09**
	cv	101	119	62	43	15	36	15	4	46	93	
	R4	56 ^a	76 ^a	117 ^{ab}	152 ^{bc}	155 ^{bc}	216 ^c	198 ^c	217 ^c	184 ^{bc}	52 ^a	6,29**
cv	137	101	37	18	18	14	34	14	40	40		
Fenóis Totais (mg L ⁻¹)	Afluente	68 ^b	138 ^{de}	132 ^e	123 ^d	112 ^d	98 ^c	86 ^c	55 ^b	123 ^d	38 ^a	7,68**
	cv	13	29	12	4	16	6	25	41	26	34	
	R1	40 ^a	92 ^c	119 ^d	107 ^c	124 ^d	94 ^c	83 ^b	77 ^b	129 ^e	30 ^a	14,28**
	cv	7	34	12	14	19	11	25	33	15	45	
	R2	50 ^b	75 ^c	109 ^e	119 ^e	122 ^e	90 ^d	73 ^c	85 ^d	129 ^f	34 ^a	8,52**
	cv	14	49	14	8	25	8	18	21	34	31	
	R3	42 ^b	82 ^c	112 ^d	100 ^d	113 ^d	85 ^c	86 ^c	98 ^d	129 ^e	34 ^a	7,90**
	cv	2	51	11	12	36	18	15	21	26	32	
	R4	39 ^a	101 ^d	111 ^d	111 ^d	120 ^e	90 ^c	80 ^b	73 ^b	124 ^e	34 ^a	10,89**
cv	1	30	30	7	26	13	12	61	23	15		

Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% ($P > 0,05$); * ($p < 0,05$) significativo a 5% de probabilidade; ** ($p < 0,01$) significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 30. Relações de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ nos afluentes e efluentes dos reatores horizontais R1, R2, R3 e R4 em diferentes fases experimentais.

	Partida	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Afluente	13,0	17,7	21,2	15,9	11,4	16,3	19,6	15,9	31,5	43,9
R1	9,2	14,3	16,4	6,1	9,2	12,6	11,1	11,1	21,7	27,8
R2	10,8	14,7	16,0	8,0	7,8	11,7	13,6	7,3	17,9	20,5
R3	8,8	14,5	11,8	6,4	8,5	11,7	9,9	6,3	13,8	14,4
R4	6,3	11,3	9,7	4,6	5,0	6,9	9,4	4,9	11,1	10,5

De acordo com a tabela 30, é possível observar que para as fases 8 e 9, os valores da relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ verificados tanto no afluente como para os efluentes dos reatores R1, R2, R3 e R4 estão de acordo com valores sugeridos por Chernicharo et al (2016), acima de 10.

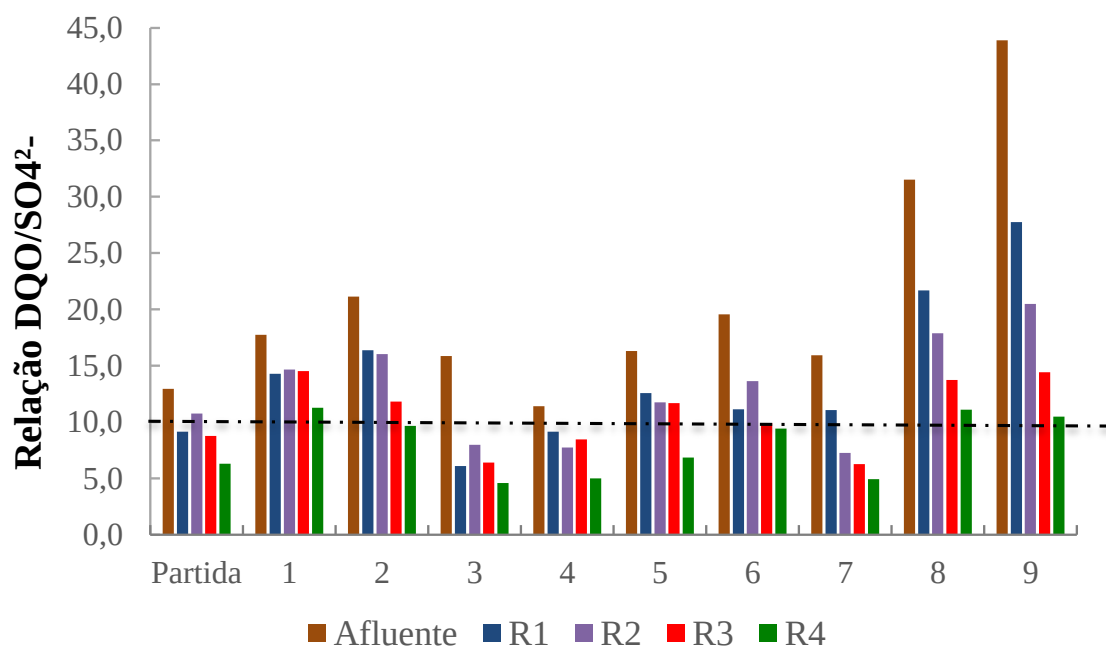


Figura 28. Valores da relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ nos afluentes e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série, no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

Conforme Callado et al. (2017) a metanogênese e a sulfetogênese na digestão anaeróbia também pode ser influenciada por outros fatores, como por exemplo, a presença de sais. Em ambientes salinos os microrganismos metanogênicos podem ter a sua fisiologia afetada pela constituição catiônica celular e pela concentração do cátion no meio, ao passo que as bactérias redutoras de sulfato não são afetadas (Callado et al., 2017; Muyzer e Stams, 2008).

Sendo assim, torna-se complexo o entendimento sobre a toxicidade, visto que a maioria das pesquisas abordam os efeitos da relação DQO/SO_4^{2-} sobre a remoção de matéria orgânica e sulfato, sem discutir os efeitos inibitórios promovidos pela ação de cátions (Callado et al., 2017), além de outros compostos tóxicos presentes no afluente, como a presença de fenóis.

Conforme descrito anteriormente, o sulfeto de hidrogênio é formado pela decomposição anaeróbia da matéria orgânica que possui enxofre em sua composição, ou ainda pela redução de sulfetos e sulfatos minerais. Este gás não possui coloração, é tóxico, e em elevadas concentrações pode afetar as glândulas olfativas em seres humanos, gerando riscos aos operadores de sistemas de tratamento anaeróbios sem equipamentos de proteção (Metcalf e Eddy, 2016). Portanto, a monitorização adequada em processos de tratamento de digestão anaeróbia envolvendo substratos com elevada concentração de sulfato é de grande importância.

A fase 9 do experimento, correspondente à combinação integrada do tratamento químico Fenton com o processo de digestão anaeróbia, apresentou menor concentração de sulfato no afluente (747 mg L^{-1}) em comparação à fase anterior (fase 8) (500 mg L^{-1}), que não recebeu recirculação parcial do efluente tratado com Fenton (Tabela 29).

A tabela 29 demonstra que para o sulfeto, houve pequenas remoções das concentrações para as fases 2, 3 e 5, todavia, os valores ainda permaneceram elevados no sistema RAHLF. Em contrapartida, a fase 9 apresentou um afluente com concentração de sulfeto inferior (42 mg L^{-1}) em relação à fase anterior (145 mg L^{-1}). Sendo assim, a adição de sais de ferro durante a fase 9 para o processo Fenton no efluente do R4 para a posterior recirculação parcial ao sistema, pode ter promovido remoções do sulfeto por precipitação no formato de sulfeto ferroso FeS , conforme também verificado por

(Zhang et al., 2008). De acordo com Metcalf e Eddy (2016), para processos oxidativos avançados, dependendo da forma de aplicação desejada e finalidade do processo, a oxidação completa de um substrato pode não ser necessária, visto que a oxidação parcial pode ser o suficiente para tornar alguns componentes mais específicos a formas mais adaptadas ao tratamento biológico, de modo a reduzir a sua toxicidade, sendo este um dos objetivos deste trabalho.

Apesar da concentração de sulfeto verificado no afluente do sistema RAHLF estar acima das condições ideais para digestão anaeróbia e da presença de elevadas quantidades de sulfato no sistema durante a maioria das fases operacionais do experimento, o sistema RAHLF produziu biogás, apresentou estabilidade e eficiências de remoção de DQO total acima de 60% para a fase 2 e fases de 4 a 9, sendo esta última fase a responsável pela maior eficiência de remoção (Tabela 21).

De acordo com Arias (2010), a composição do biometano gerado no processo da digestão anaeróbia pode interferir na sua qualidade, podendo estar relacionado, principalmente, aos teores de H_2S e CO_2 . Deste modo, dependendo da aplicação do biogás gerado em substratos com altos teores de sulfato, pode ser necessária a dessulfurização, como um tratamento prévio. Como exemplo, para o biometano, biocombustível gasoso obtido a partir da purificação do biogás, há limites de concentrações de H_2S para uso conforme a finalidade empregada, tais como: uso em caldeiras: até 1000 mg L^{-1} ; micro-turbinas: até 70000 mg L^{-1} ; motores de combustão interna: até 100 mg L^{-1} ; células combustíveis: até 20 mg L^{-1} ; gasodutos: até 4 mg L^{-1} (Arias, 2010).

Além do sulfeto e sulfato, existem outras variedades de substâncias que vêm sendo relatadas como inibidoras dos processos de digestão anaeróbia visto que afetam negativamente os microrganismos envolvidos. Estas substâncias podem estar contidas na matéria orgânica, ou podem ser geradas durante a sua degradação (Chapleur et al., 2015; Chen et al., 2018). Os compostos fenólicos, por exemplo, é um deles e estão presentes em diversos tipos de efluentes industriais, e quando se apresentam em altas concentrações, também podem dificultar o processo da digestão anaeróbia e a produção de biogás (Chapleur et al., 2015).

Neste trabalho a maior concentração de fenóis no afluente foi verificada na fase 1 do experimento (Tabela 29). De maneira geral, embora tenha sido observada redução dos valores médios da concentração de fenóis pelo sistema, este ainda permanecia no efluente do R4.

A recirculação constante do efluente do R4 ao sistema de tratamento possui o inconveniente de reintroduzir ao conjunto de reatores os compostos recalcitrantes que não foram degradados pela digestão anaeróbia, desta forma, estes persistem no sistema. Sabe-se que a presença de certas substâncias recalcitrantes e inibidoras na vinhaça dificulta gravemente o processo anaeróbico, e estas substâncias são principalmente compostos fenólicos e melanoidinas (Aquino e Pires, 2016). Estes compostos podem vir a inibir ou reduzir a atividade de microrganismos durante o tratamento da vinhaça (Gebreeyessus et al., 2019). No entanto, para este experimento, foi observado que da fase 8 para a fase 9, o afluente apresentou menor concentração de fenol total para a última fase (Tabela 29), o que nos permite concluir que parte do material recalcitrante presente no efluente do R4 durante as fases anteriores, foi degradado pelo processo Fenton.

Botello-Suárez et al (2018) realizaram a recirculação parcial de efluente biodigerido e tratado posteriormente com Fenton em sistemas de tratamento anaeróbio (UASB e RAHLF) de água residuária do processamento de café, e verificaram que também houve a redução das concentrações de compostos recalcitrantes. Além disto, também observaram aumentos das remoções de DQO total e melhores resultados para a produção de metano.

Chapleur et al. (2016) verificaram a influência do fenol na metanização da celulose por meio de ensaios de toxicidade em digestores anaeróbios em batelada. Foram testadas diferentes concentrações de fenóis (0, 0,01, 0,05, 0,10, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 g L⁻¹), e foi observado que à medida que as concentrações de fenóis aumentaram, as diferentes etapas da digestão anaeróbica da celulose foram afetadas de forma desigual e progressiva, sendo a metanogênese a etapa mais sensível: a atividade metanogênica específica foi inibida a 1,40 g/L de fenol, enquanto a hidrólise da celulose e sua fermentação para AGV foram observados até 2,00 g/L. Os autores verificaram que dependendo do nível de fenol, as comunidades microbianas resistem através de adaptações fisiológicas ou estruturais, e no caso do experimento realizado em questão, a capacidade de

adaptação das comunidades foi limitada e os seus desempenhos diminuiram drasticamente nas concentrações testadas acima de $2,00 \text{ g L}^{-1}$ de fenol. Portanto, é importante salientar que, apesar das concentrações indicadas para o bom desempenho do processo da digestão anaeróbia, a comunidade microbiana também pode adaptar-se.

De acordo com Gebreeyessus et al. (2019), os efluentes da destilaria, após o processo de digestão anaeróbia, permanecem com coloração escura e ainda apresenta compostos considerados tóxicos para microrganismos. Neste sentido, estratégias como o pós-tratamento com o Fenton para remoção dos compostos, com posterior recirculação ao sistema, podem ser realizadas para auxiliar o aumento da produção de biogás e melhores rendimentos de metano.

No sistema RAHLF, a recirculação parcial da vinhaça biodigerida tratada com o Fenton (fase 9) promoveu melhoria na eficiência de remoção da DQO total pelo conjunto de reatores (R1+R2+R3+R4) e favoreceu a produção volumétrica de metano. Contudo, para condições de COVs semelhantes, a produção específica de metano para as fases 8 e 9 foram similares.

Relembrando que durante todo o período experimental não houve a suplementação de macro ou micronutrientes, vale ressaltar que o sistema composto pelo conjunto de reatores horizontais demonstrou-se robusto, visto que apresentou estabilidade por um longo período experimental, com recirculação constante do efluente biodigerido sem a necessidade de aplicação química de alcalinizantes.

Deste modo, para que o sistema apresente melhores rendimentos de metano, a suplementação de nutrientes como o fósforo total, atingindo a relação de DQO : N : P próximos a 350 : 5 : 1, e estratégias de adição de micronutrientes, tal como o Fe na forma biodisponível para a assimilação dos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, pode ser necessária.

5.7. Sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV)

De acordo com Leite e Povinelli (1999), a concentração de sólidos refere-se ao resíduo total presente no substrato, sendo um indicador da massa total a ser tratada, de origem orgânica ou inorgânica. No processo anaeróbio, a estabilização da matéria orgânica irá ocorrer na fração orgânica do substrato. Teoricamente, quanto maior for a concentração de sólidos totais voláteis, maior deverá ser a taxa de bioconversão do substrato.

A concentração de sólidos totais (ST) no afluente do R1 variaram de 9527 a 25192 mg L⁻¹ durante o experimento. Nos períodos de partida e nas fases 1 e 4, foram verificados aumentos dos teores de sólidos do afluente para o efluente do R4 (Tabela 31), que pode ser em virtude do arraste de lodo contido nos reatores anaeróbios horizontais. Contudo, houve redução das concentrações de ST do afluente para o efluente do R4, para as demais fases do experimento (Tabela 31).

Tabela 31. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV), em mg L⁻¹, no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4), em série e eficiências de remoção do sistema (%).

		Primeira Safra			Segunda Safra				Terceira Safra		
		P	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ST	Afl.	9527 ^a	20369 ^c	25192 ^c	11714 ^c	12717 ^{ab}	21259 ^c	19213 ^c	12259 ^c	22586 ^{ab}	18735 ^{bc}
	cv	13	15	33	23	27	25	36	20	17	57
	R1	11770 ^{ab}	25665 ^d	19513 ^c	11767 ^{ab}	17305 ^c	20850 ^{cd}	15708 ^{bc}	10003 ^a	18776 ^c	15927 ^{bc}
	cv	4	18	29	38	15	23	44	37	27	20
	R2	12503 ^{ab}	25276 ^d	18810 ^{bc}	11160 ^a	17310 ^{ab}	23956 ^{cd}	15306 ^{ab}	11955 ^a	16873 ^{ab}	16023 ^{ab}
	cv	24	11	33	31	20	43	36	38	22	10
	R3	11589 ^{ab}	23513 ^e	20771 ^d	10207 ^a	22430 ^{bcd}	23956 ^d	15306 ^d	12125 ^{abc}	17046 ^{cd}	12845 ^{abc}
	cv	10	20	29	25	14	28	36	34	24	23
	R4	12416 ^{ab}	27917 ^c	18260 ^b	9888 ^{ab}	13993 ^{ab}	14305 ^{ab}	14179 ^{ab}	8830 ^a	14924 ^{ab}	14772 ^{ab}
	cv	29	51	28	47	19	31	34	27	19	28
SF	R1-R4	-	-	30 ^b	36 ^d	-	30 ^b	24 ^a	34 ^{bc}	34 ^{bc}	37 ^d
	cv	-	-	64	53	-	68	75	60	33	29
	Afl.	1882 ^a	5734 ^{abc}	10555 ^d	3987 ^{ab}	3426 ^a	2352 ^d	10015 ^d	5604 ^{abc}	10033 ^{cd}	8074 ^{bcd}
	cv	55	70	30	40	93	23	36	55	67	52
	R1	6555 ^{ab}	12782 ^c	10852 ^{bc}	7138 ^{ab}	8812 ^{abc}	9692 ^{abc}	9456 ^{bc}	5639 ^a	9239 ^{abc}	8158 ^{ab}
	cv	9	21	49	20	19	24	58	43	20	14
	R2	8101 ^{bc}	12855 ^d	9565 ^{bc}	6990 ^{ab}	9035 ^{bc}	10504 ^{cd}	9382 ^{cd}	5187 ^a	9361 ^{bc}	8807 ^{bc}
	cv	21	20	32	34	12	20	39	36	20	7
	R3	6674 ^a	13375 ^c	10627 ^{bc}	5901 ^a	9024 ^{ab}	9236 ^{ab}	10486 ^{bc}	6705 ^a	8960 ^{ab}	6192 ^a
	cv	80	28	41	71	14	22	34	16	22	38
SV	R4	3625 ^a	15836 ^b	9667 ^{ab}	3796 ^a	8276 ^{ab}	7462 ^a	9012 ^{ab}	6153 ^a	8882 ^{ab}	10001 ^{ab}
	cv	98	103	47	68	20	40	42	25	29	46
	R1-R4	-	-	21 ^b	67 ^c	-	-	14 ^a	-	19 ^b	-
	cv	-	-	112	15	-	-	144	-	121	-
	Afl.	7645 ^{ab}	14635 ^c	14637 ^c	1520 ^{ab}	9291 ^{abc}	11003 ^{abc}	9198 ^{abc}	6655 ^a	12553 ^{bc}	10661 ^{abc}
	cv	24	21	45	20	13	28	45	43	67	67
	R1	5215 ^{ab}	12883 ^e	8661 ^{bcd}	4628 ^a	8493 ^{bcd}	11159 ^{de}	6252 ^{abc}	4363 ^a	9537 ^{cd}	7769 ^{abcd}
	cv	6	18	34	23	15	40	44	47	40	29
	R2	4402 ^a	12421 ^{bc}	9245 ^{abc}	4169 ^a	8275 ^{ab}	13451 ^c	5923 ^a	6769 ^a	7512 ^{ab}	7216 ^a
	cv	47	21	43	40	43	67	48	94	38	17
	R3	4915 ^{ab}	11372 ^d	8733 ^{cd}	4306 ^a	7059 ^{abc}	8850 ^{cd}	6393 ^{abc}	5419 ^{abc}	8086 ^{bcd}	6653 ^{abc}
	cv	90	18	32	84	19	49	44	71	36	28
	R4	8792 ^{cd}	12081 ^d	8593 ^c	6092 ^{abc}	5717 ^{abc}	6842 ^{bc}	5168 ^{abc}	2677 ^a	6042 ^{abc}	4770 ^{ab}
	cv	15	33	48	57	22	39	48	50	30	34
	R1-R4	-	23 ^a	50 ^c	-	36 ^b	37 ^b	51 ^c	49 ^c	68 ^d	61 ^d
	cv	-	38	39	-	52	44	28	76	53	42

Unidades: mg L⁻¹. Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%;

5.8. Sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV)

Normalmente, a unidade de massa de células microbianas é expressa em sólidos em suspensão (SS), em virtude de a biomassa ser constituída de sólidos que se encontram suspensos em um reator, quando há crescimento disperso (Von Sperling, 2016). Todavia, parte da massa que constitui os sólidos representa uma fração inerte (sólidos totais fixos), que por sua vez não possui desempenho para o tratamento biológico de um substrato. Sendo assim, a biomassa de um reator também pode ser representada pelos sólidos em suspensão voláteis (SSV), que representam a fração orgânica da biomassa, visto que a matéria orgânica é capaz de ser volatilizada (Von Sperling, 2016).

Os valores médios de SST, mensurados do afluente ao efluente dos reatores foram decrescentes indicando que houve redução do teor de sólidos suspensos pelo sistema (R1+R2+R3+R4), alcançando eficiência média de remoção de até 84%, na fase 9 (Tabela 32).

Para a fração de SSF dos sólidos totais do afluente do sistema, as maiores eficiências de remoção pelo conjunto de reatores foram constatadas nas fases 8 e 9 (Tabela 32).

Para os SSV, foi observado uma tendência ao aumento das concentrações no afluente, à medida em que a COV foi elevada. As concentrações da fração orgânica (SSV) foram reduzidas no decorrer do conjunto de reatores, atingindo eficiências de remoção de até 89% nos reatores anaeróbios horizontais, dispostos em série.

Tabela 32. Valores médios e coeficientes de variação (cv) das concentrações dos sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV), em mg L⁻¹, no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) e eficiências de remoção do sistema (%).

		Primeira Safra			Segunda Safra			Terceira Safra			
		P	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SST	Afluente	3760 ^a	6887 ^d	6220 ^b	4032 ^b	3000 ^a	5709 ^b	4673 ^b	3605 ^a	9708 ^e	4717 ^b
	cv	67	23	32	67	45	39	41	107	70	33
	R1	1209 ^a	1201 ^a	1435 ^{ab}	1175 ^a	1141 ^a	1566 ^{ab}	1277 ^a	563 ^a	2753 ^c	1213 ^a
	cv	21	34	39	66	64	52	62	66	61	58
	R2	944 ^a	1788 ^b	1535 ^b	933 ^a	938 ^a	2149 ^d	1820 ^c	1047 ^a	2978 ^e	1153 ^b
	cv	46	54	48	67	57	40	58	122	68	72
	R3	933 ^b	1725 ^{bc}	1412 ^b	1384 ^b	1143 ^b	1841 ^{bc}	1717 ^b	540 ^a	2504 ^d	1183 ^b
	cv	22	36	30	22	83	45	50	64	90	33
	R4	816 ^c	1697 ^f	1158 ^e	1158 ^e	748 ^c	605 ^a	954 ^d	608 ^a	1644 ^f	752 ^b
	cv	29	30	47	47	68	32	49	54	149	86
	R1-R4 (%)	61 ^a	74 ^b	78 ^b	77 ^b	75 ^b	79 ^{bd}	73 ^b	74 ^b	83 ^{bd}	84 ^d
	cv	62	14	21	30	20	21	35	33	20	15
SSF	Afluente	1193 ^c	2642 ^e	1318 ^c	1112 ^c	787 ^a	1488 ^d	850 ^b	875 ^b	1197 ^c	1187 ^c
	cv	61	31	43	72	49	47	38	116	15	15
	R1	547 ^e	471 ^c	402 ^c	493 ^{cd}	341 ^b	524 ^{de}	465 ^c	241 ^s	845 ^f	317 ^b
	cv	21	55	66	100	89	39	73	83	90	116
	R2	493 ^c	729 ^e	533 ^d	414 ^c	290 ^b	779 ^e	559 ^d	298 ^b	878 ^f	183 ^a
	cv	49	59	59	110	73	43	78	94	96	72
	R3	649 ^e	864 ^f	512 ^{de}	657 ^e	356 ^c	363 ^c	415 ^d	202 ^b	694 ^e	157 ^a
	cv	34	38	55	55	77	51	67	100	99	33
	R4	564 ^d	940 ^e	509 ^d	305 ^c	494 ^d	415 ^d	494 ^d	295 ^b	355 ^c	82 ^a
	cv	55	33	89	106	49	81	89	98	90	95
	R1-R4 (%)	70 ^b	62 ^a	67 ^a	85 ^c	70 ^{ab}	79 ^b	67 ^a	86 ^c	88 ^c	93 ^{cd}
	cv	28	24	26	21	12	21	23	23	18	6
SSV	Afluente	2567 ^b	424 ^a	4902 ^f	2920 ^b	2213 ^b	4221 ^e	3823 ^b	2730 ^b	4332 ^e	3520 ^b
	cv	76	30	39	36	48	43	45	110	25	40
	R1	662 ^b	730 ^c	1033	682 ^b	800 ^d	1042 ^e	812 ^d	322 ^a	798 ^c	897 ^d
	cv	30	86	37	52	58	62	65	71	27	39
	R2	451 ^a	1059 ^f	1133 ^f	555 ^b	540 ^b	1370 ^g	932 ^e	750 ^c	849 ^d	970 ^e
	cv	14	59	67	48	60	50	74	135	47	84
	R3	284 ^s	861 ^d	900 ^{de}	727 ^c	787 ^c	1125 ^{de}	1098 ^{de}	339 ^b	784 ^c	1027 ^{de}
	cv	22	52	40	9	96	48	60	57	48	40
	R4	251 ^a	757 ^e	649 ^e	318 ^b	300 ^b	460 ^c	553 ^d	312 ^b	384 ^b	670 ^e
	cv	63	66	61	30	35	45	62	41	23	85
	R1-R4 (%)	89 ^b	81 ^a	84 ^{ab}	88 ^b	81 ^a	87 ^b	83 ^{ab}	78 ^a	87 ^b	80 ^a
	cv	4	14	14	7	23	8	13	21	14	19

Unidades: mg L⁻¹. Letras iguais na mesma linha não possuem diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%;

Na figura 29 estão representados os valores médios de DQO total, DQO dissolvida, Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) no conjunto de reatores, nas diferentes fases operacionais.

Observa-se que as maiores concentrações dos parâmetros expressados foram maiores no afluente quando comparados ao efluente do R1, demonstrando que já no primeiro reator houve remoção de material orgânico contido no afluente. Observa-se que a DQO total e a DQO dissolvida apresentaram tendência a serem removidas no decorrer do sistema (R1+R2+R3+R4), no entanto, os valores das concentrações de SST e SSV apresentam variações nos reatores.

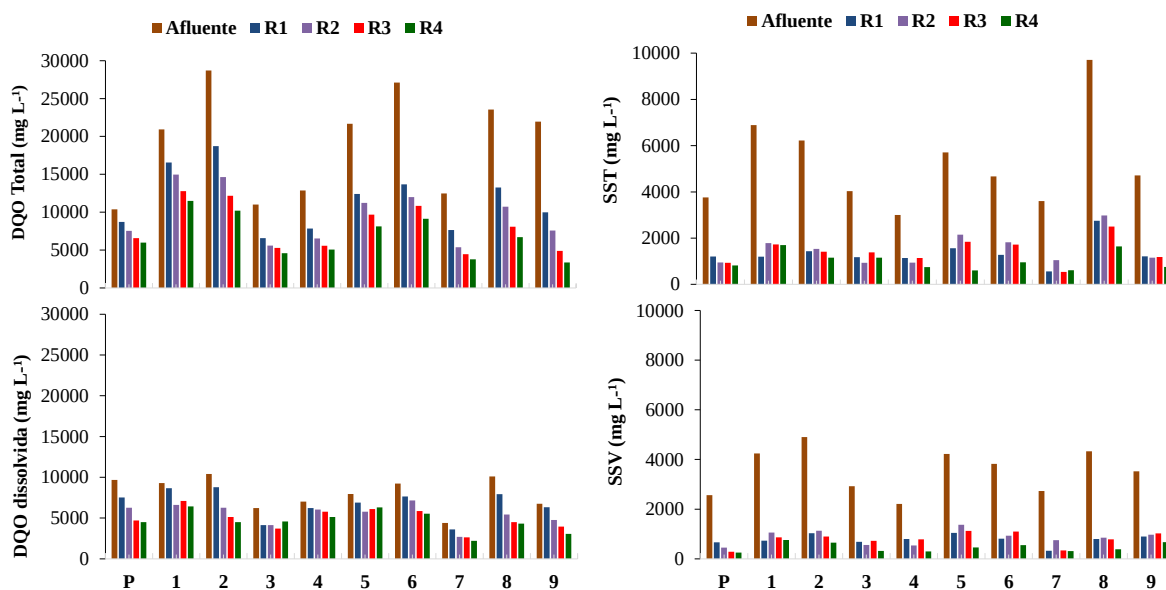


Figura 29. Valores médios de DQO total, DQO dissolvida, Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) no afluente e efluentes dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa (R1, R2, R3 e R4), instalados em série, durante a fase de partida e fases de 1 a 9.

5.9. Bioestabilização do lodo

Todos os processos de tratamento biológico geram lodo, sendo este lodo originado pela própria biomassa que cresce em virtude do alimento fornecido pelo afluente do sistema (Von Sperling, 2014). O lodo presente em reatores biológicos são compostos por microrganismos diversos.

A acumulação de sólidos biológicos em um sistema de tratamento se dá após alguns meses de operação contínua (Chernicharo, 2016). A biomassa em um sistema de tratamento anaeróbio, quando não removida, tende a acumular-se, tornando possível eventuais perdas através do seu carregamento juntamente com o efluente final do sistema, ocasionando em alguns casos, a deterioração da qualidade do efluente em virtude do aumento das concentrações de sólidos em suspensão e de matéria orgânica (Von Sperling, 2014). Contudo, a taxa de acumulação de sólidos depende essencialmente do tipo de efluente, sendo mais elevado quando apresenta maiores concentrações de sólidos suspensos, 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).

Nos casos de tratamentos de efluentes solúveis, a produção de lodo excedente, normalmente é muito baixa contribuindo com poucos problemas na manutenção do sistema, no armazenamento e disposição final (Chernicharo et al., 2016). Uma das grandes vantagens de reatores anaeróbios contendo meio de suporte para a aderência de microrganismos, tal como o sistema RAHLF, é a imobilização da biomassa, que permite a sua retenção por tempos consideravelmente elevados, e em grandes concentrações. Sistemas com biomassa aderida estão continuamente sendo expostos a novos substratos, elevando a sua atividade. Entretanto, quando o biofilme atinge espessura muito elevada, o aumento do consumo do substrato ao longo do biofilme pode prejudicar as camadas mais internas da massa microbiana, promovendo deficiências de substrato, reduzindo desta maneira, a atividade microbiana, ocasionando também o desprendimento desta biomassa ao meio suporte (Von Sperling, 2016).

Neste experimento, foram observados no sistema RAHLF valores de concentrações de sólidos voláteis (SV) e sólidos totais (ST) superiores a 15 g L^{-1} , praticamente em todos os pontos de coleta de lodo (P1, P2, P3, P4, P5 e P6) dos reatores R1, R2, R3 e R4 (Figura 30).

Os maiores valores de SV foram verificados nos reatores R1 e R2, atingindo valores acima de 20 g L^{-1} , sendo estes reatores os responsáveis pelas maiores produções volumétricas de metano. Contudo, a última fase do experimento (fase 9) foi responsável pelas maiores concentrações de SV para os reatores. Este período experimental, contemplado pela integração da digestão anaeróbia com o processo Fenton, pode ter auxiliado na multiplicação da biomassa microbiana, tornando o lodo biológico ativo no sistema, proporcionando elevada remoção da DQO total também para esta fase.

O meio suporte, constituído de conduítes, contido no sistema RAHLF permite a aderência de microrganismos, promovendo a formação de um biofilme imobilizado. Contudo, baixos TDHs podem acarretar no desprendimento da massa microbiana ao meio suporte, gerando arraste de lodo. O sistema RAHLF composto por reatores instalados em série se apresentou robusto frente aos baixos TDHs nos reatores e às elevadas COVs aplicadas.

De acordo com Metcalf e Eddy (2016), a relação entre os sólidos voláteis e sólidos totais (SV/ST) avalia a estabilidade do lodo de digestores. Altas relações SV/ST evidenciam a predominância de matéria orgânica no lodo, indicando a presença de microrganismos (Oliveira e Duda, 2009), e consequentemente, alta atividade dos mesmos. A legislação brasileira (Resolução CONAMA nº375/2006) define que o lodo de esgoto em estações de tratamento e seus produtos derivados são considerados estáveis para o uso agrícola quando a relação SV/ST é inferior a 0,70. Portanto, observou-se que o lodo foi estabilizado. Para alguns pontos, houve valores superiores, todavia, acredita-se em uma tendência à estabilização nos mesmos (Figura 31). Quando necessário, o descarte de lodo nos reatores poderiam ser realizados nos pontos onde foram verificados estabilidade ($\text{SV/ST} < 0,70$). Contudo, não houve o descarte de lodo durante o período experimental.

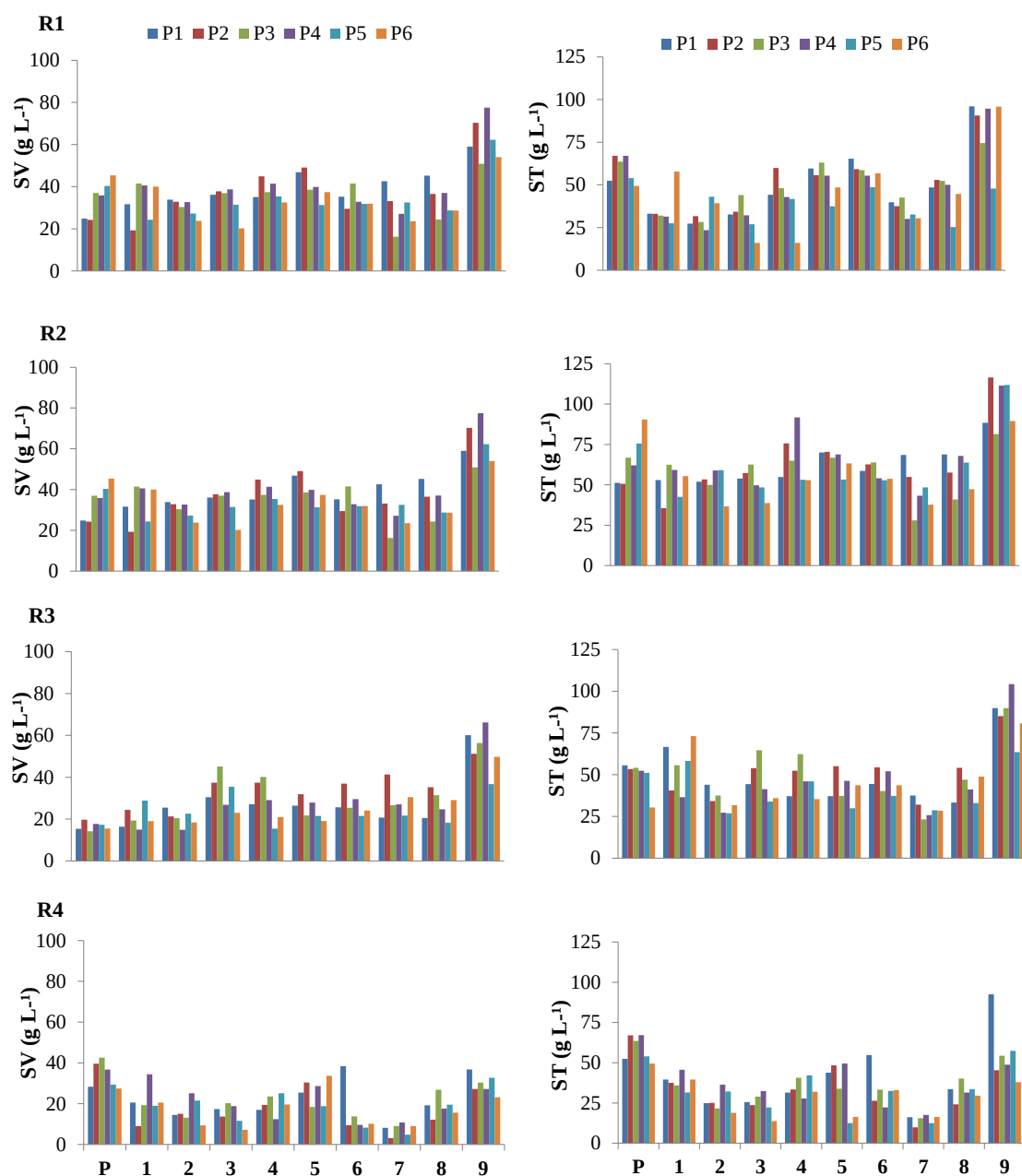


Figura 30. Concentração de sólidos voláteis e sólidos totais do lodo nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF – R1, R2, R3 e R4) em série nos pontos de coleta P1 a P6 durante a partida e fases 1 a 9.

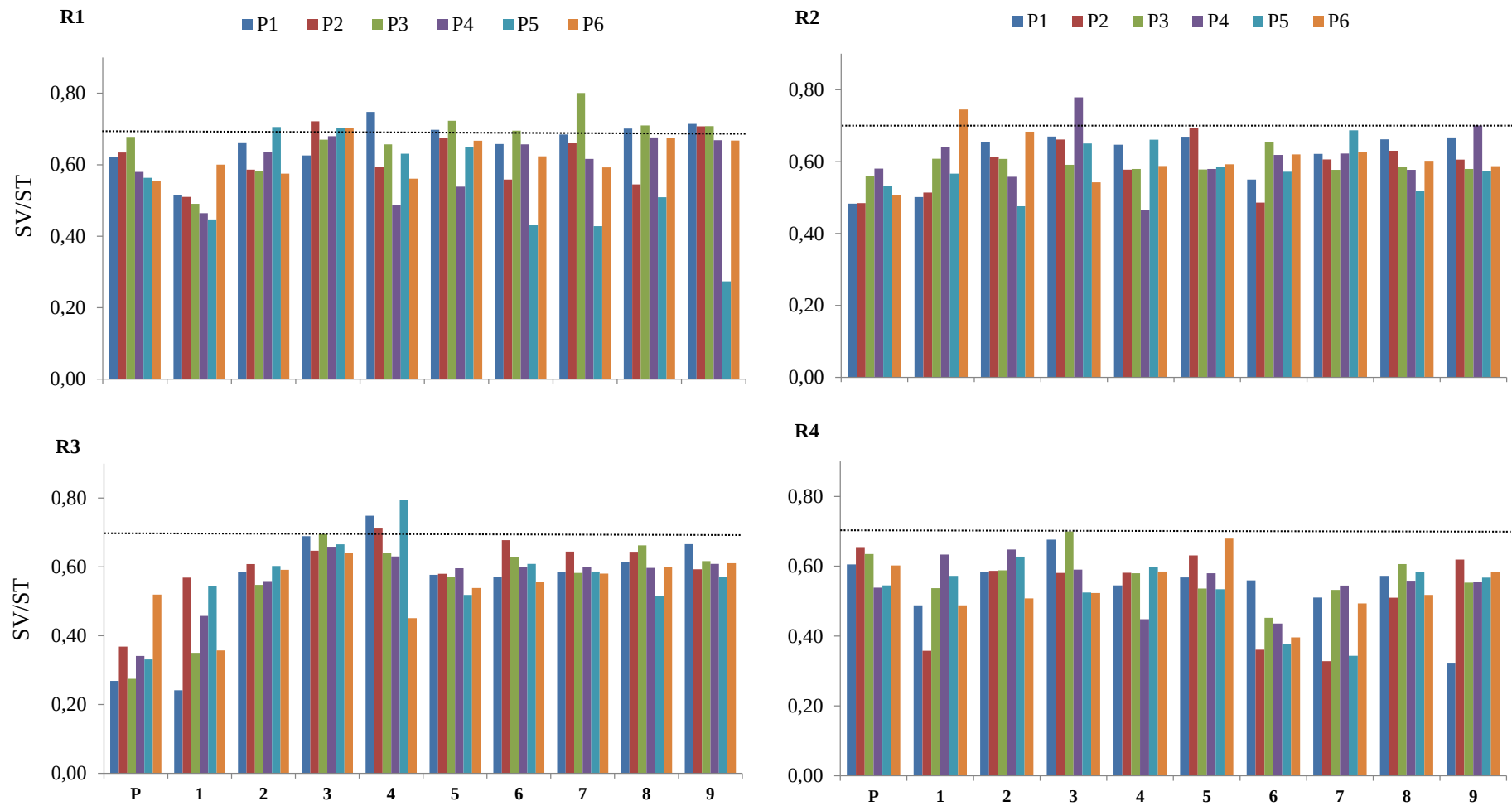


Figura 31. Relação de sólidos voláteis e sólidos totais (SV/ST) determinados no período de partida (P) e fases de 1 a 9 do experimento, nos 6 pontos de coletas de lodo P1, P2, P3, P4, P5 e P6 dos reatores anaeróbios horizontais com leito fixo (RAHLF – R1, R2, R3 e R4), em série.

5.10. Perfil longitudinal do sistema RAHLF

Os resultados do perfil longitudinal do sistema RAHLF, realizados em amostras coletadas para cada ponto de coleta contido nos reatores R1, R2, R3 e R4 (Figura 4) ao final da fase 6, estão expressos nas figuras 32 e 33. Este tipo de monitoramento demonstra o comportamento do sistema na degradação biológica da vinhaça, ao longo do conjunto de reatores, apresentando uma visão um pouco mais refinada sobre o processo.

Foi observado o aumento de alcalinidade total (AT) e de alcalinidade parcial (AP) do R1 para o R4 (Figura 32 A-B). Este resultado demonstra que o sistema RAHLF tratando vinhaça de cana-de-açúcar promove alcalinidade suficiente para manter o pH ideal para a digestão anaeróbia, indicando que o efluente gerado pelo R4 pode ser utilizado para a diluição e correção do pH afluente do sistema.

A relação AI/AP decresceu do R1 para o R4 (Figura 32-D), atingindo valores abaixo de 0,3 ainda no R1, para os pontos de coletas P6 e P7, indicando estabilidade do sistema anaeróbio, conforme reportado por Ripley et al. (1983).

A alcalinidade parcial verificada no sistema (Figura 32-B) foi capaz de tamponar o pH do meio (Figura 33-A). Além disto, foi observado que os ácidos voláteis gerados pelos microrganismos acidogênicos foram consumidos no decorrer do sistema (Figura 33-B), o que é favorável na digestão anaeróbia, pois o acúmulo de AVT pode promover a acidificação do sistema, inviabilizando desta forma, a etapa de metanogênese visto que a microbiota responsável pela produção de metano é sensível a alterações de pH.

O perfil de DQO no sistema demonstrou que houve remoção de DQO total do R1 para o R4, no entanto, foram constatadas variações de DQO nos pontos de coleta do R3. Esta variação pode ter sido decorrente da pressão de biogás gerado no R2, promovendo certa turbulência no R3, que consequentemente ocasiona o arraste de lodo no sistema (Figura 33-D).

O sistema RAHLF apresentou amonificação (Figura 33-C), decorrente da degradação biológica do material orgânico nitrogenado contido na vinhaça, entretanto, os valores de Nitrogênio amoniacal observados no sistema se

aprenaram abaixo do nível considerado tóxico para a digestão anaeróbia ($>1700 \text{ mg L}^{-1}$) segundo Koster e Lettinga (1984).

Desta forma, podemos constatar que o sistema RAHLF tratando vinhaça de cana-de-açúcar se manteve estável mesmo para COVs elevadas, que variaram de 24,8 a 27,9 g DQO (L.d) $^{-1}$ durante a fase 6, sem a suplementação de macro e micronutrientes.

Tendo em vista que os resultados do perfil demonstrou estabilidade do sistema durante o período correspondente ao final da segunda safra, a coleta do lodo para esta fase (fase 6) foi realizada para a avaliação da composição da comunidade (Illumina) e quantificação microbiana (q-PCR), além das coletas realizadas para o lodo de inóculo, e para a fase 2, correspondente ao final da primeira safra.

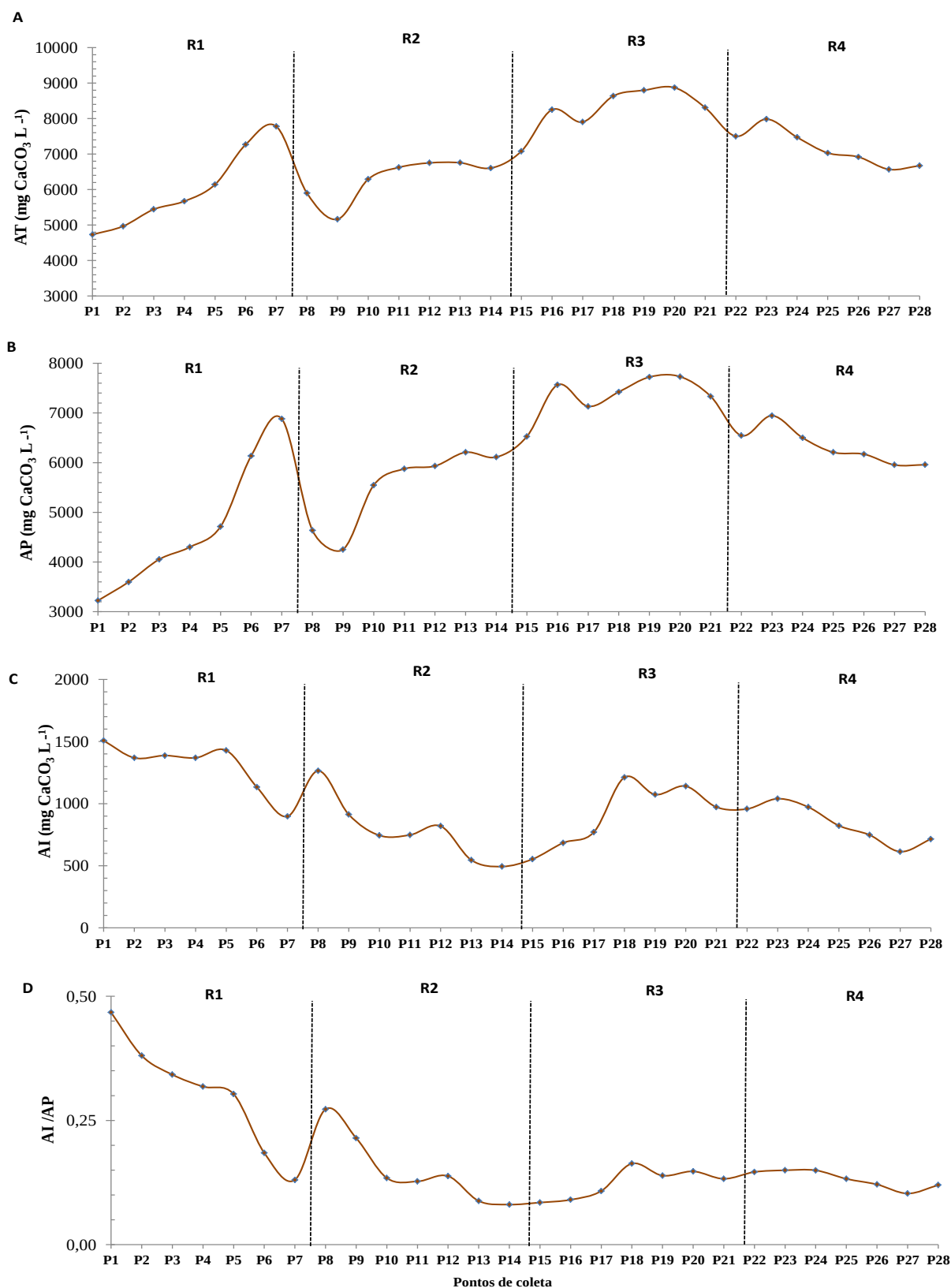


Figura 32. Perfil longitudinal de Alcalinidade Total (AT), Alcalinidade Parcial (AP), Alcalinidade Intermediária (AI) e relação AI/AP do sistema RAHLF.

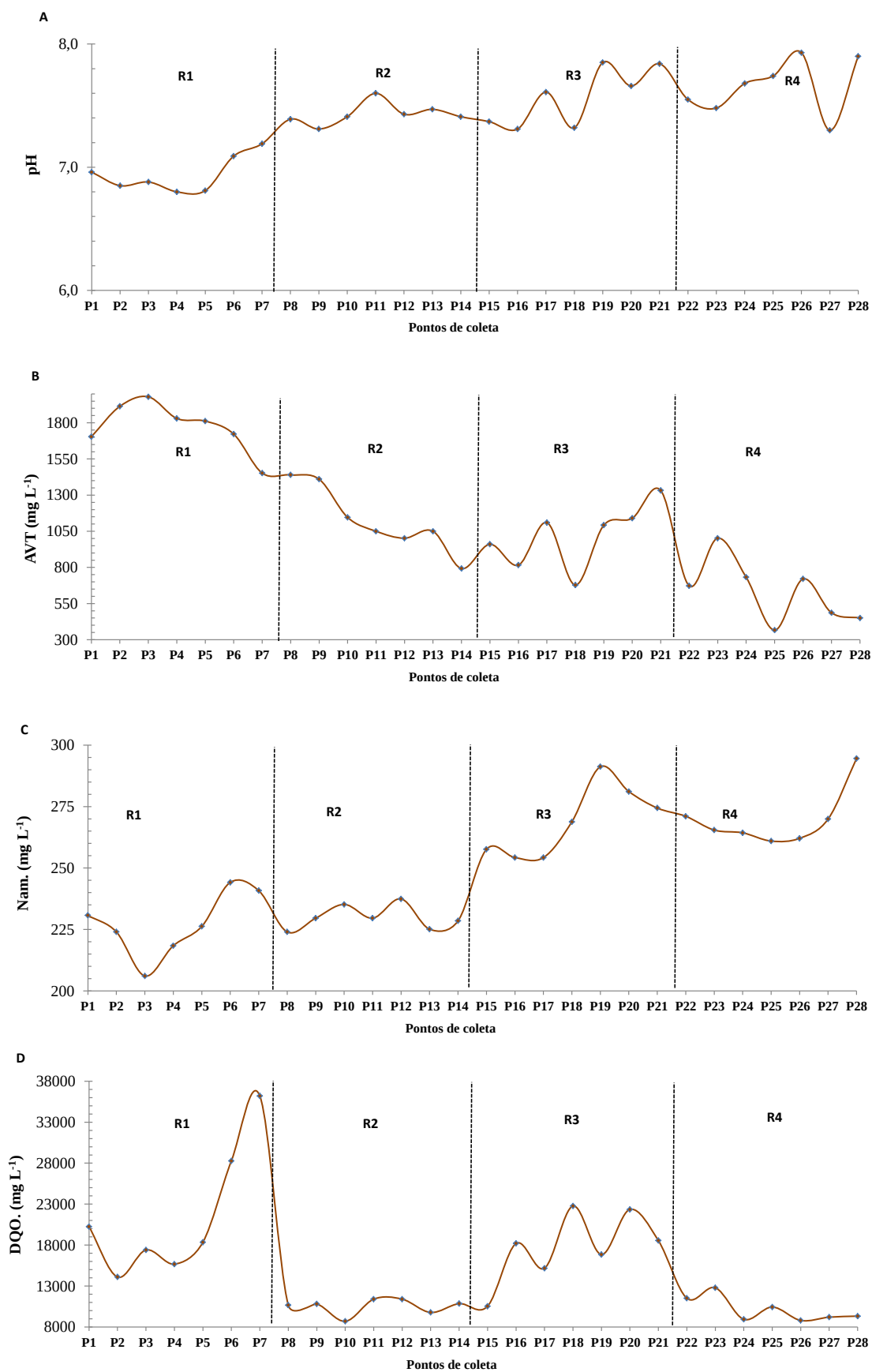


Figura 33. Perfil de potencial hidrogeniônico (pH); Ácidos Voláteis Totais (AVT); Nitrogênio Amoniacal (N. Am.); e Demanda Química de Oxigênio Total (DQO) do sistema RAHLF.

5.11. Diversidade microbiana nos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo e alta taxa

De acordo com Ordaz-Díaz e Bailón-Salas (2020), a eficiência da digestão anaeróbia da vinhaça e a maximização da produção de metano dependem muito da microbiota presente no sistema e das suas atividades, todavia, a identificação da composição microbiana, e principalmente, as alterações das comunidades presentes no lodo de sistemas de tratamento anaeróbio tratando a vinhaça de cana-de-açúcar ainda foram pouco exploradas.

A digestão anaeróbia consiste em quatro etapas, sendo elas as fases de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. As três primeiras etapas são realizadas principalmente por bactérias, enquanto que a etapa de metanogênese são concluídas por um ramo específico de arqueias, que por sua vez, podem atuar por via hidrogenotrófica ou acetoclástica (Vrieze et al., 2015).

Conforme Nobu et al. (2015), os microrganismos fermentadores e sintróficos (ou acetogênicos) possuem a capacidade de degradar os compostos orgânicos em substratos mais simples e que são utilizáveis para os microrganismos metanogênicos (ex: acetato e H_2), e convertem esses compostos em CH_4 e CO_2 . Os sintróficos formam interações específicas mutualísticas com os metanogênicos para metabolizar os compostos orgânicos à medida que os subprodutos se acumulam e cuja degradação rápida se torna termodinamicamente desfavorável.

Vale ressaltar que os microrganismos acidogênicos crescem de maneira rápida, visto que as reações de fermentação possuem maiores rendimentos energéticos em relação às reações de formação do metano. Todavia, apesar das condições de baixa energia, ambientes que favorecem a presença dos metanogênicos podem abrigar uma diversidade de microrganismos de filos conhecidos e de filos cujos microrganismos ainda não foram representados (Nobu et al., 2015). Desta maneira, mesmo que em um estudo seja identificado algum microrganismo ainda não descrito na literatura, já é uma contribuição para o início de compreensão das possíveis interações entre os microrganismos presentes e os seus papéis no processo da digestão anaeróbia.

Segundo Vrieze et al. (2015) para que haja uma produção de maneira contínua e estável de metano a partir de substratos orgânicos complexos, é necessária a interações específicas de microrganismos que realizam diferentes etapas, e essas interações podem ocorrer através de metabólitos sucessivos ou por meio de transferência indireta ou direta de elétrons. Em alguns casos específicos, é necessário a sintrofia entre dois microrganismos para manter a atividade metabólica que eles não conseguem realizar por conta própria. A sintrofia é uma forma de simbiose entre dois grupos de bactérias que são metabolicamente diferentes, mas que permite a degradação de vários substratos (Shah et al., 2014).

A presença ou ausência de microrganismos específicos irão depender de diversos fatores, principalmente a composição do substrato, pois está diretamente relacionado à introdução de novas espécies presentes na matéria prima aos sistemas de tratamento anaeróbio (Vrieze et al., 2015). A própria composição da vinhaça está sujeita a variações microbianas, pois a suas características durante o período das safras variam. Segundo España-Gamboa et al. (2011) a composição da vinhaça da cana-de-açúcar é alterada conforme a biomassa (cana-de-açúcar) utilizada para a produção de etanol. Além disto, a presença de nutrientes e de outros compostos presentes no substrato também podem selecionar alguns tipos de microrganismos, influenciando no processo da digestão anaeróbia.

A cana-de-açúcar possui uma diversidade de microrganismos que compõe a sua microbiota, desta maneira, a agroindústria da cana enfrenta problemas com contaminantes (Dunkan et al., 1964). Tanto o caldo da cana quanto o mosto também são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, principalmente bactérias, devido ao elevado conteúdo de nutrientes inorgânicos e orgânicos (Caetano e Madaleno, 2011). A presença de bactérias e leveduras indesejáveis durante processos da produção do etanol podem prejudicar o rendimento da fermentação. Deste modo, o uso de antibióticos, antifúngicos, além de estratégias como a adição de ácido sulfúrico para o controle de bactérias, também são comuns nas indústrias para o controle microbiológico (Góes-Favoni et al., 2018). As alterações dos componentes da matéria-prima, principalmente com relação à microbiota presente nela, pode aumentar ainda mais a dificuldade de investigar as correlações entre as

populações microbianas e os parâmetros físico-químicos, bem como o entendimento sobre os mecanismos que conduzem a diferenciação das comunidades microbianas sob diferentes condições operacionais (Hao et al., 2016). Acredita-se que a presença de antibióticos na vinhaça também possa ter gerado influência sobre a composição microbiana dentro do sistema RAHLF neste experimento.

Os resultados da análise da composição microbiana, obtido pelo método de sequenciamento de segunda geração (Illumina) aplicado ao lodo dos reatores horizontais (R1, R2, R3 e R4), revelaram que grande parte das leituras foram atribuídas ao domínio Bacteria. A avaliação da composição microbiana associada aos lodos de cada reator foram determinadas no lodo de inóculo e no lodo contido nos reatores durante as fases 2 e 6 do experimento.

De maneira geral, o lodo presente no sistema como um todo (R1+R2+R3+R4), apresentou uma comunidade bacteriana diversa (Figura 34). O perfil da comunidade microbiana foi traçado a nível taxonômico de gênero, desta forma, as atribuições taxonômicas foram geradas levando em consideração o último nível taxonômico. Portanto, quando não foi possível a identificação e atribuição do microrganismo ao nível de gênero, novamente, o último nível taxonômico foi aplicado para reconhecimento (ex: família, ordem, classe, filo). Conforme Hao et al. (2016) ainda existem poucas informações disponíveis sobre a relação entre estratégias operacionais de sistemas de tratamento anaeróbio, eficiência do processo da digestão e as populações bacterianas de níveis taxonômicos abaixo do nível de classe.

A análise do microbioma para diferentes fases do experimento (lodo de inóculo, fases 2 e 6) demonstrou que a composição da comunidade microbiana nos reatores foi relativamente semelhante, entretanto, houve a variação em termos de abundância. Essa variação na abundância de determinados microrganismos pode estar associada às diferentes condições de operação do sistema. Grande parte dos gêneros identificados no sistema (*Sedimentibacter*, *Tissierella* e *Acholeplasma*) pertenciam ao filo Firmicutes (Figura 34). Também foram verificados a presença bactérias do gênero *Arcobacter*, pertencentes ao filo Proteobacteria (Tabela 33).

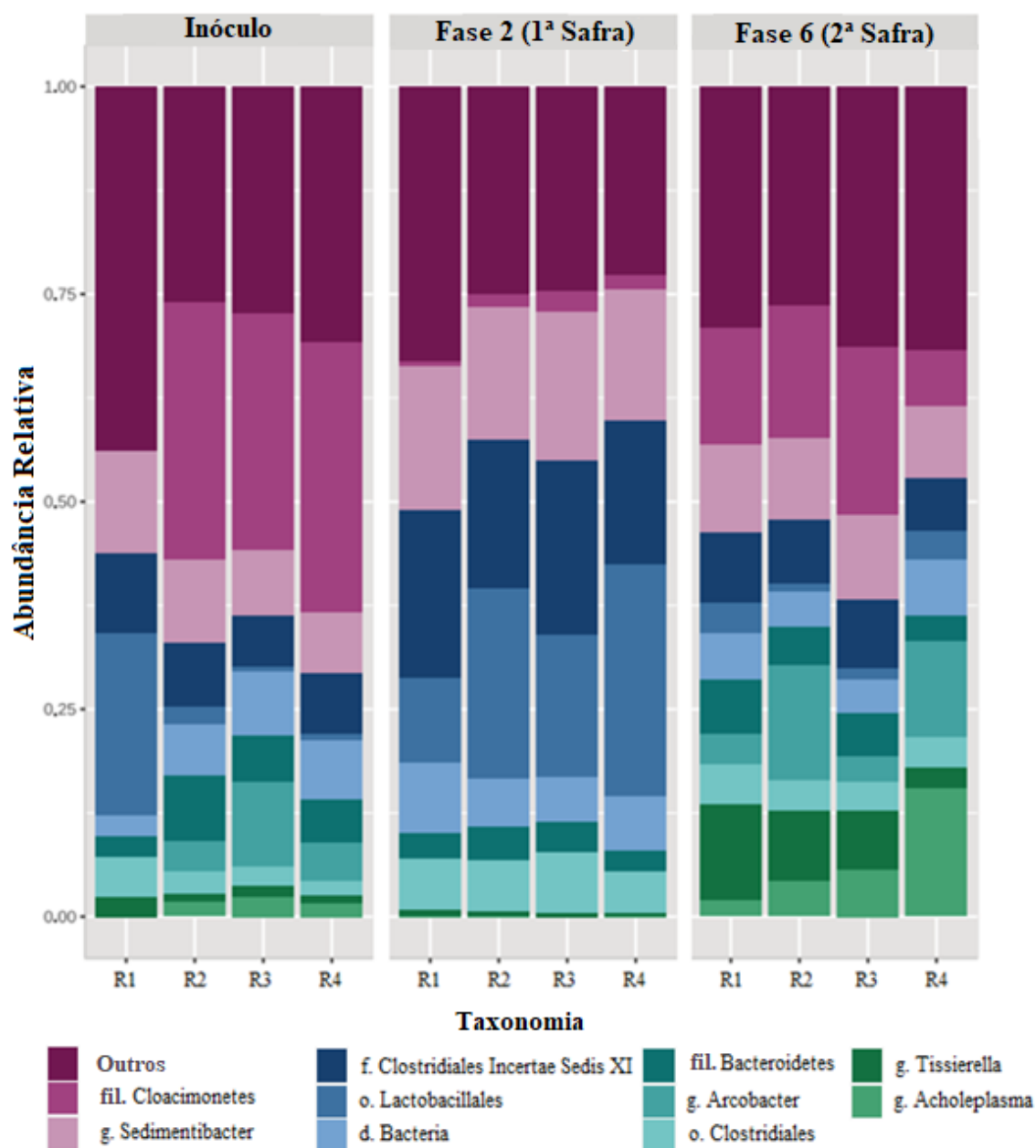


Figura 34. Afiliações taxonômicas bacterianas e abundância relativa dos filos, classes, ordem e gênero verificados nas amostras de lodo dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF): R1, R2, R3 e R4, coletados no lodo de inóculo e nas fases 2 e 6, correspondentes à primeira e segunda safra da cana-de-açúcar, respectivamente. D: domínio; fil: filo; g: gênero; f: família; o: ordem. Outros: Abundância relativa de microrganismos abaixo dos 10 principais identificados.

Tabela 33. Composição bacteriana e classificação dos 10 principais membros verificados no lodo do sistema RAHLF.

Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Incertae Sedis XI	<i>Sedimentibacter</i>
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Incertae Sedis XI	<i>Tissierella</i>
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Incertae Sedis XI	-
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	-	-
Bacteria	Firmicutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	-	-
Bacteria	Firmicutes	-	-	-	-
Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>
Bacteria	Cloacimonetes	-	-	-	-
Bacteria	-	-	-	-	-
Outros	-	-	-	-	-

Outros: Microrganismos detectados, abaixo dos 10 principais membros.

De acordo com Khan et al. (2019), os filos Firmicutes e Bacteroidetes compreendem uma ampla gama de bactérias hidrolíticas, principalmente nos gêneros *Streptococcus*, *Acetivibrio*, *Enterobacterium* e *Clostridium*. Firmicutes e Bacteroidetes também apresentam espécies acidogênicas bastante conhecidas, assim como nos filos Chloroflexiand e Proteobacteria.

O filo Bacteroidetes, presente no lodo dos reatores RAHLF possui grande importância na degradação de polímeros de alta complexidade e produzem propionato e acetato como produtos da fermentação (Rivière et al., 2009). São um grupo de bactérias com características fermentativas, portanto, também são capazes de hidrolisar e fermentar as substâncias orgânicas em CO₂ e H₂ (Khan et al., 2019).

Os Firmicutes são microrganismos facultativos bastante conhecidos por produzir lipases, celulasas, proteases e outras enzimas extracelulares, e além disto, possui alguns indivíduos que são capazes de formar esporos. O filo Firmicutes inclui muitas bactérias da classe Clostridia que decompõem matéria orgânica complexa (Wirth et al., 2012; Yin et al., 2016; Barros et al., 2017; Iltchenko et al., 2020). Certamente, estes microrganismos, que também foram diagnosticados no lodo do sistema RAHLF (Tabela 33), contribuíram para a degradação da vinhaça de cana-de-açúcar.

No presente experimento, observou-se elevada abundância relativa do filo Cloacimonetes no lodo de inóculo contido nos reatores R2, R3 e R4 (R1: 0,00%, R2: 30,84%, R3: 28,41%, R4: 32,49%) (Tabela 34). No entanto, a abundância relativa de Cloacimonetes ao final da fase 2 (segunda safra) apresentou abundância reduzida (R1: 0,56%, R2: 1,40%, R3: 2,33%, R4: 1,67%) e na última fase do experimento (fase 6) a abundância relativa deste filo voltou a apresentar abundância representativa (R1: 13,92%; R2: 15,89%; R3: 20,08; R4: 6,7%).

Em contrapartida, a composição microbiana verificada no lodo dos reatores na fase 2 demonstrou uma maior abundância relativa de bactérias pertencentes ao gênero *Sedimentibacter* (R1: 17,39%; R2: 15,95%; R3:17,95; R4: 15,66%), à família Clostridiales Incertae Sedis IX (R1: 20,34%; R2: 17,97%; R3:21,05; R4: 17,41%) e às ordens Lactobacillales (R1: 10,16%; R2: 22,75%; R3:17,10; R4: 27,87%) e Clostridiales (R1: 6,06%; R2: 6,06%; R3:7,32; R4: 5,07%) quando comparada às outras fases experimentais (Tabela 34). Estes

grupos de bactérias supracitados, que se apresentaram em maior abundância durante a fase experimental 2, compõem o filo Firmicutes (Tabela 33), o que nos permite inferir também que, para esta fase experimental, o ambiente pode ter favorecido a prevalência deste filo em relação ao filo Cloacimonetes. Já foi confirmada o envolvimento de grupos bacterianos do filo Cloacimonetes na degradação de celulose, e além disto, estudos envolvendo o genoma de alguns destes microrganismos identificaram genes que codificam enzimas envolvidas na oxidação do propionato através da via do metilmalonil-CoA, sugerindo que eles podem estar envolvidos em uma oxidação sintrófica do propionato (Kuever et al., 2014; Liman et al., 2014; Calusinka et al., 2018).

Como dito anteriormente, a família Clostridiales Incertae Sedis XI (classe Clostridia), também foi verificada em abundância na fase 2 do experimento. A classe Clostridia pode catabolizar proteínas, lipídeos e carboidratos complexos (Ilcthenco et al., 2019). De acordo com Hugon et al. (2013), as espécies listadas na família Clostridiales Incertae Sedis XI são compostas principalmente de cocos anaeróbicos obrigatórios gram-positivos. A família Clostridiales Incertae Sedis XI foi citada pela primeira vez em 2001 (Garrity e Holt, 2001) e inclui alguns gêneros conhecidos: *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Dethiosulfatibacter*, *Gallicola*, *Helcococcus*, *Parvimonas*, *Peptoniophilus*, *Sedimentibacter*, *Soehngenia*, *Sporanaerobacter* e *Tissierella*. Alguns membros desta família já foram identificados como patógenos em humanos e animais (Garrity e Holt, 2001; Hugon et al., 2013). De acordo com Vrieze et al. (2015) a oxidação do acetato requer parceria de bactérias específicas, das quais a maioria são representantes da classe Clostridia com metanogênicas hidrogenotróficas. Roske et al. (2014) alegaram que a degradação de material orgânico complexo é comumente realizada pela fermentação de bactérias, principalmente as pertencentes às ordens Clostridiales e do filo Bacteroidetes, comumente descritos como as mais abundantes em processos de digestão anaeróbia, tanto em condições mesofílicas como em termofílicas.

Bactérias, como os clostrídios (ordem: Clostridiales) são capazes de esporular e podem aumentar rapidamente em número após atingirem condições de crescimento adequadas. A ordem Clostridiales é conhecida por possuir bactérias com maior atividade hidrolítica e fermentativa, o que pode estar relacionado à formação de ácidos graxos voláteis (Blasco et al., 2020).

Tabela 34. Percentuais de abundância relativa de microrganismos verificados no lodo dos reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF - R1, R2, R3 e R4) no período de partida (lodo de inóculo) e nas fases 2 e 6 do experimento.

Microrganismos	Inóculo				Fase 2 (Primeira Safra)				Fase 6 (Segunda Safra)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
o.Lactobacillales	21,95%	1,93%	0,46%	0,70%	10,16%	22,75%	17,10%	27,87%	3,51%	0,96%	1,34%	3,35%
g.Sedimentibacter	12,20%	9,96%	7,73%	7,14%	17,39%	15,95%	17,95%	15,66%	10,65%	9,86%	10,21%	8,64%
f.ClostridialesIncertaeSedisXI	9,76%	7,80%	6,44%	7,46%	20,34%	17,97%	21,05%	17,41%	8,56%	7,86%	8,35%	6,53%
fil.Firmicutes	9,76%	5,19%	5,48%	4,36%	2,62%	2,84%	3,31%	2,19%	3,01%	2,92%	2,95%	4,65%
f.Peptostreptococcaceae	4,88%	0,03%	0,02%	0,13%	0,06%	0,12%	0,07%	0,03%	0,01%	0,02%	0,01%	0,23%
o.Clostridiales	4,88%	2,61%	2,23%	1,64%	6,06%	6,06%	7,32%	5,07%	4,67%	3,53%	3,39%	3,60%
g.Desulfovibrio	4,88%	1,82%	1,35%	2,34%	7,33%	4,65%	3,61%	4,42%	0,93%	1,04%	1,56%	0,74%
g.Candidate_Cloacamonas	4,88%	0,27%	0,51%	0,13%	6,38%	4,22%	4,13%	2,99%	0,07%	0,09%	0,06%	0,13%
c.Clostridia	2,44%	1,19%	1,31%	1,14%	1,90%	1,24%	1,56%	1,62%	1,15%	0,98%	1,23%	2,66%
f.Acidaminococcaceae	2,44%	1,40%	1,28%	1,64%	0,72%	0,62%	0,57%	0,58%	2,07%	0,89%	1,08%	0,66%
g.Desulfomicrobium	2,44%	2,02%	1,88%	2,97%	1,36%	1,18%	1,87%	0,96%	1,17%	0,76%	0,81%	0,36%
g.Tissierella	2,44%	0,93%	1,29%	0,95%	0,89%	0,64%	0,43%	0,37%	11,42%	8,40%	7,11%	2,50%
g.Olsenella	2,44%	0,16%	0,30%	0,51%	1,32%	0,59%	0,62%	1,28%	0,06%	0,04%	0,14%	0,11%
g.Telmatospirillum	2,44%	0,08%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,03%	0,03%	0,15%
d.Bacteria	2,44%	6,31%	7,78%	7,27%	8,56%	6,03%	5,49%	6,61%	5,79%	4,15%	4,12%	6,81%
g.Armatimonadetes gp2	2,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,01%	0,03%	0,00%
g.ClostridiumIV	2,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
o.Bacillales	2,44%	0,02%	0,02%	0,00%	0,00%	0,02%	0,01%	0,01%	0,09%	0,08%	0,09%	0,18%
fil.Bacteroidetes	2,44%	7,80%	5,43%	5,06%	2,93%	3,91%	3,57%	2,46%	6,43%	4,56%	5,17%	2,90%
c.Actinobacteria	0,00%	1,78%	2,05%	2,21%	0,76%	0,38%	0,40%	0,77%	0,80%	0,80%	1,30%	0,89%

Microrganismos	Inóculo				Fase 2 (Primeira Safra)				Fase 6 (Segunda Safra)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
c.Alphaproteobacteria	0,00%	0,03%	0,06%	0,00%	0,06%	0,05%	0,04%	0,04%	0,02%	0,01%	0,02%	0,01%
c.Bacteroidia	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,02%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,01%
c.Deinococci	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,01%	0,00%
c.Erysipelotrichia	0,00%	0,03%	0,01%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,09%	0,10%	0,11%	0,67%
c.Flavobacteriia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,06%	0,01%
c.Methanobacteria	0,00%	0,03%	0,08%	0,06%	0,03%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,01%
c.Spirochaetia	0,00%	0,09%	0,03%	0,00%	0,13%	0,07%	0,05%	0,09%	0,02%	0,03%	0,04%	0,04%
c.Synergistia	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,25%	0,25%	0,34%	0,24%	0,10%	0,04%	0,00%	0,00%
c.Verrucomicrobiae	0,00%	0,00%	0,02%	0,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
d.Archaea	0,00%	0,03%	0,12%	0,13%	0,00%	0,03%	0,03%	0,01%	0,01%	0,02%	0,01%	0,03%
d.Thermus	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%
f.Acetobacteraceae	0,00%	0,07%	0,04%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	0,01%	0,01%	0,01%	0,02%	0,00%
f.Acholeplasmataceae	0,00%	0,08%	0,05%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,01%	0,05%	0,06%	0,05%	0,15%
f.Alcaligenaceae	0,00%	0,06%	0,19%	0,25%	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,13%	0,14%	0,21%	0,11%
f.Anaerolineaceae	0,00%	0,02%	0,02%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,01%	0,03%
f.Carnobacteriaceae	0,00%	0,06%	0,02%	0,13%	1,57%	1,28%	0,42%	0,78%	0,29%	0,08%	0,13%	0,45%
f.Clostridiaceae1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,06%	0,07%	0,01%	0,01%
f.Clostridiaceae2	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,27%	3,04%
f.ClostridialesIncertaeSedisXIII	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
f.Comamonadaceae	0,00%	0,23%	0,22%	0,19%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,27%	0,38%	0,51%	0,33%
f.Coriobacteriaceae	0,00%	0,24%	0,11%	0,13%	0,53%	0,41%	0,49%	0,85%	0,02%	0,07%	0,08%	0,13%
f.Enterobacteriaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,02%	0,03%

Microrganismos	Inóculo				Fase 2 (Primeira Safra)				Fase 6 (Segunda Safra)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
f.Enterococcaceae	0,00%	0,00%	0,01%	0,06%	0,04%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
f.Erythrobacteraceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%
f.Flavobacteriaceae	0,00%	0,02%	0,00%	0,13%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,05%	0,03%	0,05%
f.Geobacteraceae	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,03%	0,04%	0,08%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
f.Lachnospiraceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,25%	0,03%	0,01%	0,02%
f.Peptococcaceae1	0,00%	0,02%	0,04%	0,00%	0,02%	0,05%	0,04%	0,03%	0,04%	0,03%	0,03%	0,02%
f.Peptococcaceae2	0,00%	0,17%	0,17%	0,13%	0,04%	0,03%	0,01%	0,01%	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%
f.Planococcaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,02%	0,00%	0,01%	0,01%	0,03%	0,03%	0,16%
f.Porphyromonadaceae	0,00%	2,61%	2,09%	2,59%	1,99%	0,91%	0,97%	1,14%	1,49%	0,93%	1,48%	0,58%
f.Rhodobacteraceae	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,03%	0,03%	0,01%
f.Ruminococcaceae	0,00%	0,50%	0,56%	0,82%	0,50%	0,33%	0,46%	0,59%	0,23%	0,25%	0,36%	0,66%
f.Sphingobacteriaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%
f.Sphingomonadaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%
f.Spirochaetaceae	0,00%	0,07%	0,05%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	0,03%	0,02%
f.Synergistaceae	0,00%	0,03%	0,02%	0,25%	0,09%	0,10%	0,03%	0,03%	0,04%	0,04%	0,03%	0,01%
f.Syntrophaceae	0,00%	0,30%	0,44%	0,38%	0,06%	0,12%	0,16%	0,17%	0,01%	0,02%	0,05%	0,08%
f.Syntrophomonadaceae	0,00%	0,02%	0,06%	0,06%	0,40%	0,18%	0,13%	0,12%	0,03%	0,01%	0,01%	0,02%
f.Veillonellaceae	0,00%	0,33%	0,25%	0,57%	0,23%	0,12%	0,11%	0,11%	0,05%	0,03%	0,04%	0,07%
g.Acetanaerobium	0,00%	0,05%	0,02%	0,00%	0,19%	0,14%	0,09%	0,05%	2,94%	1,63%	1,11%	0,04%
g.Acetobacter	0,00%	0,02%	0,03%	0,13%	0,02%	0,02%	0,02%	0,03%	0,01%	0,00%	0,02%	0,01%
g.Acholeplasma	0,00%	1,91%	2,41%	1,64%	0,04%	0,10%	0,04%	0,06%	2,11%	4,42%	5,70%	15,56%
g.Acidaminococcus	0,00%	0,06%	0,03%	0,06%	0,00%	0,02%	0,01%	0,03%	0,03%	0,02%	0,03%	0,02%

Microrganismos	Inóculo				Fase 2 (Primeira Safra)				Fase 6 (Segunda Safra)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
g.Acinetobacter	0,00%	0,77%	0,56%	0,88%	0,24%	0,12%	0,12%	0,17%	0,99%	1,67%	1,64%	1,29%
g.Advenella	0,00%	0,15%	0,08%	0,06%	0,00%	0,02%	0,00%	0,01%	0,13%	0,13%	0,13%	0,05%
g.Alcaligenes	0,00%	0,06%	0,01%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,04%	0,02%
g.Alkalibacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,04%	0,03%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
g.Alkaliphilus	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,23%	1,15%
g.Aminivibrio	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,03%	0,08%	0,15%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Aminobacterium	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,06%	0,10%	0,09%	0,07%	0,00%	0,02%	0,01%	0,03%
g.Anaerocella	0,00%	0,03%	0,10%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,00%	0,02%	0,01%
g.Anaerofilum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,03%	0,03%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Anaerovorax	0,00%	0,15%	0,09%	0,32%	0,10%	0,12%	0,13%	0,06%	0,05%	0,07%	0,05%	0,07%
g.Arcobacter	0,00%	3,78%	10,36%	4,80%	0,05%	0,07%	0,02%	0,06%	3,82%	14,05%	3,10%	11,63%
g.Bacteroides	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Blautia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Brevundimonas	0,00%	0,01%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,28%	0,25%	0,30%	0,05%
g.Candidate_Endomicrobium	0,00%	0,03%	0,02%	0,06%	0,11%	0,05%	0,03%	0,04%	0,06%	0,06%	0,03%	0,02%
g.Clostridiumsensustricto	0,00%	0,03%	0,13%	0,19%	0,07%	0,10%	0,12%	0,03%	0,08%	0,07%	0,07%	0,21%
g.ClostridiumXI	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,02%
g.ClostridiumXVIII	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,02%	0,01%	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Cryptanaerobacter	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,04%	0,03%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Desemzia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,01%	0,01%	0,10%	0,08%	0,09%	0,08%
g.Erysipelothrix	0,00%	0,03%	0,02%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,03%	0,02%	0,02%
g.Eubacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%

Microrganismos	Inóculo				Fase 2 (Primeira Safra)				Fase 6 (Segunda Safra)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
g.Exiguobacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%	0,67%	0,54%	0,05%	0,01%	0,00%	0,01%	0,02%
g.Flavobacterium	0,00%	0,37%	2,42%	0,82%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	5,42%	6,69%	9,36%	4,57%
g.Gemmobacter	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,27%	0,30%	0,49%	0,09%
g.Geobacter	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Geovibrio	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,03%	0,13%
g.Gp18	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,04%	0,01%	0,02%	0,02%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%
g.Gp6	0,00%	0,17%	0,16%	0,19%	0,00%	0,07%	0,10%	0,06%	0,10%	0,14%	0,14%	0,12%
g.Gracilibacter	0,00%	0,01%	0,06%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,02%	0,00%	0,01%
g.Kurthia	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Lactivibrio	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Lactobacillus	0,00%	0,01%	0,01%	0,06%	0,11%	0,08%	0,11%	0,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
g.Lactococcus	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Lampropedia	0,00%	0,13%	0,05%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,03%	0,02%	0,02%
g.Lysinibacillus	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,03%	0,01%	0,00%
g.Megasphaera	0,00%	0,58%	0,60%	1,39%	0,19%	0,28%	0,37%	0,35%	0,11%	0,11%	0,16%	0,12%
g.Mesotoga	0,00%	0,28%	0,38%	0,57%	0,13%	0,14%	0,13%	0,10%	0,11%	0,12%	0,05%	0,06%
g.Methanobacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,02%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%
g.Methanosarcina	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,21%	0,05%	0,02%	0,02%	0,02%	0,00%	0,00%	0,04%
g.Methanothrix	0,00%	0,21%	0,24%	0,25%	0,69%	0,77%	0,85%	0,38%	0,22%	0,24%	0,11%	0,29%
g.Microgenomates	0,00%	0,02%	0,12%	0,06%	0,14%	0,07%	0,08%	0,04%	0,03%	0,05%	0,03%	0,13%
g.Mitsuokella	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,06%	0,05%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
g.Myroides	0,00%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,02%

[illegible]

A ordem Lactobacillales também demonstrou elevada representatividade no sistema RAHLF durante a fase 2 (Figura 34). Esta possui vários gêneros e são conhecidos por produzirem ácido láctico como o principal produto de fermentação dos açúcares, podendo utilizar açúcares de cadeia curta facilmente fermentáveis para o seu crescimento. Os membros desta ordem são capazes de produzir altas concentrações de ácidos láctico e acético em curto prazo durante a fermentação acidogênica. Além disto, apresentam alta tolerância ao ácido, sobrevivendo a valores de pH de inferiores a 5,0 além de poderem acidificar o meio (Tannock, 2004; Blasco et al., 2020).

O gênero *Arcobacter* foi verificado no sistema RAHLF em todas as fases (Tabela 34), entretanto a sua presença foi um pouco mais expressiva no lodo de inóculo e no lodo coletado durante a fase 6 do experimento. Bactérias do gênero *Arcobacter* são bastante conhecidas por serem considerados enteropatógenos emergentes e/ou potenciais agentes zoonóticos. Há alguns anos, o gênero foi ampliado com várias novas espécies (Vandamme, 1991; Collado e Figueras, 2011). São comuns em águas residuárias em todo o mundo, entretanto a sua origem ainda não está bem descrita, todavia, já foi relatado que essas bactérias são capazes de crescer em biofilmes aderidos em superfícies de tubos presentes em sistemas de tratamento de efluentes, e além disto, foi considerado um gênero fundamental envolvido na difusão de plasmídeos, incluindo a transferência de genes de resistência a antibióticos do esgoto para o meio ambiente (Doudah et al 2014; Narbenovich et al., 2017; Kristensen et al., 2020).

Os grupos de microrganismos que foram possíveis de serem identificados no sistema RAHLF demonstraram que o sistema de tratamento representou um ambiente bastante diverso, o que comprova a importância do estudo da biologia molecular juntamente com os processos físico-químicos realizados para o monitoramento, parâmetros operacionais executados, e dos produtos intermediários e finais gerados durante as etapas da digestão anaeróbia. O conjunto de informações avaliados podem permitir que haja melhorias nos sistemas de tratamento anaeróbios, permitindo assim um maior rendimento de gás metano como produto final.

Neste experimento, foi verificado em todas as amostras de lodo (R1, R2, R3 e R4) a presença de microrganismos pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* (Tabela 34), grupo de bactérias conhecidas por serem bactérias gram-negativas

redutoras de sulfato. Em sistemas de tratamento anaeróbios, os microrganismos produtores de H_2S são, provavelmente, bactérias sulforedutoras, grupo de procariotos onde estão inseridas diversas linhagens filogenéticas capazes de compartilhar vias metabólicas permitindo o uso de sulfato, a forma mais oxidada de enxofre, como aceptor de elétrons para a oxidação da matéria orgânica, resultando na produção de H_2S (Gibson, 1990).

As bactérias redutoras de sulfato podem ser classificadas, principalmente, em dois grandes grupos metabólicos, sendo um deles o grupo de espécies que oxidam seus substratos de maneira incompleta até o acetato como as espécies pertencentes ao gênero *Desulfobulbus* sp, *Desulfomonas* sp, e uma variedade de espécies do gênero *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio*. O outro grupo é composto por bactérias capazes de oxidar completamente os substratos orgânicos, incluindo do acetato até o gás carbônico (Ex: gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosacina*, *Desulfobacterium* e *Desulfonema*) (Chernicharo, 2016).

A produção de H_2S por bactérias sulforedutoras pode ser considerada uma atividade indesejável no processo de digestão anaeróbia, pois além de gerar riscos aos operadores do sistema também gera danos relacionados à corrosão de tubulações (St-Pierre e Wright, 2017). O gênero *Desulfovibrio* pertence à classe Deltaproteobacteria. As fontes de carbono preferenciais para bactérias pertencentes deste gênero são compostos orgânicos como lactato, piruvato e malato e álcoois, como o etanol, propanol e butanol (Gibson, 1990). Segundo Shah et al. (2014), *Desulfovibrio* pode participar, juntamente com o gênero *Methanobacterium*, na formação de CH_3COOH e H_2 no processo de respiração e da digestão anaeróbia, utilizando o sulfato e lactato para dar origem aos produtos mencionados. Vale ressaltar que este gênero pode competir com os microrganismos metanogênicos ao utilizar o mesmo substrato, produzindo o H_2S , dificultando a formação de metano. Compostos específicos presentes na vinhaça, como fenóis e melanoidinas, e a presença de sulfato, podem ocasionar inibições de populações microbianas anaeróbias, especialmente arqueias metanogênicas. Como mencionado anteriormente, as destilarias da cana-de-açúcar aplicam amplamente o ácido sulfúrico para se evitar a contaminação microbiana, sendo possível ser encontrada na vinhaça valores de sulfato de até $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Kiyuna et al., 2017).

Comparativamente, neste estudo, a diversidade das arqueias presente no sistema RAHLF (Figura 35) apresentaram-se inferiores em relação à comunidade bacteriana (Tabela 34), provavelmente, devido à baixa diversidade filogenética inerente às arqueias (Guo et al., 2014). Para o lodo de inóculo, poucas sequências de arqueias foram detectadas para o R1 (Figura 35), tornando-se pouco expressiva no gráfico.

A elevada dominância da comunidade bacteriana sobre as arqueias pode ser explicada pela alta taxa de crescimento e da elevada versatilidade metabólica desses microrganismos (Bolello-Suárez et al., 2018). Foram verificadas a presença de arqueias pertencentes aos gêneros *Methanotrix* (classe: Methanomicrobia), *Methanosarcina* (classe: Methanomicrobia) e *Methanobacterium* (classe: Methanobacteria). Barros et al. (2017) relataram a presença de arqueias das classes Methanomicrobia e Methanobacteria em sistema de tratamento composto por UASBs termofílicos dispostos em série na digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar com torta de filtro. Botello-Suárez et al. (2018) também descreveram a presença de arqueias do gênero *Methanosarcina* e *Methanobacterium* no lodo de um sistema mesofílico composto por reatores UASB em dois estágios tratando águas residuárias de processamento de café.

Grande parte dos estudos que envolvem a determinação da composição de arqueias na degradação anaeróbia menciona representantes do filo Euryarchaeota, demonstrando também que os microrganismos mais abundantes deste filo estão intimamente relacionados ao gênero *Methanotrix* (Vitézová et al., 2020). Embora arqueias *Methanotrix*, ou *Methanosaeta*, frequentemente estejam associadas à metanização pela via acetoclástica, estudos recentes têm demonstrado que espécies de *Methanotrix* também são capazes de aceitar elétrons para a redução do dióxido de carbono em metano por vias hidrogenotróficas (Detman et al., 2021). As *Methanotrix* são capazes de aceitar elétrons entre espécies por meio de transferência direta (DIET) para a redução do dióxido de carbono ao metano (Zhao et al., 2020). Normalmente, a transferência de elétrons entre espécies ocorre pela transferência de elétrons indireta e direta (Yin et al., 2017). De acordo com Rotaru et al. (2014), quando espécies de *Methanotrix* recebem parte da sua energia vinda da DIET, este

grupo cresce mais rapidamente quando existe apenas o acetato como fonte de energia.

Elevadas abundâncias de bactérias dos filos Cloacimonetes e Firmicutes demonstraram a importância destes dois grupos para a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar. No entanto, microrganismos com baixa abundância também se correlacionam com importantes parâmetros bioquímicos e podem ter efeitos substanciais no desempenho do processo (Blasco et al., 2020). Tendo em vista os resultados da análise microbiana encontrados neste trabalho, podemos inferir que a comunidade microbiana diversa pode ter promovido associações sintróficas, contribuindo desta forma, para a degradação dos compostos orgânicos presentes na vinhaça. Deste modo, este estudo fornece informações inéditas sobre o microbioma de um sistema de tratamento anaeróbio composto por reatores horizontais de leito fixo, tratando a vinhaça sobre elevadas cargas orgânicas volumétricas, contribuindo para que indústrias sucroenergéticas possam realizar possíveis aplicações desta conformação de reatores em escala real para a produção de metano. A identificação de microrganismos em consórcio envolvidos na digestão anaeróbia pode colaborar para tecnologias de digestão anaeróbia, sendo de grande relevância para aumentar a produção de gás metano, tornando possível também, o isolamento microbiano, bioaugmentação e co-culturas do microrganismo de interesse (Iltchenko et al., 2019).

Na figura 36, é possível visualizar por meio da árvore de calor, a comparação da comunidade microbiana presentes nos lodos do sistema de tratamento RAHLF, coletados durante a fase 2 e fase 6 do experimento, ambas correspondentes aos períodos de final de safra da cana-de-açúcar (primeira e segunda safra, respectivamente). A tendência das cores representa a abundância (em nível de gênero) de microrganismos favorecidos durante a fase 2 (coloração vermelha) e durante a fase 6 (coloração azul). Como exemplo, podemos observar que para as condições da fase 2, a família lactobacillaceae (ordem: Lactobacillales) foi altamente favorecida. No entanto, para a família Bacillales Incertae Sedis XII (ordem: Bacillales) houve maior abundância destes microrganismos durante a fase 6. Os microrganismos com nomes expostos possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

A figura 37 representa, comparativamente, a abundância de microrganismos favorecidos em condições de concentrações de cobalto mais elevadas e em condições de concentrações baixas de cobalto. Altas concentrações de Co no sistema está associado à maior abundância de arqueias da classe Methanobacteria, enquanto que para baixas concentrações de Co, arqueias pertencentes à família Methanosarsinaceae foram favorecidas. O cobalto (Co) é essencial para o funcionamento dos microrganismos acetogênicos e metanogênicos devido ao seu envolvimento nas coenzimas cobamidas, responsáveis pelas transferências do grupo metil (Safaric et al., 2020). Abdelwahab et al. (2021) também alegaram que o Co é um elemento importante, sendo essencial para a degradação do metanol por microrganismos metanogênicos, além de também ser considerado um fator chave na oxidação do acetato em CO_2 e H_2 , tornando-os disponíveis aos metanogênicos hidrogenotróficos.

Para condições de menores e maiores produção de metano (Figura 38), poucos microrganismos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Os períodos de menor produção volumétrica de metano foram associados à maior abundância de bactérias do gênero *Syntrophorhabdaceae* e bactérias do filo Elusimicrobia.

O microbioma core, apresentado na figura 39, exhibe os microrganismos mais prevalentes para qualquer subconjunto de amostras de lodo avaliados (lodo de inóculo, e lodos coletados nas fases 2 e 6 do experimento). Observa-se que, para 100% das amostras avaliadas (1.0 – tonalidade amarronzada), é possível detectar no mínimo 6,9% de bactérias do gênero *Sedimentibacter*. Dando outro exemplo, para 70% das amostras avaliadas, é possível detectar pelo menos 2,2% de bactérias do gênero *Arcobacter*.

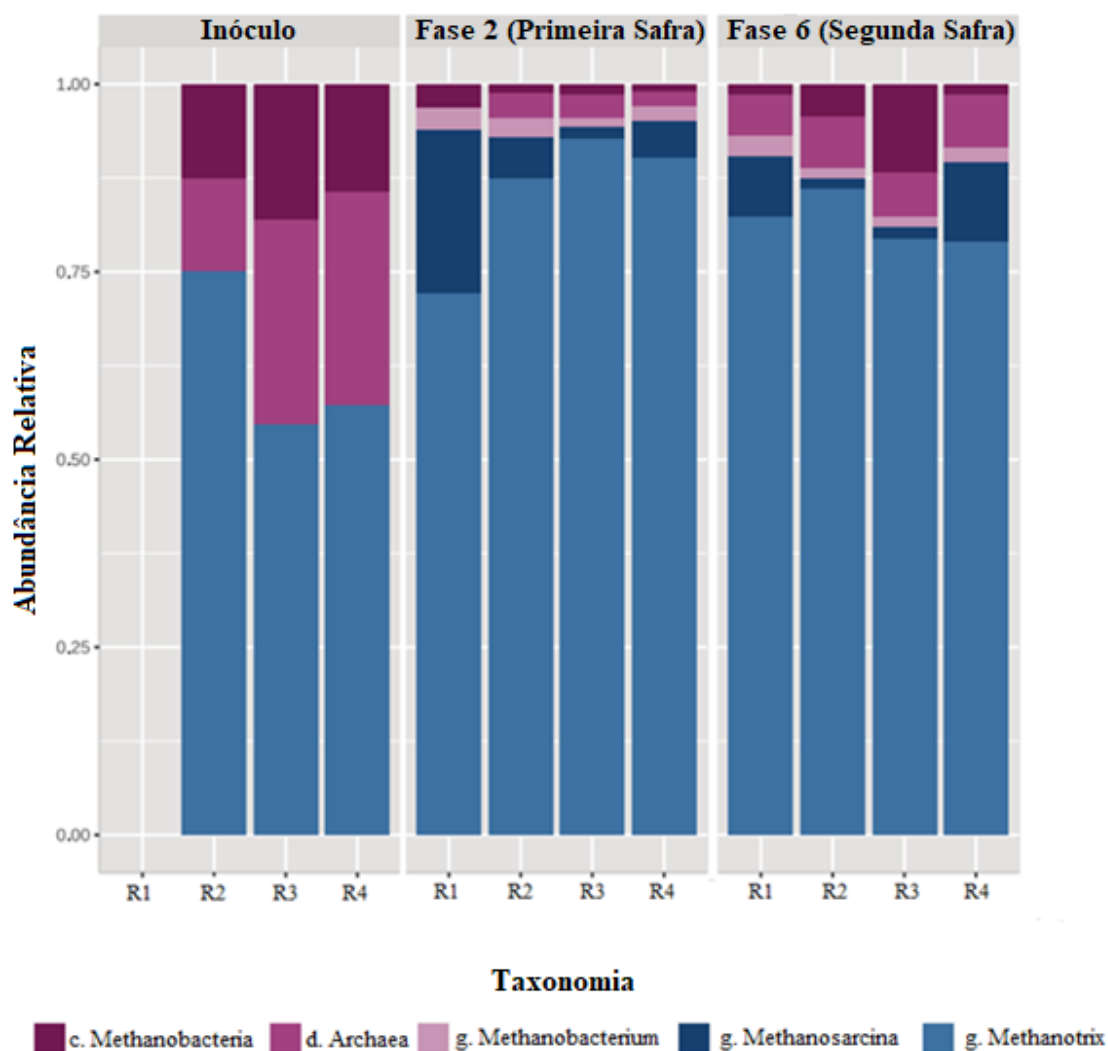


Figura 35. Afiliações taxonômicas de arqueias e abundância relativa de classes e gêneros verificadas em amostras de lodo dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF: R1, R2, R3 e R4), coletados no lodo de inóculo e nas fases 2 e 6, correspondentes à primeira e segunda safra da cana-de-açúcar, respectivamente.

Tabela 35. Composição e classificação dos principais membros de arqueias verificadas no lodo do sistema RAHLF (R1, R2, R3 e R4).

Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanonosaeaceae	<i>Methanotrix ou Methanosaeta</i>
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	-	-	-
Archaea	-	-	-	-	-

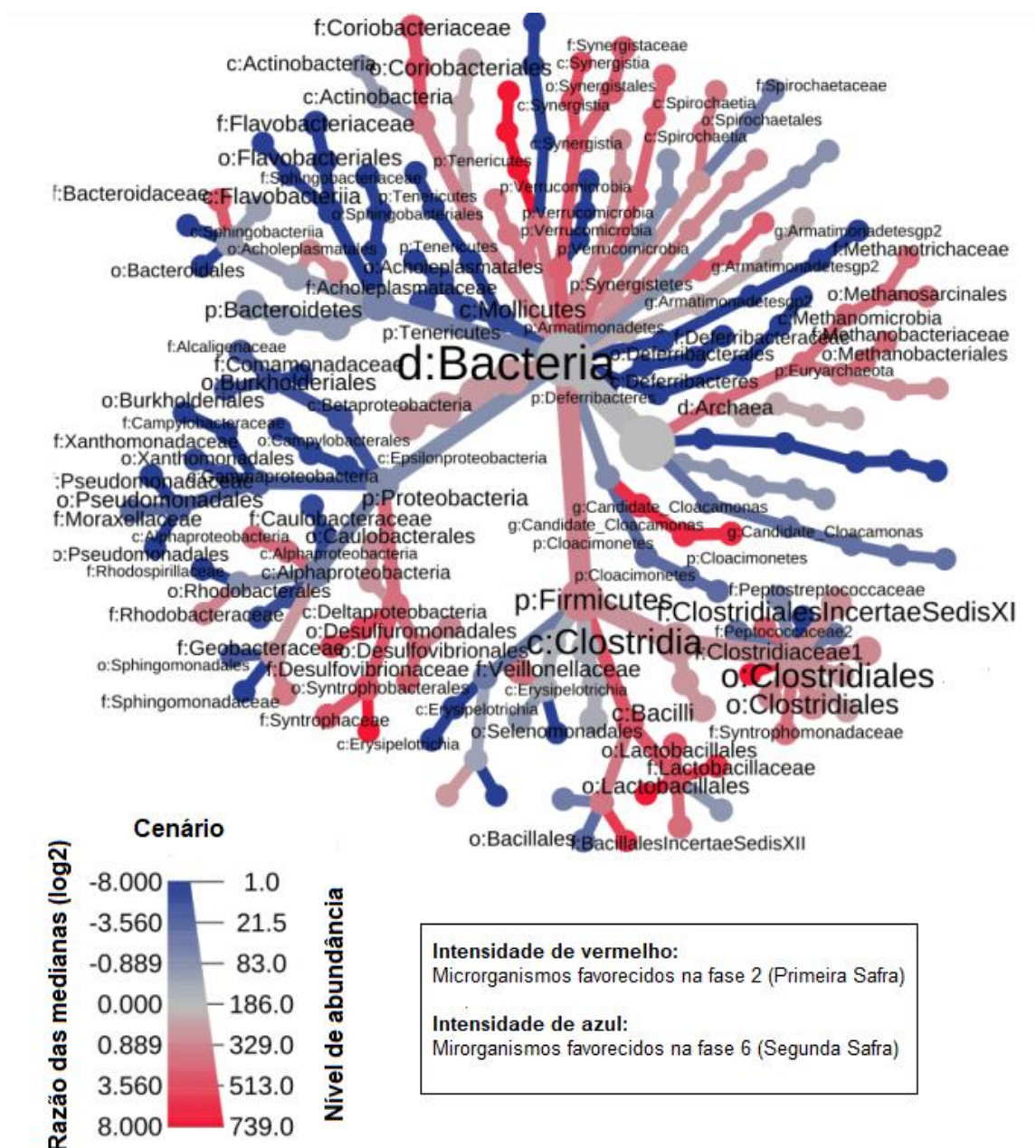


Figura 36. Árvore de calor: Comparação da comunidade microbiana verificada no lodo presente no sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF - R1+R2+R3+R4), em diferentes períodos experimentais, correspondentes às fases 2 (primeira safra da cana-de-açúcar) e 6 (segunda safra da cana-de-açúcar). Os microrganismos cujo nome está exposto, possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). C: classe; d: domínio; f: família; g: gênero; p: filo; o: ordem.

Cobalto baixo (vermelho) vs Cobalto alto (azul)

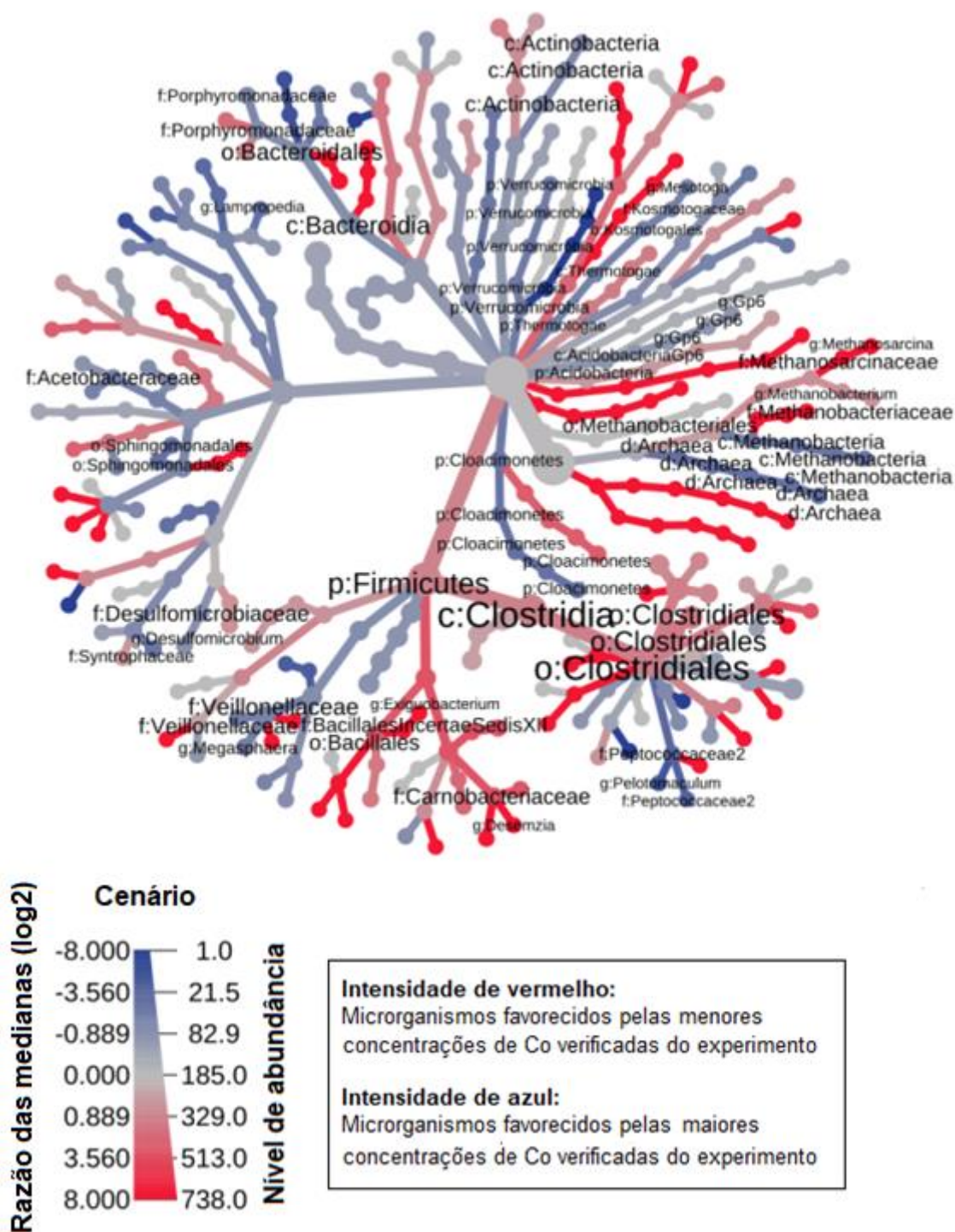


Figura 37. Árvore de calor: Comparação da comunidade microbiana verificada no lodo presente no sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF - R1+R2+R3+R4), em condições de ambiente com baixas e elevadas concentrações de Cobalto. Os microrganismos cujo nome está exposto, possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). C: classe; d: domínio; f: família; g: gênero; p: filó; o: ordem.

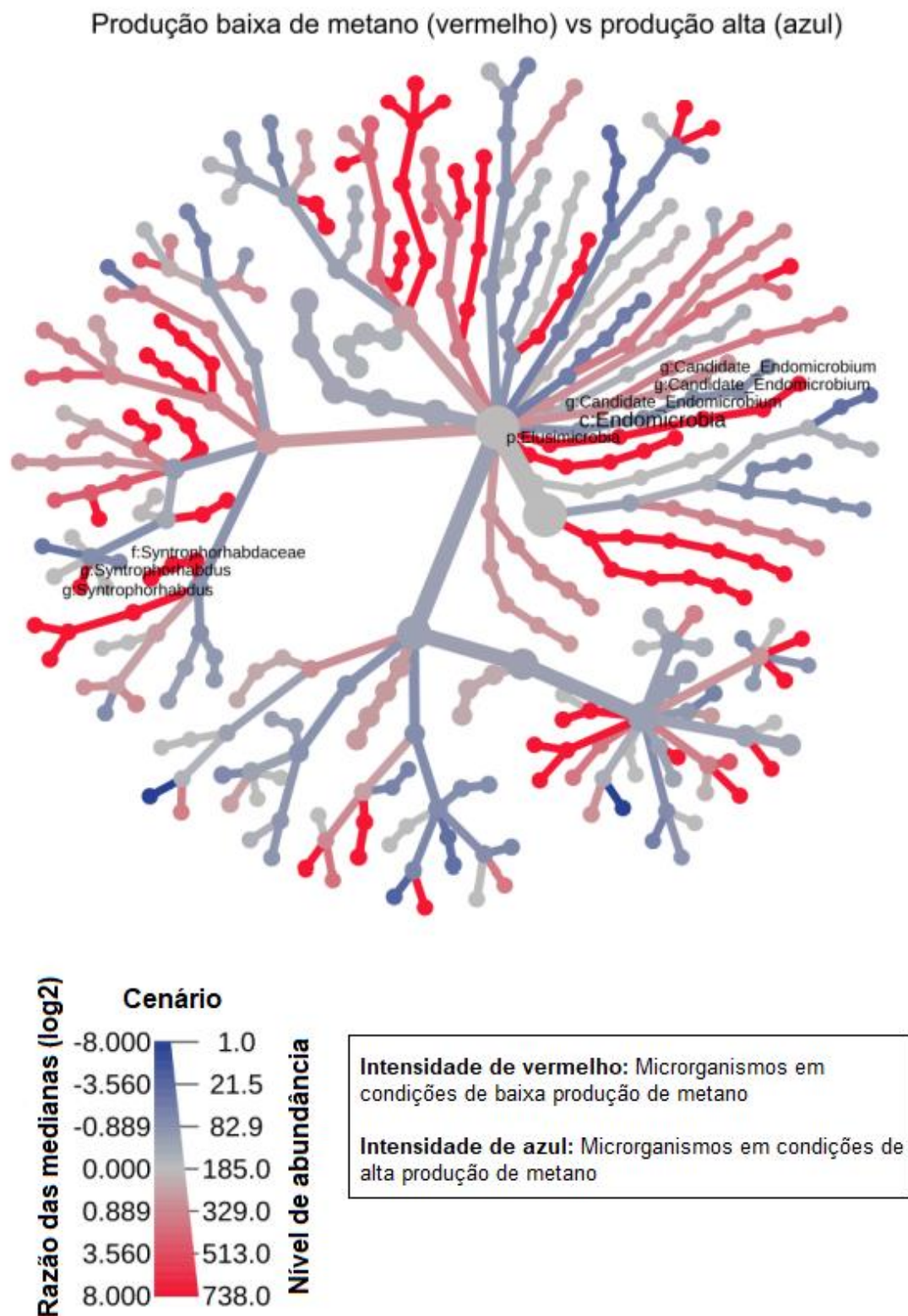


Figura 38. Árvore de calor: Visualização da comunidade microbiana verificada no lodo presente no sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF -R1+R2+R3+R4), em condições de alta e de baixa produção volumétrica de metano. Os microrganismos cujo nome está exposto, possuem diferença significativa pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). C: classe; f: família; g: gênero; p: filo.

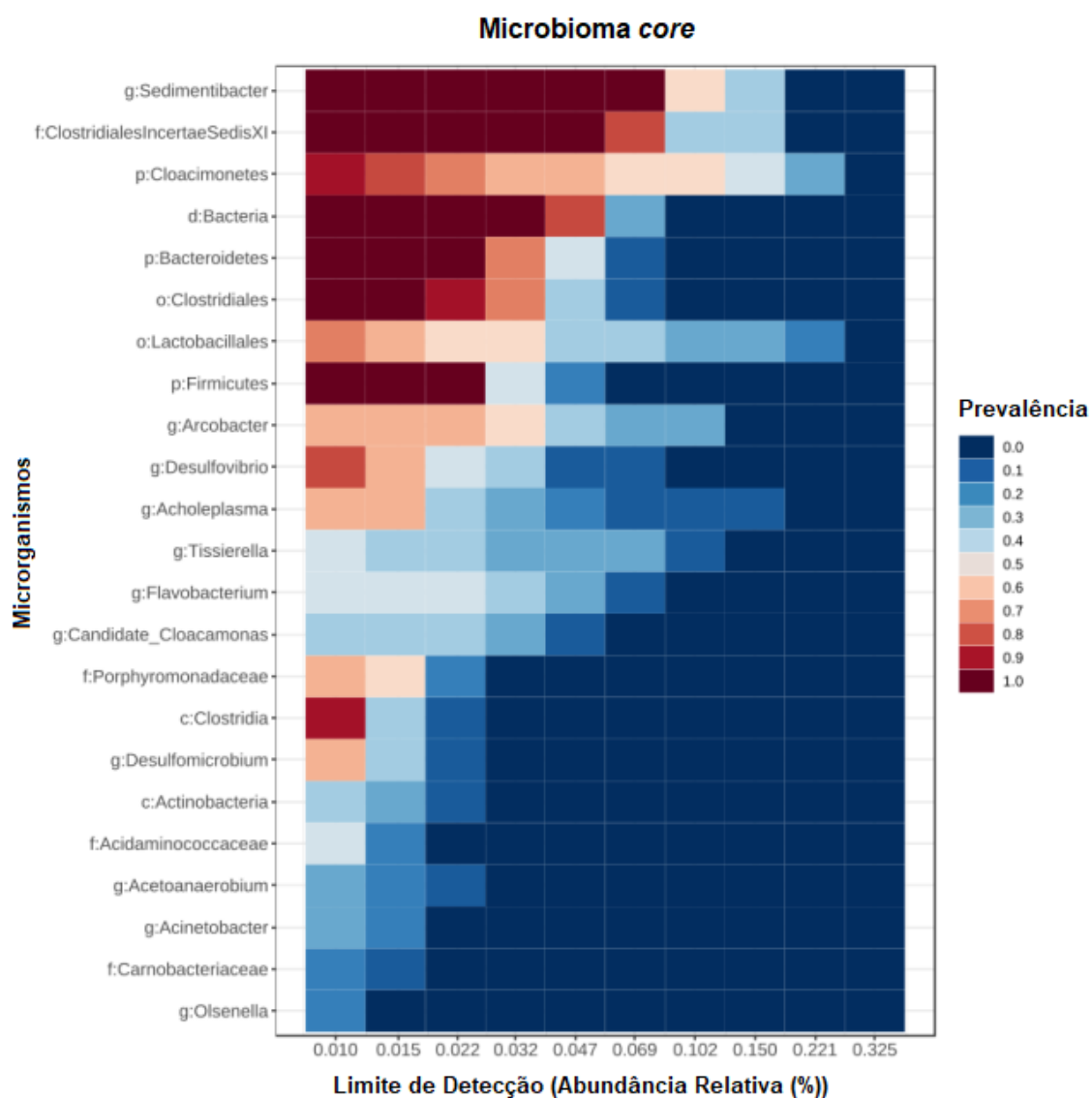


Figura 39. Microbioma core realizado para amostras de lodos coletados no sistema composto pelos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (RAHLF - R1+R2+R3+R4). C: classe; d: domínio; f: família; g: gênero; p: filo, o: ordem.

5.12. Quantificação da microbiota (q-PCR)

Para que haja a conversão de matéria orgânica em metano são necessárias interações de diversas espécies microbianas, sendo os principais grupos envolvidos as bactérias fermentativas, bactérias acetogênicas e as arqueias metanogênicas (Ferrera et al., 2016). Neste experimento, os principais grupos de micro-organismos responsáveis pela digestão anaeróbia, contidos no lodo dos reatores (lodo de inóculo e lodo das fases 2 e 6), foram quantificados por qPCR (Figuras 40 e 41).

Amostras de DNA do lodo de inóculo e do lodo dos reatores coletadas ao final da fase 2 do experimento (primeira safra) demonstraram que os domínios Bacteria e Archaea apresentaram-se em equilíbrio nos reatores anaeróbios horizontais em série, com valores entre $1,0 \times 10^{11}$ - $2,0 \times 10^{11}$ cópias do gene 16S rDNA/g SV para Bacteria, e valores entre $5,0 \times 10^9$ – $1,0 \times 10^{10}$ cópias do gene 16S rDNA/g SV para Archaea para o lodo de inóculo (Figura 40). No lodo extraído da fase 2 do experimento, os valores verificados para os domínios Bacteria e Archaea variaram de $3,0 \times 10^{11}$ a $2,0 \times 10^{12}$ e de $2,0 \times 10^{10}$ a $1,0 \times 10^{11}$ cópias do gene 16S rDNA/g SV, respectivamente (Figura 41-A). O balanço entre estes domínios foi comprovado também por Duda et al. (2015) tratando resíduos de suinocultura em reatores anaeróbios horizontais, e por Barros et al., (2017) tratando resíduo de vinhaça em reatores UASB.

Em relação às ordens metanogênicas estudadas, a Methanosarcinales foi a que apresentou maior abundância no número de cópias do gene 16S rDNA, tanto para os resultados do lodo de inóculo (Figura 40) quanto para o lodo coletado na fase 2 (Figura 41-A). As ordens Methanomicrobiales e Methanobacteriales apresentaram valores similares (Figuras 40 e 41-A). Estes dois últimos grupos de metanogênicas são estritamente hidrogenotróficas, e a leve redução na concentração destes indivíduos indica uma provável competição pelos substratos presentes no meio. No entanto, as famílias Methanosaetacea (acetoclástica) e Methanosarcinaceae (acetoclástica e hidrogenotrófica), correspondentes à ordem Methanosarcinales, responsáveis pela produção do metano e dióxido de carbono, se apresentaram altamente abundantes em todo o sistema de tratamento no lodo de inóculo (Figura 40) e durante o período

experimental ocorrido na fase 2, correspondente à primeira safra (Figura 41-A). As acetoclásticas utilizam o acetato como fonte de energia e carbono. Já as hidrogenotróficas aproveitam o gás carbônico como fonte de carbono e sãoceptoras de átomos de hidrogênio como fonte de energia (Aquino and Chernicharo, 2005; Pilarska, 2018).

Com relação aos resultados de qPCR do lodo coletado ao final da 2ª safra (fase 6), foram observadas alterações na composição microbiana (Figura 41-B), visto que nos domínios Bacteria e Archaea foram verificados número de cópias do gene 16S rDNA em menor abundância quando comparado ao balanço realizado ao final da fase 2 (Figura 41-A). Essa alteração pode estar associada à presença de compostos recalcitrantes permanentes no sistema por um longo período experimental.

Em relação às ordens Methanobacteriales, Methanomicrobiales e Methanosarcinales, as concentrações verificadas, durante a fase 6, foram similares para Methanobacteriales e Methanomicrobiales, indicando que houve o aumento da abundância destes dois grupos e redução da abundância de Methanosarcinales (Figura 41-B). O aumento da abundância de microrganismos pertencentes às ordens Methanobacteriales e Methanomicrobiales pode ser resultante de uma maior produção de H^+ no sistema, todavia, a presença dos mesmos em grande quantidade ajuda a manter as concentrações de hidrogênio dissolvido no sistema baixos, visto que são consumidos por esses microrganismos, evitando desta forma, a redução do pH e consequentemente a desestabilização de todo o processo anaeróbio.

Em relação às famílias (fase 6), foi observada a predominância de Methanosarcinaceae, que por sua vez possui afinidade baixa pelo acetato, podendo utilizar o hidrogênio como fonte de energia. Os microrganismos pertencentes a esta família possuem uma taxa de crescimento específico maior quando comparado aos microrganismos da família Methanocetaceae (Chernicharo, 2016). Esta última possui uma elevada afinidade por acetato. Sendo assim, podemos inferir que, para a fase 6, a produção do metano pode ter ocorrido principalmente a partir do hidrogênio, por meio de vias metanogênicas hidrogenotróficas.

Tendo em vista que o sequenciamento de segunda geração (Illumina) demonstrou elevada abundância relativa de arqueias do gênero *Methanotrix*

(Figura 35), comumente caracterizado como acetoclásticos, e levando em consideração de que estudos recentes têm demonstrado que existem espécies destes microrganismos que podem produzir o metano também pela via hidrogenotrófica (Detman et al., 2021), torna-se necessário maiores estudos para a compreensão de espécies pertencentes a este gênero.

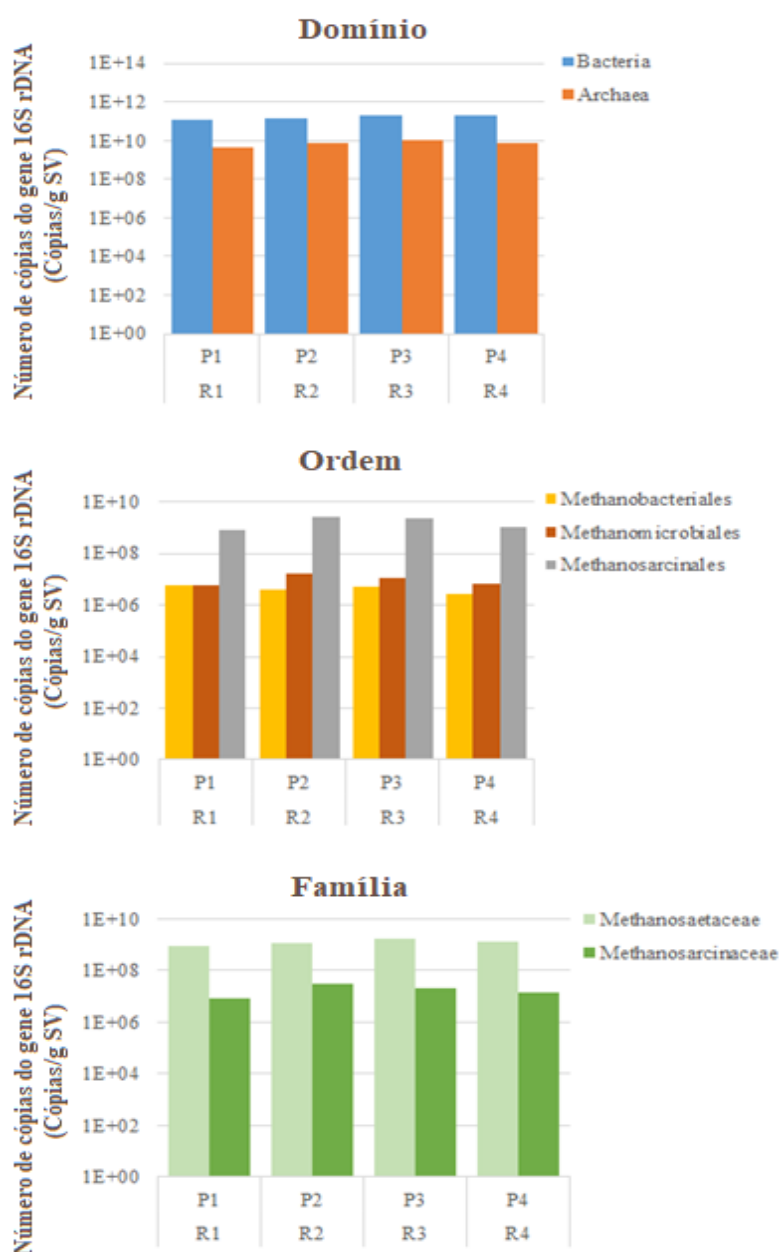


Figura 40. Quantificação (qPCR) do número de cópias do gene 16S rDNA (cópias/gSV) dos principais microrganismos metanogênicos do lodo dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (R1, R2, R3 e R4) em série, coletado no lodo de inóculo. P1, P2, P3, e P4 – Pontos de coleta correspondentes aos lodos coletados, de maneira composta, para cada reator.

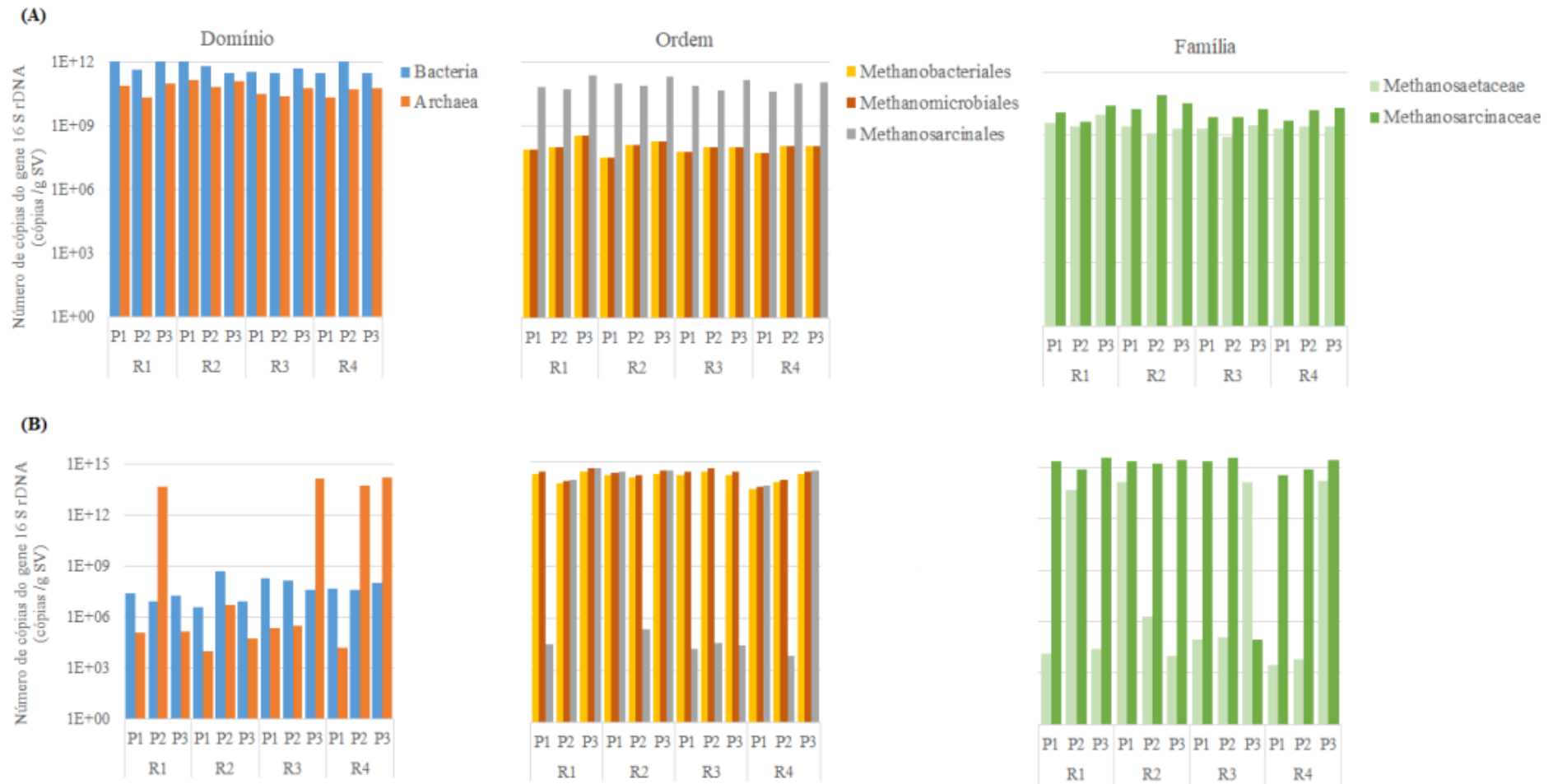


Figura 41. Quantificação (qPCR) do número de cópias do gene 16S rDNA (cópias/g SV) dos principais microrganismos metanogênicos do lodo dos reatores anaeróbios horizontais de alta taxa (R1, R2, R3 e R4) em série. (A): lodo coletado ao final da primeira safra da cana-de-açúcar (fase 2); (B): lodo coletado ao final da segunda safra da cana-de-açúcar (fase 6). P1, P2 e P3: Pontos de coleta das amostras do lodo ao longo de cada reator.

6. CONCLUSÕES

O crescente aumento da carga orgânica volumétrica (COV) aplicado aos reatores RAHLF resultou no aumento das eficiências de remoções da DQO total e das produções volumétricas de metano.

O conjunto de reatores (R1+R2+R3+R4) atingiram eficiências de remoção de DQO elevadas, superiores a 60%. Todavia, para a fase 9, distinguida das demais fases, pela integração do processo Fenton com o processo anaeróbio, foi observado as melhores remoções de DQO (85 %). Além disto, na fase 9 observou-se a redução das concentrações de sulfato, sulfeto e fenóis no sistema, o que favoreceu a produção volumétrica de metano ($0,28 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$) em relação à fase anterior, cujas condições de COVs foram similares. No entanto os valores médios da produção específica de metano, para ambas as fases (8 e 9), apresentaram-se semelhantes.

A recirculação do efluente aos reatores juntamente com a vinhaça *in natura* permitiu a correção do pH, sendo possível o aumento da COV em até $27,9 \text{ g DQO}_{\text{total}} (\text{L d})^{-1}$, sem afetar a digestão anaeróbia e os demais parâmetros de estabilidade dos reatores, por um longo período experimental. Além disto, o sistema apresentou estabilidade sem suplementação nutricional, o que torna o conjunto de reatores um sistema robusto para o tratamento da vinhaça.

O sequenciamento de nova geração (Illumina) realizado no lodo dos reatores, em diferentes fases do experimento, demonstrou uma comunidade microbiana diversa que contribuiu para a eficácia do sistema. A q-PCR demonstrou que para a fase 2, correspondente ao período final da primeira safra da cana-de-açúcar, os domínios Bacteria e Archaea apresentaram-se em equilíbrio nos reatores anaeróbios horizontais em série, com valores entre $3,0 \times 10^{11}$ a $2,0 \times 10^{12}$ e de $2,0 \times 10^{10}$ a $1,0 \times 10^{11}$ cópias do gene 16S rDNA/g SV, respectivamente, e a prevalência de microrganismos da ordem Methanosarcinales e microrganismos da família Methaenosaetaceae e Methanosarcinaceae. O equilíbrio entre os domínios para esta fase pode estar associado à maior produção volumétrica de metano atingida pelo sistema, de $0,34 \text{ L CH}_4 (\text{L d})^{-1}$.

Para a fase experimental 6, podemos inferir que houve uma tendência dos microrganismos a realizarem a metanização por via hidrogenotrófica, visto que foi possível observar o aumento da abundância em números de cópias do gene 16 S rDNA das ordens Methanobacteriales e Methanomicrobiales, além da prevalência da família Methanosarcinaceae. O sequenciamento por Illumina demonstrou, para todas as fases em que os lodos foram avaliados, elevada abundância relativa de arqueias do gênero *Methanotrix*, que por muito tempo foram associadas ao consumo de acetato. Entretanto estudos recentes demonstraram a possibilidade de espécies deste gênero produzirem o metano também por via hidrogenotrófica.

O estudo do perfil longitudinal dos reatores, executado durante a fase 6 do experimento (segunda safra), foi relevante para demonstrar que, apesar da ocorrência da alteração da composição microbiana, o conjunto de reatores apresentou-se estável, sem o acúmulo de ácidos graxos voláteis e redução de pH.

Tendo em vista os resultados da análise microbiana encontrados neste trabalho por meio do sequenciamento de segunda geração, podemos inferir que a comunidade microbiana diversa pode ter promovido associações sintróficas, contribuindo desta forma, para a degradação dos compostos orgânicos presentes na vinhaça. Deste modo, este estudo fornece informações inéditas sobre o microbioma de um sistema de tratamento anaeróbio composto por reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, tratando a vinhaça sobre elevadas cargas orgânicas volumétricas, contribuindo para que indústrias sucroenergéticas possam realizar possíveis aplicações desta conformação de reatores em escala real para a produção de metano, de maneira sustentável, contribuindo para grandes questões de uma nova consciência coletiva, que envolve aspectos ambientais, sociais e de governança (ESG), melhorando também a reputação deste ramo para o público consumidor e aos *stakeholders*.

As estratégias da combinação da digestão anaeróbia com o processo oxidativo avançado Fenton é capaz de melhorar a biodegradabilidade do substrato, sendo capaz de remover a presença de compostos recalcitrantes, melhorando as eficiências de remoções de DQO total e da produção de biogás. Todavia, para melhorias na produção de biogás e rendimento de metano, é sugerida a suplementação de nutrientes conforme as proporções indicadas para

os microrganismos anaeróbios. Além disto, o controle e monitoramento da presença de micronutrientes no afluente é desejável, visto que durante o processo oxidativo (ajuste de pH após a reação) pode haver a precipitação de minerais, como por exemplo, o ferro.

Ressalta-se também a necessidade de maiores estudos das espécies de arqueias pertencentes ao gênero *Methanotrix* para a melhor compreensão da sua atuação para a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar e demais efluentes da agroindústria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelwahab TAM, Mohanty MK, Sahoo PK (2021) Cobalt nanoparticles to enhance anaerobic digestion of cow dung: focusing on kinetic models for biogas yield and effluente utilization. **Biomass Conv. Bioref.** <https://doi.org/10.1007/s133999-021-02002-x>.

Albuquerque JN, Orellana MR., Ratusznei, SM, Rodrigues JA (2019). Thermophilic biomethane production by vinasse in an ANSBBR: start-up strategy and performance optimization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** 36: 717-731.

Alkimin A, Clarke K (2018). Land use change and the carbon debt for sugarcane ethanol production in Brazil. **Land Use Policy.** 72:65-73.

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

Alvarado A, Montañes-Hernández L, Palacio-Molina SL, Oropeza-Navarro R, Luévanos-Escareño MP, Balagurusamy N (2014). Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of anaerobic digesters. **Front Microbiol.** 5: 597.

American Public Health Association, APHA (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22 ed. Washington DC. American Public Health Association, Washington DC.

Appels L, Assche AV, Willems K, Degreve J, Impe VJ, Dewil R (2011). Peracetic acid oxidation as an alternative pre-treatment for the anaerobic digestion of waste activated sludge. **Bioresour. Technol.** 102:4124.

Andrade TE, Carvalho RGC, Souza LF (2009). Programa do Próalcool e o etanol no Brasil. **Engevista.** 11:127-136.

Appels L, Baeyens J, Degrevè K, Dewil R (2008). Principales and potential of the anaerobic digestion of waste-activates sludge. **Prog. Energy Combust.** 34:755-781.

Aquino SF, Chernicharo CAL (2005). Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVS) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Eng. sanit. ambient.** 10:152-161.

Aquino S, Pires EC (2016). Assessment of ozone as a pretreatment to improve anaerobic digestion of vinasse. **Brazilian J. Chem. Eng.** 33:279-285. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160332s20140141>

Arancon RAD, Lin CSK, Chan KM (2013). Advances on waste valorization: new horizons for a more sustainable society. **Energy Sci Eng.** 1:53-71.

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.

Araujo FVF (2008). **Estudo do processo Fenton Heterogêneo utilizando hematita (Fe₂O₃) como catalisador na descoloração de soluções de corante reativo.** 183f. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos), UFRJ, Rio de Janeiro.

Arias JAV (2010). Remoción del sulfuro de hidrógeno (H₂S(g))/ácido sulfhídrico (H₂S(aq)) en el biogás. **ECAG Informa** 53:16-21.

Arimi MM, Zhang Y, Namango SS, Geiben SU (2016). Reuse of recalcitrant-rich anaerobic effluent as dilution water after enhancement of biodegradability by Fenton process. **Journal of Environmental Management.** 168:10-15.

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 Manag.** 38:388-398. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.12.001>

Azhar SHM, Abdulla R, Jambo SA, Marbawi H, Gansau AG, Faik AAM, Rodrigues K (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports.** 10:52–61.

Azevedo A, Fornasier F, Szarblewski MS, Schneider, RZS, Hoeltz M, Souza D. (2017). Life cycle assessment of bioethanol production from cattle manure. **Journal of Cleaner Production.** 162:1021-1030.

Baraldi EA, Damianovic MHRZ, Manfio GP (2008). Performance of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor and dynamics of the microbial community during degradation of pentachlorophenol (PCP). **Anaerobe.** 14:268–274.

Barrera EL, Spanjers H, Dewulf J, Romero O, Rosa E (2013). The sulfur chain in biogas production from sulfate-rich liquid substrates: a review on dynamic modeling with vinasse as model substrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** 16:1405–1420. <https://doi.org/10.1002/jctb.4071>

Barrera EL, Spanjers H, Romero O, Rosa E, Dewulf J (2014). Characterization of the sulfate reduction process in the anaerobic digestion of a very high strength and sulfate rich vinasse. **Chem. Eng. J.** 248:383-393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.057>

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.

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.

Basanta MV, Netto DD et al (2003). Management effects on nitrogen recovery a sugarcane crop grow in Brazil. **Geoderma**. 116:235-248.

Blasco L, Kahala M, Tampio E, Vainio M, Ervasti S, Rasi S (2020). Effect of Inoculum Pretreatment on the Composition of Microbial Communities in Anaerobic Digesters Producing Volatile Fatty Acids. **Microorganisms**. 8:581. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040581>

BMELV (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz / German Ministry for food, agriculture and consumers' protection) (Ed.), (2008). Expertise "Urlaub auf dem Bauernhof / Lande". Bonn.

Bories A, Raynal J, Bazile F (1988). Anaerobic digestion of high-strength distillery wastewater (cane molasses stillage) in a fixed-film reactor. **Biological Wastes**. 23:251-267.

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. **Bioresour. Technol.** 268:158-168. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.091>

Brasil, 2017. Lei Nº 13.576, de 26 de dezembro de 2017. Política Nacional de Biocombustíveis – RENOVBIO. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/l13576.htm

Brasil, 2006. Resolução CONAMA nº. 375. Brazil. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>.

Brasil, 2011. Resolução CONAMA nº. 430. Brazil. Disponível em: <http://conama.mma.gov.br/>

Buller LS, Cristhy WSR, Lamparelli RAC, Ferreira SF, Bortoleto AP, Mussato SI, Foster-Carneiro T (2021). A spatially explicit assessment of sugarcane vinasse as a sustainable by-product. **Science of the Total Environment**. 765:142717. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142717>

Cabello PE, Scognamiglio FP, Teran FJ (2009). Tratamento da vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental**. 6:321-338.

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-Diaz A, Pereda-Reyes I, Oliva-Merencio, Lebrero R, Zaiat M (2017). Anaerobic Digestion of Sugarcane Vinasse Through a Methanogenic UASB Reactor Followed by a Packed Bed Reactor. **Appl Biochem Biotechnol**. 183: 1127–1145.

Callado NH, Damianovic MHZ, Foresti E (2017). Influência da razão DQO/[SO₄²⁻] e da concentração de Na⁺ na remoção de matéria orgânica e sulfato em reator UASB. **Eng. Sanit. e Ambient**. 22:381–390. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522016140811>

Calusinka M, Goux X, Fossépré M, Muller EEL, Wilmes P, Delfosse P (2018). A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems. **Biotechnol Biofuels**. 11:1-19. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1195-8>

Campos CR, Mesquita VA, Silva CF, Schwan RF (2014). Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. **Waste Manag**. 34:2036–2046. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.006>

Cañizares GIL, Rodrigues GIL, Rodrigues L, Cañizares MC (2009). Metabolismo de carboidratos não-estruturais em ruminantes. **Archives of Veterinary Science**. 14:63-73.

Cattony YJ, Chinalia FA, Ribeiro R, Zaiat M, Foresti E, Varesche MBA (2005). Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate. **Biotechnology and Bioengineering**. 91:244-253.

Castro SR, Crutchik D, Garrido JM, Lange LC (2015). Chemical precipitation of struvite: Nutrients recovery in conic fluidized bed reactor using a low-cost industrial magnesia compound. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**. 20:259-268.

Chan, YJ, Chong MF, Law CL, Hassell D (2009). A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chem. Eng. J**. 155:1-18.

Chapleur O, Madigou C, Civade R, Rodolphe Y, Mazéas L, Bouchez T (2016). Increasing concentrations of phenol progressively affect anaerobic digestion of cellulose and associated microbial communities. **Biodegradation**. 27:15-27.

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

Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresour. Technol.** 102; 71-81.

Chen T, Jin Y, Shen D (2015). A safety analysis of food waste-derived animal feeds from three typical conversion techniques in China. **Waste Manag.** 45:42-50.

Chernicharo CAL (2016). Reatores anaeróbios. Belo Horizonte. UFMG, v5, 379p.

Chong S, Sen TK, Kayaalo A, Ang HM (2012). The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. **Water Research.** 46:3434-3470.

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.

Christofolletti CA, Escher, JP, Correia JE, Marinho JFU, Fontenetti CA.(2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Manage.** 33: 2752-2761.

Collado L, Figueras JM (2011). Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews.** 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>

Colin X, Farinet JL, Rojas O, Alazar D (2007). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Bioresour. Technol.** 98:1602–1607.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2017: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Brasília: Conab, 2017.p.73

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2018: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Brasília: Conab, 2018. p.75.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2019: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Brasília: Conab, 2019. p.58.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2020: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Brasília: Conab, 2020. p.57.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2021: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Brasília: Conab, 2021. p.63.

Correia JE, Christofolletti CA, Ansoar-Rodríguez Y, Guedes A, Fontanetti CS (2017). Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to

physicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). **Chemosphere**. 173:494-501.

Cortez LA, Lora EES, Gómez EO (2016). Biomassa para Energia. Campinas: Editora da Unicamp, 2008, 734p.

Cortez L, Magalhaes P, Happi J (1992). Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**. 2:2.

De Souza RP, Girardi F, Santana VS, Fernandes-Machado NRC, Gimenes ML (2013). Tratamento de vinhaça utilizando coagulante tanino vegetal e fotocatalise. **Acta Sci. - Technol**. 35:89–95.

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. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.002>

Demirel B, Scherer P (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. **Biomass and Bioenergy**. 35:992-998.

Detman A, Buchal M, Treu L (2021). Evaluation of acidogenesis products' effect on biogas production performed with metagenomics and isotopic approaches. **Biotechnol Biofuels**. 14:125. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01968-0>

Dey P, Pal P, Kevin JP, Das DB (2020). Lignocellulosic bioethanol production: prospects of emerging membrane technologies to improve the process – a critical review. **Rev Chem Eng**. 36:333-367.

Dhariwal A, Chong J, Habib S, King I, Agellon LB, Xia J (2017). Microbiomeanalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic acids research**. 45:180-188.

Diaz MJ, Madejon E, Lopez F, Lopez, R, Cabrera F (2002). Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. **Process Biochemistry**. 37:1143-1150.

Díaz-Reinoso B, Moure A, González J, Domínguez H (2017). A membrane process for the recovery of a concentrated phenolic product from white vinasses. **Chemical Engineering Journal**. 327:210-217.

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

Doll MMR, Foresti E (2010). Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35 °C. **Eng. Sanit. Ambient**. 15:275-282.

Dos Reis CM, Carosia MF, Sakamoto IK, Vareche MBA, Silva EL (2015). Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an

anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**. 40:8498-8509.

Doudah L, De-Zutter L, Van-Nieuwerburgh F, Deforce D, Ingmer H, Vandenberg O, Abeele AMV, Houf K (2014). Presence and analysis of plasmids in human and animal associated *Arcobacter* species. **PLoS One**. 9:e85487-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085487>

Duarte ICS, Oliveira LL, Saaverdra NK, Fantinatti-Garbogini F, Menezes CBA, Oliveira VM, Varesche MBA (2010). Treatment of linear alkylbenzene sulfonate in a horizontal anaerobic immobilized biomass reactor. **Bioresource Technology**. 101:606–612.

Duda MD, Vantini JS, Martins LS, Varini AM, Lemos MVF, Ferro MIT, Oliveira RA (2015). A balanced microbiota efficiently produces methane in a novel high-rate horizontal anaerobic reactor for the treatment of swine wastewater. **Bioresource Technology**. 197:152-160.

Duncan CL, Colmer AR (1964). Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Appl Microbiol**. 12:173-177.

Echiegu, EA (2015). Kinetic models for anaerobic fermentation processes-a review **Am. J. Biochem. Biotechnol**. 11:132–148.

Edgar RC (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than blast. **Bioinformatics. Oxford University Press**. 26:2460–246.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Notes RKA (2011). Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics. Oxford University Press**. 27:2194–2200.

Edgar RC. 2016a. Unoise2: improved error-correction for illumina 16s and its amplicon sequencing. **BioRxiv**, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 081257. <https://doi.org/10.1101/081257>

Edgar R. 2016b. Syntax: a simple non-bayesian taxonomy classifier for 16s and its sequences. **BioRxiv**, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 074161. <https://doi.org/10.1101/074161>

Elmekawy S, Diels AL, Wever H, Pant D. (2013). Valorization of Cereal Based Biorefinery Byproducts: Reality and Expectations. **Environ. Sci. Technol**. 47:9014-9027

ENGENOVO (2008). Clarificação de xarope por flotação. Rio de Janeiro: TecEn Comercial, 7p. Disponível em: <http://www.engenovo.com.br/infotec/Art%20Tec--Flotacao%20de%20Xarope--2014.pdf>. Acesso em: 28 de abr. de 2018.

Espanã-Gamboa E, Mijangos-Cortes J, Barahona-Perez L, Dominguez-Maldonado J, Hernández-Zarate G, Alzate-Gaviria L (2011). Vinasses:

characterization and treatments. **Waste Management & Research**. 29:1235–1250.

España-Gamboa EI, Mijangos-Cortés JO, Hernández-Zárate G, Maldonado JAD, Alzate-Gaviria LM (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**.5: 82.

España-Gamboa E, Vicent T, Font X, Dominguez-Maldonado J, Canto-Canché B, Alzate-Gaviria L. (2017). Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. **Journal of Biological Engineering**. 6:1-11.

Fares ST. (2007). O Pragmatismo do Petróleo: as relações entre o Brasil e o Iraque. **Rev. bras. polít. int.** [online]. 50:129-145. <https://doi.org/10.1590/S0034-73292007000200009>.

Ferrera I, Sánchez O (2016). Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: How far have we come? **Biotechnol. Adv.** 34:790–802. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.003>

Filho AAV, Ramos P (2006). Próalcool e evidências de concentração na produção e processamento de cana-de-açúcar. **Informações Econômicas**. 36: 48-61.

Foresti WE (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. São Carlos, p.97-110.

Foresti E, Zaiat M, Cabral AKA, Del Nery V (1995). Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment. **Brazilian J. Chem. Engng**. 12: 235-239.

Formann S, Han A, Janke L, Stinner W, Strauber H, Logroño Q, Nikolausz M (2020). Beyond Sugar and Ethanol Production: Value Generation Opportunities Through Sugarcane Residues. **Front. Energy Res**. 8:579577.

Freire WJ, Cortez LAB (2003). Vinhaça de cana-de-açúcar. Guaíba: Agropecuária, 203p.

Friedricha LC, Zantac CLPS, Machulek AJ, Quinab FH (2017). Estudo mecanístico das reações fenton e cupro-fenton por análise voltamétrica in situ. **Quim. Nova**. 40:769-773.

Fuess LT, Garcia ML (2014). Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**. 145:210-229.

Fuess LT, Garcia ML (2015). Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. **Journal of Environmental Management**.162:102-114.

Fuess LT, Kiyuna LSM, Ferraz ADN, 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. **Appl. Energy**. 189:480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>

Fuess LT, Zaiat M, Nascimento CAO (2019). Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**. 286: 121379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121379>

Fuess LT, Kiyuna LSM, Ferraz ADN, 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. **Appl. Energy**. 189:480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>

Fuess TL, Júnior ADN, Machado CB, Zaiat M (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**. 247:426-433.

Fuess TL, 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.

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

Ganesh R, Torrijos M, Sousbie P, Steyer JP, Lugardon A, Delgenes JP (2013). Anaerobic co-digestion of solid waste: Effect of increasing organic loading rates and characterization of the solubilised organic matter. **Bioresource Technology**. 130:559-569.

Garrity GMM, Holt JG (2001). Taxonomic outline of the Archae and Bacteria. In: Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ed, Springer-Verlag, New York, 155-166p.

Garcia GJL, Venceslada BPR, Peña J (1997). Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. **Water Research**. 31:2005-2011.

Garcia-Garcia G, Woolley E, Rahimifard S, Colwill J, White R, Needham L (2017). A methodology for sustainable management of food waste. **Waste and Biomass Valorization**. 8:2209-2227.

Gebreeyessus GD, Jenicek P (2016). Thermophilic versus mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge: a comparative review. **Bioengineering**. 3:6-14.

Gebreeyessus GD, Makonnen A, Alemayehu E (2019). A review on progresses and performances in distillery stillage management. **Journal of Cleaner Production**. 232:295-307.

Gibson GR (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. **J Appl Bacteriol**. 69:769-797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01575.x>

Góes-favoni SP, Monteiro ACC, Dorta C, Crippa MG, Shigematsu E (2018). Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**. 9:285-296.

Grassi MCB, Pereira GAG (2019). Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops & Products**. 129:201-205.

Guerreiro LF, Rodrigues CSD, Duda RM, Oliveira RA, Boaventura RAR, Madeira LM (2016). Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation. **Journal of environmental Management**. 181:237-248.

Guo X, Wang C, Sun F, Zhu W, Wu W (2014). A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. **Bioresource Technology**. 152:420–428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.012>

Gupta J, Verma P (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Energy Reviews**. 41:550-567.

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.

Hao L, Bize A, Conteau D (2016). New insights into the key microbial phylotypes of anaerobic sludge digesters under different operational conditions. **Water Research**. 102:158-169. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.014>

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

Hugon P, Ramasamy D, Robert D, Courdec C, Raoult D, Fournier PE (2013). Non-contiguous finished genome sequence and description of *Kallipyga massiliensis* gen. nov, sp. nov., a new member of the family Clostridiales Incertae Sedis XI. **Stand em Genomic Sci**. 8:500-515. <https://doi.org/10.4056/sigs.4047997>.

Ilitchenco J, Almeida LG, Beal LL, Marconatto L, Borges LGA, Giongo A, Paesi S (2020). Microbial consortia composition on the production of methane from sugarcane vinasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**. 10:299–309. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00426-0>

Ingrao C, Bacenetti J, Adamczyk J, Ferrante V, Messineo A, Huisingh D (2019). Investigating energy and environmental issues of agro-biogas derived energy systems: A comprehensive review of Life Cycle Assessments. **Renewable Energy**. 136:296-307.

IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (2010). Biocombustíveis no Brasil: etanol e biodiesel. Série Eixos do Desenvolvimento Brasileiro: Comunicados do IPEA, n. 53, 26 de maio de 2010, 57p. Disponível em: https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/comunicado/100526_comunicadoipea53.pdf. Acesso em: 21 jan. 2021.

Jahnen-dechent W, Ketteler M (2012). Magnesium basics. **Clinical Kidney Journal**. 5:3-14.

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.

Jena SD, Poggi M (2013). Harvest planning in the Brazilian sugar cane industry via mixed integer Programming. **European Journal of Operational Research**. 230:374–384.

Jimenez J, Latrille E, Harmand J, Robles A, Ferrer J, Gaida D, Wolf C, Mairet F, Bernard O, et al (2015). Instrumentation and control of anaerobic digestion processes: a review and some research challenges. **Rev Environ Sci Biotechnol**. 14:615-648.

Junior AES (2018). **Vinhaça em reatores horizontais de alta taxa, em série: efeito do aumento gradual das cargas orgânicas volumétricas na produção de biogás e nas populações microbianas**. 94 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Unesp, Jaboticabal.

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

Kannan N, Karthikeyan G, Tamilselvan N (2006). Comparison of treatment potential of electro-coagulation of distillery effluent with and without activated *Areca catechu* nut carbon. **Journal of Hardous Materials**. 137: 1803-1809.

Karlsson A, Einarsson P, Schnurer A, Sundberg C, Ejlertsson J, Svensson BH (2012). Impact of trace element addition on degradation efficiency of volatile fatty acids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 114:446-452.

Khan MA, Ashar NN, Ganesh AG, Rais N, Faheem SM, Khan ST (2019). Bacterial Community Structure in Anaerobic Digesters of a Full Scale Municipal Wastewater Treatment Plant – Case Study of Dubai, United Arab Emirates. **Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems**. 7:385-398. <http://dx.doi.org/10.13044/j.sdewes.d6.0222>

Kiyuna LM, Fuess LY, Zaiat M (2017). Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**. 232:103-112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.028>

Kondo MM, Leite KU, Silva MRA, Reis ADP (2010). Fenton and Photo-Fenton Processes Coupled to UASB to Treat Coffee Pulping Wastewater. **Separation Science and Technology**.45:1506-1511.

Koster I, Lettinga G (1984). The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. **Agricultural Wastes**.9:205-216.

Knittel K, Boetius A (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. **Annu Rev Microbiol**. 63:311-334.

Kristensen JM, Nierychlo M, Albertsen M, Nielsen PH (2020). Bacteria from the Genus *Arcobacter* Are Abundant in Effluent from Wastewater Treatment Plants. **Applied and environmental microbiology**. 86:9. e03044-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.03044-19>

Kuever J, Visser M, Loeffler C, Boll M, Worm P, Sousa DZ, Plugge CM, Schaap PJ, Muyzer G, Pereira IA, et al (2014). Genome analysis of *Desulfotomaculum gibsoniae* strain Groll(T) a highly versatile Gram-positive sulfatereducing bacterium. **Stand Genomic Sci**. 3:39-52. doi: 10.4056/sigs.5209235

Laime EMO, Fernandes PD, Oliveira DCS, Freire EA (2011). Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **R. Trop. Ci. Agr. Biol**. 5:16-29.

Latif MA, Mehta CM, Batstone DJ (2017). Influence of low pH on continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. **Water Res**. 113:42–49. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.002>

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

Lee JTE, HE J, Tong YW (2017). Acclimatization of a mixed-animal manure inoculum to the anaerobic digestion of *Axonopus compressus* reveals the putative importance of *Mesotoga infera* and *Methanosaeta concilii* as elucidated by DGGE and Illumina MiSeq. **Bioresource Technology.** 245:1148-1154.

Leite VD, Povinelli J (1999). Comportamento dos sólidos totais no processo da digestão anaerobia de resíduos sólidos urbanos e industriais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** 3:229-232.

Leite AF, Janke L, Harms H, Zang JW, Fonseca-Zang A, Stinner W, Nikolausz M (2015). Assessment of the Variations in Characteristics and Methane Potential of Major Waste Products from the Brazilian Bioethanol Industry along an Operating Season. **Energy & Fuels.** 29:4022–4029. <https://doi.org/10.1021/ef502807s>

Lerm S, Kleybocker A, Miethling-Graff R, Alawi M, Liebich M, Wurdemann H (2012). Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. **Waste Manag.** 32:389–399.

Li C, Champagne P, Bruce C (2014). Anaerobic co-digestion of municipal organic wastes and pre-treatment to enhance biogas production from waste. **Water Science & Technology.** v.69: 443-449.

Li H, Sia D, Liu C, Feng K, Liu C (2018). Performance of direct anaerobic digestion of dewatered sludge in long-term operation. **Bioresource Technology.** 250:355–364.

Liman RD, Chouari R, Mazéas L, Wu TD, Li T, Grossin-Debattista J, Guerquin-Kern JL, Saidi M, Landousli A, Sghir A, Bouchez T (2014). Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. **Microbiology Open.** 3:157. 67.51. <https://doi.org/10.1002/mbo3.144>

Liu Z, Zhang C, Lu Y, Wu X, Wang L, Han B, Xing XH (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. **Bioresour. Technol.** 135:292-303.

Londoño JEG, Uller B, Sørensen HR, Meyer AS (2019). Fast anaerobic digestion of complex substrates via immobilized biofilms in a novel compartmentalized reactor design. **Biochem. Eng. J.** 143:224–229. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.023>

Lunedo R, Fernandez-Alarcon MF, Carvalho FMS, Furlan LR, Macari M (2014). Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize- or sorghum-fed broiler chickens using real-time PCR. **Br. Poult. Sci.** 55:795–803. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.975781>

Lovato G, Batista LPP, Preite MB, Yamashiro JN, Becker ALS, Vidal MFG, Pezini N, Albanez R, Ratusznei SM, Rodrigues JAD (2019). Viability of Using Glycerin as a Co-substrate in Anaerobic Digestion of Sugarcane Stillage (Vinasse): Effect of Diversified Operational Strategies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**.188:1-21.

Lopes CH, Gabriel AVMD, Borges MTMR (2011). Produção de etanol a partir da cana de açúcar. São Carlos. UFSCAR, 129p.

Luo G, Xie L, Zhou Q (2009). Enhanced treatment efficiency of an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) for cassava stillage with high solids content. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 107:641-645.

Madaleno LL, Caetano ACG (2011). Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**. 2:27-37.

Madden P, Al-RAEI AM, Enright AM, Chinalia FA, Beer D, O'Flaherty V, Collins G (2014). Effect of sulfate on low-temperature anaerobic digestion. **Front. Microbiol**. 5:1-15.

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

Mak TMW, Xiong X, Tsang DCW, Yu IKM, Poon CS (2020). Sustainable food waste management towards circular bioeconomy: policy review, limitations and opportunities. **Bioresour Technol**. 297:122497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122497>

Manochio C, Andrade BR, Rodriguez RP, Moraes BS (2017). Ethanol from biomass: a comparative overview. **Renew. Sustain. Energy Rev**. 80:743-755.

Martins AS (2018). **Digestão anaeróbia de resíduos alimentares: efeito da carga orgânica e da adição de elementos traço sobre a produção de metano e a diversidade microbiana**. 2018, 156f. (Tese de doutorado) Escola de Engenharia UFMG, Belo Horizonte.

Mata-Alvarez J, Macé S, Llabrés P (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes: An overview of research achievements and perspectives. **Bioresour. Technol**. 74:3-16.

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

Mcmurdie PJ, Holmes S (2013). Phyloseq: an r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**. 8:4. e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Mehariya S, Patel KA, Obulisamy PK, Punniyakotti E, Wong JWC (2018). Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. **Bioresource Technology**. 265:519-531.

Melo AS, Sampaio YSB (2016). Uma nota sobre o impacto do açúcar, do etanol e da gasolina na produção do setor sucroalcooleiro. **Ver. Bras. Econ**. 70:61-69.

Metcalf L, Eddy H (2003). Wastewater engineering: treatment and reuse. 4ed. New York: McGraw-Hill, 1819p.

Metcalf L, Eddy H. (2016). Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. 5ed. – Porto Alegre: AMGH, 1980p.

Michellon E, Santos AAL, Rodrigues JRA (2008). Breve Descrição do Proálcool e Perspectivas Futuras para o Etanol Produzido no Brasil. Rio Branco AC: SOBER, 16p.

Moraes BS, Junqueira TL, Pavanello GL, Cavalett O, Mantelatto PE, Bonomi A, Zaiat M (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**. 113:825–835.

Moraes BS, Zaiat M (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, enviromental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**.113:825-836.

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

Morales M, Quintero J, Conejeros R (2015). Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 42:1349-1361.

Morital DM, Avilal RL, Aidar FN (2019). Nucleação na formação de estruvita: estado da arte. **Eng Sanit Ambient**. 24:637-654.

Mojiri A, Aziz HAA, Zaman NQ, Aziz SQ (2012). A review on anaerobic digestion, bio-reactor and nitrogen removal from wasterwater and landfill leachate by bio-reactor. **Advances in Environmental Biology**. 6:2143-2150.

Mohan SV,Nikhil GN, Chiranjeevi P, Nagendranatha E, Rohit MV, Kumar AN, Sarkar O (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**. 215:2-12.

Mota VS, Santos FS, Amaral CS (2013). Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: Assessment on biological activity and filtration performance. **Technology**. 146:494–503.

Muyzer G, Stams, AJM (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nat. Rev. Microbiol.** 6:441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>

Nakashima RN, Oliveira Junior S (2020). Comparative exergy assessment of vinasse disposal alternatives: Concentration, anaerobic digestion and fertirrigation. **Renew. Energy**. 147:1969–1978. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.124>

Narbenovich VM, Vladimirovich CS (2017). Deciphering conjugative plasmid permissiveness in wastewater microbiomes. **J Technol**. 32:139-146.

Narihiro T, Sekiguchi Y (2007). Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. **Curr. Opin. Biotechnol**. 18:273-278.

Nery VD, Alves I, Damianovic MHR, 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.

Neyens E, Baeyens J (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation. **Journal of Hazardous Materials**. 98:33-50.

Nobu MK, Narihiro T, Rinke C, Kamagata Y, Tringe SG, Woyke T, Liu WT (2015). Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. **ISME J**. 9:1710-1722. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.256>

Nogueira RFP, Trovo AG, Silva MRA, Villa RD, Oliveira MC (2007). Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**. 30: 400-408.

Odoño JEG, Uller B, Sorensen HR, Meyer AS (2019). Fast anaerobic digestion of complex substrates via immobilized biofilms in a novel compartmentalized reactor design. **Biochemical Engineering Journal**. 143:224-229.

Oliveira RA, Duda RM (2009). Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reator anaeróbio operado em batelada sequencial. **Eng Sanit Ambient**. 14:533-542.

Oliveira ED, Penteado DP (2019). Removal kinetics of sulfamethazine and its transformation products formed during treatment using a horizontal flow-

anaerobic immobilized biomass bioreactor. **Journal of Hazardous Materials.** 365:34-43.

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. **Bioresour. Technol.** 131, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.126>

Ordaz-Díaz LA, Bailón-Salas AM (2020). Molecular identification of microbial communities in the methane production from vinasse: A review. **BioRes.** 15:4528-4552.

Pant D, Adholeya A (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology.** 98:2321-2334.

Parsaee M, Kiani MK, Karim K (2019). A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy.** 122:117–125.

Patel JB (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Mol Diagn.** 6:313-321.

Paulino TRS, Araujo RS, Salgado BCB (2015). Estudo de oxidação avançada de corantes básicos via reação Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). **Eng Sanit Ambient.** 20:347-352.

Paulo PL, Villa G, Lier JBV, Lettinga G (2003). The anaerobic conversion of methanol under thermophilic conditions: pH and bicarbonate dependence. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 96:213-218.

Peiter FS, Hankins NP, Pires EC (2019). Evaluation of concentration technologies in the design of biorefineries for the recovery of resources from vinasse. **Water Research.** 157:483-497.

Pilarska AA (2018). Anaerobic Co-Digestion of Waste Wafers from Confectionery Production with Sewage Sludge. **Pol. J. Environ. Stud.** 27:237-245.

Pilli S, Yan S, Tyagy RD (2015). Overview of Fenton pre-treatment of sludge aiming to enhance anaerobic digestion. **Rev Environ Sci Biotechnol.** 14:453-472.

Rabelo SC, Costa ACDA, Rossel CEV (2015). Industrial waste recovery. In: Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy, and Ethanol. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802239-9.00017-7>.

Ramos LR, Silva EL (2020). Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. **Int. J. Hydrogen Energy.** 45:5239–5251.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.025>

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.

Rivière D, Desvignes V, Pelletier E, Chaussonnerie S, Guermazi S, Weissenbach J, Li T, Camacho P, Sghir A (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. **ISMEJ**. 3:700–714. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.2>

Robertiello A (1982). Upgrading of agricultural and agro-industrial wastes: The treatment of distillery effluents (vinasses) in Italy. **Agricultural Wastes**. 4: 387-395.

Rodrigues CSD, Neto AR, Duda RM, Oliveira RA, Boaventura RAR, Madeira LM (2017). Combination of chemical coagulation, photo-Fenton oxidation and biodegradation for the treatment of vinasse from sugar cane ethanol distillery. **Journal of Cleaner Production**. 142:3634-3644.

Romano RT, Zhang R (2011). Anaerobic digestion of onion residuals using a mesophilic Anaerobic Phased Solids Digester. **Biomass and Bioenergy**. 35:4174–4179.

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 β -blocker metoprolol. **Water Research**. 88:449-457.

Romero-Guiza 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.

Roske I, Sabra W, Nacke H, Daniel R, Zeng AP, Antranikian G, Sahm K (2014). Microbial community composition and dynamics in high-temperature biogas reactors using industrial bioethanol waste as substrate. **Appl Microbiol Biotechnol**. 98:9095-9106. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5906-1>

Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Shrestha M, Shrestha D, Embree M, Zengler K, Wardman C, Nevin KP, Nevin KP, Lovley DR (2014). A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. **Energy Environ. Sci**. 7:408–415.

Šafarič L, Yekta SS, Svensson BH, Schnürer A, Bastviken D, Björn A (2020). Effect of Cobalt, Nickel, and Selenium / Tungsten Deficiency on Mesophilic Anaerobic Digestion of Chemically Defined Soluble Organic Compounds. **Microorganisms**. 8:598. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040598>

Saini JK, Saini R, Tewari L (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **Biotec.** 5:337-353.

Sakar SK, Gosh SK, Bannerjee S, Aikat K (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renew Energy.** 37:19-27.

Santana-Junior AE, Duda RM, Oliveira RA (2019). Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in two-stage anaerobic reactors. **Journal of Cleaner Production.** 238:1-11.

Santana Júnior AE (2013). **Produção de Metano a partir de vinhaça e melaço em reatores UASB termofílicos, em dois estágios.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal.

Santos AC, Oliveira RA (2011). Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reatores anaeróbios horizontais seguidos de reator aeróbio em batelada sequencial. **Eng. Agríc., Jaboticabal.** 31:781-794.

Santos PA, Zaiat M, Oller N, Fuess LT (2019). Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production.** 10,1-7.

Santos SC, Rosa PRF, Sakamoto IK, Varesche A, Silva EL (2014). Hydrogen production from dilutes and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy.** 39:9599-9610.

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.

Suela SC, Porto PSS, Freitas RR (2018). Tratamento de águas residuais para produção de estruvita: Um estudo bibliométrico. **Research, Society and Development.** 7:01-26. <https://doi.org/10.17648/rsd-v7i9.380>

Sun JH, Sun SP, Wang GL, Qiao LP (2007). Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process. **Dyes and Pigments.** 74:647-652.

Shah FA, Mahmood Q, Shah M M, Pervez A, Asad SA (2014). Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. **Scientific World Journal.** 2014:183752. <https://doi.org/10.1155/2014/183752>

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology.** 299:152-178.

Siqueira LM, Barros AR, Amorim EL, Damianovic MH, Foresti E, Silva EL (2008). Influence of increasing organic load on the treatment of sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). In: IWA, IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia. Isla de Pasqua, CL, 345-351.

Silva MA, Griebeler NP, Borges LC. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 11:108-114, 2007.

Silva BM, Silva WST (2019). Um panorama da implantação do etanol de 3ª geração como uma fonte de energia sustentável. **Egevista**. 21:176-192.

Silva CF, Arcuri SL, Campos CR, Vilela DM, Alves JGLF, Schwan RF (2011). Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. **Waste Manag.** 31:108–114. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.08.015>

Siqueira LM, Damiano ESG, Silva EL (2013). Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.** 48:1707–1716. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.815535>

Soares CMT, Feiden A, Tavares SG (2017). Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**. 5:522-528.

Song M, Shin SG, Hwang S (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. **Bioresour. Technol.** 101:23–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.054>

Sousa RMO, Amaral C, Fernandes JM, Fraga I, Semitela S, Braga F, Coimbra AM, Dias AA, Bezerra RM, Sampaio A (2019). Hazardous impact of vinasse from distilled winemaking by-products in terrestrial plants and aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 183, 109493. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109493

Souza RP, Girardi F, Gimenes ML (2013). Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and photocatalysis. **Acta Scientiarum. Technology**. 35:89-95.

Speece RE (2007). Anaerobic biotechnology e odor/corrosion control for municipalities e industries. Nashville. Archae press, 596p.

Sun JH, Sun SP, Wang GL, Qiao LP (2007). Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process. **Dyes and Pigments**. 74:647-652.

St-Pierre B, André-Denis G, Wright ADG (2017). Implications from distinct sulfate-reducing bacteria populations between cattle manure and digestate in the

elucidation of H₂S production during anaerobic digestion of animal slurry. **Appl Microbiol Biotechnol.** 101:5543-5556. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8261-1>

Swoboda AK (1976). Inflação, petróleo e crise econômica mundial. **R. Bras. Econ.** 30:41-71.

Tannock GW (2004). A special fondness for lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.** 70:3189–3194.

Tapia-Tussel R, Pérez-Brito D, Torres-Calzada C (2015). Laccase Gene Expression and Vinasse Biodegradation by *Trametes hirsute* Strain Bm-2. **Molecules.** 20:15147-15157.

Tena M, Buller LS, Sganzerla WG, Berni M, Forster-Carneiro T, Solera R, Pérez M (2021). Techno-economic evaluation of bioenergy production from anaerobic digestion of by-products from ethanol flex plants. **Fuel.** 309:122171. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122171>.

Thai CCD, Bakir H, Doherty WOS (2012). Insights to the Clarification of Sugar Cane Juice Expressed from Sugar Cane Stalk and Trash. **J. Agric. Food Chem.** 60: 2916-2923.

Umar Z, Kenourgios D, Papathanasiou S (2020). The static and dynamic connectedness of environmental, social, and governance investments: International evidence. **Economic Modelling.** 93:112–124. <https://doi.org/10.1016/j.econmod.2020.08.007>

ÚNICA (2019). Acompanhamento quinzenal da safra na região Centro-Sul. Disponível em: <https://www.jornalcana.com.br/wp-content/uploads/2018/09/Unica.pdf>

Vaccari G (2005). Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. **Journal of Cleaner Production.** 13:449-507.

Vandamme P, Falsen E, Rossau R (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen.nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 41, 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>

Vilela RS. **Produção de hidrogênio e metano a partir de subproduto da indústria sucroalcooleira, em reatores anaeróbios de fases separadas sob condução termofílica.** Tese de doutorado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2017.

Vitezová M, Kohoutová A, Vitez T, Hanisakova N, Kunshkevych I (2020). Review: Methanogenic Microorganisms in Industrial Wastewater Anaerobic Treatment. **Processes.** 8:1546. <https://doi:10.3390/pr8121546>.

Vrieze JD, Saunders AM, He Y, Fang J, Nielsem PH, Verstraete W, Boon N (2015). Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. **Water Res.** 75:312-323. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.025>

Von Sperling M (2014). Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte. UFMG, v1, 472p.

Von Sperling M (2016). Princípios básicos de tratamento de esgotos. Belo Horizonte. UFMG, v2, 211p.

Von Sperling M, Chernicharo CAL (2005). Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions. Lonfon. IWA Publishing, 856p.

Wang S, Ma F, Ma W, Wang P, Zhao G, Lu X (2019). Influence of temperature on biogas production efficiency and microbial community in a two-phase anaerobic digestion system. **Water**. 11:133. <https://doi.org/10.3390/w11010133>

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, Kovacs E, Maroti G, Bagi Z, Rakhely G, Kovacs KL (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read nextgeneration DNA sequencing. **Biotechnol. Biofuels**. 5: 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>

Worldwatch I (2008). Biofuels for transportation. Global potential and implications for sustainable agriculture and energy in the 21st century. **Management of Environmental Quality**. 19:1. <https://doi.org/10.1108/meq.2008.08319aae.005>

Yang H, Li S (2013). Energy analysis of cassava vinasse treatment. **Process Safety and Environmental Protection**. 91:503-507.

Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology Nature Publishing Group**. 12: 635-645.

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. **Bioresour. Technol.** 216:996-1003. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.05>

Yin Qidong, Miao J, Li B (2017). Enhancing electron transfer by ferrous iron during the anaerobic treatment of synthetic wastewater with mixed organic carbon. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 119:104-110.

Yu H, Zhu Z, Hu W, Zhang H (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. 27:1359-1365.

Zaiat M, Vieira GT, Foresti E (1997). Spatial and temporal variations of monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilizes sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate. **Wat. Res.** 31:1760-1766.

Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A (2013). Pear: a fast and accurate Illumina paired-end read merger. **Bioinformatics**. 30:614–620.

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.

Zhao Z, Wang J, Li Y (2020). Why do DIETers like drinking: Metagenomic analysis for methane and energy metabolism during anaerobic digestion with ethanol. **Water Research**. 171: 115425. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115425>

Zuo Z, Wu S, Zhang W, Dong R (2013). Effects of organic loading rate and effluent recirculation on the performance of two-stage anaerobic digestion of vegetable waste. **Bioresour. Technol.** 146: 556–561. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.128>

APÊNDICES

Apêndice A. Correlação da comunidade microbiana com metano e correlação das comunidades microbianas com os reatores horizontais

A figura 1A demonstra a correlação da comunidade microbiana verificada no lodo coletado do sistema RAHLF com a produção volumétrica de metano. Microorganismos positivos, expressos em vermelho, estão correlacionados à produção volumétrica de metano. Por exemplo: *Blautia*, *Aminobacterium* e todos os outros microrganismos citados abaixo e com a mesma coloração, estão positivamente correlacionados à produção de metano, enquanto *Tissierella* e *Acidaminococcace* estão correlacionadas negativamente pelo teste de Correlação de Spearman (* $p < 0,95$; ** $p < 0,99$).

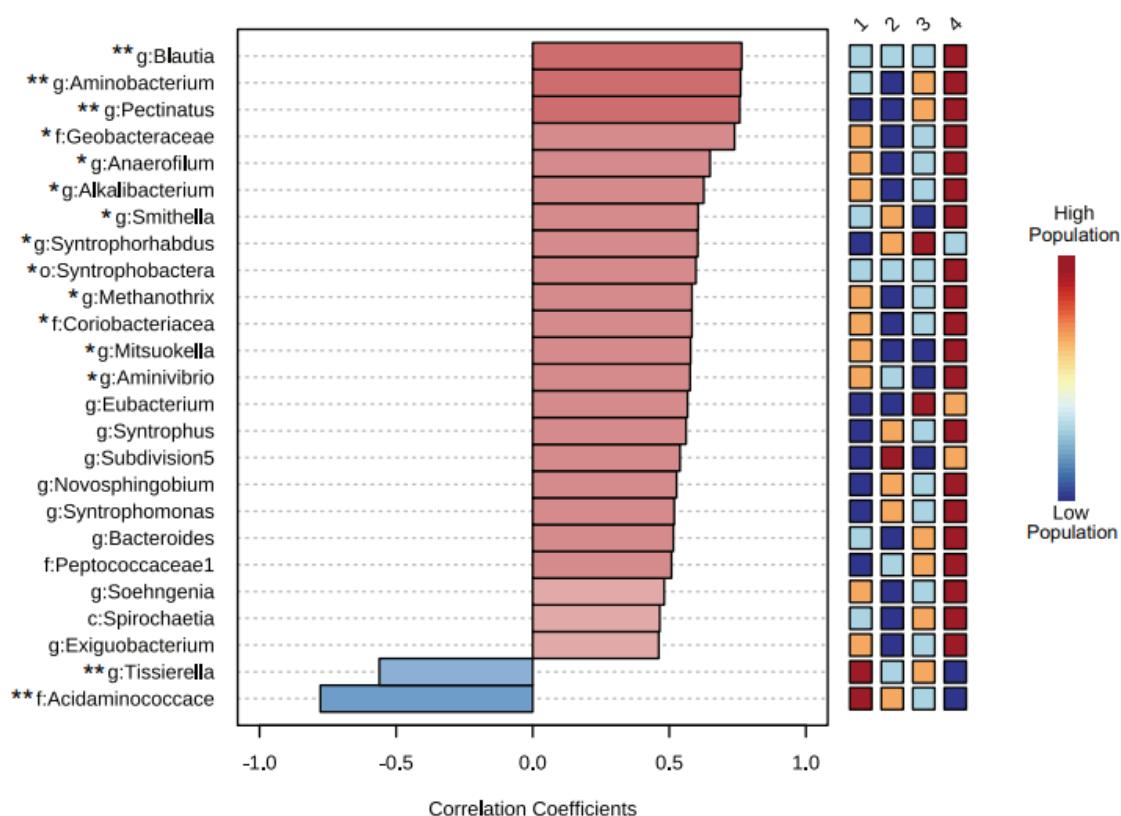


Figura 1A. Correlação da comunidade microbiana com metano.

A figura 2A demonstra a composição da comunidade microbiana correlacionada com a posição nos reatores, de acordo com a Correlação de Spearman (*p < 0,95). Microrganismos expressos com barras vermelhas são mais abundantes conforme mais próximos de R4. Microrganismos com barras azuis são mais abundantes conforme mais próximos de R1.

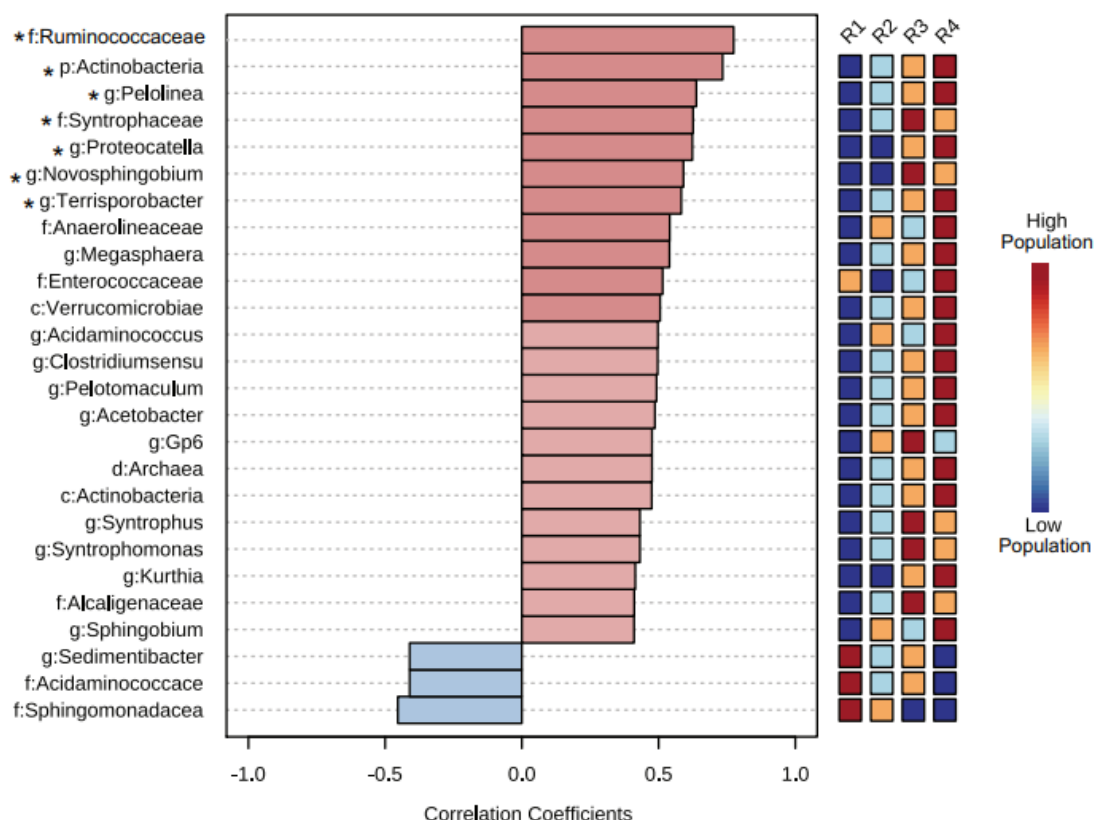


Figura 2A. Correlação da comunidade microbiana com os reatores R1, R2, R3 e R4.

Apêndice B. Rotas metabólicas correlacionadas à posição no reator e rotas metabólicas correlacionadas à produção de metano

Na figura 1B estão demonstradas as rotas metabólicas correlacionadas às posições dos reatores. Barras azuis representam as rotas metabólicas

enriquecidas quando apresentaram maior proximidade ao R1. Em vermelho, foram destacadas as rotas favorecidas quando mais próximas ao R4.

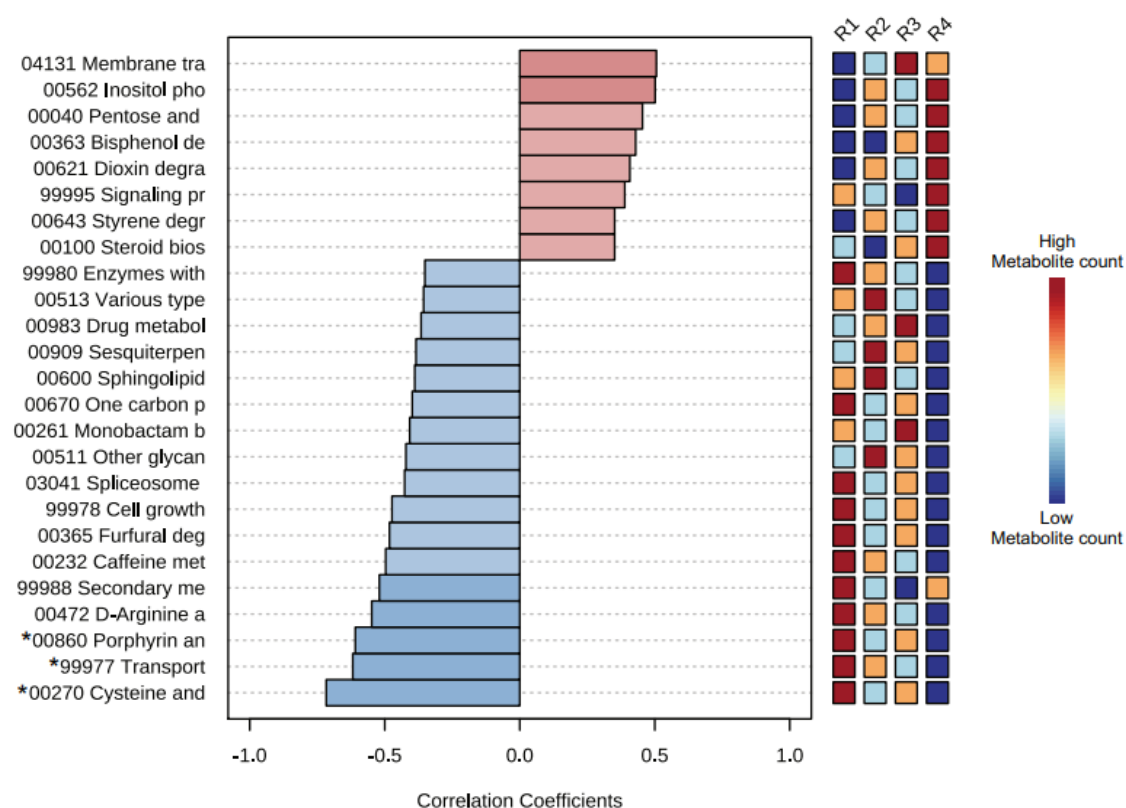


Figura 1B. Rotas metabólicas correlacionadas à posição no reator. (*) significativos a 0,95 pela correlação de Spearman. Metabólitos preditos usando o pipeline do PICRUST2. Os nomes completos das rotas estão expressos na tabela 1B.

Tabela 1B. Lista de rotas metabólicas correlacionadas às posições nos reatores (R1, R2, R3 e R4). (*) significativos a 0,95 pela correlação de Spearman.

Metabolic pathway (KEGG)	Correlation	T-Stat	P	Sig.
00270 Cysteine and methionine metabolism [PATH:ko00270]	-72%	377,73	0,01	*
99977 Transport	-62%	356,08	0,04	*
00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism [PATH:ko00860]	-61%	354,02	0,05	*
00944 Flavone and flavonol biosynthesis [PATH:ko00944]	56%	97,32	0,07	NS
00472 D-Arginine and D-ornithine metabolism [PATH:ko00472]	-55%	340,62	0,08	NS
99988 Secondary metabolism	-52%	334,43	0,10	NS
04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]	51%	108,66	0,11	NS
00562 Inositol phosphate metabolism [PATH:ko00562]	50%	109,69	0,12	NS
00232 Caffeine metabolism [PATH:ko00232]	-50%	329,24	0,12	NS
00365 Furfural degradation [PATH:ko00365]	-48%	326,19	0,13	NS
99978 Cell growth	-47%	324,12	0,14	NS
00040 Pentose and glucuronate interconversions [PATH:ko00040]	45%	120	0,16	NS
00363 Bisphenol degradation [PATH:ko00363]	43%	125,59	0,19	NS
03041 Spliceosome [BR:ko03041]	-43%	313,81	0,19	NS
00511 Other glycan degradation [PATH:ko00511]	-42%	312,78	0,20	NS
00621 Dioxin degradation [PATH:ko00621]	41%	130,31	0,21	NS
00261 Monobactam biosynthesis [PATH:ko00261]	-41%	309,69	0,21	NS
00670 One carbon pool by folate [PATH:ko00670]	-40%	307,63	0,23	NS
99995 Signaling proteins	39%	134,43	0,24	NS
00600 Sphingolipid metabolism [PATH:ko00600]	-39%	305,57	0,24	NS
00909 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis [PATH:ko00909]	-38%	304,54	0,24	NS
00983 Drug metabolism - other enzymes [PATH:ko00983]	-37%	300,41	0,27	NS
00513 Various types of N-glycan biosynthesis [PATH:ko00513]	-36%	298,35	0,28	NS
00100 Steroid biosynthesis [PATH:ko00100]	35%	142,68	0,29	NS
00643 Styrene degradation [PATH:ko00643]	35%	142,68	0,29	NS
99980 Enzymes with EC numbers	-35%	297,32	0,29	NS
00591 Linoleic acid metabolism [PATH:ko00591]	34%	144,74	0,30	NS
03400 DNA repair and recombination proteins [BR:ko03400]	34%	144,74	0,30	NS
00140 Steroid hormone biosynthesis [PATH:ko00140]	-33%	293,2	0,32	NS
00537 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins [BR:ko00537]	-33%	292,16	0,32	NS
00400 Phenylalanine_ tyrosine and tryptophan biosynthesis [PATH:ko00400]	32%	148,87	0,33	NS
00780 Biotin metabolism [PATH:ko00780]	32%	148,87	0,33	NS
00195 Photosynthesis [PATH:ko00195]	32%	149,9	0,34	NS
01053 Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides [PATH:ko01053]	-30%	287,01	0,36	NS
00250 Alanine_ aspartate and glutamate metabolism [PATH:ko00250]	-30%	285,98	0,37	NS
03020 RNA polymerase [PATH:ko03020]	30%	154,02	0,37	NS
00405 Phenazine biosynthesis [PATH:ko00405]	30%	155,05	0,38	NS
03029 Mitochondrial biogenesis [BR:ko03029]	30%	155,05	0,38	NS
00333 Prodigiosin biosynthesis [PATH:ko00333]	29%	156,08	0,39	NS
00730 Thiamine metabolism [PATH:ko00730]	-29%	282,89	0,39	NS

00330 Arginine and proline metabolism [PATH:ko00330]	-28%	280,82	0,41	NS
00603 Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series [PATH:ko00603]	-28%	280,82	0,41	NS
04090 CD molecules [BR:ko04090]	-28%	280,82	0,41	NS
00908 Zeatin biosynthesis [PATH:ko00908]	-27%	279,79	0,42	NS
99981 Carbohydrate metabolism	-27%	278,76	0,43	NS
00622 Xylene degradation [PATH:ko00622]	25%	165,36	0,46	NS
99982 Energy metabolism	-24%	273,61	0,47	NS
99996 General function prediction only	24%	166,39	0,47	NS
00910 Nitrogen metabolism [PATH:ko00910]	-24%	272,58	0,48	NS
00590 Arachidonic acid metabolism [PATH:ko00590]	23%	168,45	0,49	NS
00604 Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series [PATH:ko00604]	-23%	270,52	0,50	NS
00901 Indole alkaloid biosynthesis [PATH:ko00901]	-23%	270,52	0,50	NS
03032 DNA replication proteins [BR:ko03032]	22%	171,55	0,52	NS
00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms [PATH:ko00710]	22%	172,58	0,52	NS
01057 Biosynthesis of type II polyketide products [PATH:ko01057]	-21%	266,43	0,53	NS
00640 Propanoate metabolism [PATH:ko00640]	21%	173,61	0,53	NS
01054 Nonribosomal peptide structures [PATH:ko01054]	-21%	266,39	0,53	NS
04812 Cytoskeleton proteins [BR:ko04812]	-21%	266,39	0,53	NS
99999 Others	21%	173,61	0,53	NS
00565 Ether lipid metabolism [PATH:ko00565]	21%	174,64	0,54	NS
01051 Biosynthesis of ansamycins [PATH:ko01051]	-21%	265,36	0,54	NS
02022 Two-component system [BR:ko02022]	-20%	264,33	0,55	NS
01055 Biosynthesis of vancomycin group antibiotics [PATH:ko01055]	20%	175,67	0,55	NS
00626 Naphthalene degradation [PATH:ko00626]	19%	177,73	0,57	NS
00966 Glucosinolate biosynthesis [PATH:ko00966]	-19%	262,27	0,57	NS
00981 Insect hormone biosynthesis [PATH:ko00981]	-19%	262,27	0,57	NS
04040 Ion channels [BR:ko04040]	19%	178,4	0,58	NS
00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis [PATH:ko00130]	19%	178,76	0,58	NS
99986 Glycan metabolism	-18%	260,21	0,59	NS
00361 Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation [PATH:ko00361]	18%	179,79	0,59	NS
03051 Proteasome [BR:ko03051]	18%	179,79	0,59	NS
00450 Selenocompound metabolism [PATH:ko00450]	17%	181,86	0,61	NS
00510 N-Glycan biosynthesis [PATH:ko00510]	-17%	258,14	0,61	NS
00941 Flavonoid biosynthesis [PATH:ko00941]	17%	182,54	0,62	NS
00945 Stilbenoid_ diarylheptanoid and gingerol biosynthesis [PATH:ko00945]	17%	182,54	0,62	NS
02044 Secretion system [BR:ko02044]	17%	182,89	0,62	NS
00030 Pentose phosphate pathway [PATH:ko00030]	16%	183,92	0,63	NS
00220 Arginine biosynthesis [PATH:ko00220]	-16%	256,08	0,63	NS
00903 Limonene and pinene degradation [PATH:ko00903]	-16%	256,08	0,63	NS
00999 Biosynthesis of secondary metabolites - unclassified [PATH:ko00999]	-16%	256,08	0,63	NS
00072 Synthesis and degradation of ketone bodies [PATH:ko00072]	16%	184,95	0,64	NS
03011 Ribosome [BR:ko03011]	16%	184,95	0,64	NS
00362 Benzoate degradation [PATH:ko00362]	15%	185,98	0,65	NS

00401 Novobiocin biosynthesis [PATH:ko00401]	15%	185,98	0,65	NS
00430 Taurine and hypotaurine metabolism [PATH:ko00430]	-15%	254,02	0,65	NS
00531 Glycosaminoglycan degradation [PATH:ko00531]	15%	185,98	0,65	NS
00625 Chloroalkane and chloroalkene degradation [PATH:ko00625]	15%	185,98	0,65	NS
00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism [PATH:ko00630]	15%	185,98	0,65	NS
00984 Steroid degradation [PATH:ko00984]	-15%	254,02	0,65	NS
04121 Ubiquitin system [BR:ko04121]	15%	185,98	0,65	NS
00521 Streptomycin biosynthesis [PATH:ko00521]	-15%	251,96	0,67	NS
00071 Fatty acid degradation [PATH:ko00071]	-14%	250,93	0,68	NS
00310 Lysine degradation [PATH:ko00310]	-14%	250,93	0,68	NS
00340 Histidine metabolism [PATH:ko00340]	-14%	250,93	0,68	NS
00471 D-Glutamine and D-glutamate metabolism [PATH:ko00471]	-14%	250,93	0,68	NS
00010 Glycolysis / Gluconeogenesis [PATH:ko00010]	14%	190,1	0,69	NS
00052 Galactose metabolism [PATH:ko00052]	14%	190,1	0,69	NS
00624 Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation [PATH:ko00624]	-14%	249,9	0,69	NS
00830 Retinol metabolism [PATH:ko00830]	14%	190,1	0,69	NS
00770 Pantothenate and CoA biosynthesis [PATH:ko00770]	-13%	248,87	0,70	NS
00190 Oxidative phosphorylation [PATH:ko00190]	13%	192,17	0,71	NS
00940 Phenylpropanoid biosynthesis [PATH:ko00940]	13%	192,17	0,71	NS
03016 Transfer RNA biogenesis [BR:ko03016]	13%	192,17	0,71	NS
99974 Translation	-13%	247,83	0,71	NS
00061 Fatty acid biosynthesis [PATH:ko00061]	12%	193,2	0,72	NS
00523 Polyketide sugar unit biosynthesis [PATH:ko00523]	-12%	245,77	0,73	NS
00525 Acarbose and validamycin biosynthesis [PATH:ko00525]	-12%	245,77	0,73	NS
00360 Phenylalanine metabolism [PATH:ko00360]	-11%	244,74	0,74	NS
00410 beta-Alanine metabolism [PATH:ko00410]	-11%	244,74	0,74	NS
00740 Riboflavin metabolism [PATH:ko00740]	-11%	244,74	0,74	NS
03012 Translation factors [BR:ko03012]	-11%	244,74	0,74	NS
03019 Messenger RNA biogenesis [BR:ko03019]	11%	195,26	0,74	NS
00473 D-Alanine metabolism [PATH:ko00473]	-11%	243,71	0,75	NS
00633 Nitrotoluene degradation [PATH:ko00633]	-11%	243,71	0,75	NS
00650 Butanoate metabolism [PATH:ko00650]	-11%	243,71	0,75	NS
00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 [PATH:ko00980]	11%	196,29	0,75	NS
00982 Drug metabolism - cytochrome P450 [PATH:ko00982]	11%	196,29	0,75	NS
99992 Structural proteins	-11%	243,71	0,75	NS
00960 Tropane_ piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis [PATH:ko00960]	10%	197,32	0,76	NS
03009 Ribosome biogenesis [BR:ko03009]	-10%	242,68	0,76	NS
00900 Terpenoid backbone biosynthesis [PATH:ko00900]	10%	198,35	0,77	NS
04147 Exosome [BR:ko04147]	-10%	241,65	0,77	NS
00620 Pyruvate metabolism [PATH:ko00620]	9%	199,38	0,78	NS
00500 Starch and sucrose metabolism [PATH:ko00500]	9%	200,41	0,79	NS
99993 Cell motility	-9%	239,59	0,79	NS
00051 Fructose and mannose metabolism [PATH:ko00051]	8%	201,44	0,81	NS
00750 Vitamin B6 metabolism [PATH:ko00750]	-8%	238,56	0,81	NS

02035 Bacterial motility proteins [BR:ko02035]	-8%	238,56	0,81	NS
99997 Function unknown	8%	201,44	0,81	NS
03036 Chromosome and associated proteins [BR:ko03036]	-8%	237,53	0,82	NS
00540 Lipopolysaccharide biosynthesis [PATH:ko00540]	7%	203,51	0,83	NS
00592 alpha-Linolenic acid metabolism [PATH:ko00592]	7%	203,51	0,83	NS
00524 Neomycin_ kanamycin and gentamicin biosynthesis [PATH:ko00524]	-7%	236,49	0,83	NS
99973 Transcription	-7%	236,49	0,83	NS
99998 Others	-7%	236,49	0,83	NS
00230 Purine metabolism [PATH:ko00230]	7%	204,54	0,84	NS
00785 Lipoic acid metabolism [PATH:ko00785]	7%	204,54	0,84	NS
00902 Monoterpenoid biosynthesis [PATH:ko00902]	-7%	235,14	0,84	NS
00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism [PATH:ko00760]	-7%	234,43	0,85	NS
00253 Tetracycline biosynthesis [PATH:ko00253]	-6%	234,05	0,85	NS
00571 Lipoarabinomannan (LAM) biosynthesis [PATH:ko00571]	-6%	233,4	0,86	NS
99983 Lipid metabolism	-6%	233,4	0,86	NS
00121 Secondary bile acid biosynthesis [PATH:ko00121]	6%	206,6	0,86	NS
00332 Carbapenem biosynthesis [PATH:ko00332]	6%	207,63	0,87	NS
00627 Aminobenzoate degradation [PATH:ko00627]	6%	207,63	0,87	NS
00660 C5-Branched dibasic acid metabolism [PATH:ko00660]	6%	207,63	0,87	NS
00053 Ascorbate and aldarate metabolism [PATH:ko00053]	-6%	232,37	0,87	NS
00404 Staurosporine biosynthesis [PATH:ko00404]	-6%	232,37	0,87	NS
00550 Peptidoglycan biosynthesis [PATH:ko00550]	-6%	232,37	0,87	NS
00300 Lysine biosynthesis [PATH:ko00300]	5%	208,66	0,88	NS
00561 Glycerolipid metabolism [PATH:ko00561]	-5%	230,31	0,89	NS
00564 Glycerophospholipid metabolism [PATH:ko00564]	-5%	230,31	0,89	NS
00680 Methane metabolism [PATH:ko00680]	-5%	230,31	0,89	NS
02042 Bacterial toxins [BR:ko02042]	-5%	230,31	0,89	NS
99984 Nucleotide metabolism	-5%	230,31	0,89	NS
00020 Citrate cycle (TCA cycle) [PATH:ko00020]	5%	209,69	0,89	NS
00906 Carotenoid biosynthesis [PATH:ko00906]	5%	209,69	0,89	NS
00950 Isoquinoline alkaloid biosynthesis [PATH:ko00950]	5%	209,69	0,89	NS
01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids [PATH:ko01040]	5%	209,69	0,89	NS
03110 Chaperones and folding catalysts [BR:ko03110]	5%	209,69	0,89	NS
00240 Pyrimidine metabolism [PATH:ko00240]	4%	210,72	0,90	NS
00260 Glycine_ serine and threonine metabolism [PATH:ko00260]	-4%	228,25	0,91	NS
00536 Glycosaminoglycan binding proteins [BR:ko00536]	-4%	228,25	0,91	NS
00280 Valine_ leucine and isoleucine degradation [PATH:ko00280]	-3%	227,22	0,92	NS
00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes [PATH:ko00720]	-3%	227,22	0,92	NS
00350 Tyrosine metabolism [PATH:ko00350]	-3%	226,19	0,93	NS
00572 Arabinogalactan biosynthesis - Mycobacterium [PATH:ko00572]	-3%	226,19	0,93	NS
00965 Betalain biosynthesis [PATH:ko00965]	-3%	226,19	0,93	NS
00120 Primary bile acid biosynthesis [PATH:ko00120]	3%	213,81	0,93	NS
00460 Cyanoamino acid metabolism [PATH:ko00460]	3%	213,81	0,93	NS
00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism [PATH:ko00520]	3%	213,81	0,93	NS

01504 Antimicrobial resistance genes [BR:ko01504]	3%	213,81	0,93	NS
03021 Transcription machinery [BR:ko03021]	3%	213,81	0,93	NS
99976 Replication and repair	3%	213,81	0,93	NS
99994 Others	3%	213,81	0,93	NS
99975 Protein processing	2%	214,85	0,95	NS
00281 Geraniol degradation [PATH:ko00281]	2%	215,88	0,96	NS
00290 Valine_ leucine and isoleucine biosynthesis [PATH:ko00290]	-2%	224,12	0,96	NS
00380 Tryptophan metabolism [PATH:ko00380]	2%	215,88	0,96	NS
00480 Glutathione metabolism [PATH:ko00480]	2%	215,88	0,96	NS
00642 Ethylbenzene degradation [PATH:ko00642]	2%	215,88	0,96	NS
00790 Folate biosynthesis [PATH:ko00790]	2%	215,88	0,96	NS
99979 Unclassified viral proteins	2%	215,88	0,96	NS
00364 Fluorobenzoate degradation [PATH:ko00364]	-1%	222,06	0,98	NS
00440 Phosphonate and phosphinate metabolism [PATH:ko00440]	-1%	222,06	0,98	NS
00791 Atrazine degradation [PATH:ko00791]	-1%	222,06	0,98	NS
00920 Sulfur metabolism [PATH:ko00920]	1%	217,94	0,98	NS
00930 Caprolactam degradation [PATH:ko00930]	-1%	222,06	0,98	NS
02000 Transporters [BR:ko02000]	1%	217,94	0,98	NS
99987 Cofactor metabolism	1%	217,94	0,98	NS
00311 Penicillin and cephalosporin biosynthesis [PATH:ko00311]	0%	218,97	0,99	NS
00623 Toluene degradation [PATH:ko00623]	0%	220	1,00	NS
02048 Prokaryotic defense system [BR:ko02048]	0%	220	1,00	NS
99985 Amino acid metabolism	0%	220	1,00	NS

Na figura 2B estão descritas as rotas metabólicas correlacionadas a produção de metano, discretizada em 4 grupos (1 a 4). Barras azuis são as rotas metabólicas correlacionadas com a baixa produção de metano, enquanto barras vermelhas são rotas correlacionadas a alta produção de metano.

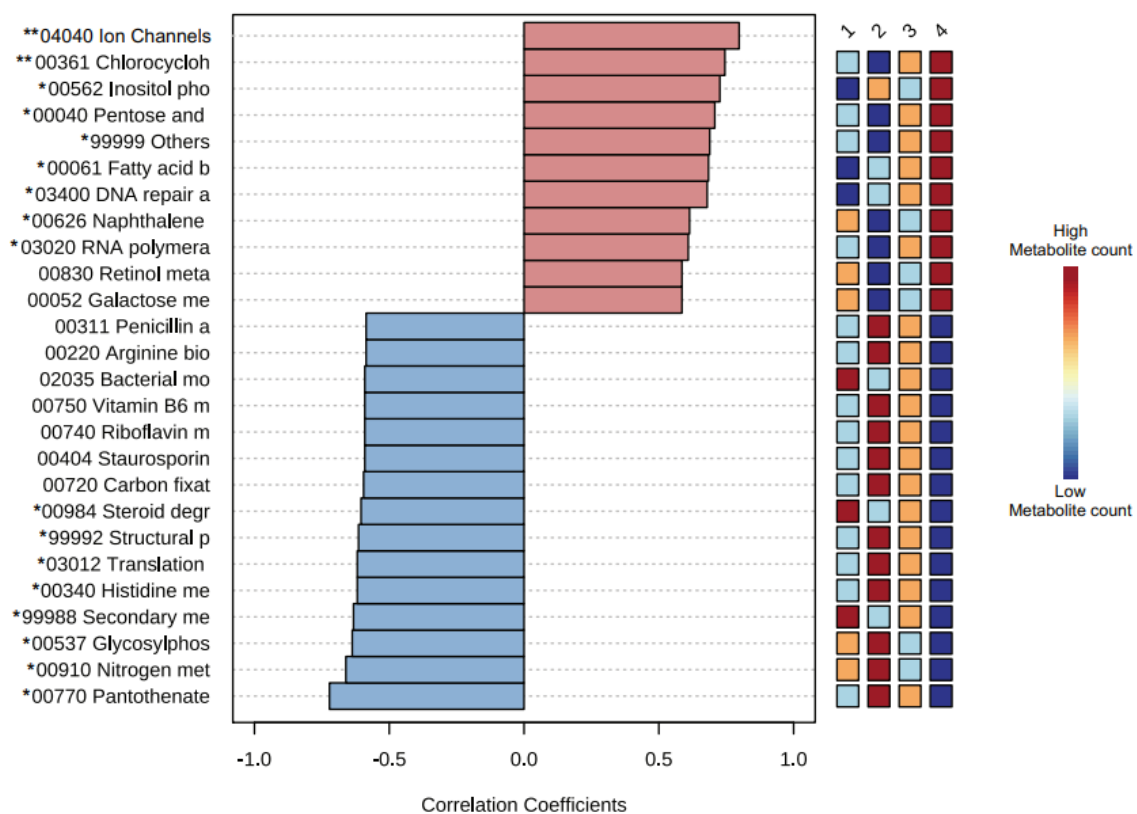


Figura 2B. Rotas metabólicas correlacionadas a produção de metano. (*) Significativos a 0,95; (**) significativos a 0,99 pela correlação de Spearman. Metabólitos preditos usando o pipeline do PICRUST2. Os nomes completos das rotas estão expressos na tabela 2B.

Tabela 2B. Listas de rotas metabólicas correlacionadas à produção de metano.

Metabolic pathway (KEGG)	Correlation	T-Stat	P	Sig.
04040 Ion channels [BR:ko04040]	79%	46,87	0,00	**
00361 Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation [PATH:ko00361]	75%	56,083	0,01	**
00562 Inositol phosphate metabolism [PATH:ko00562]	73%	60,207	0,01	*
00770 Pantothenate and CoA biosynthesis [PATH:ko00770]	-72%	378,76	0,01	*
00040 Pentose and glucuronate interconversions [PATH:ko00040]	71%	64,331	0,01	*
99999 Others	69%	68,454	0,02	*
00061 Fatty acid biosynthesis [PATH:ko00061]	68%	69,485	0,02	*
03400 DNA repair and recombination proteins [BR:ko03400]	68%	70,516	0,02	*
00910 Nitrogen metabolism [PATH:ko00910]	-66%	365,36	0,03	*
00537 Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins [BR:ko00537]	-64%	360,21	0,03	*
99988 Secondary metabolism	-63%	359,17	0,04	*
00340 Histidine metabolism [PATH:ko00340]	-62%	356,08	0,04	*
03012 Translation factors [BR:ko03012]	-62%	356,08	0,04	*
00626 Naphthalene degradation [PATH:ko00626]	61%	84,949	0,04	*
99992 Structural proteins	-61%	355,05	0,04	*
03020 RNA polymerase [PATH:ko03020]	61%	85,98	0,05	*
00984 Steroid degradation [PATH:ko00984]	-60%	352,99	0,05	*
00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes [PATH:ko00720]	-60%	350,93	0,05	NS
00404 Staurosporine biosynthesis [PATH:ko00404]	-59%	349,9	0,06	NS
00740 Riboflavin metabolism [PATH:ko00740]	-59%	349,9	0,06	NS
00750 Vitamin B6 metabolism [PATH:ko00750]	-59%	349,9	0,06	NS
02035 Bacterial motility proteins [BR:ko02035]	-59%	349,9	0,06	NS
00052 Galactose metabolism [PATH:ko00052]	59%	91,135	0,06	NS
00220 Arginine biosynthesis [PATH:ko00220]	-59%	348,87	0,06	NS
00311 Penicillin and cephalosporin biosynthesis [PATH:ko00311]	-59%	348,87	0,06	NS
00830 Retinol metabolism [PATH:ko00830]	59%	91,135	0,06	NS
00232 Caffeine metabolism [PATH:ko00232]	-58%	347,97	0,06	NS
00250 Alanine_ aspartate and glutamate metabolism [PATH:ko00250]	-58%	347,83	0,06	NS
00230 Purine metabolism [PATH:ko00230]	58%	93,196	0,06	NS
00261 Monobactam biosynthesis [PATH:ko00261]	-58%	346,8	0,06	NS
00625 Chloroalkane and chloroalkene degradation [PATH:ko00625]	58%	93,196	0,06	NS
00020 Citrate cycle (TCA cycle) [PATH:ko00020]	-57%	345,77	0,07	NS
00960 Tropane_ piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis [PATH:ko00960]	-57%	345,77	0,07	NS
03009 Ribosome biogenesis [BR:ko03009]	57%	94,227	0,07	NS
99998 Others	57%	94,227	0,07	NS
00360 Phenylalanine metabolism [PATH:ko00360]	-56%	343,71	0,07	NS
00410 beta-Alanine metabolism [PATH:ko00410]	-56%	343,71	0,07	NS
99985 Amino acid metabolism	56%	96,289	0,07	NS
00330 Arginine and proline metabolism [PATH:ko00330]	-56%	342,68	0,07	NS
00450 Selenocompound metabolism [PATH:ko00450]	-56%	342,68	0,07	NS
00650 Butanoate metabolism [PATH:ko00650]	-56%	342,68	0,07	NS
04090 CD molecules [BR:ko04090]	-56%	342,68	0,07	NS

00030 Pentose phosphate pathway [PATH:ko00030]	56%	97,32	0,07	NS
00908 Zeatin biosynthesis [PATH:ko00908]	-55%	341,65	0,08	NS
99982 Energy metabolism	-55%	341,65	0,08	NS
00540 Lipopolysaccharide biosynthesis [PATH:ko00540]	-54%	339,59	0,08	NS
00561 Glycerolipid metabolism [PATH:ko00561]	54%	100,41	0,08	NS
99973 Transcription	54%	100,41	0,08	NS
00500 Starch and sucrose metabolism [PATH:ko00500]	54%	101,44	0,09	NS
00523 Polyketide sugar unit biosynthesis [PATH:ko00523]	-54%	338,56	0,09	NS
00525 Acarbose and validamycin biosynthesis [PATH:ko00525]	-54%	338,56	0,09	NS
99975 Protein processing	-54%	338,56	0,09	NS
00350 Tyrosine metabolism [PATH:ko00350]	-53%	337,53	0,09	NS
00627 Aminobenzoate degradation [PATH:ko00627]	53%	102,47	0,09	NS
00010 Glycolysis / Gluconeogenesis [PATH:ko00010]	53%	103,51	0,09	NS
00603 Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series [PATH:ko00603]	-53%	336,49	0,09	NS
00622 Xylene degradation [PATH:ko00622]	53%	103,51	0,09	NS
01053 Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides [PATH:ko01053]	-53%	336,49	0,09	NS
03032 DNA replication proteins [BR:ko03032]	53%	103,51	0,09	NS
99979 Unclassified viral proteins	52%	104,54	0,10	NS
00909 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis [PATH:ko00909]	-52%	335,46	0,10	NS
00920 Sulfur metabolism [PATH:ko00920]	-52%	335,46	0,10	NS
00621 Dioxin degradation [PATH:ko00621]	52%	105,57	0,10	NS
00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism [PATH:ko00630]	-52%	334,43	0,10	NS
00790 Folate biosynthesis [PATH:ko00790]	-52%	333,4	0,10	NS
00950 Isoquinoline alkaloid biosynthesis [PATH:ko00950]	-52%	333,4	0,10	NS
02000 Transporters [BR:ko02000]	52%	106,6	0,10	NS
02042 Bacterial toxins [BR:ko02042]	52%	106,6	0,10	NS
99984 Nucleotide metabolism	52%	106,6	0,10	NS
99987 Cofactor metabolism	52%	106,6	0,10	NS
00332 Carbapenem biosynthesis [PATH:ko00332]	51%	108,66	0,11	NS
00471 D-Glutamine and D-glutamate metabolism [PATH:ko00471]	-51%	331,34	0,11	NS
03019 Messenger RNA biogenesis [BR:ko03019]	51%	108,66	0,11	NS
00624 Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation [PATH:ko00624]	-50%	330,31	0,12	NS
00903 Limonene and pinene degradation [PATH:ko00903]	-50%	330,31	0,12	NS
00981 Insect hormone biosynthesis [PATH:ko00981]	-50%	330,31	0,12	NS
00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism [PATH:ko00860]	-50%	329,28	0,12	NS
00401 Novobiocin biosynthesis [PATH:ko00401]	-49%	328,25	0,12	NS
00430 Taurine and hypotaurine metabolism [PATH:ko00430]	49%	111,75	0,12	NS
03051 Proteasome [BR:ko03051]	-49%	328,25	0,12	NS
99974 Translation	49%	111,75	0,12	NS
99980 Enzymes with EC numbers	-49%	328,25	0,12	NS
00620 Pyruvate metabolism [PATH:ko00620]	49%	112,78	0,13	NS
00510 N-Glycan biosynthesis [PATH:ko00510]	-48%	326,19	0,13	NS
00571 Lipoarabinomannan (LAM) biosynthesis [PATH:ko00571]	-48%	326,19	0,13	NS
00120 Primary bile acid biosynthesis [PATH:ko00120]	-48%	325,15	0,14	NS
00572 Arabinogalactan biosynthesis - Mycobacterium [PATH:ko00572]	48%	114,85	0,14	NS

02044 Secretion system [BR:ko02044]	-48%	325,15	0,14	NS
00290 Valine_ leucine and isoleucine biosynthesis [PATH:ko00290]	-47%	323,09	0,15	NS
00564 Glycerophospholipid metabolism [PATH:ko00564]	-47%	323,09	0,15	NS
00405 Phenazine biosynthesis [PATH:ko00405]	-46%	322,06	0,15	NS
00785 Lipoic acid metabolism [PATH:ko00785]	-46%	322,06	0,15	NS
01054 Nonribosomal peptide structures [PATH:ko01054]	46%	117,94	0,15	NS
03016 Transfer RNA biogenesis [BR:ko03016]	-46%	322,06	0,15	NS
00524 Neomycin_ kanamycin and gentamicin biosynthesis [PATH:ko00524]	46%	118,97	0,16	NS
00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism [PATH:ko00760]	-46%	321,03	0,16	NS
01051 Biosynthesis of ansamycins [PATH:ko01051]	-46%	321,03	0,16	NS
00999 Biosynthesis of secondary metabolites - unclassified [PATH:ko00999]	45%	120	0,16	NS
00053 Ascorbate and aldarate metabolism [PATH:ko00053]	45%	121,03	0,17	NS
00550 Peptidoglycan biosynthesis [PATH:ko00550]	45%	121,03	0,17	NS
00623 Toluene degradation [PATH:ko00623]	-45%	318,97	0,17	NS
00965 Betalain biosynthesis [PATH:ko00965]	-45%	318,97	0,17	NS
01504 Antimicrobial resistance genes [BR:ko01504]	-45%	318,97	0,17	NS
02048 Prokaryotic defense system [BR:ko02048]	45%	121,03	0,17	NS
99976 Replication and repair	-45%	318,97	0,17	NS
99994 Others	-45%	318,97	0,17	NS
00140 Steroid hormone biosynthesis [PATH:ko00140]	-45%	317,94	0,17	NS
00400 Phenylalanine_ tyrosine and tryptophan biosynthesis [PATH:ko00400]	-44%	315,88	0,18	NS
00780 Biotin metabolism [PATH:ko00780]	-44%	315,88	0,18	NS
00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis [PATH:ko00130]	-43%	314,84	0,19	NS
00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism [PATH:ko00520]	42%	127,22	0,20	NS
00071 Fatty acid degradation [PATH:ko00071]	-42%	312,78	0,20	NS
00310 Lysine degradation [PATH:ko00310]	-42%	312,78	0,20	NS
00460 Cyanoamino acid metabolism [PATH:ko00460]	-42%	312,78	0,20	NS
00983 Drug metabolism - other enzymes [PATH:ko00983]	-42%	312,78	0,20	NS
00966 Glucosinolate biosynthesis [PATH:ko00966]	-42%	311,75	0,20	NS
99996 General function prediction only	41%	129,28	0,21	NS
03029 Mitochondrial biogenesis [BR:ko03029]	-41%	309,69	0,21	NS
03110 Chaperones and folding catalysts [BR:ko03110]	-40%	308,66	0,22	NS
00660 C5-Branched dibasic acid metabolism [PATH:ko00660]	-39%	306,6	0,23	NS
00643 Styrene degradation [PATH:ko00643]	38%	136,5	0,25	NS
00260 Glycine_ serine and threonine metabolism [PATH:ko00260]	-37%	302,47	0,26	NS
03036 Chromosome and associated proteins [BR:ko03036]	37%	138,56	0,26	NS
00280 Valine_ leucine and isoleucine degradation [PATH:ko00280]	-37%	301,44	0,26	NS
00604 Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series [PATH:ko00604]	-37%	301,44	0,26	NS
99983 Lipid metabolism	-37%	301,44	0,26	NS
00941 Flavonoid biosynthesis [PATH:ko00941]	-37%	301,15	0,26	NS
00945 Stilbenoid_ diarylheptanoid and gingerol biosynthesis [PATH:ko00945]	-37%	301,15	0,26	NS
00531 Glycosaminoglycan degradation [PATH:ko00531]	-35%	297,32	0,29	NS
00642 Ethylbenzene degradation [PATH:ko00642]	-35%	296,29	0,30	NS
00521 Streptomycin biosynthesis [PATH:ko00521]	-34%	295,26	0,30	NS
00670 One carbon pool by folate [PATH:ko00670]	-34%	295,26	0,30	NS

99995 Signaling proteins	-34%	295,26	0,30	NS
00253 Tetracycline biosynthesis [PATH:ko00253]	33%	146,36	0,31	NS
00900 Terpenoid backbone biosynthesis [PATH:ko00900]	32%	148,87	0,33	NS
00940 Phenylpropanoid biosynthesis [PATH:ko00940]	-32%	291,13	0,33	NS
00281 Geraniol degradation [PATH:ko00281]	-32%	290,1	0,34	NS
00380 Tryptophan metabolism [PATH:ko00380]	-32%	290,1	0,34	NS
00536 Glycosaminoglycan binding proteins [BR:ko00536]	-32%	290,1	0,34	NS
01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids [PATH:ko01040]	-32%	290,1	0,34	NS
00944 Flavone and flavonol biosynthesis [PATH:ko00944]	30%	152,99	0,36	NS
00513 Various types of N-glycan biosynthesis [PATH:ko00513]	-30%	285,98	0,37	NS
00100 Steroid biosynthesis [PATH:ko00100]	-30%	284,95	0,38	NS
04121 Ubiquitin system [BR:ko04121]	-30%	284,95	0,38	NS
00364 Fluorobenzoate degradation [PATH:ko00364]	-29%	283,92	0,39	NS
00592 alpha-Linolenic acid metabolism [PATH:ko00592]	-29%	283,92	0,39	NS
00791 Atrazine degradation [PATH:ko00791]	-29%	283,92	0,39	NS
00906 Carotenoid biosynthesis [PATH:ko00906]	-29%	283,92	0,39	NS
00930 Caprolactam degradation [PATH:ko00930]	-29%	283,92	0,39	NS
00730 Thiamine metabolism [PATH:ko00730]	-29%	282,89	0,39	NS
00901 Indole alkaloid biosynthesis [PATH:ko00901]	-29%	282,89	0,39	NS
03021 Transcription machinery [BR:ko03021]	28%	158,14	0,40	NS
99997 Function unknown	28%	158,14	0,40	NS
02022 Two-component system [BR:ko02022]	28%	159,18	0,41	NS
03041 Spliceosome [BR:ko03041]	28%	159,18	0,41	NS
99993 Cell motility	28%	159,18	0,41	NS
00902 Monoterpenoid biosynthesis [PATH:ko00902]	-28%	280,55	0,41	NS
00333 Prodigiosin biosynthesis [PATH:ko00333]	-27%	279,79	0,42	NS
00190 Oxidative phosphorylation [PATH:ko00190]	-27%	278,76	0,43	NS
00270 Cysteine and methionine metabolism [PATH:ko00270]	-27%	278,76	0,43	NS
04147 Exosome [BR:ko04147]	-27%	278,76	0,43	NS
01057 Biosynthesis of type II polyketide products [PATH:ko01057]	26%	161,96	0,43	NS
04131 Membrane trafficking [BR:ko04131]	-25%	275,67	0,45	NS
99981 Carbohydrate metabolism	24%	167,42	0,48	NS
00590 Arachidonic acid metabolism [PATH:ko00590]	23%	168,45	0,49	NS
00363 Bisphenol degradation [PATH:ko00363]	23%	168,86	0,49	NS
00600 Sphingolipid metabolism [PATH:ko00600]	23%	169,48	0,50	NS
00511 Other glycan degradation [PATH:ko00511]	-22%	269,48	0,51	NS
99978 Cell growth	-22%	268,45	0,52	NS
00362 Benzoate degradation [PATH:ko00362]	-21%	266,39	0,53	NS
00680 Methane metabolism [PATH:ko00680]	21%	174,64	0,54	NS
00633 Nitrotoluene degradation [PATH:ko00633]	20%	175,67	0,55	NS
00480 Glutathione metabolism [PATH:ko00480]	19%	178,76	0,58	NS
00195 Photosynthesis [PATH:ko00195]	-19%	261,24	0,58	NS
00565 Ether lipid metabolism [PATH:ko00565]	-19%	261,24	0,58	NS
99977 Transport	-17%	257,11	0,62	NS
00473 D-Alanine metabolism [PATH:ko00473]	-16%	256,08	0,63	NS

00591 Linoleic acid metabolism [PATH:ko00591]	-16%	256,08	0,63	NS
00240 Pyrimidine metabolism [PATH:ko00240]	-15%	254,02	0,65	NS
00440 Phosphonate and phosphinate metabolism [PATH:ko00440]	13%	191,13	0,70	NS
00472 D-Arginine and D-ornithine metabolism [PATH:ko00472]	-10%	241,65	0,77	NS
99986 Glycan metabolism	-10%	241,65	0,77	NS
00300 Lysine biosynthesis [PATH:ko00300]	-9%	239,59	0,79	NS
00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 [PATH:ko00980]	8%	202,47	0,82	NS
00982 Drug metabolism - cytochrome P450 [PATH:ko00982]	8%	202,47	0,82	NS
00121 Secondary bile acid biosynthesis [PATH:ko00121]	-8%	237,53	0,82	NS
01055 Biosynthesis of vancomycin group antibiotics [PATH:ko01055]	-8%	237,53	0,82	NS
00640 Propanoate metabolism [PATH:ko00640]	7%	204,54	0,84	NS
04812 Cytoskeleton proteins [BR:ko04812]	-7%	235,46	0,84	NS
00072 Synthesis and degradation of ketone bodies [PATH:ko00072]	-7%	234,43	0,85	NS
03011 Ribosome [BR:ko03011]	-7%	234,43	0,85	NS
00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms [PATH:ko00710]	-4%	228,25	0,91	NS
00051 Fructose and mannose metabolism [PATH:ko00051]	-3%	226,19	0,93	NS
00365 Furfural degradation [PATH:ko00365]	2%	214,85	0,95	NS