UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

RAPHAELLA MACHADO BARBOSA

Influência do sulfato na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar

DISSERTAÇÃO

VERSÃO CORRIGIDA
SÃO CARLOS – SP
2018

RAPHAELLA MACHADO BARBOSA

Influência do sulfato na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra.
Márcia H. R. Zamariolli Damianovic

SÃO CARLOS – SP
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

MB238i

Machado Barbosa, Raphaella
Influência do sulfato na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar / Raphaella Machado Barbosa; orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Area de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Reator anaeróbio. 2. Reator em batelada. 3. Vinhaça. 4. Redução de sulfato. 5. Planejamento experimental. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **RAPHAELLA MACHADO BARBOSA.**

Título da dissertação: "Influência do sulfato na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar".

Data da defesa: 18/09/2018.

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic (Orientadora)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovada
Profa. Dra. **Ana Cláudia Barana** (Universidade Estadual de Ponta Grossa/UEPG)	Aprovada
Dra. **Valéria Del Nery** (Bioproj – Tecnologia Ambiental)	APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Rosimeire Machado Barbosa e José Isnaldo de Lima Barbosa, porque sem eles eu não estaria aqui. Para mim eles são exemplos na minha vida, e os respeito demais. À minha irmã, Rebecca Machado Barbosa, que mesmo sendo 9 anos mais nova do que eu, sinto uma proximidade que não mudou mesmo morando longe. Agradeço pela paciência, pelos conselhos, pelas conversas, e claro, pelo amor e suporte que têm me dado nesses 27 anos de vida.

A minha orientadora, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic que acreditou no meu potencial e me deu essa oportunidade, obrigada por ser tão atenciosa, querida, cheia de vida, e claro, uma ótima profissional, dedicada, firme, me auxiliando nessa jornada.

Aos meus amigos da internet, em especial, Carlirio, Nayara, Luis, Elisabete, Guilherme, Ian, Amanda, Henrique, Melissa, Evilásio, pelas boas conversas, pelos surtos, os conselhos, os eventos, os bares, as *calls,* e os podcasts que me divertiram bastante em meio do estresse desses quase 3 anos.

Aos meus amigos do mestrado e da USP, que fizeram parte da minha vida nos últimos 2 anos, em especial a Elis, Fernanda, Williane, Rodrigo, Gabriel, Andressa Messias, Janaína, Juliana, Fernando, Bruno, Arlan, Andressa Bernal, Bruna, Hugo, Paula, Amanda e Eduardo, obrigada pelo apoio emocional, a ajuda na pesquisa e nos estudos, e acima de tudo, o tempo que passamos juntos.

A todos meus companheiros de LPB, em especial a Renata, Lucas, Fabrício, Felipe, Raissa, Alejandra, Vanessa, Inaê, Julliana Silva, Bruno Garcia, Carla, Carol Gil, Elias, Cristiane, Mirabelle, Guilherme e Rodrigo, obrigada pela ajuda na pesquisa, na hora das dúvidas, os papos na hora do café, nas viradas de noite, e principalmente, no meu crescimento profissional.

As Técnicas do LPB, Carol, Elô, Janja e Isabel, pela ajuda e a instrução durante a minha estadia.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento e toda a equipe, Sá, Pri, Rose, André, e a equipe do prédio da Engenharia Ambiental, Silvana e Fernando.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 131527/2016-9). Ao Projeto Temático FAPESP 2017/2018 que financiou minha pesquisa e a de muitos pesquisadores no LPB. A Universidade de São Paulo. Aos participantes da banca de qualificação e de defesa, Valéria Del Nery, Ana Claudia Barana e Eugênio Foresti.

A cada um que contribuiu direta ou indiretamente com esse trabalho, o meu muito obrigada.

“Inspiration unlocks the future.”

—*The Wind Rises* (2013)

RESUMO

BARBOSA, R. M. **A influência do sulfato na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar**. 2018. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2018.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, o biocombustível mais utilizado como alternativa energética no país (BRASIL, 2017). No entanto, esse processo produtivo precisa considerar os subprodutos gerados, principalmente a vinhaça, que se não tratada e disposta corretamente podem causar problemas ambientais sérios. Sendo um efluente com alta carga orgânica, a vinhaça concentra potencial substancial para geração de bioenergia como o metano. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da concentração de sulfato, advindo da utilização de ácido sulfúrico para manutenção da pureza das cepas fermentativas e incorporado à vinhaça, na produção de metano. Para tanto, testes em batelada foram feitos com relações DQO/Sulfato diferentes. As respostas obtidas no planejamento experimental fatorial 2^2 com ponto central, utilizando a demanda química de oxigênio (DQO) e sulfato como os fatores, foram a produção de metano, a eficiência de remoção de matéria orgânica e a eficiência de remoção de sulfato ao longo dos ciclos de operação. As faixas estudadas foram de 4,6 a 2,0 $gDQO.L^{-1}$ e 0,3 a 2,3 $gSO_4^{-2}.L^{-1}$. Dessa forma, para o intervalo de concentrações testadas, a quantidade de matéria orgânica foi o fator mais importante para a produção de metano, e foi constatado que o sulfato possuiu efeito negativo em sua produção. Para a eficiência de remoção de matéria orgânica, a interação dos fatores foi a mais significativa, mostrando que a participação das bactérias redutoras de sulfato foi positiva, aumentando a eficiência de remoção. Com relação à eficiência de remoção do sulfato, apenas a concentração de sulfato foi significativa para a remoção do mesmo, quanto maior a concentração menor foi a eficiência de remoção observada. A maior produção de metano ocorreu na condição 4,6 $gDQO.L^{-1}$ e 0,3 $gSO_4^{-2}.L^{-1}$, DQO/SO_4^{2-} de 12,5, em que a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 80% e a de sulfato foi de 89%. A biomassa desenvolveu as rotas metanogênica e sulfetogênica, sendo a metanogênica responsável pela maior eficiência de remoção (85% do total). Sequenciamento Illumina MiSeq 16S rRNA foi feito no inóculo utilizado nos experimentos, indicando a presença abundante das bactérias capazes de produzir acetato (54,75%), dentre elas o gênero

Desulfofaba (Bactéria Redutora de Sulfato Oxidativa Incompleta, 7,08%), mostrando uma predisposição da rota metanogênica pela via do acetato ser a predominante.

Palavras Chaves: Reatores anaeróbios. Reator em batelada. Vinhaça. Redução de Sulfato. Planejamento Experimental.

ABSTRACT

BARBOSA, R. M. **The influence of sulfate on the production of methane from sugarcane vinasse**. 2018. 113p. Dissertation (Master in Hydraulic Engineering and Sanitation) - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos. 2018.

Brazil is the world's largest producer of sugarcane and the world's leading producer of sugar and ethanol, the most used biofuel as an energy alternative in the country (BRASIL, 2017). However, this productive process needs to consider the by-products generated, especially the vinasse, which if not treated and disposed properly can cause serious environmental problems. Being an effluent with high organic load, vinasse concentrates potential for bioenergy generation as methane. The objective of this work was to evaluate the influence of the sulfate concentration, resulting from the use of sulfuric acid to maintain purity of fermentative strains and incorporated into vinasse, in the production of methane. For that, batch tests were done with different COD/SO_4^{2-} ratios. The responses obtained in the 2^2 design of experiment with central point, using the chemical oxygen demand (COD) and sulfate, as the factors were the methane production, the organic matter removal efficiency and the sulfate removal efficiency along the cycles of operation. The ranges studied were 4.6 to 2.0 gDQO.L^{-1} and 0.3 to 2.3 gSO_4^{2-}.L^{-1}. Therefore, for the range of concentrations tested, the amount of organic matter was the most important factor for the production of methane, and it was verified that the sulfate had a negative effect on its production. For the removal efficiency of organic matter, the interaction of the factors was the most significant, showing that the participation of the sulfate reducing bacteria was positive, increasing the removal efficiency. Regarding the sulfate removal efficiency, only the sulfate concentration was significant for the removal of itself, the higher the concentration the lower the observed removal efficiency. The highest methane production occurred in the condition 4.6 gDQO.L^{-1} and 0.3 gSO_4^{-2}.L-1, COD/SO_4^{2-} of 12.5, where the removal efficiency of organic matter was 80% and sulfate was 89%. The biomass developed the methanogenic and sulfetogenic routes, being the methanogenic responsible for the greater removal efficiency (85% of the total). Sequencing Illumina MiSeq 16S rRNA was done in the inoculum used in the experiments, indicating the abundant presence of bacteria capable of producing acetate (54.75%), among them the genus *Desulfofaba* (Incomplete Oxidative Sulfate Reducing Bacteria, 7.08%), showing a predisposition of the methanogenic route through the acetate route is the predominant one.

Key Words: Anaerobic Reactors. Batch reactor. Vinasse. Reduction of Sulfate. Design of Experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do processo de produção de açúcar e etanol. 28
Figura 2: Esquema das vias de degradação anaeróbia da matéria orgânica. 33
Figura 3: Esquema dos testes iniciais. 45
Figura 4: Exemplo de planejamento com ponto central, sendo X1 e X2 os fatores, e os valores -1, 0 e 1 as posições decodificadas dos fatores. 47
Figura 5: Produção de Metano: Concentrações de MO de 4 $g.L^{-1}$ - R1: 4320 $mgDQO.L^{-1}$ e 628 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$/ R1: 4135 $mgDQO.L^{-1}$ e 708 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ / R1: 4950 $mgDQO.L^{-1}$ e 2189 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ / R1: 4670 $mgDQO.L^{-1}$ e 2387 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ 55
Figura 6: a) Decaimento da Matéria Orgânica nos reatores R1, R2, R3 e R4 b) Decaimento do Sulfato nos reatores R1, R2, R3 e R4 56
Figura 7: Produção de Metano - Concentrações de MO de 2 $g.L^{-1}$ a) Todas as condições de acordo com a Tabela 8 b) Vinhaça de Pedra do lodo c) Vinhaça de Rio Pardo d) Vinhaça de Rio Pardo com centrifugação do lodo. 57
Figura 8: Produção de Metano - Concentrações de SO_4^{2-} de 700 $mg.L^{-1}$- R2.3 e R2.4: Vinhaça de Rio Pardo sem centrifugação de lodo/ R3.1 e R3.2: Vinhaça de Rio Pardo com centrifugação do lodo 63
Figura 9: Produção de Metano - Concentrações de SO_4^{2-} variadas 65
Figura 10: Produção de Metano - Relações DQO/SO_4^{2-} de 10 e 2 67
Figura 11: Produção de Metano - Relações DQO/SO_4^{2-} de 2 69
Figura 12: Produção de Metano - Relações DQO/SO_4^{2-} de 10 70
Figura 13: Superfície de reposta para a produção de metano. 73
Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores na Produção de Metano. 74
Figura 15: a) Regressão contra Valores observados b) Resíduos contra Valores observados . 76
Figura 16: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de matéria orgânica. 79
Figura 17: a) Regressão contra Valores observados b) Resíduos contra Valores observados . 80
Figura 18: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de matéria orgânica em duas dimensões. 81
Figura 19: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores na Eficiência de emoção de Matéria Orgânica 82
Figura 20: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de sulfato. 83
Figura 21: a) Regressão contra Valores observados b) Resíduos contra Valores observados 84
Figura 22: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de sulfato em duas dimensões. 86
Figura 23: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores na Eficiência de remoção de Sulfato 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da vinhaça da cana-de-açúcar. 29
Tabela 2: Reações Redox de produção do Acetato em processos anaeróbios..... 31
Tabela 3: Efeitos da formação de sulfeto em reatores anaeróbios. 34
Tabela 4: Equações das rotas de remoção de matéria orgânica..... 38
Tabela 5: Caracterização da vinhaça da Usina Rio Pardo e da Usina de Pedra 43
Tabela 6: Descrição do planejamento experimental 2^2 com ponto central..... 48
Tabela 7: Variáveis analisadas na pesquisa 50
Tabela 8: Dados dos experimentos para as concentrações de MO acima de $4gL^{-1}$ 54
Tabela 9: Dados dos experimentos para as concentrações de MO de $2gmL^{-1}$ 57
Tabela 10: Dados de regressão do Modelo Gompertz modificado para as concentrações de MO de $2gmL^{-1}$ 61
Tabela 11: Rotas de biodegradação da matéria orgânica e produção de metano teórica 63
Tabela 12: Dados dos experimentos com montagem com centrifugação – utilizando a vinhaça de Usina Rio Pardo. 64
Tabela 13: Rotas de biodegradação da matéria orgânica e produção de metano calculado, da vinhaça da Usina de Rio Pardo. 66
Tabela 14: Dados dos experimentos para as relações DQO/SO_4^{2-} de 10 e 2..... 67
Tabela 15: Dados dos experimentos para as relações DQO/SO_4^{2-} de 2 68
Tabela 16: Dados dos experimentos para as relações DQO/SO_4^{2-} de 10 70
Tabela 17: Dados de regressão do Modelo Gompertz modificado para as relações DQO/SO_4^{2-} de 10 71
Tabela 18: Resultados obtidos nos experimentos em batelada 72
Tabela 19: Resultados da ANOVA dos fatores da produção de Metano. 73
Tabela 20: Resultados da ANOVA para o modelo de regressão dos fatores da produção de Metano 75
Tabela 21: Rotas de biodegradação da Matéria orgânica e produção de metano Teórica..... 77
Tabela 22: Resumo das participações das vias metanogênicas e sulfetogênicas 78
Tabela 23: Resultados da ANOVA para o modelo de regressão dos fatores da eficiência de remoção de MO. 79
Tabela 24: Resultados da ANOVA dos fatores da eficiência de remoção de matéria orgânica. 82
Tabela 25: Resultados da ANOVA para o modelo de regressão dos fatores da eficiência de remoção de Sulfato. 83
Tabela 26: Resumo das concentrações de sulfeto nos ensaios. 87
Tabela 27: Resultados da ANOVA dos fatores da eficiência de remoção de sulfato. 87
Tabela 28: Ordens taxonômicas identificadas na biomassa 89
Tabela 29: Abundância Relativa dos principais gêneros *Bacteria*. 90
Tabela 30: Abundância Relativa dos principais gêneros *Archaea* 94
Tabela 31: Composição das soluções de macro e micronutrientes 115

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µmax	Taxa de Crescimento especifico máximo
AM	Arqueias Metanogênicas
ANOVA	Analise de Variância
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DOE	Design of Experiments ou Planejamento de experimentos
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F/M	Food/Microorganism ou Alimento/Microrganismo
Ks	Afinidade ao substrato
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MO	Matéria Orgânica
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
pH	Potencial Hidrogeniônico
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
SVT	Sólidos Voláteis Totais
UASB	Up flow Anaerobic Sludge Blanket

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23
2. OBJETIVOS 25
2.1. OBJETIVO GERAL 25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27
3.1. PRODUÇÃO DE AÇÚCAR, ALCOOL E VINHAÇA 27
3.2. PROCESSOS ANAERÓBIOS E METANOGÊNESE 30
3.3. A RELAÇÃO DO SULFATO COM A ANAEROBIOSE 32
3.3.1. Toxicidade do sulfeto 33
3.3.2. Competição entre BRS e AM 34
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 39
4. MATERIAL E MÉTODOS 41
4.1. REATORES EM BATELADA 41
4.2. COLETA E CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA 41
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO LODO 43
4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 45
4.5. MONTAGEM DOS REATORES 48
4.6. COLETAS E ANÁLISE DA FASE GASOSA 49
4.7. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 50
4.8. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 51
4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS 52
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 54
5.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA NA PRODUÇÃO DE METANO 54
5.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SULFATO NA PRODUÇÃO DE METANO 62
5.3. RELAÇÃO DQO/SO_4^{2-} 66
5.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 72
5.4.1. A influência da concentração da Matéria Orgânica e Sulfato na Produção de Metano 72
5.4.2. A influência da concentração da Matéria Orgânica e Sulfato na Eficiência de remoção de Matéria Orgânica 78

5.4.3. A influência da concentração da Matéria Orgânica e Sulfato na Eficiência de Remoção de Sulfato 83
5.5. BIOLOGIA MOLECULAR – SEQUENCIAMENTO 16S 89
5.5.1. Domínio *Bacteria* 89
5.5.2. Domínio *Archaea* 93
6. CONCLUSÕES 97
7. RECOMENDAÇÕES 99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101
APÊNDICE A 109
APÊNDICE B 112
ANEXO A 115

1. INTRODUÇÃO

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, o biocombustível mais utilizado como alternativa energética no país (BRASIL, 2017).

A vinhaça, produzida na razão média de 13L por 1L de etanol produzido, é um efluente que possui uma elevada salinidade, carga orgânica, fenóis, e metais pesados, o que agrava seu efeito negativo atinge o ambiente (PRASAD; KUMAR; SRIVASTAVA, 2008; ESPAÑA-GAMBOA *et al*., 2011). Dentre os constituintes da vinhaça destaca-se o sulfato, adicionado ao processo produtivo, de maneira crescente ao longo da safra de cana-de-açúcar, para manutenção das cepas utilizadas na fermentação para geração de etanol (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Em 1967, o Governo Federal emitiu o Decreto-Lei n.º 303, que proíbe a descarga de vinhaça em corpos d'agua, atualmente refogada, sendo reafirmada em 1978, pela Portaria n. 323, visando a proteção do equilíbrio ecológico e do meio ambiente (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Buscando alternativas para a disposição desses efluentes, se tornou uma prática comum utilizar a vinhaça *in natura* nas próprias áreas de plantio de cana-de-açúcar para restituir alguns nutrientes ao solo. Dias *et al.* (2015) descreveram os aspectos relacionados à produção e ao destino da vinhaça, informando que o armazenamento da vinhaça é tipicamente feito em lagoas, o que ocasiona uma decomposição microbiana parcial e consequente geração de odor e que a maioria das usinas não possui um sistema de distribuição adequado da vinhaça, o que proporciona contaminação das águas subterrâneas.

Pensando nessa realidade, se discute a ideia do tratamento anaeróbio, que, de acordo com Foresti *et al.* (1999), dentre as vantagens amplamente conhecidas pode se citar: baixo consumo de energia; produção de lodo baixa, quando comparado ao tratamento aeróbio, associado ao menor gasto com manejo e disposição final; possibilidade de funcionar bem mesmo depois de longos períodos de interrupção, o que seria adequado em função dos períodos de entressafras; e a possibilidade da produção de energia a partir do biogás.

Porém, quando uma água residuária rica em sulfato é introduzida em um reator anaeróbio, a matéria orgânica pode ser removida pelas vias sulfetogênica, metanogênica ou ambas. A relação DQO/Sulfato, que implica na disponibilidade de elétrons para as reações

bioquímicas, é determinante para o estabelecimento das vias de degradação da matéria orgânica.

Apesar de contribuir para degradação da matéria orgânica, a sulfetogênese acarreta na produção do sulfeto (S^{2-}) que além de produzir um mau odor característico também diminui a qualidade do biogás, sendo corrosivo e tóxico aos seres humanos. A participação das Bactérias Redutores de Sulfato (BRS) em reatores anaeróbios auxilia na eficiência de remoção de matéria orgânica, já que a o fluxo de elétrons se distribui pelas duas vias, e as BRS não são afetadas pela pressão parcial de hidrogênio, em comparação aos organismos metanogênicos. As BRS podem ser classificadas em oxidativas completas e incompletas, sendo as incompletas aquelas que não transformam completamente os ácidos orgânicos voláteis em CO_2, e sim em acetato, que é o principal substrato para a produção de metano. Assim, no caso de relações DQO/sulfato maiores que 0,67, a coexistência da sulfetogênese e da metanogênese em um reator anaeróbio podem levar a uma boa eficiência de remoção de matéria orgânica, mantendo a produção de metano.

Vários pesquisadores vêm pesquisando a influência da razão DQO/Sulfato relacionada a remoção de matéria orgânica em reatores em bateladas e contínuos em diversas condições (DE SMUL; GOETHALS; VERSTRAETE, 1999; JEONG et al., 2008; HU et al., 2015; KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017).

O presente manuscrito refere-se à dissertação apresentada à Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento, com objetivo principal de contribuir no entendimento do papel do sulfato, presente na composição da vinhaça de cana-de-açúcar, na produção de metano se utilizando de técnicas de planejamento de experimentos e superfícies de resposta. A proposta parte da consideração que a vinhaça possui constituição variável de sulfato ao longo da safra e baseia-se na possibilidade de ocorrência da sulfetogênese, uma das vias de degradação da matéria orgânica em ambiente anaeróbio, a qual desvia o fluxo de elétrons da via metanogênica, requerida para geração de metano.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da concentração de sulfato presente na vinhaça, observando o potencial na produção de metano.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a degradação da matéria orgânica pelas rotas metanogênica e sulfetogênica durante ensaios em batelada.

b) Avaliar os fatores de concentração de matéria orgânica e concentração de sulfato utilizando-se das análises de planejamento experimental.

c) Avaliação das rotas metânogênicas e sulfetogênicas do lodo utilizado com base nas características da comunidade microbiana determinada pelo Illumina MiSeq.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PRODUÇÃO DE AÇÚCAR, ALCOOL E VINHAÇA

O Proálcool foi um programa instituído pelo governo de Ernesto Geisel em 14 de novembro de 1975, com o intuito de aumentar a produção de álcool para uso como combustível diante do aumento dos preços do petróleo no mercado internacional. O incentivo governamental existiu até 1999 com uma campanha de ajuste de preços para aquecer o mercado, mas hoje a indústria amadureceu significativamente e depende exclusivamente de investimentos privados (COELHO *et al*., 2006).

Os resultados positivos do programa de produção de etanol foram possíveis devido aos avanços tecnológicos, investimentos em infraestrutura e gestão da produção de cana-de-açúcar e etanol. Devido a esses desenvolvimentos, o Brasil é hoje a referência mundial na produção de etanol à base de cana-de-açúcar (COELHO *et al*., 2006).

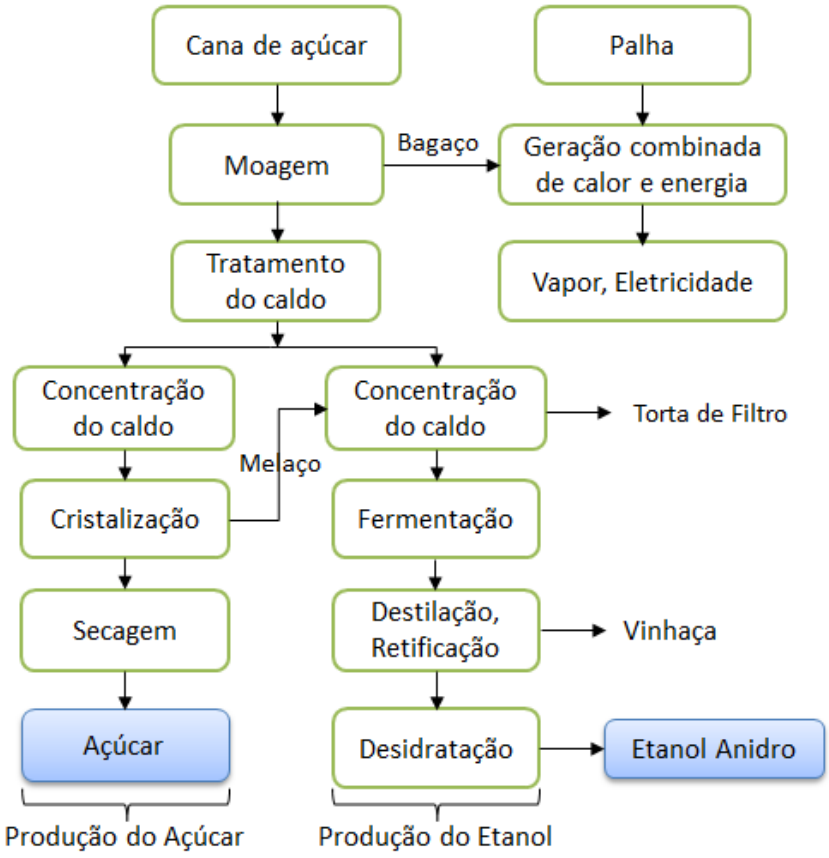
Para haver a produção do açúcar e do álcool, a cana-de-açúcar depois de colhida vai para moinhos onde é lavada e moída para a extração do caldo. Em seguida, este caldo é submetido a um tratamento de clarificação, concentração e centrifugação para a produção do açúcar comercial e xarope (SALOMON; LORA, 2009).

De acordo com Salomon e Lora (2009) depois de passar por processo de cozimento a vácuo para a obtenção de um açúcar de menor qualidade, o xarope é transformado em um xarope final, também conhecido como melaço, sendo enviado para os tanques de concentração para ser reutilizado na produção de etanol.

Após a fermentação, o líquido resultante é chamado de vinho, que também passa por um processo de centrifugação para recuperar as leveduras que serão reutilizadas no processo de fermentação. Em seguida, este vinho é enviado para as colunas de destilação para a separação do álcool, que por sua vez produz um efluente chamado vinhaça (SALOMON; LORA, 2009).

Para melhor compreensão dos passos dentro do processo produtivo mencionado, a Figura 1 representa um fluxograma com as etapas para a produção do açúcar e do álcool anidro.

Figura 1: Fluxograma do processo de produção de açúcar e etanol.



Fonte: Adaptado de Dias *et al*. (2015)

Na produção de álcool, a cada 1 litro de álcool produzido há a formação de 9 a 14 litros de vinhaça. Em comparação ao esgoto sanitário, esse resíduo pode ser 100 vezes mais concentrado em relação ao poder de contaminação, trata-se de um material rico em matéria orgânica, elevada DBO, pH ácido e alta cor e salinidade, como também contêm compostos fitotóxicos, antibacterianos e recalcitrantes, tais como fenóis, polifenóis e metais pesados, que têm efeitos negativos sobre os microrganismos e às plantas (PANT; ADHOLEYA, 2007; PRASAD; KUMAR; SRIVASTAVA, 2008; SALOMON; LORA, 2009; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

A composição química da vinhaça depende das características do solo, da variedade de cana-de-açúcar, do período de colheita e do processo industrial utilizado para a produção de etanol (SALOMON; LORA, 2009). A Tabela 4 destaca uma composição relativa tanto da vinhaça proveniente do melaço quanto diretamente do caldo de cana.

Tabela 1: Características da vinhaça da cana-de-açúcar.

Parâmetro	Unidade	Melaço	Caldo	Mistura
pH	-	4,2-5,0	3,7-4,6	4,4-4,6
Temperatura	°C	80-100	80-100	80-10
DBO	$gL^{-1}O_2$	25	6-16	19,8
DQO	gL^{-1}	65	15-33	45
Sólidos Totais	gL^{-1}	81,5	23,7	52,7
Sólidos Voláteis	gL^{-1}	60	20	40
Sólidos Fixos	gL^{-1}	21,5	3,7	12,7
Nitrogênio	$gL^{-1}N$	0,45-1,6	0,15-0,7	0,48-0,71
Fósforo	$gL^{-1}P_2O_5$	0,10-0,29	0,10-0,21	0,09-0,20
Potássio	$gL^{-1}K_2O$	3,74-7,83	1,20-2,10	3,34-4,60
Cálcio	$gL^{-1}CaO$	0,45-5,18	0,13-1,54	1,33-4,57
Magnésio	$gL^{-1}MgO$	0,42-1,52	0,20-0,49	0,58-0,70
Sulfato	$gL^{-1}SO_4$	6,40	0,60-0,76	3,70-3,73
Carbono	$gL^{-1}C$	11,20-22,90	5,70-13,40	8,70-12,10
C/N	gL^{-1}	16-16,27	19,7-21,0	16,4-16,43
Matéria Orgânica	gL^{-1}	63,40	19,50	38
Substâncias reduzidas	gL^{-1}	9,50	7,90	8,30

Fonte: Adaptado de Salomon e Lora (2009).

A vinhaça, por ter uma composição com elevada concentração de matéria orgânica e nutrientes, é um resíduo potencialmente perigoso para ser disposto no meio ambiente *in natura*. A cor do efluente pode por si só afetar diretamente a penetração da luz solar em rios e lagos, reduzindo a atividade fotossintética e concentrações de oxigênio dissolvido, causando assim condições perigosas para a vida aquática e mudanças altamente indesejáveis na estrutura e função do ecossistema (PANT; ADHOLEYA, 2007).

No Brasil, é uma prática comum usar a vinhaça como fertilizante e fonte de potássio e cálcio nas próprias áreas agrícolas como medida de uso do efluente, mas essa prática não é recomendada sem uma devida análise das características do solo e da vinhaça, uma vez que, com esses cuidados é possível aplicar a quantidade apropriada e evitar contaminações das águas subterrâneas (SALOMON; LORA, 2009).

Os critérios para a aplicação de vinhaça em uso agrícola foram regulamentados recentemente, mas apenas no estado de São Paulo como norma técnica (CESTESB, 2015).

Esta regulamentação prevê apenas os impactos causados pela vinhaça no solo, água superficial e subterrânea, prescrevendo a aplicação de acordo com seu conteúdo de potássio, mas negligenciando o conteúdo de matéria orgânica e os impactos atmosféricos devido às emissões atmosféricas (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Com o intuito da utilização do resíduo para obter resultados econômicos, os sistemas de tratamento baseados no processo anaeróbio se mostraram como uma proposta interessante. O processo permite remover uma porcentagem da matéria orgânica, enquanto parte dos nutrientes e minerais são mantidos no efluente resultante, podendo ser utilizado como fertilizante. Além disso, o processamento da vinhaça por via anaeróbia contribui para redução de impactos ambientais associados ao aporte de matéria orgânica, além de viabilizar a recuperação de uma fração da energia contida nesse subproduto com a produção de biogás (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

3.2. PROCESSOS ANAERÓBIOS E METANOGÊNESE

Ao longo dos anos se tornou crescente o interesse pelo tratamento anaeróbio, fato esse que ocorre principalmente devido aos gastos de energia nos processos industriais e também devido ao maior rigor nas legislações que normatizam a descarga de efluentes em corpos d'água (OUDE ELFERINK *et al.* 1994).

Em 1983, Mosey definiu em seu trabalho que a digestão anaeróbia compreende uma série de processos metabólicos sequenciais, estáveis e autorregulados que se desenvolvem na ausência de oxigênio molecular. Nesses processos, um consórcio com diferentes tipos de microrganismos atua a fim de se promover a transformação de compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, resultando principalmente em metano e dióxido de carbono.

Bio-polímeros como: carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios são os primeiros a serem hidrolisados a monômeros e oligômeros pelos microrganismos hidrolíticos e fermentativos. Alguns dos produtos criados podem ser utilizados diretamente na metanogênese, porém o restante continua sendo fermentado pelas bactérias acidogênicas a fim de serem convertidos em ácidos orgânicos voláteis (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (especialmente etanol), cetonas (mormente acetona), dióxido de carbono e hidrogênio. Os produtos podem continuar no processo de fermentação em uma fase denominada acetogênese, e então serem oxidados a acetato. No último estágio, o acetato e o hidrogênio produzidos são convertidos a metano e dióxido de carbono pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas (AM) (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994).

Segundo Mc Carty (1964), a produção de metano através do acetato corresponde em aproximadamente 70% da DQO digerida, enquanto os demais 30% são concentrados no hidrogênio.

A metanogênese a partir do acetato é limitada por dois aspectos, destacados na sequência:

Primeiro, a acetogênese possui uma termodinâmica desfavorável para sua formação ($\Delta G_0 > 0$), pois não ocorre espontaneamente em alguns casos, como é detalhado na Tabela 1. Em reações de redução de ácidos orgânicos como propiônico e butílico, e álcoois como etanol, para a formação do ácido acético, o hidrogênio é produzido conjuntamente, e essas reações só são termodinamicamente favoráveis se a pressão parcial de H_2 for mantida abaixo de 10^{-4}, 10^{-3} e 10^{-1} atm para ácido propiônico, butiríco e etanol, respectivamente (SPEECE, 1981; HAPER; POHLAND, 1986).

Tabela 2: Reações Redox de produção do Acetato em processos anaeróbios.

Compostos	Reações	ΔG_0, kJ
Propionato → Acetato:	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 76,1
Butirato → Acetato:	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 48,1
Etanol → Acetato:	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 9,6
Lactato → Acetato:	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$	- 4,2
Bicarbonato→ Acetato:	$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-104,6
Acetato → Metano:	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow HCO_3^- + CH_4$	-31,0

Fonte: Harper e Pohland (1986)

Para que ocorra a formação do acetato, o equilíbrio da reação precisa ser deslocado para a direita, e isso é conseguido quando o H_2 é consumido continuamente por reações receptoras de elétrons, como a produção de metano pelas arqueias metanogênicas hidrogênotróficas.

Para situações onde os níveis de H_2 estão mais elevados, esta conversão não pode prosseguir e, portanto, os ácidos voláteis se acumulam no sistema podendo causar inibição da metanogênese.

No segundo aspecto vem a cinética, arqueias metanogênicas tem um crescimento mais lento comparado aos outros microrganismos participantes da fermentação anaeróbia, por isso qualquer mudança significativa no meio ao qual elas estão habituadas, estas serão diretamente afetadas, podendo não ocorrer formação de metano.

Diante desses aspectos, a presença de vários microrganismos diferentes coexistindo de forma sintrófica é importante para o balanceamento do processo como um todo.

Existem muitos fatores ambientais que influenciam nas condições do meio que podem afetar diretamente os microrganismos, os principais são: temperatura, pH, alcalinidade, macronutrientes (N, P, SO_4^{2-}) e micronutrientes (metais traços), tempo metabólico adequado, uma fonte de carbono (para síntese e energia), e características do reator (suspenso ou crescimento aderido).

3.3. A RELAÇÃO DO SULFATO COM A ANAEROBIOSE

Em ambientes anaeróbios a remoção de matéria orgânica não ocorre apenas pela metanogênese. Se o efluente a ser tratado é rico em sulfato, então este pode ser utilizado como aceptor final de elétrons dentro da via sulfetogênica.

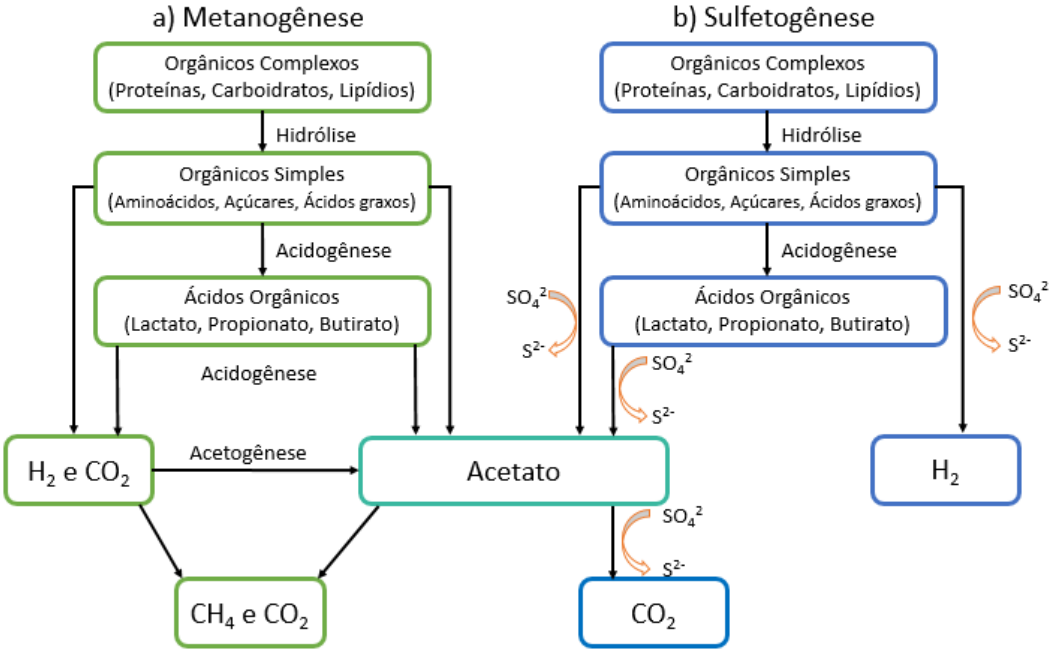
O sulfato (SO_4^{2-}) é a forma mais oxidada do enxofre, tendo como características ser inerte, não tóxico e não volátil (SHIN *et al*., 1995). Na natureza os compostos sulfurosos são encontrados em sedimentos principalmente na forma de pirita (FeS_2) e gipsita ($CaSO_4$) e como íon sulfato na água salobra e salina (HAO *et al.*, 2014).

Porém o sulfato aparece de maneira recorrente em resíduos gerados no âmbito industrial, como por exemplo, nas indústrias de papel e celulose, farmacêuticas, alimentícias, curtume, petroquímicas e mineração (HAO *et al.*, 2014). No caso da indústria de açúcar e álcool, deve-se principalmente à adição de ácido sulfúrico para controle bacteriano durante a etapa de fermentação, já que é um ácido forte, relativamente barato e com alto grau de pureza (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

A sulfetogênese ocorre por intermédio das bactérias redutoras de sulfato (BRS), que usam o sulfato para a degradação de componentes orgânicos e hidrogênio (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). O sulfato sofre redução, o que acarreta na produção do sulfeto (S^{2-}). Subsequentemente, o sulfeto pode ser oxidado em condições aeróbias pelas bactérias quimiotróficas de enxofre, ou em ambiente anóxico pelas bactérias fototróficas de enxofre (MUYZER; STAMS, 2008).

A metanogênese e sulfetogênese podem ocorrer concomitantemente em um mesmo reator, por mecanismos de competição e simbiose não obrigatória. A Figura 2 mostra um esquema das rotas de degradação e o quanto esses procedimentos são semelhantes.

Figura 2: Esquema das vias de degradação anaeróbia da matéria orgânica.



Fonte: Adaptado de Muyzer; Stams (2008)

3.3.1. Toxicidade do sulfeto

A emissão de sulfeto em baixas concentrações não afeta diretamente o meio ambiente, já que o enxofre pode ser utilizado como nutriente para ser incorporado nos aminoácidos e enzimas das células (MUYZER; STAMS, 2008). O sulfeto se torna mais perigoso quando está em sua forma não dissociável (H_2S), já que por ser uma molécula neutra e com baixo peso molecular, ela consegue permear pela membrana celular facilmente por difusão simples, sem gastos de energia, o que pode interferir no metabolismo assimilatório do enxofre, além de apresentar o potencial de alterar o pH intercelular (LENS *et al*., 1998; OUDE ELFERINK *et al*., 1994; POL *et al*., 1998).

Ademais, quanto maior a concentração de sulfeto maior a interferência nas rotas de biodegradação da matéria orgânica, quando se objetiva a produção de metano. A qualidade do biogás produzido durante a digestão anaeróbia está diretamente ligada à concentração do H_2S, que se as condições estiverem favoráveis, quanto maior for sua produção, maior será a transferência do H_2S dissolvido para a fase gasosa (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994) o que pode inviabilizar economicamente a utilização do metano para produção de energia, já que sua remoção do biogás é difícil, necessitando de técnicas avançadas e de custo elevado.

As desvantagens da redução de sulfato em sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes, bem como vantagens associadas podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3: Efeitos da formação de sulfeto em reatores anaeróbios.

Desvantagens	Vantagens
• Redução da remoção de DQO total devido à presença de H_2S (efeito tóxico).	• Possibilidade de remoção de componentes oxidados do enxofre do efluente.
• Corrosivo	• Remoção de metais pesados
• Acumulação de material inerte no lodo (deposição de enxofre elementar)	• Precipitação de sulfato metálicos, bons precursores de granulação
• Menor produção de metano (desvio dos elétrons da metanogênese para a sulfetogênese)	• Produção de acetato, precursor da metanogênese, independentemente da pressão parcial de hidrogênio.
• Biogás de pouca qualidade e necessidade de remoção do H_2S.	• Quando está em baixas concentrações pode ser utilizado como fonte de enxofre para o crescimento celular.
• Maus Odores	
• Precipitação de íons metálicos utilizados como nutrientes para crescimento celular	

Fonte: Adaptado de POL *et al.* (1998)

O sulfeto produzido em um reator anaeróbio é encontrado nas formas de S_2^-, HS^-, H_2S em solução, H_2S na forma de biogás e sulfetos metálicos insolúveis de acordo com os equilíbrios químicos e físicos (LENS *et al.*, 1998).

O que determina em qual forma bioquímica o sulfeto estará em solução é o pH, e isso influencia excepcionalmente as arqueias metanogênicas; sua faixa ótima de crescimento é entre pH 6,5 a 8,2, porém o valor de pKa do equilíbrio de dissociação de H_2S é de aproximadamente 6,9 a 30°C (LENS *et al.*, 1998). Isto quer dizer que, pequenas variações de pH entre 6 e 8 afetam significativamente a concentração de H_2S na solução ou biogás. As concentrações de espécies de sulfetos podem ser calculadas, basta para isso saber o pH e o valor da constante de dissociação, utilizando a lei de Henry.

Todavia, o comportamento tóxico do sulfeto de hidrogênio não ionizado não depende apenas de sua concentração no reator, de acordo com LENS, *et al.* (1998) pode haver diferentes efeitos tóxicos, dependendo da espécie em que está presente (iônica ou molecular) e da disposição da biomassa no reator (suspensa ou imobilizada). No caso de biomassa imobilizada, pode existir uma limitação na transferência de massa nas camadas mais profundas de um biofilme ou granulado anaeróbico, o que pode ocasionar a diminuição de sua toxicidade.

Por outro lado, os efeitos colaterais da toxicidade do sulfeto, e a precipitação de íons metálicos essenciais também podem contribuir com a diminuição da atividade metanogênica. (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994)

3.3.2. Competição entre BRS e AM

A relação DQO/sulfato, que implica na disponibilidade de elétrons para as reações bioquímicas, é determinante para compreender qual das vias de degradação da matéria orgânica (via metanogênica ou via sulfetogênica) será a mais relevante no processo de remoção da matéria orgânica.

Em baixas relações DQO/sulfato, associado a altas concentrações de sulfato, observa-se a competição das BRS por acetato e hidrogênio junto às arqueias metanogênicas acetoclásticas e às hidrogenotróficas (AM).

LENS *et al*. (1998) provou em seu trabalho, através de estequiometria, que para haver remoção da matéria orgânica somente pela via sulfetogênica, é necessário que a relação DQO/Sulfato seja de aproximadamente 0,67. Teoricamente com esse valor haveria sulfato suficiente no meio para que as BRS conseguissem consumir a matéria orgânica disponível. Em valores abaixo de 0,67, seria necessária a suplementação de matéria orgânica, caso o objetivo do tratamento seja a remoção do sulfato. Já para valores acima deste, a remoção da matéria orgânica ocorre somente se a metanogênese e a sulfetogênese acontecerem conjuntamente.

Nesse sentido, o limite de 0,67 baseia-se no pressuposto de que o processo é realizado apenas por BRS oxidativas completas, isto é, aquelas que convertem ácidos orgânicos e etanol em dióxido de carbono, sulfeto e água, conforme apresentado nas Equações: (1) referente ao uso do acetato e a (2) referente ao etanol.

$$SO_4^{-2} + CH_3COOH \rightarrow 2\ CO_2 + S^{-2} + 2\ H_2O \qquad (1)$$

$\Delta G^o = -\ 47{,}6\ kJ.mol^{-1}$

$$3SO_4^{-2} + 2CH_3CH_2OH \rightarrow 3HS^- + 3\ HCO_3^- + 3H_2O + CO_2 \qquad (2)$$

ΔG^o = não disponível na literatura consultada.

Para as BRS oxidativas incompletas, ou seja, aquelas que reduzem os ácidos orgânicos e etanol para acetato, Damianovic e Foresti (2007) observaram que as proporções de 1,92, 1,55 e 1,83, são aplicadas respectivamente, para o etanol (equação 3), o propionato (equação 4) e o butirato (equação 5).

$$SO_4^{-2} + 2\ CH_3CH_2OH \rightarrow 2\ CH_3COOH + S^{-2} + 2\ H_2O \qquad (3)$$

$\Delta G^o = -\ 133{,}2\ kJ.mol^{-1}$

$$3SO_4^{-2} + 4\ CH_3CH_2COOH \rightarrow 4\ CH_3COOH + 3\ S^{-2} + 4\ CO_2 + 4\ H_2O \qquad (4)$$

$\Delta G^o = -\ 37{,}7\ kJ.mol^{-1}$

$$10SO_4^{-2} + 2\ CH_3CH_2CH_2COOH \rightarrow 4\ CH_3COOH + S^{-2} \qquad (5)$$

$\Delta G^o = -\ 27{,}8\ kJ.mol^{-1}$

Do ponto de vista termodinâmico e cinético, em relação ao acetato, as BRS têm vantagem sobre as AM, uma vez que, BRS ganham mais energia no consumo de acetato e tendem a ter maiores taxas de crescimento quando comparadas às AM (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994).

Logo, se considerarmos altas concentrações de sulfato, as BRS poderiam superar as AM e se tornarem a espécie dominante. Por outro lado, na situação contrária, quando existem baixas concentrações de sulfato, isso limita o crescimento das BRS permitindo assim que as AM ganhem a competição. As AM possuem uma maior afinidade ao acetato que as BRS (Ks) e uma maior taxa de crescimento específico máximo (μmax), o que deixa a competição mais acirrada e as relações DQO/Sulfato mais altas (YODA; MIYAJI; KITAGAWA, 1987).

Além disso, diferentes tipos metabólicos de BRS poderão concorrer pelo sulfato, quando este estiver escasso. BRS acetogênicas perderiam a competição pelo sulfato contra as BRS consumidoras de H_2 ou de propionato (LAANBROEK *et al*., 1984), devido à sua menor afinidade ao substrato, já que possui valor de Ks mais alto que suas concorrentes.

Portanto, em situações de escassez de doador de elétrons, é mais provável que as BRS utilizem H_2 e propionato como substrato, enquanto o acetato é utilizado pelas AM (LENS *et al.*, 1998). Uma situação semelhante pode ocorrer quando se apresenta uma quantidade excessiva de sulfato e a matéria orgânica disponível é insuficiente para redução completa do mesmo, sendo assim o H_2 disponível é usado preferencialmente pelas BRS (ROBINSON; TIEDJE, 1984)

Entretanto, quando se trata de reatores com biofilme, o resultado da competição é menos previsível, como observado em reatores anaeróbios de alta taxa, baseados em imobilização de lodo. Tanto a composição do afluente, quanto as condições do processo influenciam a competição entre BRS e AM pelo acetato, principalmente por causa de possíveis limitações na transferência de massa, como já citado anteriormente, este processo por sua vez pode criar insuficiência de sulfato nas camadas mais profundas do biofilme ou grânulo (LENS *et al.*, 1998).

A competição entre as bactérias que utilizam o acetato depende de vários outros fatores como a adaptação das bactérias, a capacidade de produzir biofilme, a variação do pH e a temperatura, dificultando a previsão do que poderá acontecer no reator.

Em relação ao hidrogênio, assim como para o acetato, as BRS ganham mais energia com o consumo de hidrogênio molecular e possuem maior afinidade, maior taxa de crescimento e maior rendimento celular do substrato quando comparadas às AM hidrogênotróficas (OUDE ELFERINK *et al.*, 1994). E como as BRS consomem o H_2 mais rapidamente que as AM, elas causam um desiquilíbrio na pressão parcial de hidrogênio, podendo eliminar completamente as AM da competição. Quando o H_2 e o CO_2 são utilizados como substrato, altas taxas de redução de sulfato são vistas tanto em reatores mesofílicos quanto em termofílicos (HAO *et al.*, 2014).

BRS e AM são comunidades que coexistem e dificilmente ocorre a lavagem de uma ou das duas comunidades, a não ser que condições ambientais extremas para isso sejam atendidas. Ainda assim, para uma mudança na população de um reator, elevado intervalo de tempo é requerido, como por exemplo o observado por Omil *et al*., (1996), que demandou 100 dias para a mudança da comunidade dominante para BRS, e mesmo assim as AM ainda consumiam entre 5% a 20% da matéria orgânica.

Existe uma variedade de substratos que podem ser utilizados pelas BRS e que são incapazes de serem usados pelas metanogênicas (MUYZER; STAMS, 2008). Algumas espécies de BRS podem degradar ácidos graxos de cadeia longa para CO_2, propionato e butirato, e outras e realizam oxidação incompleta dos ácidos, com acetato e sulfeto como produtos finais (LENS *et al.* 1998).

Outros compostos que podem ser completamente ou incompletamente degradados por BRS são: ácidos graxos de cadeias longas, etanol e outros álcoois, ácidos orgânicos, e componentes aromáticos como benzoato, catecol, fenol, indol e anilina, bem como componentes sem grupo funcional como tolueno e alcanos (OUDE ELFERINK *et al.* 1994).

Em condições mesofílicas com relações DQO/Sulfato superiores a 10, a metanogênese é o processo que tende a se sobressair, mas quando tem uma relação DQO/sulfato igual ou inferior a 1, a sulfetogênese pode se tornar predominante (DAMIANOVIC; FORESTI, 2007).

Na ausência de um receptor de elétrons, as BRS podem crescer por meio de uma reação fermentativa ou acetogênica (VISSER et al., 1993; LENS et al., 1998), vivendo em sintrofisimo com as metanogênicas.

A presença de BRS em sistemas de tratamentos para remoção de matéria orgânica possuem como suas vantagens: ao contrário das AM, as BRS não precisam da relação de sintrofismo com as acetogênicas, o que implica em uma menor sensibilidade a sobrecargas orgânicas; as BRS são menos sensíveis a substâncias tóxicas, como metais pesados, pois o sulfeto pode se ligar a eles, precipitando-os, consequentemente diminuindo seu efeito potencialmente tóxico (HAO *et al.*, 1996); as BRS também são capazes de metabolizar inibidores orgânicos como compostos aromáticos, alcanos, componentes clorados e cadeias longas de ácidos graxos. Porém, esse tipo de reação não possui uma das maiores vantagens de um tratamento metanogênico, que seria a recuperação do metano (POL *et al.*, 1998).

É possível determinar matematicamente a eficiência de remoção da matéria orgânica dentro de um processo de tratamento considerando as diferentes rotas de degradação. Visser, Gao e Lettinga, (1993a) propuseram as equações disponíveis na Tabela 3, que são utilizadas para fazer essa quantificação, porém é necessário destacar que para facilitar os cálculos, os autores desconsideram que uma parte da matéria orgânica é utilizada para crescimento celular.

Tabela 4: Equações das rotas de remoção de matéria orgânica.

Substrato Removido	Equações
DQO total removida (%)	$DQO_{removida}$ (%) = $\left(1 - \frac{DQO_{afl}}{DQO_{efl}}\right) x\ 100$
DQO removida via metanogênese (%)	CH_4 - DQO (%) = $\left(\frac{p_{CH4} \cdot V_{gás} \cdot f + Q_{afl} \cdot g}{Q_{afl} \cdot DQO_{afl}}\right) x\ 100$
DQO removida via sulfetogênese (%)	DQO_{SO4} (%)= $0{,}67\ x \left(\frac{SO_{4afl} - SO_{4efl}}{DQO_{removida}}\right) x\ 100$

Onde: DQOafl = DQO afluente ($mg.L^{-1}$); DQOefl = DQO efluente ($mg.L^{-1}$); pCH_4 = fração de metano no biogás; Vgás = vazão de biogás (l.d-1); f = fator de conversão (litros de CH4 para gramas de DQO); Qafl = vazão afluente (l.d-1); g = solubilidade do metano (g DQO.l-1).

Fonte: Adaptado de Visser, Gao e Lettinga. (1993a)

Em trabalhos mais recentes de Godoi, Damianovic e Foresti, (2015) e Vilela, Damianovic e Foresti (2014) mostram maneiras alternativas e simplificadas de utilização das equações citadas, sendo ilustradas como as Equações (6), (7) e (8), destacadas a seguir.

$$DQO_{Removida} = \frac{DQO_{Afluente} - DQO_{Efluente}}{DQO_{Afluente}} . 100\ (\%) \quad (6)$$

$$DQO_{Sulfato} = \frac{0{,}67\ x(SO4^{2-}{}_{Afluente} - SO4^{2-}{}_{Efluente})}{DQO_{Afluente} - DQO_{Efluente}} . 100\ (\%) \quad (7)$$

$$DQO_{Metano} = DQO_{Removida} - DQO_{Sulfato}\ (\%) \quad (8)$$

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na busca de dar continuidade à utilização da vinhaça em forma de reúso agrícola, mas buscando a adequação do seu aproveitamento em safras futuras e a possibilidade de um retorno financeiro as empresas, verificou-se a necessidade de se investigar a aplicabilidade de um sistema de tratamento que pudesse reduzir ou eliminar os possíveis impactos ambientais associados à matéria orgânica em questão.

Os sistemas de tratamento baseados no processo anaeróbio mostraram-se como uma proposta viável, pois além de remoção de uma determinada porcentagem da matéria orgânica, mantém parte dos nutrientes e minerais, além de viabilizar a recuperação da fração da energia contida nesse subproduto com a produção de biogás (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Entretanto, é importante salientar que quando se pensa em utilizar esse tipo de configuração, além da matéria prontamente biodegradável, esse material também possui compostos tóxicos para as bactérias, os quais podem inibir sua digestão. Além disso, devido à natureza sazonal desse tipo de indústria (entressafra) e à ausência de microrganismos na vinhaça capazes de realizar a digestão anaeróbia, são necessários longos períodos de incubação para a fase inicial (BELTRAN; GARCIA-ARAYA; ALVAREZ, 1999).

O estudo de outra rota de degradação se faz indispensável, considerando as possibilidades de utilização das BRS na remoção de matéria orgânica, na eliminação em parte da toxicidade do meio e possivelmente ajudando na produção do acetato responsável pela maior rota de produção do metano.

Em 1999, Smul, Goethals e Vertraete fizeram um estudo em reator de leito de expandido (EGSB) alimentado com etanol a 33ºC, onde 80-90% de sulfato era removido de uma carga de 4g S/l.d, com uma DQO/Sulfato de 7. Porém, remoção de matéria orgânica se manteve em 70-75% de eficiência, mas isso foi relacionado a perda alta da biomassa na saída do reator.

Se utilizando de lodo de descarte de estação de tratamento anaeróbias e aeróbias Jeong et al. em 2008 fez testes em batelada com o lodo tratado termalmente a 120ºC por 30 minutos e não tratado para observar os efeitos do relação DQO/Sulfato variando de 116 a 1,16. As taxas de produção de metano do lodo não tratado e termicamente tratado foram de 0,21 a 1,23 e 0,64 a 2,02 mL/dia, respectivamente. As taxas de produção de gás sulfídrico de hidrogênio das amostras foram de 0,11 a 0,36 para as não tratadas e de 0,11 a 0,21 mL/dia para as pré-tratadas. À medida que a relação DQO/sulfato aumentou, as eficiências de remoção de matéria orgânica também aumentaram.

Utilizando reator UASB e alimentação sintética constituída de acetato, etanol e sulfato, HU et al. fizeram um estudo em 2015, variando a DQO/Sulfato entre 20 e 0,5 a 35ºC. Os resultados experimentais mostram que em uma razão DQO/Sulfato de 20 e uma carga de DQO de 25,2 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$, chegou a 87,8% de remoção de matéria orgânica. Com DQO/Sulfato de 0,5 (6000 $mgSO_4^{2-}/L$) a remoção de DQO foi de 79,2%, e o rendimento do metano foi de 0,20 $LCH_4/gDQO$. Ainda neste trabalho foi feito o sequenciamento das comunidades arqueia e bactéria mostrando que a maior parte do metano foi produzido por via metanogênicas acetoclásticas e entre as espécies de BRS apenas a Desulfovibrio, teve um papel chave na degradação do etanol, e as demais foram oxidativas incompletas.

Em 2017, Kiyuna, Fuess e Zaiat fizeram um estudo em reator batelada para observar a influência da relação DQO/Sulfato (12, 10 e 7,5) em condições termofílicas. A produção de CH_4 na condição DQO/Sulfato de 7,5 foi 35% menor em comparação com uma razão de 12, considerando um desvio de aproximadamente 13,6% do fluxo de elétrons para sulfidogênese, indicando que a atividade metanogênica foi influenciada negativamente pela sulfidogênese, entretanto a remoção de matéria orgânica foi apenas levemente afetada.

Assim, é necessário avaliar a influência do sulfato nas rotas de degradação da matéria orgânica considerando suas mudanças quantitativas frequentes durante a produção anual de açúcar e álcool, e como isso pode afetar a biomassa ativa de um reator e a produção de metano, pontualmente. O enfoque deste trabalho é utilizar de técnicas estatísticas de planejamento de experimentos, buscando formular e interpretar dados de forma mais otimizada e eficiente, que possam trazer como resultado modelos que facilitem a compreensão do funcionamento das rotas de biodegradação em um intervalo definido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da influência da concentração de sulfato na vinhaça no desenvolvimento da biomassa em condições anaeróbias, observando o potencial na produção de metano e sulfeto, foi realizada por meio de teste em batelada, com o inóculo de um reator UASB em escala piloto, tratando vinhaça. Utilizaram-se vinhaças de duas usinas diferentes e, quando necessária, foi feita a suplementação do sulfato nos testes para chegar às concentrações e relações DQO/sulfato pretendidas.

4.1. REATORES EM BATELADA

Ensaios experimentares foram realizados por meio de reatores em bateladas, utilizando frascos Duran® de 1L de volume total e volume útil de 600 mL, mantidos em incubadora Nova Ética, modelo 430, a 30 ± 3 ºC de temperatura com gradiente de velocidade constante de 125 ± 5 s^{-1}.

A produção de biogás foi determinada com a medição da mudança de pressão dentro dos frascos, sendo mensurada através de dois medidores de pressão, o Indicador de pressão T &S Eletrônicos, Modelo MDD50 e Medidor de pressão Desin instruments, modelo TPR18.

O volume de *headspace* deixado nos frascos (espaço vazio no frasco onde o gás produzido estaria provavelmente armazenado) foi calculado subtraindo o volume útil do volume total do frasco. O volume total foi medido pela determinação da massa do frasco cheio de água, subtraindo a massa do frasco vazio. Considerando a densidade da água igual a 1, o volume de água colocado seria igual a massa de água que foi pesada.

Com a intenção de se evitar uma alta pressão no interior dos frascos, optou-se por despressurizá-los sempre que chegassem a 300 mBar (30 kPa ou ≈ 0,30 atm), para evitar perdas na medição, considerando a medição máxima do medidor de pressão utilizado.

Os testes foram feitos com vinhaça de duas procedências distintas, em condições semelhantes para observar o comportamento da biomassa a diferentes cargas de matéria orgânica inicial, diferentes relações DQO/Sulfato e a influência da toxicidade do sulfeto na produção de metano.

4.2. COLETA E CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA

As amostras de vinhaça utilizadas nos experimentos originaram-se em duas usinas: Usina da Pedra e Usina Rio Pardo. A Usina Pedra Agroindustrial S/A, é localizada no

município de Serrana – SP, e sua principal atividade é a produção de etanol anidro e hidratado, açúcar e energia elétrica a partir do bagaço da cana-de-açúcar. A Usina Rio Pardo S/A é localizada no município de Cerqueira César – SP, e seus produtos são açúcar, etanol hidratado e produção de energia.

A coleta da vinhaça na Usina de Pedra foi feita no início da safra de 2017. Utilizou-se um recipiente de plástico com capacidade volumétrica de 20L. A vinhaça foi refrigerada em câmera térmica a 2ºC enquanto fosse distribuída em recipientes menores, para facilitar o manuseio, e logo depois foi congelada à temperatura de -20ºC, a fim de se manter as características físico-químicas da vinhaça preservadas.

A Vinhaça da Usina de Rio Pardo estava disponível no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), localizado no Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Engenharia Ambiental da EESC/USP, em temperatura ambiente, em recipientes de capacidade volumétrica de 500L, com concentração de aproximadamente 200 g/L DQO, garantindo a manutenção de suas características físico-químicas ao longo do tempo, sem necessidade de congelamento. Para os ensaios, a vinhaça foi diluída para concentrações próximas a 20 g/L, similar à da Usina da Pedra e guardada em câmara térmica a 2ºC até ser utilizada.

Para a caracterização da vinhaça, adotaram-se as metodologias de análise descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos–USP. Os parâmetros determinados estão descritos na Tabela 5 para ambas vinhaças usadas.

Tabela 5: Caracterização da vinhaça da Usina Rio Pardo e da Usina de Pedra

Parâmetros	**Unidade**	**Rio Pardo (Bruta)**	**Pedra (Bruta)**
Ácidos voláteis	$mgCaCO_3.L^{-1}$	1286	3474
Alcalinidade total	$mgCaCO_3.L^{-1}$	307	-
DBO bruta	$mgO_2.L^{-1}$	7314	10772
DQO bruta	$mgO_2.L^{-1}$	18750	24900
Fenol	$mgC_6H_5OH.L^{-1}$	0,688	0,428
Fosfato	(mg PO_4^{3-} L^{-1})	-	51
Nitrogênio amoniacal	$mgN.L^{-1}$	64	45
Nitrogênio nitrato	$mgN\text{-}NO_3^-.L^{-1}$	260,70	607
Nitrogênio nitrito	$mgN\text{-}NO_2^-.L^{-1}$	< 0,001	< 0,001
Nitrogênio total kjeldahl	$mgN.L^{-1}$	614	486
pH	---	4,72	4,13
Sólidos totais	$mg.L^{-1}$	17989	27100
Sólidos totais fixos	$mg.L^{-1}$	3913	12830
Sólidos totais voláteis	$mg.L^{-1}$	14076	14270
Sólidos suspensos totais	$mg.L^{-1}$	2750	-
Sólidos suspensos fixos	$mg.L^{-1}$	417	-
Sólidos suspensos voláteis	$mg.L^{-1}$	2333	-
Sólidos dissolvidos totais	$mg.L^{-1}$	15239	-
Sólidos dissolvidos fixos	$mg.L^{-1}$	3496	-
Sólidos dissolvidos voláteis	$mg.L^{-1}$	11743	-
Sulfato	$mgSO_4^{2-}.L^{-1}$	625	2000
Sulfeto	$mgS^{2-}.L^{-1}$	3,6	< 0,001
Zinco	$mgZn.L^{-1}$	1,291	0,555
Chumbo	$mgPb.L^{-1}$	0,40	0,27
Cádmio	$mgCd.L^{-1}$	0,032	0,049
Níquel	$mgNi.L^{-1}$	0,482	0,110
Ferro	$mgFe.L^{-1}$	59,8	17,30
Manganês	$mgMn.L^{-1}$	5,61	3,64
Cobre	$mgCu.L^{-1}$	0,363	0,203
Cromo total	$mgCr.L^{-1}$	0,052	< 0,005
Cálcio	mgCa $.L^{-1}$	773	644
Magnésio	mg Mg $.L^{-1}$	134	317
Sódio	mg Na $.L^{-1}$	26,1	28,4
Potássio	mg K $.L^{-1}$	1140	2940

Fonte: A autora

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO LODO

O lodo usado no experimento foi originado de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), em escala piloto, com volume total de 120 L (4 m de altura total, mas com volume reacional de 60L (2 m de altura), construído em coluna de PVC, baseado na configuração CAVALCANTI *et al*. (1999), operado à temperatura ambiente por 720 dias, com aplicação no tratamento de vinhaça utilizado em pesquisas anteriores no LPB. O lodo foi preservado para a utilização nos frascos-reatores em câmara térmica a 4º C, durante todo o período de ensaios.

A quantificação da biomassa para os cálculos teóricos do planejamento foi feita através das análises dos Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF) e Sólidos Totais Voláteis (STV) presentes no lodo, considerando a quantidade de microrganismos (M) o valor de STV.

Durante a montagem das bateladas, o lodo utilizado foi centrifugado e o sobrenadante removido, para evitar que este influenciasse nos valores de DQO iniciais (F). Com o objetivo de haver uma melhor aproximação dos valores de M para ficarem de acordo com o planejamento, se fez necessário fazer o STV da parte centrifugada.

Os procedimentos são uma adaptação da metodologia discutida no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, a diferença é que se mensura uma massa conhecida (M_I) de amostras de lodo centrifugado e sem o sobrenadante, para utiliza-lo como dividendo da equação, diferente do método do já mencionado que se utiliza do volume. As equações utilizadas neste trabalho (9), (10) e (11) estão descritas na sequência:

$$PST = \frac{(M_1 - M_0)}{M_I} * 100 \quad (9)$$

$$PSTF = \frac{(M_2 - M_0)}{M_I} * 100 \quad (10)$$

$$PSTV = \frac{(M_1 - M_2)}{M_I} * 100 \quad (11)$$

Onde: PST = Porcentagem de Sólidos Totais; PSTF = Porcentagem de Sólidos Totais Fixos; PSTV = Porcentagem de Sólidos Totais Voláteis; M_I= Massa inicial do inoculo; M_0= Massa da Capsula; M_1= Massa da Capsula + Massa do inoculo, depois de ficar na estufa; M_2= Massa da Capsula + Massa do inoculo, depois de ficar na Mufla.

O resultado do PSTV é uma porcentagem que quando multiplicada pelo valor do STV do inoculo em mg/L, mostrar quanto de massa em mg de inoculo corresponde-se a esse valor, considerando que o volume das bateladas era de 1L.

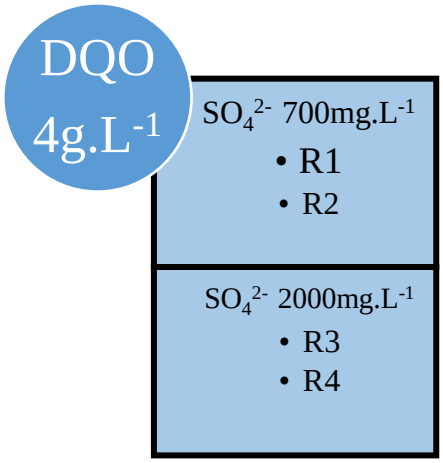
A relação Alimento/Microrganismo (F/M) adotada para os ensaios manteve-se entre 0,3 a 0,7, visando evitar sobrecarga orgânica aos frascos reatores.

4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

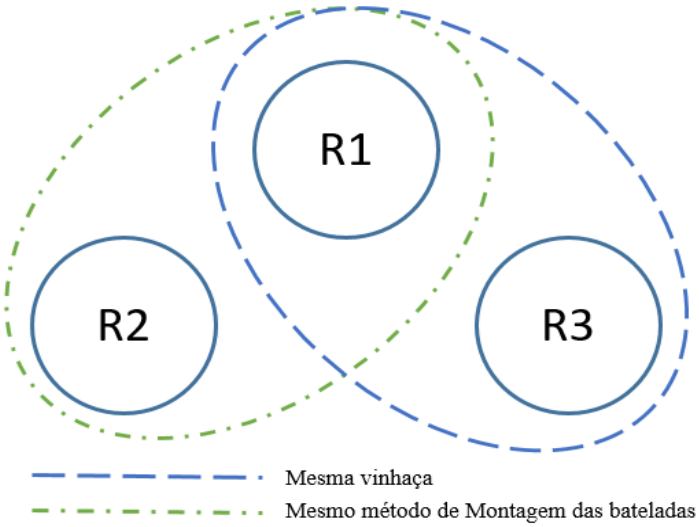
Inicialmente foram feitos testes em relações DQO/Sulfato distintas para se observar as mudanças na produção de metano como mostra a Figura 3, como também as eficiências de remoção de matéria orgânica e sulfato. Nessa primeira fase, a biomassa tinha seu valor sempre fixo de 100 mL de lodo por batelada, e o volume da vinhaça utilizada variava, dependendo do SVT encontrado, projetando para uma relação F/M entre 0,3 e 0,7.

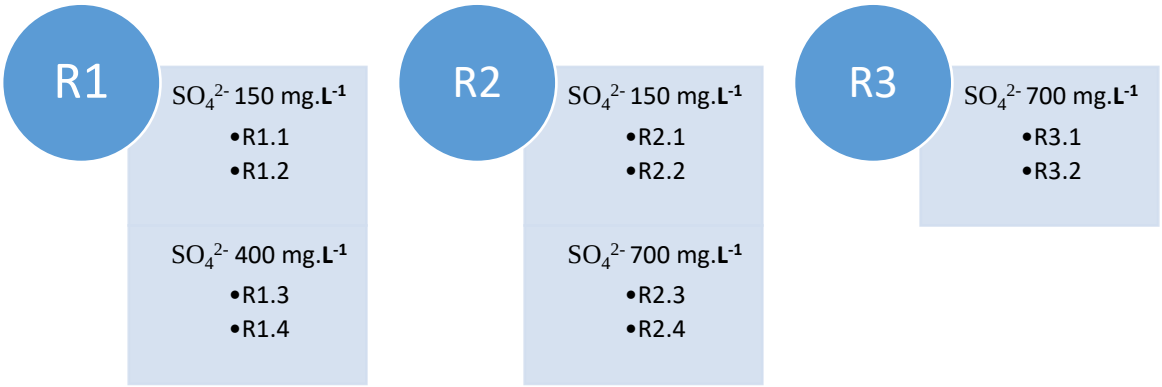
Figura 3: Esquema dos testes iniciais.

Para comparação de valores de DQO de 4g.L^{-1}:

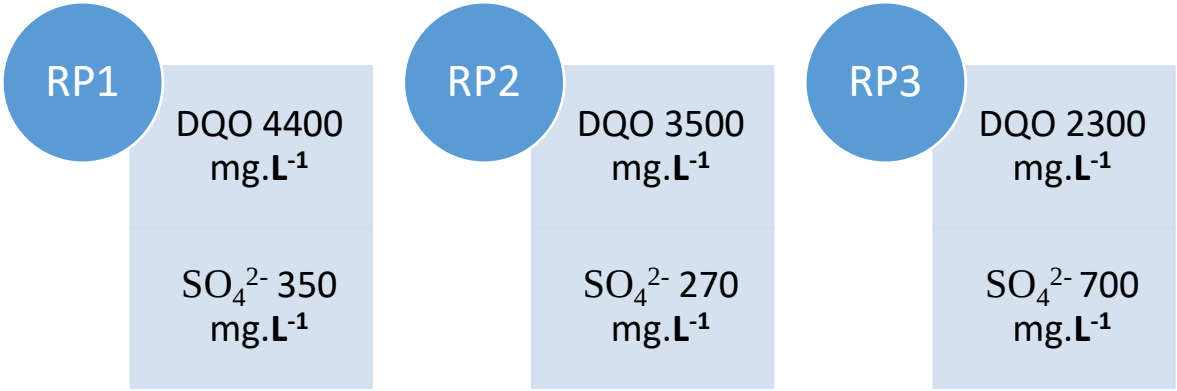


Para comparação de valores de DQO de 2g.L$^{-1:}$





Para comparações de valores de DQO e Sulfato variados:



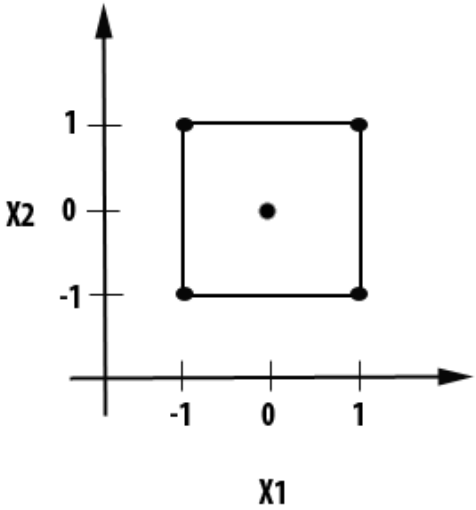
Fonte: A autora.

Diferente das bateladas direcionadas aos ensaios cinéticos, para o planejamento experimental (DOE) foi feita uma mudança na montagem dos reatores, fazendo a centrifugação do lodo para evitar erros experimentais e permitir chegar a valores próximos aos programados, preferindo assim fixar os valores de DQO e variar a quantidade de biomassa, mas buscando manter a relação F/M próxima a 0,5.

O planejamento experimental é uma técnica baseada em princípios estatísticos para se aperfeiçoar experimentos, de onde se pode extrair o máximo de informações com um número mínimo de análises (BARROS NETO, SCARMINIO E BRUNS, 2010). A ideia consiste em variar todos os fatores (variáveis de estudo), ao mesmo tempo, para poder não só observar a influência de cada fator unicamente na resposta, como também compreender se as variáveis interagem entre si. Neste trabalho os fatores escolhidos para serem observados foram a concentração matéria orgânica, quantificada pela demanda química de oxigênio (DQO) e a concentração de sulfato (SO_4^{2-}).

O planejamento escolhido o foi fatorial 2^2 com ponto central, sendo 3 réplicas do ponto central e 4 pontos axiais, totalizando 7 ensaios. Esse um dos tipos de planejamentos experimentais mais simples de serem feitos. Imaginando um quadrado, onde cada ponto do planejamento fosse um vértice, e seu centro é o ponto central, como o exemplo visto na Figura 4. Para o ponto central é necessário obrigatoriamente se fazer réplicas, pois seu papel é dar uma estimativa interna do erro puro de todos os pontos (BARROS NETO, SCARMINIO E BRUNS, 2010). Esse tipo de planejamento gera equações lineares de onde se pode adquirir gráficos tridimensionais, o que facilita a busca do ponto ótimo dentre os fatores apresentados.

Figura 4: Exemplo de planejamento com ponto central, sendo X1 e X2 os fatores, e os valores -1, 0 e 1 as posições decodificadas dos fatores.



Fonte: Portal Action

Os valores máximos e mínimos escolhidos para o DOE foram definidos considerando os seguintes aspectos: 1) considerou-se que a carga orgânica volumetria (COV) em que o reator fornecedor da biomassa estava operando era de 5 $gDQO.L^{-1}$.dia. Afim de não acender esse valor, pensando na adaptação da biomassa, o intervalo escolhido variou entre 4,6 a 2,0 $gDQO.L^{-1}$; 2) considerou-se que a vinhaça utilizada nos ensaios, já possuía uma quantidade inicial de sulfato em sua composição de aproximadamente 300 $mg.L^{-1}$, então este valor foi escolhido para ser o mínimo, variando até 2300 $mg.L^{-1}$, máximo observado nas Usinas cujas vinhaças estiveram em estudo. Na Tabela 6 está disposto o planejamento proposto para este trabalho.

Tabela 6: Descrição do planejamento experimental 2^2 com ponto central

Ensaio	DQO (codificada)	Sulfato (codificado)	DQO ($g.L^{-1}$)	Sulfato ($g.L^{-1}$)	Relação DQO/SO_4^{2-}
1	+1	+1	4,6	2,3	2,00
2	+1	-1	4,6	0,3	15,33
3	-1	+1	2	2,3	0,87
4	-1	-1	2	0,3	6,67
5	0	0	3,3	1,3	2,54
6	0	0	3,3	1,3	2,54
7	0	0	3,3	1,3	2,54

Fonte: A autora

4.5. MONTAGEM DOS REATORES

A montagem dos reatores para os testes iniciais com os dois tipos de vinhaças, baseou-se na massa de biomassa inicial, associada ao volume fixo de 100 mL de inóculo e relação F/M de 0,5, para um volume útil de 600mL. Dessa forma, após a adição de inóculo e água residuária, o volume era completado para 600 mL.

Com o decorrer da realização do planejamento experimental e as dificuldades observadas para atender a Metodologia de montagem anteriormente descrita, optou-se por controlar a quantidade de matéria orgânica e proporcionalmente calcular a massa de lodo adicionada, respeitando a relação F/M de 0,5 e o volume reacional disponível nos frascos reator.

Antes de começar uma série de bateladas, eram feitas caracterizações preliminares de DQO e sulfato da vinhaça que seria utilizada nos testes subsequentes, e os cálculos para demais componentes, utilizados na montagem dos frascos reatores. Dessa forma, calculou-se o volume da vinhaça que seria empregada de acordo com a carga de matéria orgânica pretendida em cada frasco reator, sua diluição considerando um meio reacional de 600 mL, e em seguida a quantidade de inóculo requerida.

Com esses valores definidos, centrifugava-se o lodo previamente resfriado para a remoção do sobrenadante, em seguida com o auxílio de uma balança semi-analítica, pesavam-se as massas pré-determinadas diretamente nos frascos reatores. Em seguida, a vinhaça bruta era adicionada ao frasco reator, para aplicação da carga pretendida, e água destilada era adicionado com a finalidade de se adequar aos valores previamente estabelecidos no planejamento, ou seja, concentração de matéria orgânica e sulfato, com base na relação F/M.

Ao meio reacional eram acrescidas duas soluções: uma de macronutrientes e uma de micronutrientes, cujas composições são apresentadas no Anexo A. Os volumes das soluções

nutrientes eram relacionadas à quantidade de DQO teórica em cada uma das condições analisadas, baseadas na metodologia desenvolvida por Martins *et al.* (2015).

Dependendo da quantidade de sulfato dissolvido na vinhaça inicial, era necessário suplementá-la com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para o ajuste das relações DQO/SO_4^{-2} que seriam exploradas nos experimentos, essa suplementação era feita com base nos valores da DQO solúvel e da concentração do íon sulfato na vinhaça.

Considerando que as vinhaças utilizadas possuíam pH baixo (aproximadamente 4,2), se fez necessário a utilização de alcalinizante para ajuste ao pH neutro, sendo utilizado o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), na proporção de um grama de bicarbonato para cada grama de DQO aplicada, sendo o pH final da vinhaça 7,5 ± 0,3.

Anteriormente ao início dos testes, o meio reacional recebeu introdução de gás nitrogênio (N_2) puro durante 5 minutos para estabelecimento de um ambiente anaeróbio. Em seguida os frascos foram selados com septo de borracha e tampa plástica, assegurando sua vedação, e dispostos na incubadora à 30º.

4.6. COLETAS E ANÁLISE DA FASE GASOSA

A análise da composição do biogás, no *headspac*e dos frascos reatores, foi feita utilizando-se cromatografia gasosa. Com o auxílio de uma seringa com válvula de trava, foram retiradas alíquotas de 300 µL de cada um dos frascos reatores que foram injetadas diretamente no cromatógrafo, para determinação dos teores de metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e sulfeto (H_2S), principalmente, o período médio de analise para cada amostra é de 15 minutos. As análises de cromatografia gasosa foram realizadas com o cromatógrafo modelo GC-2014 (Shimadzu Scientific Instruments ®), equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e uma coluna HP-PLOT/Q (30 m x 0,53 mm x 40µm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 160°C e 170°C, respectivamente. A rampa de aquecimento da coluna foi de 35°C a 170°C, a 60°C min^{-1}, utilizando-se hidrogênio como o gás de arraste (ADORNO *et al*., 2014).

Durante o primeiro dia da etapa experimental, as coletas do biogás ocorriam a cada 2 horas, depois de 12 horas, eram espaçadas para 4 horas, no segundo dia em diante o número de injeções foi sendo definido ao longo do experimento, baseado na progressão da geração de metano. Os testes realizados para este trabalho duravam 95 horas em sua totalidade, até o momento em que a curva de produção acumulada de metano atingia um patamar de estabilidade, 20% de diferença entre os 3 últimos pontos.

A determinação das porcentagens de metano e sulfeto no biogás, além do monitoramento das concentrações de sulfato na fase liquida ao longo do experimento, permitiram avaliar as porcentagens de remoção de matéria orgânica pelas vias metanogênica e sulfetogênica.

As quantificações das frações de matéria orgânica convertidas pelas rotas metanogênica e sulfetogênica foram feitas baseadas na DQO removida por essas rotas, utilizando as Equações 6, 7 e 8, descritas no trabalho de Vilela, Damianovic e Foresti (2014), já mencionadas anteriormente.

4.7. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas feitas ao longo dos experimentos estão expostas na Tabela 7. Amostras do sobrenadante foram retiradas para realização das análises de acompanhamento em frequências estabelecidas no decorrer dos testes. O volume total de amostras retiradas não excedeu 10% do volume líquido como recomendado por Fernandes *et al.* (2010) e Peixoto *et al.* (2012).

Tabela 7: Variáveis analisadas na pesquisa

Parâmetro	**Unidade**	**Método analítico**
Composição do biogás	$mg.L^{-1}$	Cromatografia a gás LPB-EESC/USP
Série de sólidos (Lodo)	$mg.L^{-1}$	Gravimétrico (APHA, 2005)
DQO (solúvel)	$mg.L^{-1}$	Colorimétrico (APHA, 2005)
pH	Unidades de pH	Potenciométrico (APHA, 2005)
Sulfato	$mg.L^{-1}$	Turbidimétrico (APHA, 2005)
Sulfeto	$mg.L^{-1}$	Espectrofotométrico (APHA, 2005)

Fonte: A autora.

As análises referentes à fase líquida dos reatores têm como parâmetros principais, a DQO e o sulfato, essenciais para determinar a eficiência das rotas metabólicas.

Os valores de DQO utilizados neste trabalho são os de DQO solúvel, em que as amostras foram tratadas para eliminação da interferência do sulfeto produzido e dos sólidos presentes. Para tanto, utilizou-se sulfato de zinco, promovendo a precipitação do sulfeto e filtração em membrana de fibra de vidro com poros de 0,45 μm. As amostras de efluente foram colhidas, transferidas para Eppendorfs® com sulfato de zinco (ZnSO4) em excesso e centrifugadas, com a intenção de se formar sulfeto de zinco (ZnS) e precipita-lo. Após isso o

sobrenadante ainda era filtrado em membrana de fibra de vidro com poros de 0,45 μm para então seguir em análise.

4.8. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para o inóculo (biomassa em estágio inicial do ensaio) utilizado nas bateladas, foi realizado o sequenciamento genético 16S rRNA com a plataforma MiSeq Illumina para averiguação dos microrganismos presentes dentro no Reino *Archaea* e *Bacteria*. A extração do DNA em *glass beads* foi feita no LPB com mistura de fenol tamponado com Tris e clorofórmio, seguindo a metodologia de Griffiths *et al*., (2000) modificado. As amostras foram enviadas para o laboratório MR DNA (Molecular Research LP), localizado na cidade de Shallowater, no estado do Texas, EUA. O resumo da metodologia utilizada pelo laboratório será explicado a seguir:

A amplificação do 16S rRNA foi feita com os primers de PCR 515F e 806R visando a região variável V4 do gene (CAPORASO *et al*., 2011). O ciclo termal de PCR consistiu em 30 ciclos utilizando o Kit *Master Mix HotStarTaq Plus* (Qiagen, EUA) para purificação nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto, e para finalizar, ocorreu uma etapa final de alongamento a 72 °C por 5 minutos.

Após a amplificação, os produtos de PCR são verificados em gel de agarose a 2% para determinar o sucesso do procedimento e a intensidade relativa das bandas. Múltiplas amostras são reunidas em conjunto em proporções iguais com base no seu peso molecular e concentrações de DNA. As amostras reunidas foram purificadas usando *beads* de *Agencourt AMpure XP* calibradas. Com o produto de PCR reunido e purificado é utilizado para preparar a biblioteca de DNA seguindo o protocolo de preparação de biblioteca de DNA Illumina TruSeq.

O sequenciamento foi realizado na MR DNA em MiSeq seguindo as diretrizes do fabricante. Os dados da sequência foram processados usando o pipeline de análise de DNA da própria MR DNA. Em resumo, as sequências foram unidas, depletadas de códigos de barras, e então, foram removidas as sequências menores que 150 pb, e sequências com chamadas de bases ambíguas.

As sequências foram desnaturadas, as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) geradas e as quimeras removidas. As OTUs foram definidas por agrupamento em 3% de divergência (97% de similaridade), e dados finais foram taxonomicamente classificados

usando BLASTn contra um banco de dados derivado do The Greengenes Database, RDPII e National Center for Biotechnology InformationParte (NCBI).

4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos das análises gasosas e físico-químicas foram organizados e tratados no *software* Microsoft Excel®. As planilhas construídas foram utilizadas em outros programas estatísticos de fins mais específicos.

O *software* MicroCal OriginLab® foi utilizado para a produção de regressões não-lineares para obtenção de parâmetros cinéticos tanto para a produção de metano, como para degradação da matéria orgânica existente. Já a definição do planejamento experimental, regressão, análise estatística, e criação das superfícies de resposta foram feitas utilizando o *software* Statistica®, que possui uma área especifica para DOE.

Dentro da análise de variância (ANOVA) feita pelo Statistica®, foi calculado os efeitos dos fatores, o efeito de interação, o valor-p (considerando igual ou menor que 0,05 para não ser uma hipótese nula) e feito o Teste F.

O modelo de ajuste dos dados para a produção de metano foi o Gompertz modificado, comumente utilizado para a avaliação da produção de biogás em sistemas biológicos (ZWIETERING et al., 1990; FERNANDES et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012; MOTTERAN, 2013; KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017). Os parâmetros cinéticos de interesse, conseguidos com o ajuste do modelo aos dados são a fase de adaptação ou fase *lag* do crescimento microbiano, o potencial de produção de metano e a velocidade de produção. Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017) encontraram resultados significativos quando utilizaram a equação aplicada aos resultados obtidos em reatores anaeróbios em batelada para a produção de metano. A Equação 12 descreve o modelo de Gompertz modificado:

$$V_{CH4}(t) = P_{CH4} \,.\, \exp\left\{-exp\left[\frac{R_m.e}{P_{CH4}}\right].(\lambda - t) + 1\right\} \qquad (12)$$

Os parâmetros mostrados na equação são definidos em seguida: VCH4 é a produção acumulada de metano, em mL; λ é o tempo da fase de adaptação em horas (h); PCH4 é o potencial de produção de metano, em mL; Rm é a velocidade de produção de metano, em $mL.h^{-1}$; t é o tempo de incubação, em h; e *e* é o número de Euler (2,71828).

Com relação à degradação da matéria orgânica e do sulfato, foi utilizado um modelo de decaimento de primeira ordem disponível no *software* MicroCal OriginLab®, escolhido por se ajustar bem aos dados encontrados.

$$y = yo + Ae^{\frac{-x}{t}} \quad (13)$$

Na equação 13, y seria a concentração de matéria orgânica (DQO), em $mg.L^{-1}$; y0 é a concentração de matéria orgânica inicial com t=0, em $mg.L^{-1}$; t é tempo em h; k é a constante de decaimento; e A é a amplitude.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA NA PRODUÇÃO DE METANO

Em reatores em escala plena, é necessário fazer uma adaptação da biomassa à carga orgânica volumétrica (COV) a qual o reator será incumbido de tratar futuramente, mais conhecida como a "partida" do reator. Em geral, a partida é realizada com o incremento de carga orgânica ao longo do tempo, até ser atingida a carga de projeto. Entretanto, para a presente pesquisa o inóculo utilizado originou-se de sistema de tratamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar, dispensado a etapa de adaptação ao substrato. Vale destacar que o reator fonte de inóculo era alimentado continuamente com COV de até $25 g.L^{-1}.dia^{-1}$, entretanto, nos reatores em batelada, a máxima carga potencialmente aplicável foi até $5 g.L^{-1}.dia^{-1}$. Os testes referentes à etapa de teste de potencialidade de aplicação de COV ao lodo de inóculo e ao desenvolvimento dos frascos reatores em batelada não estão apresentados nesta dissertação.

A parcela de matéria orgânica (MO) removida no reator é um fator importante para ser analisado quando se pensa na produção de biogás, uma vez que há relação direta e estequiométrica entre DQO removida e CH_4 produzido. Na Tabela 8 estão apresentados as condições e os resultados dos testes realizados para concentrações próximas a $4 gDQO.L^{-1}$ (COV de $42 mg/L^{-1}.h^{-1}$, considerando 95 horas de operação), todos com a mesma vinhaça (Usina de Pedra), sendo que R1 e R2 são duplicatas de uma mesma condição, e o mesmo acontece com R3 e R4. Na Figura 5 se observam gráficos de produção de metano com concentrações de matéria orgânica próximas a $4 g.mL^{-1}$.

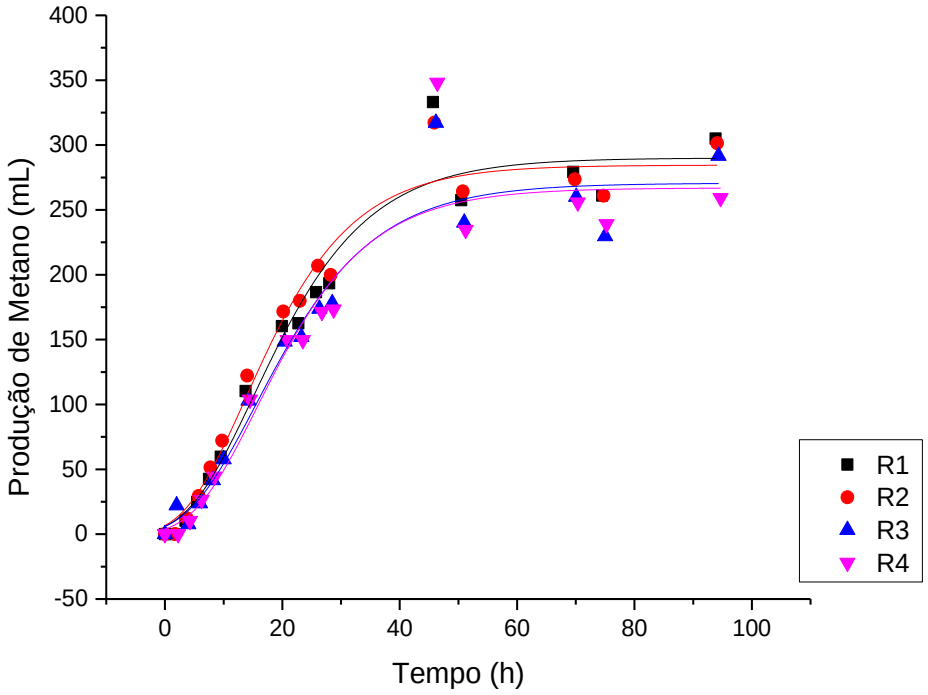
Tabela 8: Dados dos experimentos para as concentrações de MO acima de $4gL^{-1}$

Reator	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/SO_4^{2-}	F/M (g.DQO/ g.SVT)	Volume de Metano calculado* (mL) (CNTP)	Metano produzido (mL) (CNTP)	Eficiência de remoção de MO (%)	Eficiência de remoção de Sulfato (%)
R1	4320,00	628,00	6,88	0,54	765	305	90	98
R2	4135,00	708,00	5,84	0,52	737	301	92	99
R3	4950,00	2189,00	2,26	0,62	915	292	96	43
R4	4670,00	2387,00	1,96	0,58	821	259	94	50

* o desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado.

Fonte: A autora

Figura 5: Produção de Metano: Concentrações de MO de 4 $g.L^{-1}$ - R1: 4320 $mgDQO.L^{-1}$ e 628 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$/ R1: 4135 $mgDQO.L^{-1}$ e 708 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ / R1: 4950 $mgDQO.L^{-1}$ e 2189 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ / R1: 4670 $mgDQO.L^{-1}$ e 2387 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$



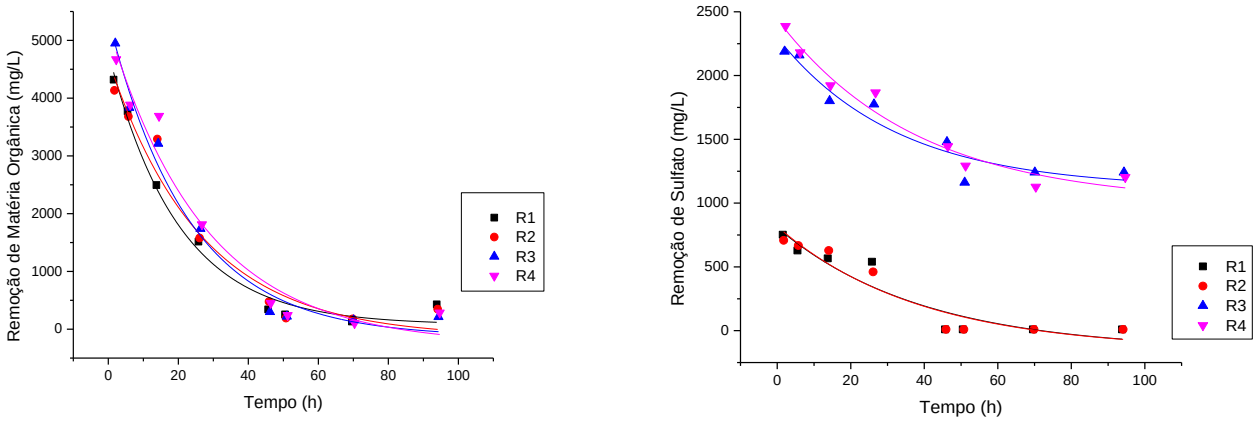
Fonte: A autora

Para a condição de DQO próxima a 4000 $mg.L^{-1}$ (Tabela 7), observa-se que a produção de metano medida em ambos os casos (R1/R2 e R3/R4) foi muito próxima, apesar da diferença na concentração de sulfato inicial, os reatores R3 e R4 possuem 70% mais sulfato que em R1 e R2. Para R4, a quantidade de sulfato removida (sulfato removido total multiplicado pelo volume da fase liquida) foi da ordem de 1200 mg, enquanto para R1 foi de 620 mg. A redução da produção de metano de R4 em relação a R1 esteve associada ao desvio de elétrons para redução de sulfato. A produção estimada de sulfeto foi de 395 $mg.L^{-1}$ para R4 e de 205 $mg.L^{-1}$ para R2.

Considerando que, em média, a concentração de MO removida no caso R3 e R4 foi 12% maior que em R1 e R2, teoricamente esses apresentariam maior produção de metano. Entretanto, os volumes de metano mensurados nos reatores R1 e R2 foram 40% do valor estimado teórico, atingindo, em média, 303 mL, contra 32% para os R3 e R4, atingindo em média 275 mL.

A remoção MO foi próxima a 90% em todos os casos, porém ela foi mais eficiente em R3 e R4. Já para a remoção do sulfato, a diferença foi substancial, enquanto em R1 e R2 a média de remoção foi de 99%, para os R3 e R4 foi de apenas 46%, porém, a carga de sulfato removida foi maior em R3 e R4, com cerca de 639 mg, contra 394 mg do R1 e R2. A eficiência de remoção de sulfato, 38% mais baixa nos reatores R3 e R4. Poderia estar associada à concentração de sulfeto de 350 $mg.L^{-1}$ e pela competição com as arqueias metanogênicas pela matéria orgânica disponível. Na Figura 6 apresentam-se os perfis de decaimento da matéria orgânica e do sulfato para essas condições. Entretanto, observa-se que a degradação da matéria orgânica e a remoção de sulfato foram similares para os 4 experimentos, indicando que não houve influência de toxicidade nos processos para as concentrações de sulfato testadas e sulfeto produzido. O aumento na eficiência de remoção de matéria orgânica nos testes R3 e R4 em relação aos anteriores esteve associado à participação da sulfetogênese, também associada a menor produção de metano nesses reatores em relação aos anteriores.

Figura 6: a) Decaimento da Matéria Orgânica nos reatores R1, R2, R3 e R4 b) Decaimento do Sulfato nos reatores R1, R2, R3 e R4



(a) (b)

Fonte: A autora

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados dos testes realizados com DQO próxima a 2000 $mg.L^{-1}$ e variação de sulfato de 150 a 750 $mg.L^{-1}$, correspondendo a relação de DQO/Sulfato de 2 a 10. A Figura 7 mostra os perfis temporais com concentrações de matéria orgânica próximos de 2 $g.L^{-1}$.

Tabela 9: Dados dos experimentos para as concentrações de MO de 2gmL^{-1}

Reator	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/SO_4^{2-}	F/M (g.DQO/ g.SVT)	Volume de Metano calculado* (CNTP) (mL)	Metano produzido (CNTP) (mL)	Eficiência de remoção de MO (%)	Eficiência de remoção de Sulfato (%)
R1.1	1610,00	156,00	10,32	0,36	295	207	90	74
R1.2	1606,67	157,73	10,19	0,36	299	198	91	68
R1.3	2051,67	437,75	4,69	0,46	373	176	95	98
R1.4	2063,33	416,50	4,95	0,46	368	178	93	94
R2.1	1691,67	163,31	10,36	0,23	315	246	89	37
R2.2	1735,00	170,80	10,16	0,23	329	242	94	47
R2.3	1525,00	755,25	2,02	0,20	228	201	80	94
R2.4	2010,00	773,25	2,60	0,27	330	206	94	84
R3.1	2375,00	714,74	3,32	0,59	348	236	86	79
R3.2	2396,67	741,46	3,23	0,59	356	233	90	94

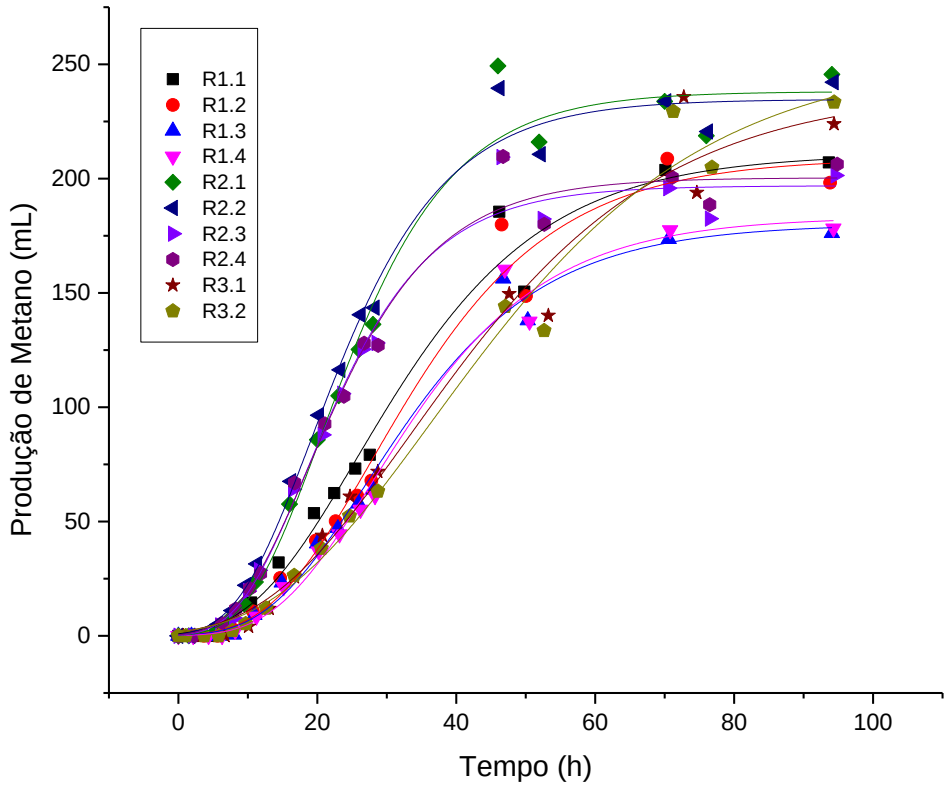
* O desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado

** Nos reatores R2.1, R2.2, R2.3 e R2.4 a relação F/M esteve abaixo da carga aplicada ao lodo estipulada em função da dificuldade de manipulação do lodo.

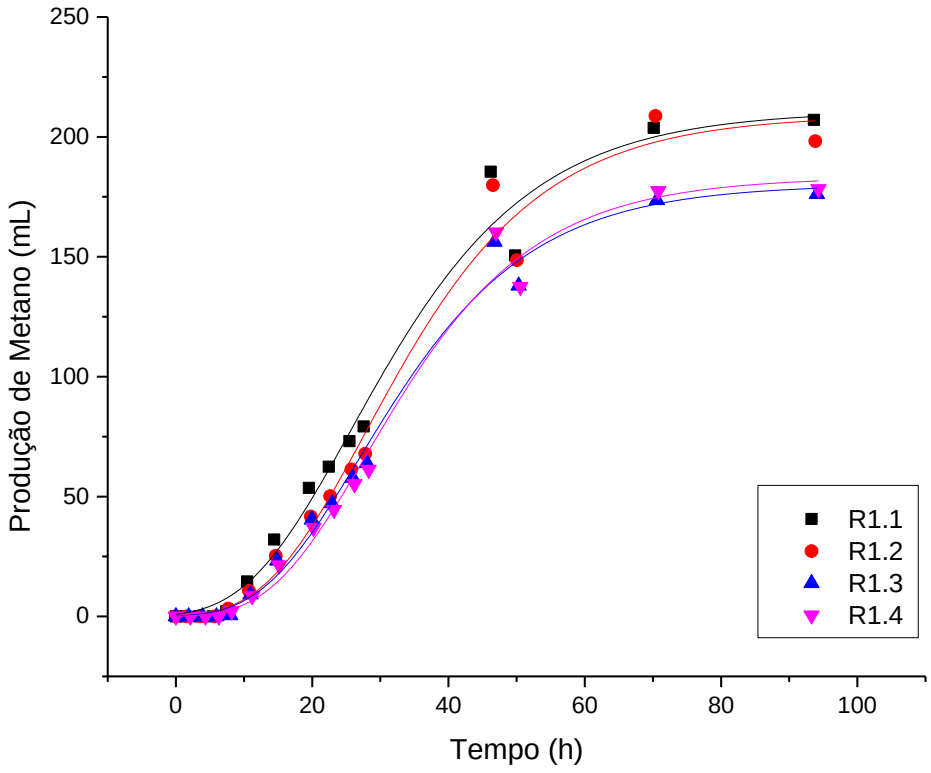
*** R1 e R3: Vinhaça da Usina Rio Pardo, R2: Vinhaça da Usina da Pedra

Fonte: A autora

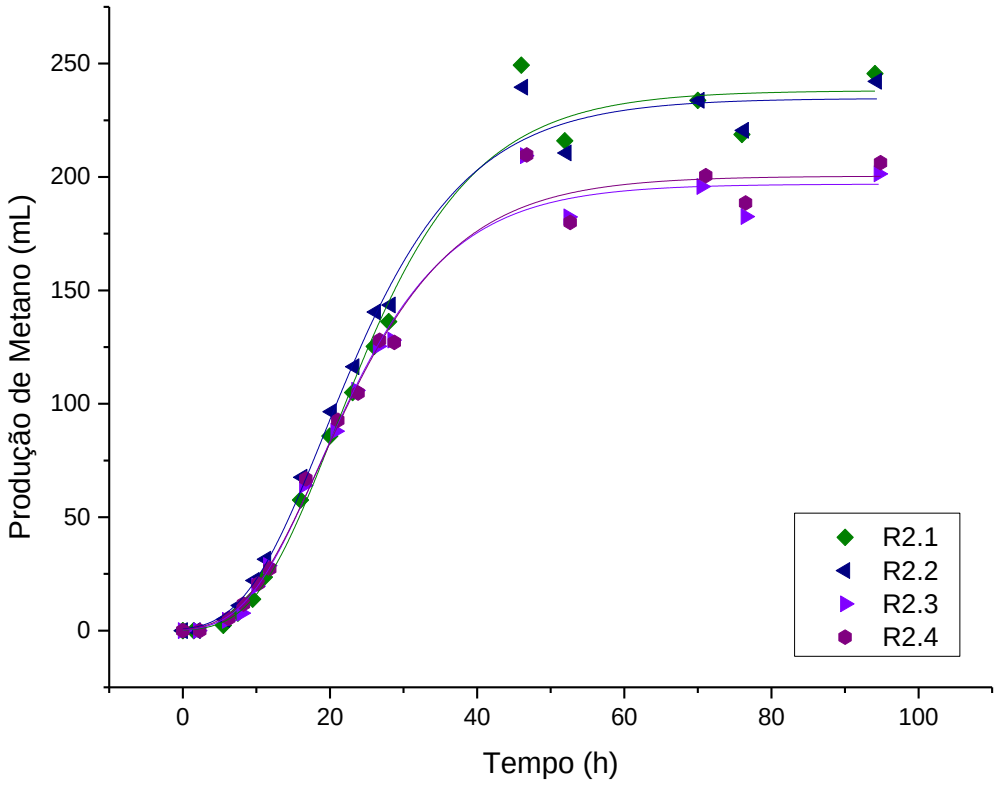
Figura 7: Produção de Metano - Concentrações de MO de 2 g.L^{-1} a) Todas as condições de acordo com a Tabela 8 b) Vinhaça de Pedra do lodo c) Vinhaça de Rio Pardo d) Vinhaça de Rio Pardo com centrifugação do lodo.



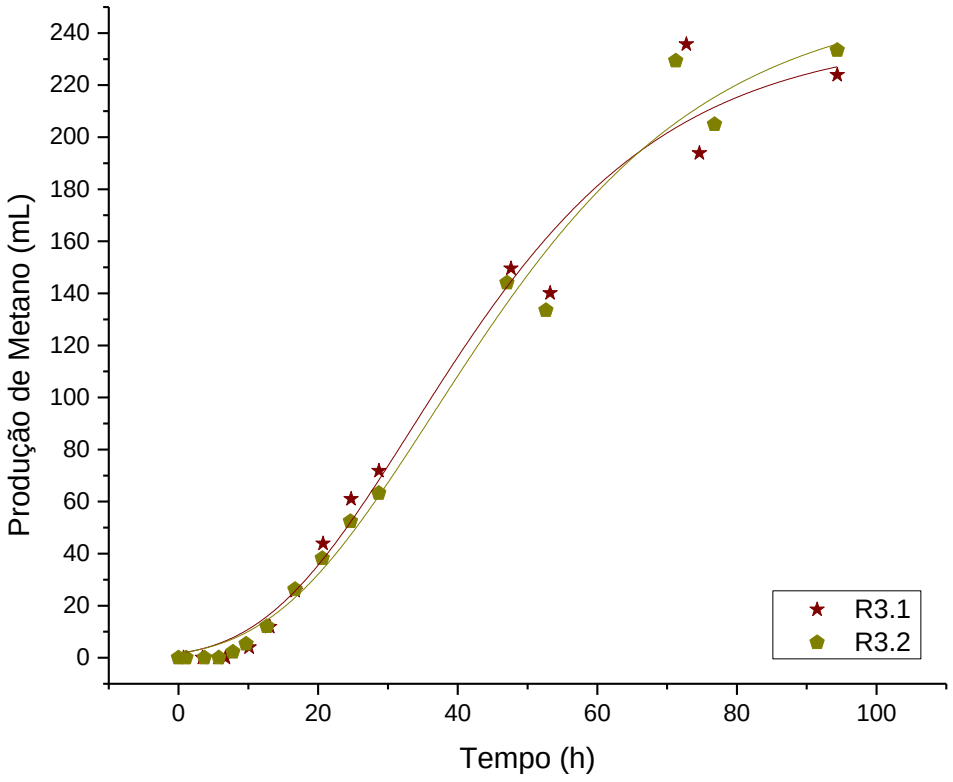
a)


250
200
150
100
50
0
Produção de Metano (mL)
0
20
40
60
80
100
Tempo (h)
R1.1
R1.2
R1.3
R1.4

b)


250
200
150
100
50
0
Produção de Metano (mL)
0
20
40
60
80
100
Tempo (h)
R2.1
R2.2
R2.3
R2.4

c)



d)

Fonte: A autora

Os ensaios apresentados na Figura 7b foram feitos com a vinhaça da Usina de Pedra, mesma vinhaça usada nos ensaios com 4g.L^{-1} comentados anteriormente. Os ensaios apresentados na Figura 7c foram feitos utilizando a vinhaça da Usina Rio Pardo, sendo essa a vinhaça utilizada no reator de origem do inóculo. Os ensaios apresentados na Figura 7d são também com a vinhaça da Usina Rio Pardo, mas com uma mudança na montagem das bateladas: os ensaios 7b e 7c foram inoculados com o lodo liquido e homogeneizado, e os ensaios 7d tiveram o lodo previamente centrifugado e o sobrenadante removido, por questões de controle operacional.

A eficiência de remoção MO nos testes do grupo R1 e do grupo R2 foi próxima dos 90%, indicando que a origem da vinhaça não exerceu influência no processo de remoção de matéria orgânica. Entretanto, nos testes do grupo R2, com baixa concentração de sulfato (R2.1 e R2.2), a eficiência de remoção de sulfato foi da ordem de 40% inferior (69 mg.L^{-1}) às encontradas para mesma vinhaça e maiores concentrações de sulfato (R2.3 e R2.4) (649 mg.L^{-1} removidos) e com a vinhaça a da Usina de Pedra (grupo R1). Uma hipótese para o resultado

é que os as BRS não foram ativadas por baixa pressão de seleção, tendo sido mais significativo na vinhaça de Pedra devido a sua composição.

Para concentrações de sulfato mais altas (R1.3, R1.4, R2.3 e R2.4), a eficiência para ambos os casos foi perto dos 90%, indicando que quando o lodo foi submetido a maior concentração, as BRS atuaram com maior eficiência na remoção de sulfato, sugerindo que a pressão de seleção favoreceu as BRS, sem prejudicar o desempenho das arqueias metanogênicas, uma vez que a metanogênese ocorreu concomitantemente à sulfetogênese.

Para a produção de metano, no caso dos reatores que utilizaram a vinhaça da Usina de Pedra (R1), a produção de metano em R1.1 e R1.2 foi 12% maior que em R1.3 e R1.4, além de ser observada maior produção de metano medida em relação à produção estimada teoricamente, sendo 68% para R1.1 e R1.2 contra 47% de R1.3 e R1.4. Os resultados indicaram que o desvio do fluxo de elétrons na presença de sulfato em maiores concentrações foi mais expressivo, influenciando negativamente na produção de metano.

Nos testes utilizando a vinhaça da Usina Rio Pardo (R2), ocorreu algo semelhante, novamente nas condições com menor concentrações de sulfato (R2.1 e R2.2), produziram em média 16% a mais metano que condições com mais sulfato (R2.3 e R2.4), concordando com o desvio do fluxo de elétrons para sulfetogênese.

Das situações mostradas na Figura 7a, nota-se que os reatores que se estabilizaram mais rapidamente, com relação à produção de metano, foram os da condição R2, em que foi utilizada vinhaça de Rio Pardo. Possivelmente isso deva-se ao fato da vinhaça de Rio Pardo, ser utilizada no reator de origem do inóculo, ter proporcionado melhor adaptação dos microrganismos nas condições de teste. Os ensaios de R1 tiveram velocidade de produção menor quando comparado a R2, o que é perceptível pela inclinação da reta durante a fase exponencial (Figura 7a), mostrando que a composição da vinhaça da Pedra provavelmente causa algum tipo de efeito negativo para a produção de metano, maior que à vinhaça da Usina Rio Pardo.

Nos testes “R3” em que os ensaios foram realizados com a mesma vinhaça da condição R2, a vinhaça da Usina Rio Pardo, e centrifugação do inóculo, a produção medida de metano alcançou 66% da produção teórica, mostrando que mesmo com montagem diferenciada, a produção de metano não foi afetada.

Tabela 10: Dados de regressão do Modelo Gompertz modificado para as concentrações de MO de 2gmL^{-1}

Reator	Respostas	Valor	Erro Padrão
R1.1	Máxima produção (A)	210,87	8,91
	Maior Velocidade (xc)	5,11	0,50
	Velocidade especifica (xs)	1,89	
	Fase de Adaptação (k)	10,49	1,53
R1.2	Máxima produção (A)	209,03	9,16
	Maior Velocidade (xc)	5,25	0,54
	Velocidade especifica (xs)	1,94	
	Fase de Adaptação (k)	13,20	1,53
R1.3	Máxima produção (A)	180,14	5,71
	Maior Velocidade (xc)	4,67	0,37
	Velocidade especifica (xs)	1,73	
	Fase de Adaptação (k)	12,80	1,14
R1.4	Máxima produção (A)	183,22	6,54
	Maior Velocidade (xc)	4,82	0,43
	Velocidade especifica (xs)	1,78	
	Fase de Adaptação (k)	13,96	1,27
R2.1	Máxima produção (A)	238,11	6,19
	Maior Velocidade (xc)	8,25	0,82
	Velocidade especifica (xs)	1,84	
	Fase de Adaptação (k)	9,93	1,24
R2.2	Máxima produção (A)	234,67	4,84
	Maior Velocidade (xc)	8,00	0,59
	Velocidade especifica (xs)	1,79	
	Fase de Adaptação (k)	8,37	0,96
R2.3	Máxima produção (A)	196,88	4,45
	Maior Velocidade (xc)	7,26	0,60
	Velocidade especifica (xs)	1,62	
	Fase de Adaptação (k)	8,52	1,03
R2.4	Máxima produção (A)	200,40	4,57
	Maior Velocidade (xc)	7,09	0,57
	Velocidade especifica (xs)	1,58	
	Fase de Adaptação (k)	8,33	1,04
R3.1	Máxima produção (A)	116,07	7,33
	Maior Velocidade (xc)	2,07	0,20
	Velocidade especifica (xs)	0,85	
	Fase de Adaptação (k)	12,64	2,01
R3.2	Máxima produção (A)	123,94	7,46
	Maior Velocidade (xc)	2,02	0,15
	Velocidade especifica (xs)	0,83	
	Fase de Adaptação (k)	13,86	1,75

Fonte: A autora

Porém a produção de metano tem uma fase *lag* menor em R2.3 e R2.4 do que em R3.1 e R3.2, como pode ser visto na Tabela 10. A manipulação do lodo para as montagens, quando

se acrescenta a etapa de centrifugação, pode causar danos aos grânulos, além de aumentar o tempo de exposição ao ar, ocasionando uma maior fase *lag* ao desempenho do reator, porém não afetando significativamente na produção de metano.

Na Tabela 10 estão os dados de regressão do modelo utilizado (Gompertz modificado), as respostas que ele fornece são o ponto máximo de produção (A) em mL, a maior velocidade de produção (xc) em $mL.h^{-1}$, a velocidade especifica (xs) em $mL.h^{-1}.g^{-1}$ e a fase de adaptação (k) em horas.

Observa-se que a maior velocidade de produção é de fato nas condições R2.1 e R2.2 com 8,1 $mL.h^{-1}$ em média, e menos tempo em fase de adaptação com 8,4h em média para as condições R2.3 e R2.4. Porém, observando a velocidade especifica das reações (velocidade dividida pela massa de microrganismos), a condição R1 e R2 não possuem diferença significativa, apenas R3 que se destoa dos demais.

Concluindo, a origem da vinhaça não afetou a remoção de matéria, entretanto, a vinhaça da Pedra contribuiu para o desempenho da sulfetogênese quando concentrações mais baixas de sulfato estiveram presentes na água residuária. Para concentrações de sulfato mais elevadas o desempenho foi similar, independentemente da vinhaça utilizadas. O estabelecimento da sulfetogênese contribuiu positivamente para remoção de matéria orgânica, entretanto o desvio dos elétrons causou redução na produção de metano.

5.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SULFATO NA PRODUÇÃO DE METANO

Um dos aspectos que destaca a importância do sulfato nos processos anaeróbios é a formação do hidrogênio sulfeto em sua forma não ionizada (HS^-) que é um inibidor para a comunidade microbiana dos reatores, incluindo as próprias BRS.

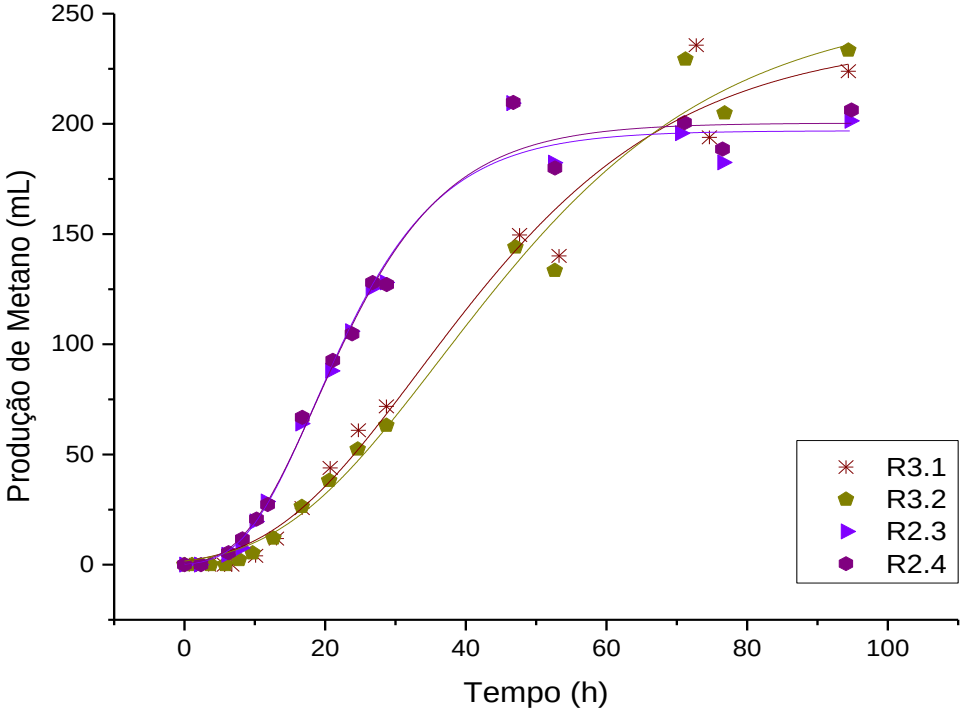
Reis *et al*. (1992) observaram em seu trabalho que a completa inibição de uma cultura pura de BRS com lactato e sulfato por H_2S foi em 547 $mgH_2S.L^{-1}$, em 37ºC e pH 6.7.

De acordo com Hao *et al.* (1996) o nível de inibição do H_2S, resultando em uma falha irreversível ao sistema seria de 60 $mgS.L^{-1}$, tanto para acetato como para propionato, no caso do sulfeto dissolvido, seriam 145 mg S por litro de acetato e 193 mg S por litro de propionato.

Em reator de lodo granular, Visser, Hulshoff Pol e Lettinga (1996) determinaram 50% de inibição e inibição completa por sulfeto total em concentrações de 90 $mgS.L^{-1}$ (pH 7.8-8.0) e 250 $mg.L^{-1}$ (pH 6.4-7.2), respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 8 e Tabela 8 mostram a produção de metano com duas situações próximas a 700 $mg.L^{-1}$ de sulfato.

Figura 8: Produção de Metano - Concentrações de SO_4^{2-} de 700 mg.L^{-1}- R2.3 e R2.4: Vinhaça de Rio Pardo sem centrifugação de lodo/ R3.1 e R3.2: Vinhaça de Rio Pardo com centrifugação do lodo



Fonte: A autora

A Tabela 11 apresenta um resumo sobre as rotas de biodegradação da matéria orgânica.

Tabela 11: Rotas de biodegradação da matéria orgânica e produção de metano teórica

Ensaio	MO removida total (mg)	Sulfato removido (mg)	MO removida via sulfetogênica (%)	MO removida via Metanogênica (%)	Sulfeto Teórico (mg/L)
R2.3	748	389	19	81	215,88
R2.4	1128	389	14	86	216,36
R3.1	1222	338	19	81	187,64
R3.2	1296	416	22	78	231,30

Fonte: A autora

A remoção pela via sulfetogênica em todos os casos variou de 14 a 22%, sendo a via metanogênica mais usada com uma variação de 78 a 86%. A quantidade de sulfeto teórico para ambos os casos é próxima aos 200 mg.L^{-1}, mas não houve inibição em nenhum dos casos.

Considerando a semelhança de ambas as situações, observa-se que a diferença em como o lodo foi trabalhado nos testes (com e sem centrifugação) dos frascos reatores, não

afetou negativamente nas eficiências de remoção de matéria orgânica e de sulfato, como já foi mostrado na Tabela 8.

Outros ensaios com o mesmo tipo de montagem e mesma vinhaça de R3.1 e R3.2 e concentrações de matéria orgânica e sulfato diferentes (RP) foram realizados. A produção de metano desses ensaios está mostrada na Figura 9, e o resumo dos resultados desses ensaios na Tabela 12.

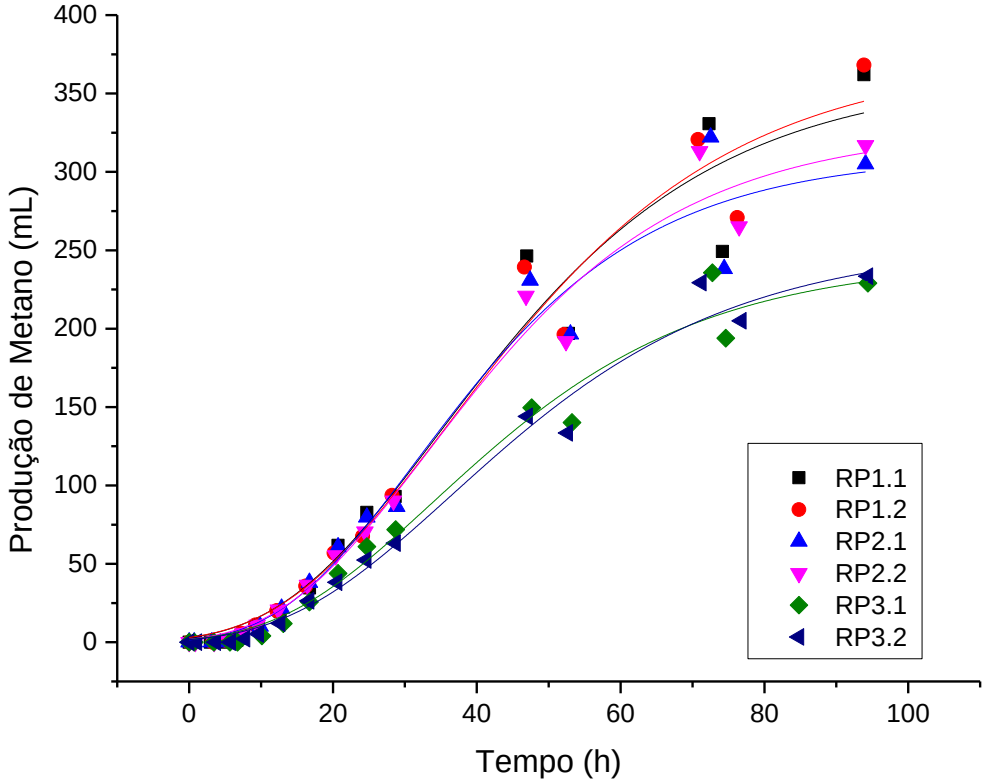
Tabela 12: Dados dos experimentos com montagem com centrifugação – utilizando a vinhaça de Usina Rio Pardo.

Reator	**DQO Inicial (mg/L)**	**Sulfato Inicial (mg/L)**	**DQO/SO_4^{2-}**	**F/M (g.DQO/ g.SVT)**	**Volume de Metano Calculado* (CNTP) (mL)**	**Metano produzido (CNTP) (mL)**	**Eficiência de remoção de MO (%)**	**Eficiência de remoção de Sulfato (%)**
RP1.1	4670,00	365,50	12,78	0,64	710	331	77	89
RP1.2	4250,00	330,95	12,84	0,58	650	368	78	97
RP2.1	3506,67	306,00	11,46	0,62	544	322	79	90
RP2.2	3275,00	238,43	13,74	0,58	512	317	79	98
RP3.1	2375,00	714,74	3,32	0,59	348	236	86	79
RP3.2	2396,67	741,46	3,23	0,59	356	233	90	94

* o desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado.

Fonte: A autora

Figura 9: Produção de Metano - Concentrações de SO_4^{2-} variadas



Fonte: A autora

A remoção de MO (Tabela 12) foi proporcional à concentração aplicada, indicando que os valores estudados foram adequados ao estabelecimento dos processos de degradação envolvidos, entretanto, as eficiências de remoção de DQO decresceram em relação ao aumento de MO aplicada.

Diferentemente, a eficiência de remoção do sulfato foi próxima a 90% (79% em RP3.1) em todos os casos, apesar da variação na concentração de sulfato de 340 a 730 mg/L e da variação da relação DQO/sulfato de 13 para 3.

A produção de metano real e teórica é semelhante aos casos já discutidos. RP1.1 e RP1.2 produziram 52% em média do valor teórico, RP2.1, RP2.2 e RP3.1, RP3.2 produziram respectivamente, 61 e 67%. A condição com maior produção de metano foi a primeira com maior concentração de MO e relações DQO/SO_4^{2-} altas, e a diferença entre essa e a menor produção é de 32%, diferente de apenas 16% de diferença nas condições R2 citadas anteriormente, mesmo utilizando a mesma vinhaça. Na Tabela 13 mostra o resumo das rotas de biodegradação da matéria orgânica.

Tabela 13: Rotas de biodegradação da matéria orgânica e produção de metano calculado, da vinhaça da Usina de Rio Pardo.

Ensaio	MO removida total (mg/L)	Sulfato removido (mg/L)	MO removida via sulfetogênica (%)	MO removida via Metanogênica (%)	Sulfeto Teórico (mg/L)
RP1.1	3598,1	326,6	6	94	109
RP1.2	3310,0	320,3	6	94	107
RP2.1	2775,4	276,3	7	93	92
RP2.2	2596,9	233,7	6	94	78
RP3.1	2036,3	562,9	19	81	188
RP3.2	2159,2	693,9	22	78	231

Fonte: A autora

Observa-se que nesse caso, os valores de remoção entre as vias de biodegradação são diferentes em todas as condições, onde a via metanogênica teve maior participação nos casos RP1 que possuem maior valores de DQO e alta relação DQO/SO_4^{2-}. A participação da rota sulfetogênica foi maior na condição RP3.1 e RP3.2, aos quais possuíam mais sulfato, que desvia o fluxo de elétrons para a produção de metano.

Concluindo, a presença de sulfato no intervalo de concentrações testado não inibiu a metanogênese ou a sulfetogênese, contribuindo pela sulfetogênese com até 20% da degradação da matéria orgânica.

5.3.RELAÇÃO DQO/SO_4^{2-}

A Relação DQO/SO_4^{2-} é m parâmetro bastante utilizado no monitoramento em reatores anaeróbios. A literatura menos recente indicava que relações mais altas são desejadas para um tratamento anaeróbio com sucesso (RINZEMA; LETTINGA, 1988), principalmente ao se considerar a produção do H_2S, interferindo na biota existente no reator, sendo tóxico para alguns microrganismos.

Porém, trabalhos como o de Godoi, Damianovic e Foresti (2015) obtiveram resultados satisfatórios para remoção de matéria orgânica em reator anaeróbio de leito estruturado (25ºC, vinhaça sintética como substrato), com eficiência de remoção de MO de 96% em relação DQO/SO_4^{2-} de 2,9.

Hu *et al*. (2015) também obtiveram sucesso na operação de um reator UASB (35ºC, com recirculação, e com esgoto sintético como substrato) com COV de 12gDQO.L^{-1} variando a relação DQO/SO_4^{2-} entre 0,5 a 20, obtendo eficiências de remoção de MO acima 70% e com produção de metano.

Na Figura 10 estão apresentados gráficos de produção de metano, para relações DQO/SO_4^{2-} de 10 e 2, em que a vinhaça da Usina Rio Pardo e condições operacionais

similares foram utilizadas. Na Tabela 14 estão dispostas as respostas obtidas nos experimentos.

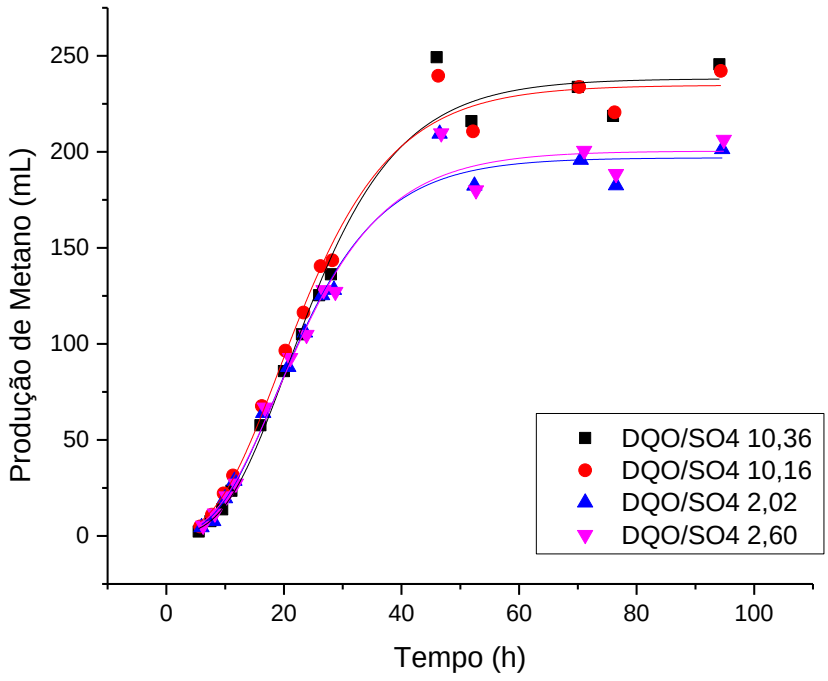
Tabela 14: Dados dos experimentos para as relações DQO/SO_4^{2-} de 10 e 2

Vinhaça	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/SO_4^{2-}	F/M (g.DQO/ g.SVT)	Volume de Metano Calculado* (CNTP) (mL)	Metano produzido (CNTP) (mL)	Eficiência de remoção de DQO	Eficiência de remoção de Sulfato
Rio Pardo	1691,67	163,31	10,36	0,23	310	246	89	37
Rio Pardo	1735,00	170,80	10,16	0,23	336	242	94	47
Rio Pardo	1525,00	755,25	2,02	0,20	196	201	80	94
Rio Pardo	2010,00	773,25	2,60	0,27	340	206	94	84

* o desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado

Fonte: A autora

Figura 10: Produção de Metano - Relações DQO/SO_4^{2-} de 10 e 2



Fonte: A autora

Observou-se que a produção de metano dos ensaios com relação DQO/Sulfato de 10 são 19% maiores do que os ensaios com relação DQO/Sulfato de 2. A produção de metano real em relação à produção teórica foi de 75% para ambas relações. A eficiência de remoção da matéria orgânica em todos os casos são próximas de 90%, sendo em média 91% para a

relação 10 e 86% para a relação 2 e a eficiência de remoção do sulfato, foram menores para a relação 10 (em média apenas 41%) comparado a relação 2 (88%).

Com isso algumas hipóteses podem ser apontadas: a) A remoção de matéria orgânica não foi afetada pela presença de sulfato, ou seja, ocorreu de maneira similar mesmo para relação DQO/SO_4^{2-} igual a 2; b) A produção de metano foi afetada pela maior quantidade de sulfato, uma vez que para DQO/sulfato de 2, a concentração de sulfato foi da ordem de 700 mg/L exercendo elevada pressão de seleção às BRS, promovendo o desvio do fluxo de elétrons para sulfetogênese.

Na Figura 11, observa-se um gráfico a produção de metano, ambas com relações DQO/SO_4^{2-} de 2 e utilizando vinhaça da Usina da Pedra, porém os valores iniciais de DQO e sulfato são diferentes, conforme explicitado na Tabela 15 logo abaixo.

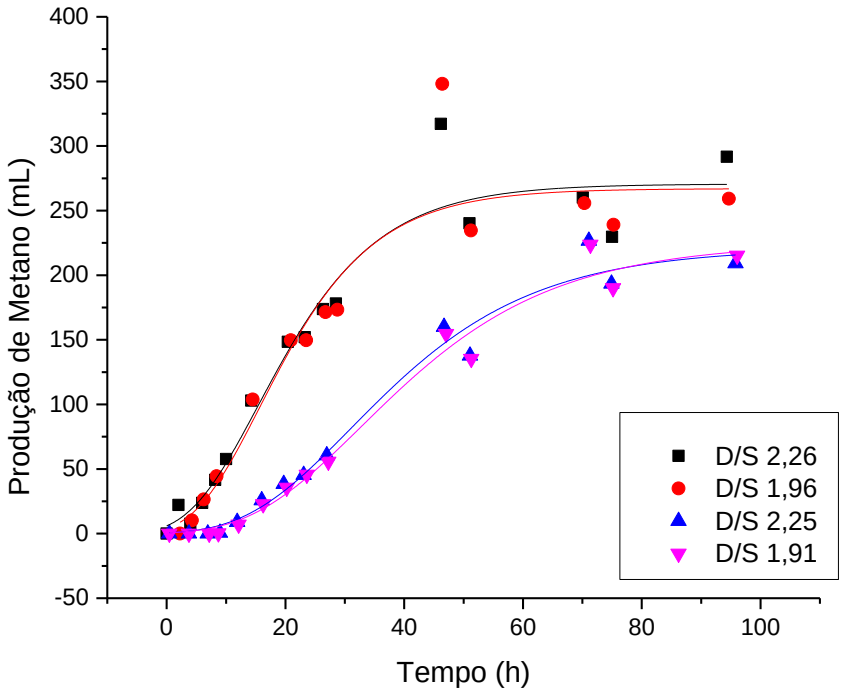
Tabela 15: Dados dos experimentos para as relações DQO/SO_4^{2-} de 2

Vinhaça	**DQO Inicial (mg/L)**	**Sulfato Inicial (mg/L)**	**DQO/SO_4^{2-}**	**F/M (g.DQO/ g.SVT)**	**Volume de Metano Calculado* (CNTP) (mL)**	**Metano produzido (CNTP) (mL)**	**Eficiência de remoção de DQO**	**Eficiência de remoção de Sulfato**
Pedra	4950,00	2189,00	2,26	0,62	915	292	96	43
Pedra	4670,00	2387,00	1,96	0,58	821	259	94	50
Pedra	2730,00	1213,01	2,25	0,50	442	227	91	75
Pedra	2576,67	1346,94	1,91	0,47	407	224	90	72

* o desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado

Fonte: A autora

Figura 11: Produção de Metano - Relações DQO/SO_4^{2-} de 2



Fonte: A autora

Observa-se que a DQO inicial das duas primeiras curvas são aproximadamente 81% maiores que os outros dois ensaios seguintes, o mesmo se refere à concentração de sulfato, por terem a mesma relação DQO/SO_4^{2-}. Observou-se que a produção de metano dos experimentos com DQO maior que 4000 foi em média 18% maior do que os de DQO com valor de 2000, porém comparando a produção de metano teórica com o valor real produzido, a produção foi apenas 30% para as condições de 4000 mg.L^{-1}, e 48% para as condições de 2000 mg.L^{-1}.

A eficiência de remoção da matéria orgânica foi levemente maior para o caso dos ensaios com valores de DQO maiores, porém todos os casos conseguiram chegar aos 90% de remoção. Para eficiência de remoção do sulfato, os ensaios com maiores valores de sulfato, próximos a 2000 mg/L, não chegaram a 50% de remoção, enquanto para concentração de sulfato próxima a 1000 mg/L, a eficiência de remoção foi da ordem de 70%.

As hipóteses apontadas foram que: a) A remoção de matéria orgânica foi mantida na baixa relação DQO/SO_4^{2-}, devido à contribuição da sulfetogênese, porém, a produção de metano foi afetada pela maior quantidade de sulfato presente nos ensaios de valores de DQO 4000, em função do desvio do fluxo de elétrons. A remoção do sulfato esteve associada,

principalmente, à concentração de sulfato presente, uma vez que a relação DQO/SO_4^{2-} foi adequada para permitir o desenvolvimento da sulfetogênese.

Na Figura 12 são apresentadas as curvas da produção de metano, obtidas de ensaios com as duas vinhaças utilizadas, submetidas à relação DQO/SO_4^{2-} próximas de 10, conforme informações da Tabela 16.

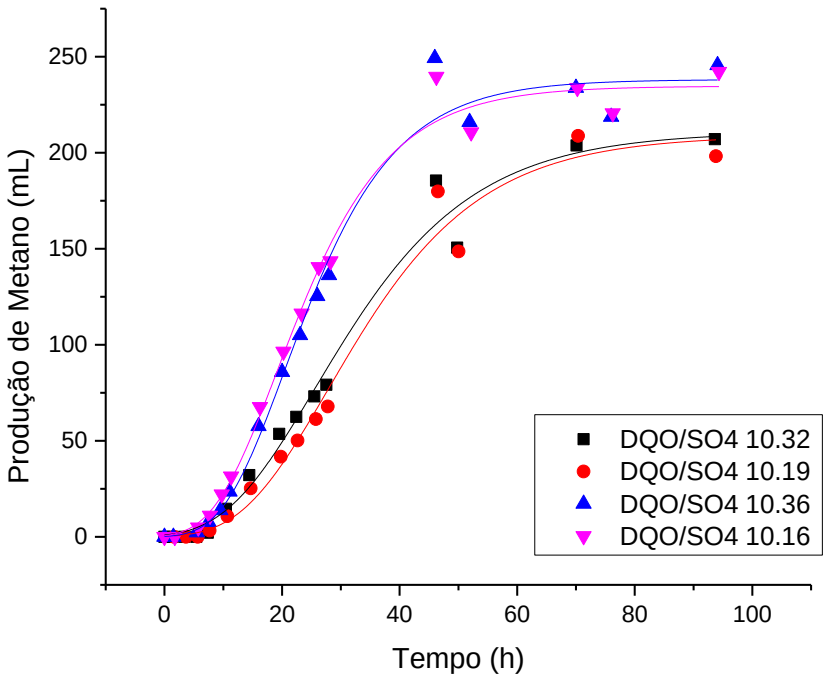
Tabela 16: Dados dos experimentos para as relações DQO/SO_4^{2-} de 10

Vinhaça	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/SO_4^{2-}	F/M (g.DQO/ g.SVT)	Volume de Metano Calculado* (CNTP) (mL)	Metano produzido (CNTP) (mL)	Eficiência de remoção de DQO	Eficiência de remoção de Sulfato
Pedra	1610,00	156,00	10,32	0,36	295	207	90	74
Pedra	1606,67	157,73	10,19	0,36	299	198	91	68
Rio Pardo	1691,67	163,31	10,36	0,23	315	246	90	37
Rio Pardo	1735,00	170,80	10,16	0,23	329	242	92	47

* o desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado

Fonte: A autora

Figura 12: Produção de Metano - Relações DQO/SO_4^{2-} de 10



Fonte: A autora

Mesmo possuindo a mesma relação (com os valores de DQO e sulfato iniciais bastante próximos), a produção de biogás teve uma variação de 20% no metano produzido. As eficiências de remoção de matéria orgânica foram acima de 90% para ambas as vinhaças. A eficiência de remoção de sulfato, contudo, variou mesmo entre experimentos, com 40% de diferença. Isso pode ser pela composição de cada uma das vinhaças que deu condições diferentes para que as BRS se adaptassem, conforme citado anteriormente, sendo a produção de metano da vinhaça da pedra afetada por essa condição. Na Tabela 17 estão os dados de regressão do modelo utilizado.

No caso da vinhaça de Pedra a fase de adaptação (k) dos microrganismos foi 23% mais demorada que no caso da vinhaça da Rio Pardo, isso pode estar relacionado ao fato do reator de origem do inóculo estar adaptado a essa vinhaça.

Considerando que os testes foram feitos sob mesmas condições, os resultados mostram que a constituição do efluente influencia na produção de metano, desconsiderando o sulfeto formado pois como as quantidades de sulfato iniciais são semelhantes, a produção de sulfeto estaria afetando ambos os casos de forma análoga.

Tabela 17: Dados de regressão do Modelo Gompertz modificado para as relações DQO/SO_4^{2-} de 10

Relações	Respostas	Valor	Erro Padrão
Pedra 1 (10,32)	Máxima produção (A)	210,87	8,91
	Maior Velocidade (xc)	5,11	0,50
	Fase de Adaptação (k)	10,49	1,53
Pedra 2 (10,19)	Máxima produção (A)	209,03	9,57
	Maior Velocidade (xc)	5,24	0,56
	Fase de Adaptação (k)	13,20	1,60
Rio Pardo 1 (10,36)	Máxima produção (A)	238,10	6,19
	Maior Velocidade (xc)	8,25	0,82
	Fase de Adaptação (k)	9,93	1,24
Rio Pardo 2 (10,16)	Máxima produção (A)	234,67	4,84
	Maior Velocidade (xc)	8,00	0,59
	Fase de Adaptação (k)	8,37	0,96

Fonte: A autora

Conclui-se que a relação DQO/sulfato observada nos testes permitiram a realização dos processos de remoção de matéria orgânica pelas vias metanogênica e sulfetogênica associadas. A participação da sulfetogênese foi maior para menores relações DQO/sulfato e

maiores concentrações sulfato, a última associada ao aumento da pressão de seleção para BRS.

5.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento de experimentos foi proposto como uma maneira de se visualizar e interpretar não somente a influência das variáveis escolhidas para serem observadas, como também verificar a interação que existe entre elas, na resposta desejada. Buscando confirmar as conclusões chegadas nos vários testes da sessão anterior, os fatores escolhidos foram a concentração da matéria orgânica, medida através da DQO, e a concentração do íon sulfato.

As respostas que foram analisadas são a produção de metano, a eficiência de remoção de matéria orgânica e a eficiência de remoção do sulfato, os resultados obtidos estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Resultados obtidos nos experimentos em batelada

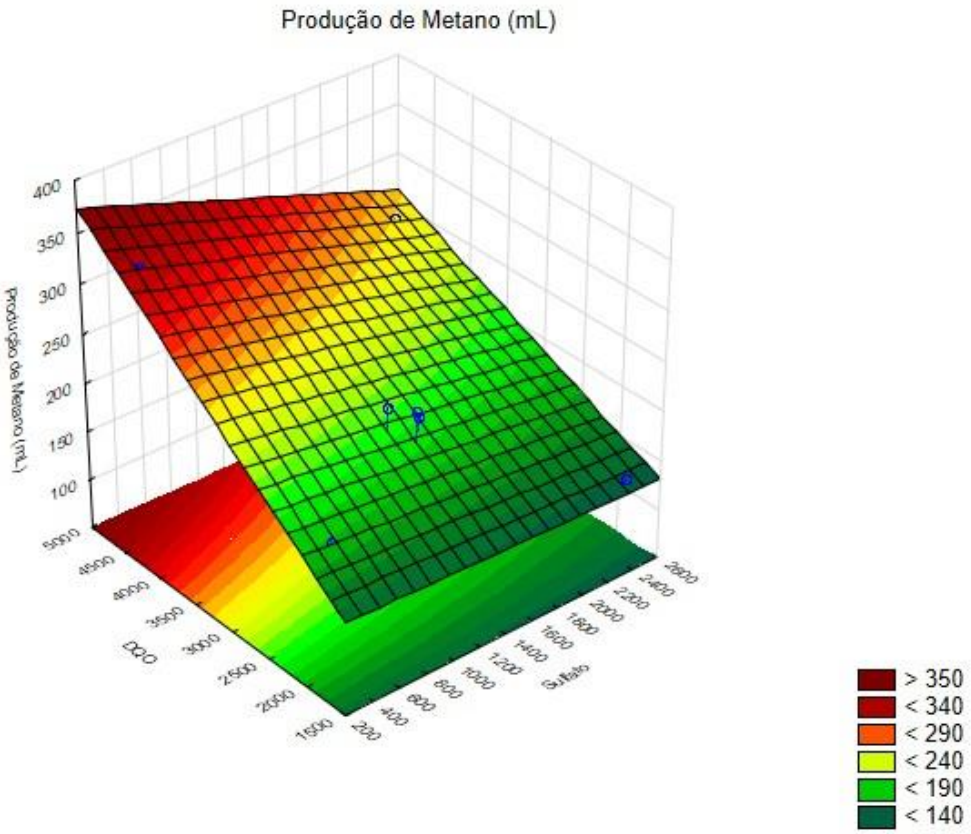
Ensaio	**DQO afluente real ($mg.L^{-1}$)**	**Sulfato Afluente Real ($mg.L^{-1}$)**	**Resposta 1: Produção de Metano (mL)**	**Resposta 2: Eficiência de remoção de DQO (%)**	**Resposta 3: Eficiência de Remoção de Sulfato (%)**	**Relação DQO/SO_4^{2-}**	**F/M**
1	4670,0	2387,0	259	94	50	1,96	0,58
2	4466,7	357,1	332	80	89	12,51	0,58
3	1640,0	2403,1	138	91	52	0,68	0,49
4	2063,3	416,5	178	93	94	4,95	0,46
5	2730,0	1213,0	227	91	75	2,25	0,50
6	2576,7	1346,9	224	90	72	1,91	0,47
7	2606,7	1381,0	215	90	75	1,89	0,47

Fonte: A autora

5.4.1. A influência da concentração da Matéria Orgânica e Sulfato na Produção de Metano

Com os resultados obtidos nos testes em batelada, foi possível gerar superfícies de resposta, gráficos tridimensionais que relaciona os fatores com a resposta observada, a fim de possibilitar uma visualização dos resultados mais simplificada. A Figura 13 apresenta a superfície de resposta obtida considerando a produção de metano em função dos fatores e Tabela 19 mostra os resultados da ANOVA para essa resposta.

Figura 13: Superfície de reposta para a produção de metano.



Fonte: A autora

Tabela 19: Resultados da ANOVA dos fatores da produção de Metano**.**

	Soma Quadrática	**Graus de Liberdade**	**Média Quadrática**	**F**	**p**
Curvatura	918,00	1	918,00	33,9501	0,028214
DQO	2411,03	1	2411,03	89,1669	0,011030
Sulfato	18842,57	1	18842,57	696,8515	0,001432
Interação dos Fatores	989,70	1	989,70	36,6020	0,026250
Resíduos	54,08	2	27,04		
Total	22487,43	6			

Fonte: A autora

A estimativa de efeito da Análise de Variância (ANOVA) pode ser interpretada como as diferenças (para a variável dependente) entre o cenário de menores valores e o cenário de maiores valores, para os respectivos fatores. Já os efeitos de interação podem ser interpretados como metade da diferença entre os principais efeitos de um fator nos dois níveis de um segundo fator (MASON, GUNST e HESS, 1989).

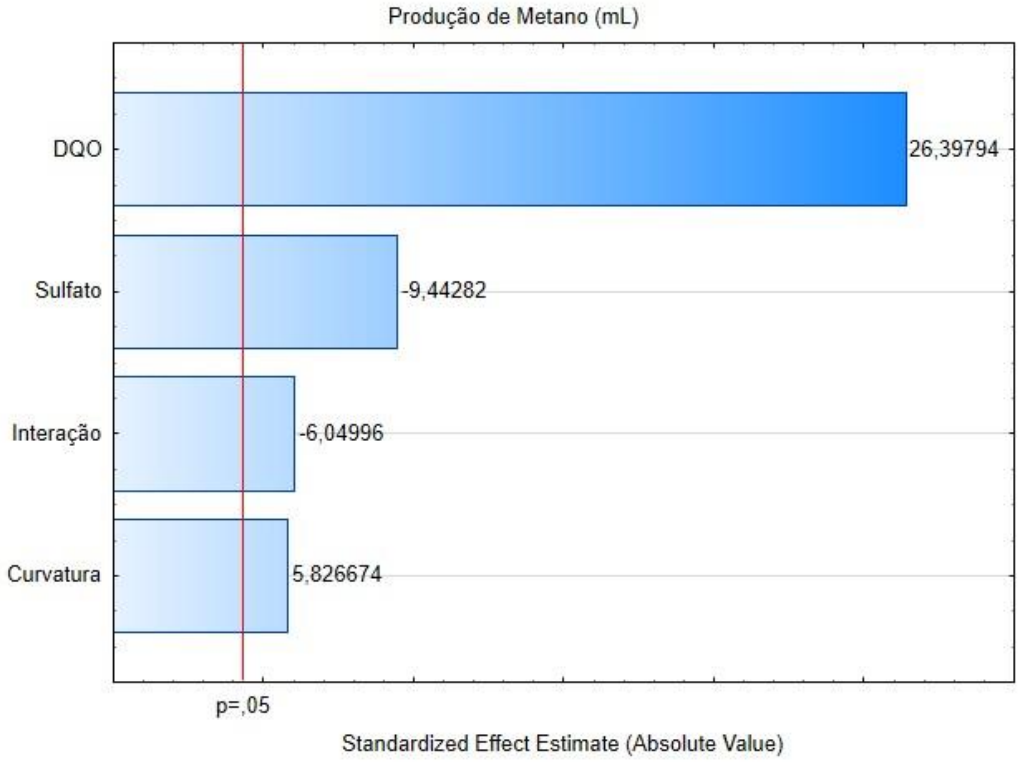
Para subsidiar a qualidade dos dados fornecidos é interessante se averiguar dois valores: o valor-p e o Teste F. O valor-p serve para saber se um fator tem a probabilidade de não ser uma hipótese nula, que é definida como a não existência de relação entre os fenômenos medidos, neste trabalho foi adotado o valor de menor ou igual a 0,05 para não ser uma hipótese nula. O Teste F tem intenção semelhante ao p, a diferença é que ele um teste estatístico, em vez de uma probabilidade, informando se um grupo de variáveis é significativo em conjunto, esse valor deve ser comparado a um F crítico tabelado.

Todos esses valores foram gerados no teste ANOVA no *software* Statistica® e seus resultados para a produção de metano, são apresentados na Tabela 19. Na Figura 14 apresenta-se um gráfico de Pareto dos efeitos de cada um dos fatores e de sua interação.

O gráfico de Pareto mostra as estimativas dos efeitos padronizados, ou seja, os efeitos encontrados pelos modelos estatísticos da ANOVA, divididos por seus respectivos erros padrão. A linha vertical mostrada indica a magnitude mínima para se considerar que os efeitos são estatisticamente significativos (valor-p ≥ 0,05).

No *software* Statistica® caso o planejamento tenha pontos centrais, também é estimado o parâmetro da curvatura, que se refere ao grau de curvatura ou não-linearidade na relação entre os fatores e a variável dependente. Porém, neste trabalho esse parâmetro não foi avaliado.

Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores na Produção de Metano.



Fonte: A autora

Como pode ser observado na Figura 14 e na Tabela 19, a concentração da matéria orgânica foi um fator bastante significativo, ou seja, quanto mais matéria orgânica disponível, maior a produção de metano. O sulfato também foi significativo, mesmo que em menor intensidade, porém seu efeito é negativo, o que quer dizer, que quanto maior sua concentração afeta mais negativamente a produção de metano.

A interação dos fatores também é negativa à produção de metano, representando a perda de elétrons que são direcionados a sulfetogênese. Porém, esse efeito se mostrou baixo, provavelmente porque as BRS oxidativas incompletas se utilizam do sulfato como aceptor final de elétrons na degradação parcial dos ácidos orgânicos formando acetato, que é um substrato utilizado pelas arqueias metanogênicas para a produção de metano, auxiliando na rota metanogênica.

Tabela 20 mostra a ANOVA da regressão do modelo usado por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010).

Tabela 20: Resultados da ANOVA para o modelo de regressão dos fatores da produção de Metano

	Soma Quadrática	**Graus de Liberdade**	**Média Quadrática**	**F**	**p**
Regressão	2,2371e+04	3	7,4569+03	191,7297	6,3350e-04
Residual	116,6786	3	38,8929		
Falta de Ajuste	38,6786	1	38,6786	0,9918	0,4242
Erro Puro	78	2	39		
Total	2,2487e+04	6			
R^2	0,9948				
R^2 Ajustado	0,9965				

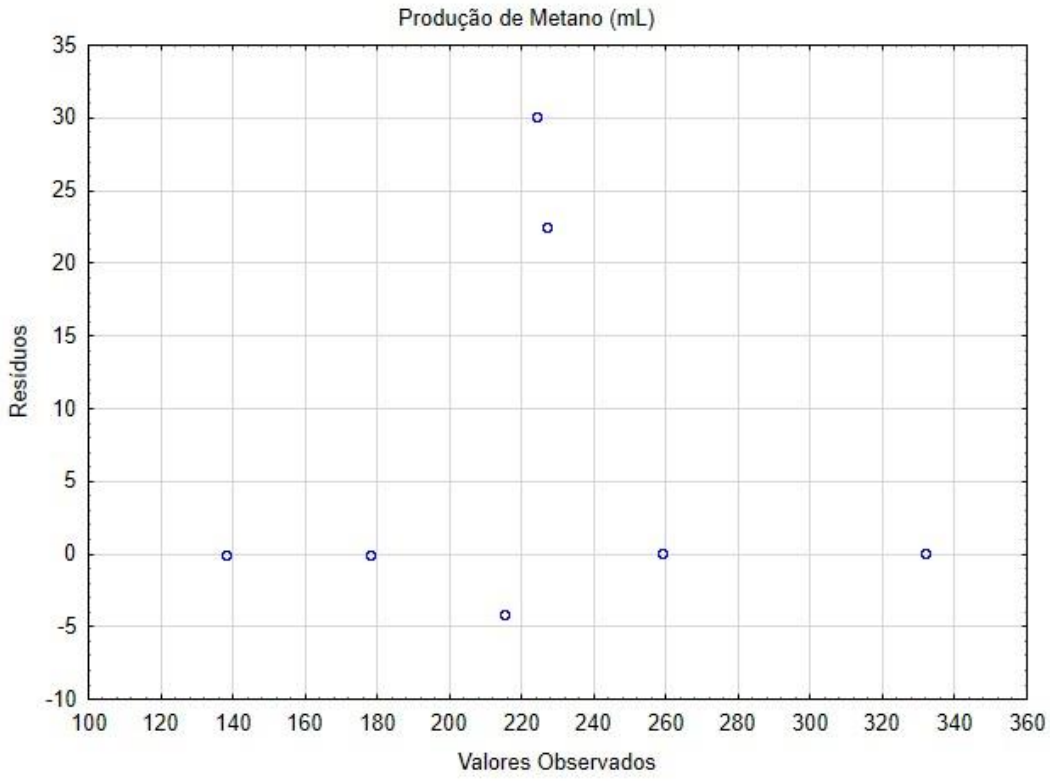
Fonte: A autora

De acordo com os autores citados, se utiliza o teste F afim de determinar se o modelo se ajusta bem aos dados, e se é significativo, e preditivo. Para saber se o modelo é bem ajustado, a média quadrática devido à falta de ajuste (MQ_{faj}) dividida pela média quadrática do erro puro (MQ_{ep}) precisa ser menor que o F crítico (que nesse caso é $F_{1,2}$ = 18.513), e neste modelo MQ_{faj}/MQ_{ep} = 0,992, que é menor que o F crítico evidenciando que o modelo é bem ajustado.

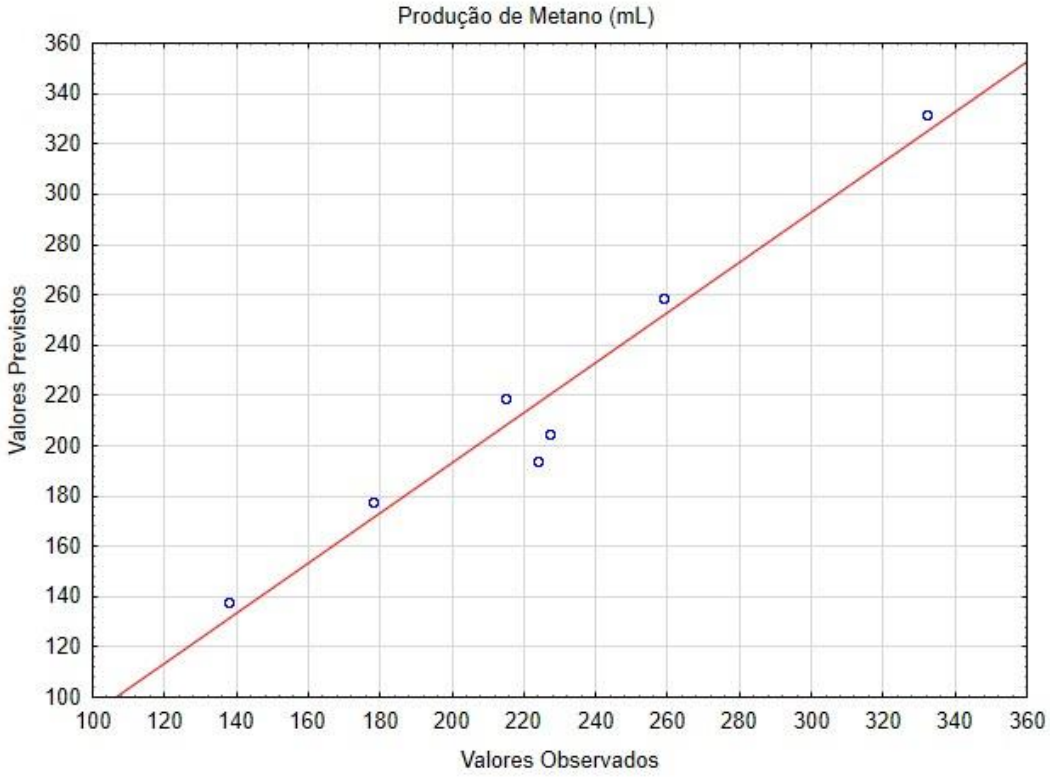
Para saber se um modelo é significativo, a divisão entre a média quadrática da regressão (MQ_R) e a média quadrática dos resíduos (MQ_r) tem que ser um número maior que o F crítico (nesse caso $F_{3,3}$ = 9.27). Mas neste modelo MQ_R/MQ_r = 191,7, que sendo maior que F crítico, o modelo é considerado significativo, além disso, pode se afirmar que o modelo é preditivo, já que MQ_R/MQr chega a ser pelo menos 10 vezes maior que o F crítico. A Figura

15a mostra um gráfico com os valores observados versus os valores previstos pelo modelo, pode se observar que o modelo se aproxima dos dados reais, e a Figura 15b mostra a relação dos resíduos com os valores observados, e eles são visivelmente aleatórios.

Figura 15: a) Regressão contra Valores observados b) Resíduos contra Valores observados



a)



b)

Fonte: A autora

Na Tabela 21, estão dispostos os valores das concentrações de Matéria Orgânica e Sulfato, distribuídos em suas rotas de biodegradação, como também os valores teóricos da produção de Metano, de acordo com as rotas.

Tabela 21: Rotas de biodegradação da Matéria orgânica e produção de metano Teórica

Ensaio	**DQO Solúvel Inicial ($mg.L^{-1}$)**	**Sulfato Inicial ($mg.L^{-1}$)**	**DQO Solúvel Final ($mg.L^{-1}$)**	**Sulfato Final ($mg.L^{-1}$)**	**Matéria Orgânica removida via sulfetogênica ($mg.L^{-1}$)**	**Matéria Orgânica removida via metanogênica ($mg.L^{-1}$)**	**Volume de Metano calculado* (mL) (CNTP)**	**Metano Real produzido (mL) (CNTP)**
1	4670	2387	286	1203	476	3908	821	259
2	4467	357	898	40	127	3442	723	332
3	1640	2403	143	1153	503	995	209	138
4	2063	417	154	26	157	1753	368	178
5	2730	1213	257	300	367	2106	442	227
6	2577	1347	250	382	388	1939	407	224
7	2607	1381	256	351	414	1937	407	215

*o desvio para redução de sulfato a sulfeto foi considerado.

Fonte: A autora

Observa-se que o a produção de metano medida foi em média 50% do valor teórico, calculado a partir da remoção da matéria orgânica considerando o fluxo de elétrons desviados a sulfetogênese. A remoção da matéria orgânica pela via sulfetogênica foi em média de 15%, e pela via metanogênica de 85%.

Em casos específicos, o Ensaio 3 foi o que obteve maior produção de metano em relação a produção teórica (considerando a participação da sulfetogênese no processo), sendo 66% do que foi calculado, e também obteve a maior participação da via sulfetogênica na remoção de matéria orgânica com 34%. O Ensaio 4 obteve as melhores eficiências de remoção de sulfato com 94%. O Ensaio 1 obteve a melhor remoção de matéria orgânica, com 94%. E o Ensaio 2 obteve a maior produção de metano real com 332 mL. A Tabela 22 mostra as porcentagens de remoção de todos os testes, em relação aos parâmetros comentados anteriormente.

Tabela 22: Resumo das participações das vias metanogênicas e sulfetogênicas

Ensaio	**Eficiência de remoção de Matéria Orgânica (%)**	**Eficiência de remoção de Sulfato (%)**	**Metano Produzido/Metano Teórico (%)**	**Participação da via sulfetogênica* (%)**	**Participação da via metanogênica* (%)**
Teste 1	**94**	50	32	11	89
Teste 2	80	89	46	4	**96**
Teste 3	91	52	**66**	**34**	66
Teste 4	93	**94**	48	8	92
Teste 5	91	75	51	15	85
Teste 6	90	72	55	17	83
Teste 7	90	75	53	18	82
		MÉDIA	50	15	85

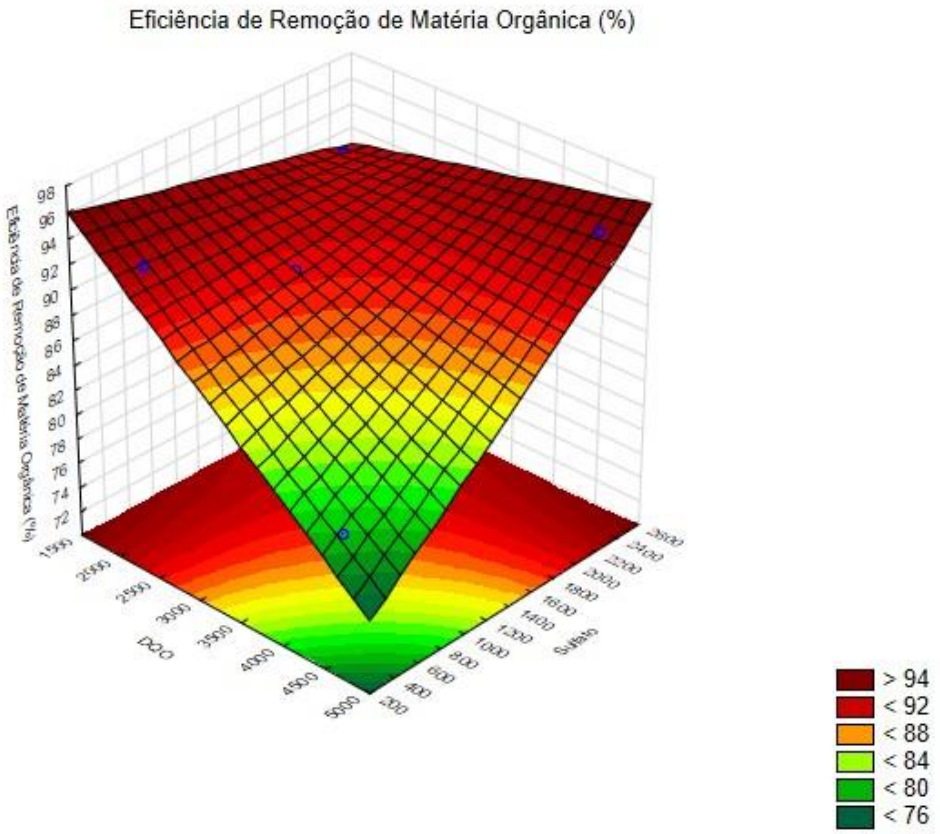
*na remoção de matéria orgânica.

Fonte: A autora

5.4.2. A influência da concentração da Matéria Orgânica e Sulfato na Eficiência de remoção de Matéria Orgânica

A segunda resposta analisada foi a eficiência de remoção da matéria orgânica, se utilizando como base os valores de DQO inicial e final de cada uma das bateladas, gerando a superfície de resposta mostrada na Figura 16, e na Tabela 23, estão os resultados da ANOVA da regressão.

Figura 16: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de matéria orgânica.



Fonte: A autora

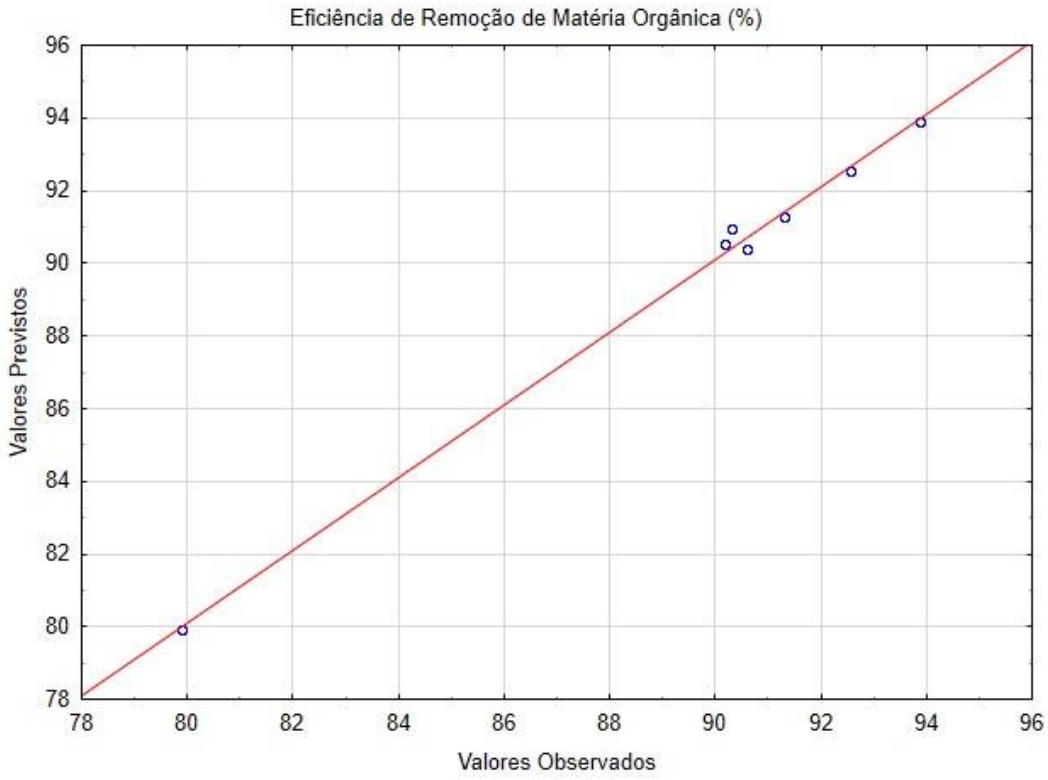
Tabela 23: Resultados da ANOVA para o modelo de regressão dos fatores da eficiência de remoção de MO.

	Soma Quadrática	**Graus de Liberdade**	**Média Quadrática**	**F**	**p**
Regressão	125,000	3	41,6667	67,3077	0,0030
Residual	1,8571	3	0,6190		
Falta de Ajuste	1,1905	1	1,1905	3,5714	0,1994
Erro Puro	0,6667	2	0,3333		
Total	126,8571	6			
R^2	0,9854				
R^2 Ajustado	0,9947				

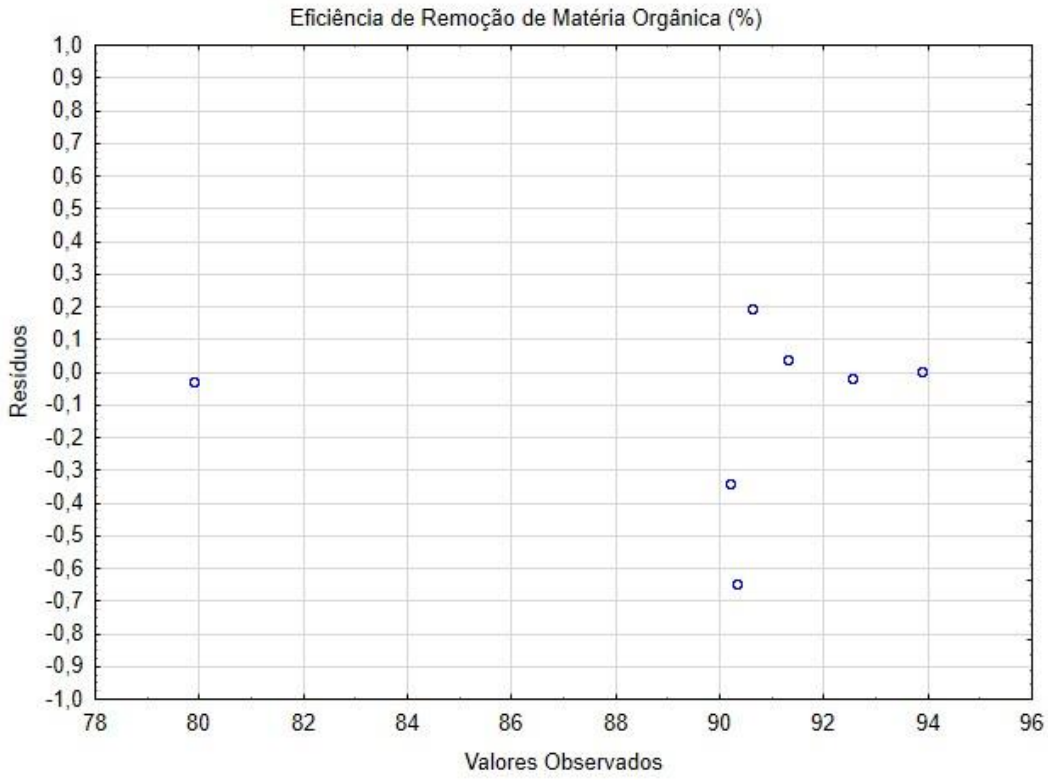
Fonte: A autora

O modelo se ajusta bem aos dados, já que $MQ_{faj}/MQ_{ep} = 3,57$, é menor que o F crítico ($F_{1,2} = 18.513$), e também é significativo, pois $MQ_R/MQ_r = 67,31$ é maior que o F crítico, mas não é preditivo, por esse valor não ser pelo menos 10 vezes maior que o F crítico. Na Figura 17a apresenta-se o gráfico com os valores observados versus os valores previstos pelo modelo e 17b os resíduos.

Figura 17: a) Regressão contra Valores observados b) Resíduos contra Valores observados



a)

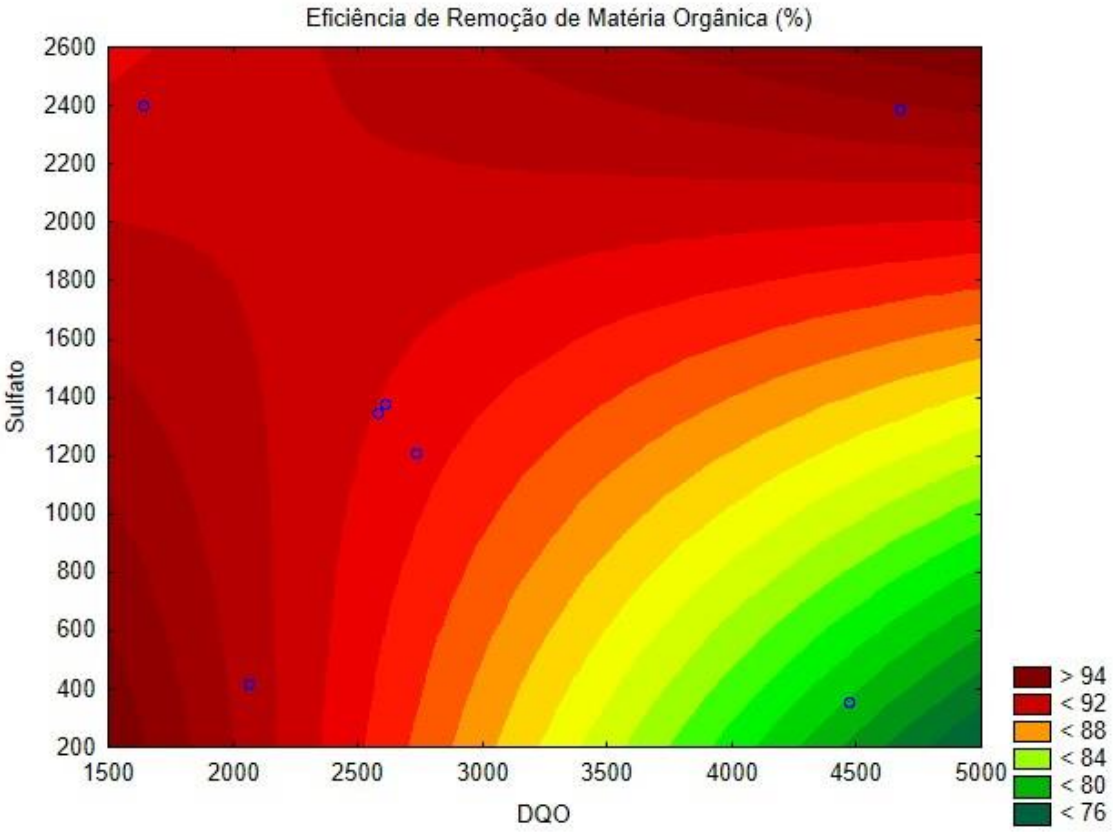


b)

Fonte: A autora

Observa-se na Figura 16 que os valores de eficiência acima dos 90% apenas não ocorrem quando a DQO é alta e o sulfato é baixo (Teste 2) que seria a região de cor verde do gráfico, mostrando que a participação das BRS, contribuem positivamente para o consumo da matéria orgânica, como também é mostrado no trabalho de Godoi, Damianovic e Foresti (2015), que conseguiram melhores eficiências de remoção de matéria orgânica em seu reator sulfetogênico e metanogênico em relações DQO/SO_4^{2-} mais baixas. Neste trabalho, como já foi mencionado antes, a melhor eficiência de remoção de matéria orgânica foi no Ensaio 1, que tinha uma relação DQO/SO_4^{2-} de 2 tal qual o trabalho de já citado. A Figura 18 mostra os resultados da superfície de resposta em duas dimensões.

Figura 18: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de matéria orgânica em duas dimensões.



Fonte: A autora

Entre os valores de DQO de 4600 a 2800 mg.L^{-1}, apenas relações DQO/SO_4^{2-} abaixo de 2,5, em média, obtiveram eficiência de remoção de matéria orgânica acima de 90%, indicando que reatores submetidos às cargas orgânicas mais elevadas têm o consumo de matéria orgânica auxiliado pela via sulfetogênica, uma vez que além da produção de acetato, cabe às BRS o consumo do propionato, contribuindo para redução da pressão parcial de hidrogênio, o que favorece a produção de acetato pela via metanogênica.

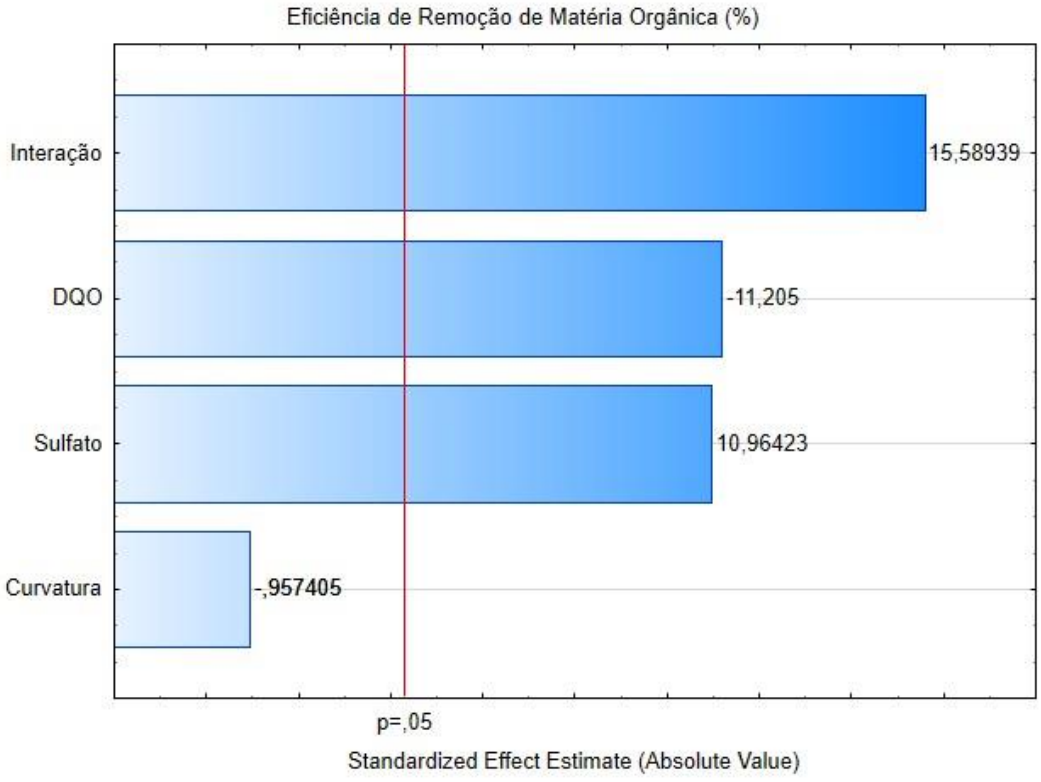
Os resultados da ANOVA para os fatores referentes à eficiência de remoção de matéria orgânica estão expostos na Tabela 24, em sequência, o gráfico de Pareto na Figura 19.

Tabela 24: Resultados da ANOVA dos fatores da eficiência de remoção de matéria orgânica.

	Soma Quadrática	**Graus de Liberdade.**	**Média Quadrática**	**F**	**p**
Curvatura	0,2452	1	0,24522	0,9166	0,439397
DQO	33,5885	1	33,58851	125,5518	0,007871
Sulfato	32,1606	1	32,16060	120,2144	0,008216
Interação dos Fatores	65,0168	1	65,01681	243,0289	0,004090
Resíduos	0,5351	2	0,26753		
Total	125,4389	6			

Fonte: A autora

Figura 19: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores na Eficiência de emoção de Matéria Orgânica.



Fonte: A autora

No gráfico de Pareto da Figura 19 e na Tabela 24, observa-se que todos os fatores são significativos, além disso, o maior efeito encontrado é o da interação dos fatores, confirmando que o auxílio das BRS é importante para a eficiência de remoção da matéria orgânica.

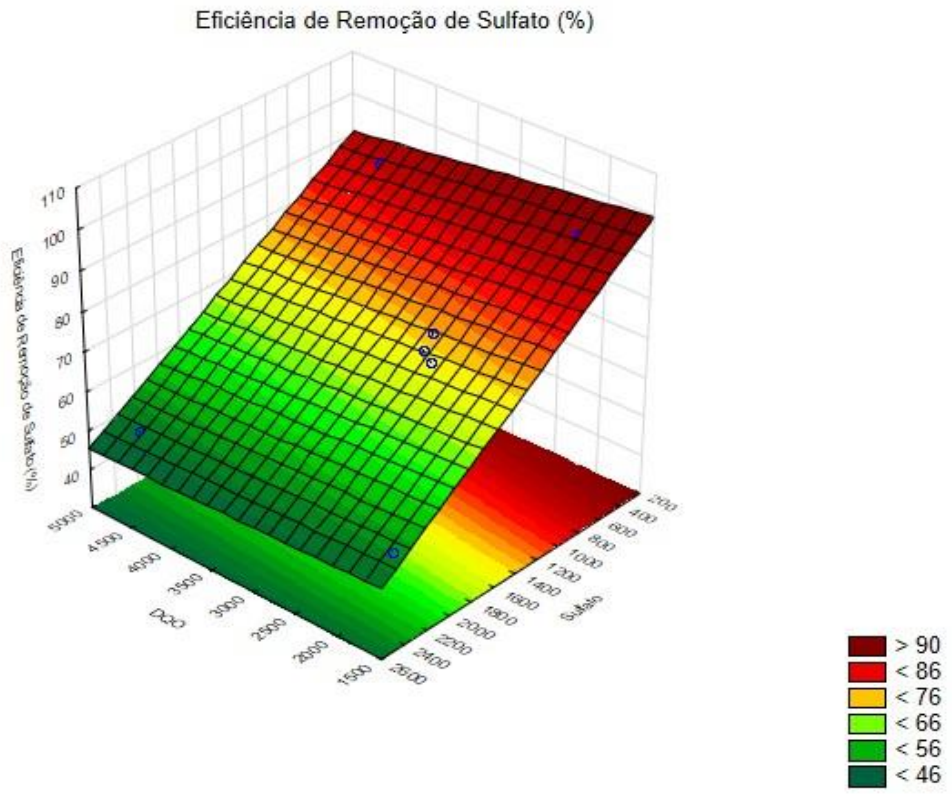
Porém uma coisa que devesse atentar é que o efeito da DQO é negativo. Se o efeito tiver sinal negativo, mostra que esse fator afeta a resposta negativamente, no sentido que ao

aumentar a concentração de matéria orgânica, a consequência na resposta é de diminuir a eficiência na remoção da mesma.

5.4.3. A influência da concentração da Matéria Orgânica e Sulfato na Eficiência de Remoção de Sulfato

No caso da eficiência de remoção do sulfato, a Figura 20 mostra a superfície de resposta encontrada. Na Tabela 25 são mostrados os resultados da ANOVA da regressão.

Figura 20: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de sulfato.



Fonte: A autora

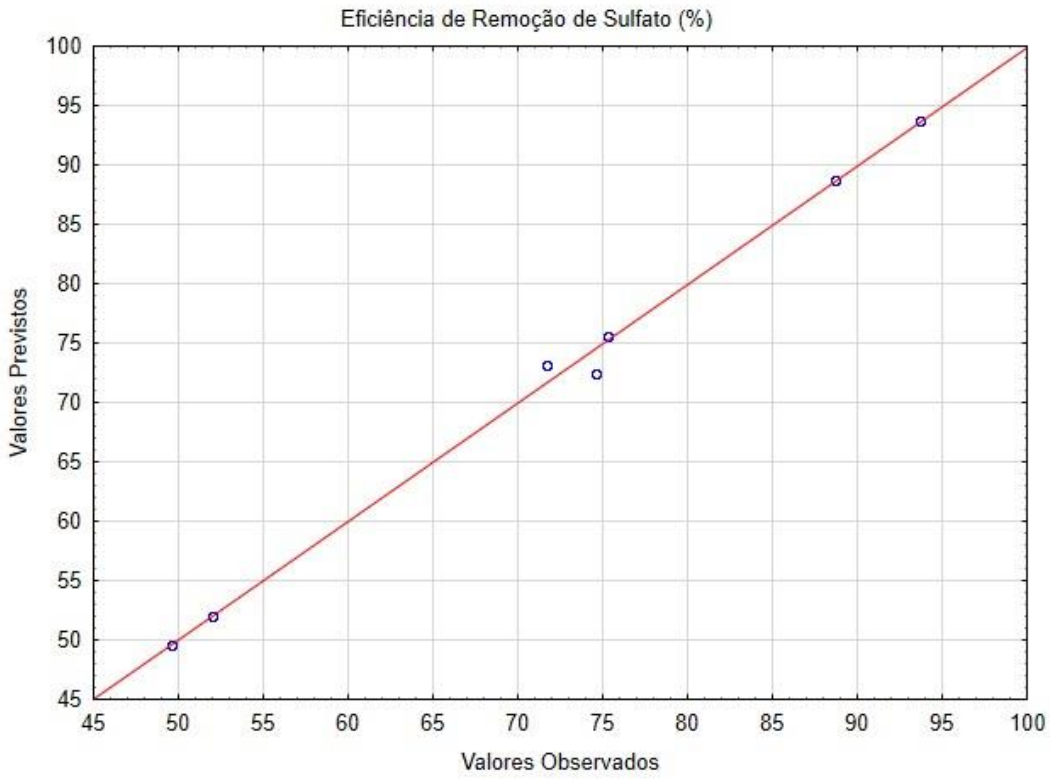
Tabela 25: Resultados da ANOVA para o modelo de regressão dos fatores da eficiência de remoção de Sulfato.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Regressão	1,6547+03	3	551,5833	87,2561	0,0020
Residual	18,9643	3	6,3214		
Falta de Ajuste	12,9643	1	12,9643	4,3214	0,1732
Erro Puro	6	2	3		
Total	1,6547e+03	6			
R^2	0,9887				
R^2 Ajustado	0,9964				

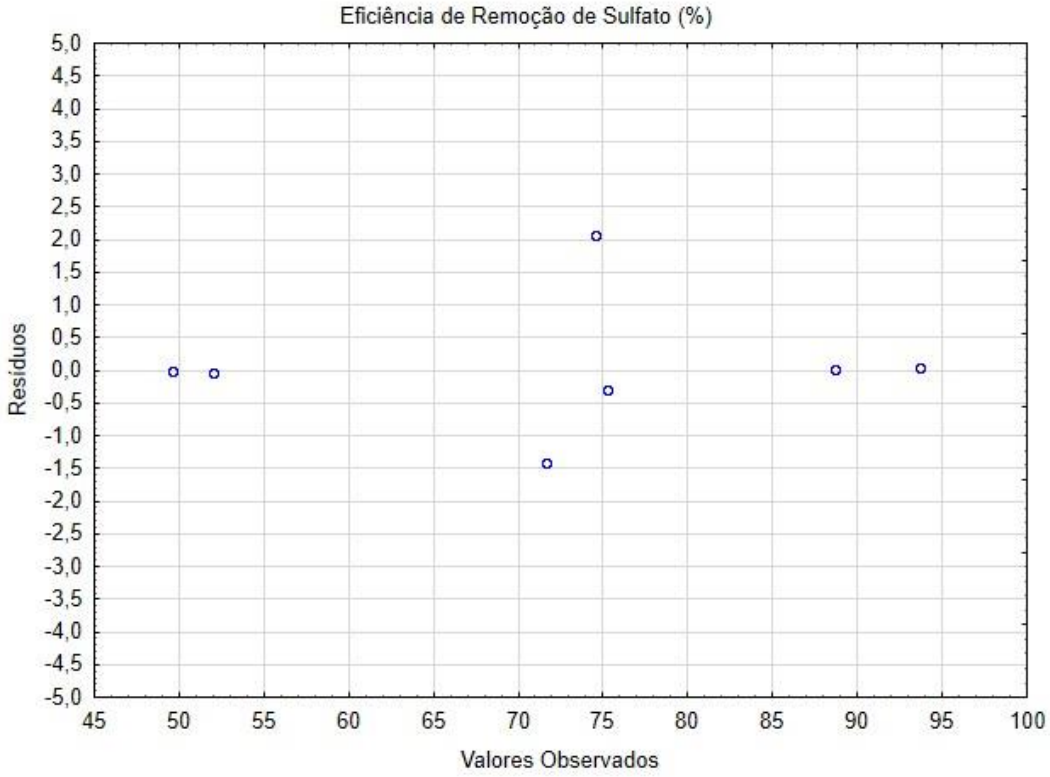
Fonte: A autora

O modelo para eficiência de remoção do sulfato se ajusta bem aos dados, já que MQ_{faj}/MQ_{ep} (4,32), é menor que o F crítico. O modelo possui significância, já que MQ_R/MQ_r (87,26) é maior que o F crítico, mas como esse valor não é pelo menos 10 vezes maior, então ele não é considerado um modelo preditivo. Na Figura 21a mostra a regressão junto aos valores observados, e na Figura 21b mostra a distribuição dos resíduos.

Figura 21: a) Regressão contra Valores observados b) Resíduos contra Valores observados



a)

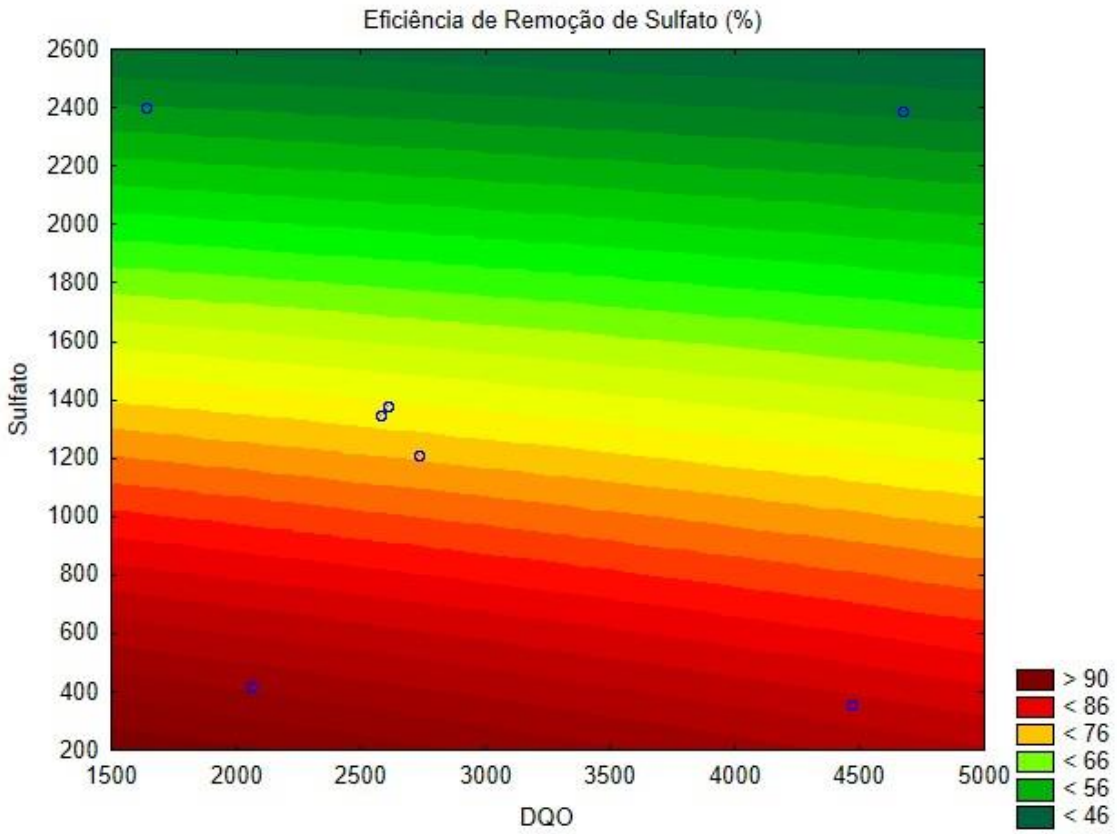


b)

Fonte: A autora

A superfície de resposta mostrada na Figura 20 tem as curvas de nível quase que paralelas ao eixo x, onde ficam os valores de DQO, esse fato já dá indícios que a quantidade de matéria orgânica não deve influenciar significativamente na resposta. Para uma melhor visualização, a Figura 22, possui a superfície de resposta em duas dimensões.

Figura 22: Superfície de reposta para a eficiência de remoção de sulfato em duas dimensões.



Fonte: A autora

A remoção de sulfato acima dos 90% só ocorre quando a concentração inicial é abaixo de aproximadamente 600 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ em todos os casos. Possivelmente, o limite de remoção do sulfato esteja associado ao sulfeto, produto gerado na sulfetogênese (DAMIANOVIC *et al.*, 2016), considerando que os ensaios com menor remoção de sulfato, Ensaio 1 com 50% de remoção e Ensaio 3 com 52%, são aqueles com maior produção de sulfeto teórica, 394 e 416 $mg.L^{-1}$, respectivamente.

Os testes que alcançaram 90% de eficiência de remoção de sulfato foram os que teoricamente produziram menos sulfeto, associados à baixas concentrações de sulfato inicial. A medida que o sulfeto aumentou, a eficiência de remoção de sulfato diminui, porém, a carga de sulfato removida foi elevada, como observado nos Ensaios 1 e 3, o que mostra que não houve limitação para sulfetogênese relacionado a toxicidade ao sulfeto produzido, e que a matéria orgânica disponível não foi limitante para atuação das BRS, mas sim a competição com as arqueias metanogênicas em baixas relações DQO/sulfato. A Tabela 26 mostra a eficiências de remoção de sulfato, junto aos valores teóricos da concentração de sulfeto em todos os testes.

Tabela 26: Resumo das concentrações de sulfeto nos ensaios.

Ensaio	Carga de sulfato removido total (mg)	Eficiência de remoção de Sulfato (%)	Sulfeto (mg/L)
1	**710**	50	394,6
2	190	89	105,6
3	**750**	52	416,7
4	234	94	130,1
5	548	75	304,3
6	579	72	321,8
7	618	75	343,3

Fonte: A autora

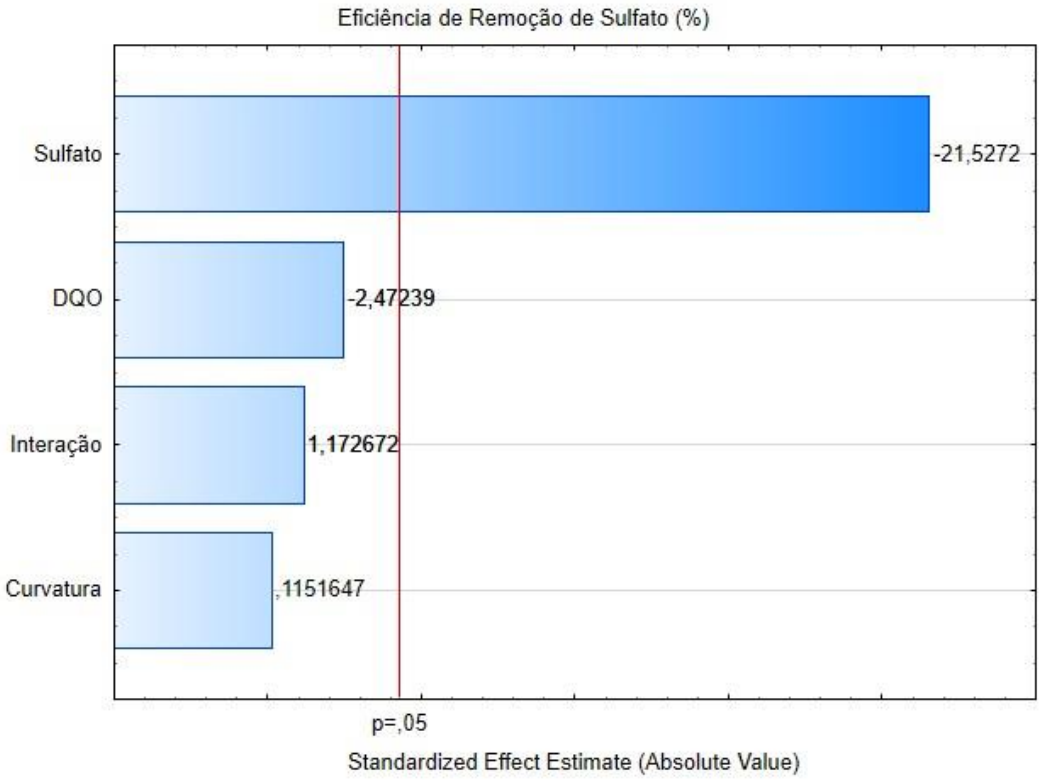
Na Tabela 27 foram expostos os resultados da ANOVA da eficiência de remoção de sulfato, e na Figura 24, está o gráfico de Pareto para a comparação dos efeitos.

Tabela 27: Resultados da ANOVA dos fatores da eficiência de remoção de sulfato.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade.	Média Quadrática	F	p
Curvatura	0,047	1	0,047	0,0133	0,918835
DQO	21,692	1	21,692	6,1127	0,131971
Sulfato	1644,560	1	1644,560	463,4207	0,002151
Interação dos Fatores	4,880	1	4,880	1,3752	0,361693
Resíduos	7,097	2	3,549		
Total	1669,219	6			

Fonte: A autora

Figura 23: Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores na Eficiência de remoção de Sulfato



Fonte: A autora

Observando o Figura 23 e a Tabela 27, observa-se que apenas o sulfato é um fator significativo para a eficiência de remoção de si próprio. Sendo ele negativo, quanto menor o valor de sua concentração, melhor será a resposta de sua eficiência de remoção, porque para todos os testes realizados a relação DQO/sulfato permitiu a ocorrência da sulfetogênese.

O planejamento experimental realizado foi importante para avaliar a resposta conjunta dos fatores interferentes e permitiram concluir que a presença do sulfato contribuiu para remoção de matéria orgânica, portanto foi positiva. Entretanto, o desvio do fluxo de elétrons afetou negativamente a produção de metano, com uma diferença de pelo menos 20% entre ensaios com concentração de sulfato de 300 e 2300 $mg.L^{-1}$, porém, mesmo com um efeito negativo, ele foi permitiu manter os processos de interesse, mantendo a hipótese que a via incompleta de sulfetogênese com a produção de acetato tenha sido importante para a faixa de concentrações testadas.

5.5. BIOLOGIA MOLECULAR – SEQUENCIAMENTO 16S

Houve um total de 174.536 sequencias encontradas, sendo 149.548 sequencias, classificadas em 1661 Unidades Taxonômicas Operacionais (*operational taxonomic units* – OTUs) encontradas no Reino *Bacteria e* 24.975 sequencias classificadas em 97 OTUs no reino *Archaea.* Na Tabela 28 estão dispostos o número de OTUs em cada ordem taxonômica.

Tabela 28: Ordens taxonômicas identificadas na biomassa

Ordem taxonômica	**Bactérias (OTUs)**	**Arqueias (OTUs)**
Filo	25	2
Classe	42	6
Ordem	75	8
Família	132	14
Gênero	258	19

Fonte: A autora

Considerando os gêneros mais importantes para a discussão aqueles que estavam com sua abundância relativa acima de 1%, nas seções seguintes irão ser discutidos os gêneros mais expressivos dos reinos *Bacteria* e *Archaea.*

5.5.1. Domínio *Bacteria*

Dentro da digestão anaeróbia as bactérias iniciam o processo de fermentação com a quebra dos carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios à produção dos ácidos orgânicos voláteis, dióxido de carbono e hidrogênio. Dependendo do arranjo dessa comunidade, pode-se definir a rota para a produção de metano, como também compreender a importância da pressão parcial de hidrogênio e a alcalinidade de meio. Destaca-se que a remoção da matéria orgânica pela via sulfetogênica está desvinculada da pressão parcial de hidrogênio e colabora para remoção de ácido propiônico, contribuindo para redução do acúmulo de ácidos e estabilidade do sistema anaeróbio. Na Tabela 29 estão dispostos os gêneros mais encontrados reinos *Bacteria* juntamente com sua abundância relativa.

Tabela 29: Abundância Relativa dos principais gêneros *Bacteria*.

Gêneros	Abundância Relativa (%)
Moorella	18,66
Clostridium	8,90
Geobacter	8,06
Cytophaga	8,05
Desulfofaba	7,08
Planctomyces	5,79
Bacteroides	4,85
Kosmotoga	4,62
Syntrophus	4,44
Bacillus	3,64
Synergistes	2,51
Bellilinea	2,29
Candidatus cloacimonas	1,36
Parabacteroides	1,10

Fonte: A autora

O Gênero *Moorella* foi o mais abundante encontrado (18,66%), que de acordo com Collins *et al.* (1994) são bactérias com formato de bastonete, gram-positivas, termofílicas (56 a 60 °C), homoacetogênicas, consomem quimiolitotróficamente H_2 e CO_2 ou CO, e quimiorganotroficamente alguns carboidratos ou metanol, produzindo acetato.

Em segundo lugar ficou o gênero *Clostridium* com 8,90% que são organismos em forma de bastonete, gram-positivos, obrigatoriamente anaeróbicos, que formam endósporos (COLLINS *et al*., 1994). Por terem uma definição tão simples ele é um dos gêneros com maior número de espécies, conhecido por ter espécies que são patogênicas e que podem viver no trato gastrointestinal do ser humano. Sua presença no inóculo pode estar relacionada tanto a produção de álcoois como a produção de hidrogênio. Chang *et al*. (2008) e Wong *et al*. (2018) comentam em seus trabalhos que várias espécies do gênero *Clostridium* fazem conversão anaeróbia de carboidratos em acetona, butanol e etanol, e também ácidos voláteis como butirato, lactato e formiato e espécies como *C. beijerinckii*, *C. diolis*, *C. roseum* podem converter hidrogênio a parti de levedura de cervejaria.

Inclusive elas trabalham sintroficamente juntas com as bactérias do gênero *Bacillus* (que no inóculo deste trabalho estão com 3,64% de abundância relativa) para a formação do

hidrogênio. Liesack, Schnell e Revsbech (2000) comentam em seu trabalho que *clostridium* celulolíticos e os *bacillus* aeróbicos são muitas vezes detectados simultaneamente em vários locais onde ocorre degradação de celulose, que é o caso da vinhaça.

Espécies do gênero *Bacillus* são importantes por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares que auxiliam na etapa da hidrólise de compostos insolúveis em monômeros solúveis (COMBET-BLANC et al., 1995; CLERCK et al., 2004). Em seu trabalho, Chang *et al* (2008) observaram que a espécie *B. themoamylovorans* desempenhou um papel importante no aumento de produção de hidrogênio pela *C. beijerinckii*, porque elas estimulam o potencial de produção de hidrogênio e a taxa de produção, além de encurtar a fase de latência, em comparação com uma cultura pura.

As espécies do gênero *Geobacter* (8,06%) são anaeróbias com a capacidade de oxidar acetato e outros ácidos graxos de cadeia curta em CO_2 utilizando substâncias húmicas ou Fe (III) e outros metais, como o aceptor de elétrons (COPPI *et al*., 2001). Algumas espécies conseguem metabolizar o etanol para acetato e assim fazer parte da via acetogênica para a formação de metano. No trabalho de Rotaru *et al*. (2014) e Zhao *et al*. (2015) observou-se que certas espécies do gênero *Geobacter,* capazes de utilizar etanol, podem doar elétrons diretamente para a metanogênese, sendo recebidos pela *Methanosaeta*, na intenção de reduzir dióxido de carbono em metano, no trabalho de Yin *et al*. (2016) observa-se o mesmo comportamento com a *Methanosarcina,* deduzindo que essa via é mais eficiente que a via tradicional que envolve a formação do hidrogênio.

Além disso, algumas espécies de *Geobacter* são capazes de oxidar completamente compostos monoaromáticos como benzoato, fenol, p-cresol e tolueno para CO_2 com Fe (III) como o aceptor de elétrons e também reduzir o nitrato e o fumarato. Sendo o fenol um composto existente na vinhaça, e assim esse gênero pode também estar auxiliando na remoção de toxicidade no meio que pode advir do fenol (COPPI *et al*., 2001).

Já o gênero *Cytophaga* (8,05%) foi descrito por Winogradsky em 1929 com forma de bastonete ou de fuso, Gram-negativo, capaz de digerir polissacarídeos. Aeróbico, principalmente de vida livre. Porém, esse gênero foi estudado por Nakagawa e Yamasato em 1996 e recebeu uma remodelação. Algumas espécies desse gênero são anaeróbias facultativas, mesófilicas, e com pH ótimo de crescimento próximo ao neutro. Fermentam polissacarídeos como xilana, xilose, glicose e outros, produzindo acetato, propionato e succinato. Peptonas, glutamina e NH_4^+ servem como fontes de nitrogênio e sulfeto é a única fonte de enxofre. Considerando que a alimentação era vinhaça, esse gênero deve ter tido uma grande

participação tanto na via de produção de metano pelo acetato, como também auxiliando na eliminação do sulfeto.

O único gênero classificado como BRS é *Desulfofaba* com 7,08% de abundância relativa, suas principais fontes de carbono e doadores de elétrons são ácidos graxos e álcoois que são oxidados incompletamente a acetato. Com a presença de BRS oxidativas incompletas no inóculo, é possível julgar que provavelmente elas tiveram um grande papel auxiliando na produção de acetato para as metanogênicas, como pode ser visto nos resultados do planejamento (KNOBTAUCH; SAHM; JCBRGENSEN, 1999).

O gênero *Planctomyces* com 5,79% de abundância relativa possuem forma bastante diversas, podendo ser esféricas, ovóides, elipsoidais, em forma de lágrima ou bulbiformes. Gram-negativas. Mesófilicas. Encontradas em águas doces, como também em águas estuarinas. Carboidratos são a principal fonte de carbono, em condições anaeróbias há formação de ácidos a partir de glicose, sacarose, maltose e galactose, nitrato é reduzido a nitrito e algumas espécies podem produzir H_2S (HIRSCH, 1972).

O gênero *Bacteroides* com 4,85% de abundância relativa, são células em forma de bastão com extremidades arredondadas, gram-negativas, anaeróbias, mesófilicas (com temperatura ótima de 37º) e pH próximo a neutralidade. Sendo quimiorganotrófica, sacarolítica e fracamente proteolítico, elas são grupo das bactérias acidogênicas. Os principais produtos de fermentação são o succinato e o acetato (SHAH *et al*., 2015).

As Kosmotoga (4,62%) são células gram-negativas, não móveis, com formato de curtas hastes e não formadoras de esporos. Termofílicas com crescimento ótimo a 65º C, pH 6,8 e 2,5-3% NaCl. Anaeróbios quimiorganotróficos, capazes de fermentar carboidratos, peptídeos e piruvato, podendo produzir hidrogênio, CO_2 e ácido acético (DIPIPPO *et al*., 2009).

O gênero Syntrophus com 4,44% de abundância relativa, tem suas células na forma de bastonete com extremidades arredondadas, gram-negativas e não formadoras de esporos. Estritamente anaeróbico e quimiorganotrófico. Mesófilicas, com temperatura ótima entre 28–37º C. O crotonato é fermentado por todas as espécies, enquanto os compostos aromáticos, como o gentisato, a hidroquinona e o cinamato, são fermentados apenas por algumas espécies. Alguns substratos, tais como benzoato ou ácidos graxos, são oxidados na presença de bactérias redutoras de sulfato ou metanogênicas hidrogênotróficas. A oxidação incompleta do substrato pode produzir acetato (KUEVER; SCHINK, 2005).

As Synergistes com 2,51%, tem a forma de bastonetes, são gram-negativas e estritamente anaeróbicas. Certos aminoácidos são fermentados e os produtos formados

incluem formato, acetato, propionato, H_2 e amônia (ALLISON; MACGREGOR; STAHL, 2015).

Bellilinea é o gênero com 2,29% de abundância relativa, elas têm forma filamentosa, não formadoras de pólipos, gram-negativas e estritamente anaeróbicas. O crescimento ocorre sob condições termofílicas e neutrofílicas com crescimento ótimo em 55° C e pH 7,0. Quimioheterotróficas, açúcares, fontes proteicas de carbono e piruvato são usados para o crescimento. O cultivo sintrófico com metanogênicos hidrogenotróficos aumenta a taxa de crescimento (YAMADA; SEKIGUCHI, 2018).

Candidatus cloacimonas com 1,36% de abundância coletiva é uma bactéria bastante encontrada em sistemas anaeróbios, mas precisam de mais estudos, de acordo com Pelletier *et al*. (2008), que fizeram o sequenciamento do genoma da espécie *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*, sugere que espécies desse gênero são anaeróbias, mas conseguem sobreviverem concentrações mínimas de oxigênio, sendo uma bactéria oxidante de propionato que conseguem gerar CO_2 e H_2. Elas possuem modo de vida sintrófico, já que esta via é termodinamicamente favorável apenas quando a pressão do hidrogênio é baixa, formando consórcios sintróficos como bactérias metanogênicas, redutoras de sulfato e acetogênicas

As células do gênero *Parabacteroides (*1,10%) são gram-negativas, obrigatoriamente anaeróbias, não formadoras de esporos, e em forma de bastonete. Os principais produtos finais são os ácidos acético e succínico (SAKAMOTO; BENNO, 2006).

A porcentagem de bactérias capazes de produzir o acetato é de 54,75%, contra 18,5% das produtoras de hidrogênio, o que mostra que existe predisposição da rota metanogênica pela via do acetato ser a mais predominante.

5.5.2. Domínio *Archaea*

As arqueias metanogênicas participam da última etapa do processo de digestão anaeróbia para produção de metano. As arquéias metanogênicas hidrogenotróficas desempenham papel importante para diminuição da pressão parcial de hidrogênio, condição importante para realização da acetogênese. Na Tabela 30 estão dispostos os gêneros de arqueia mais abundantes dos encontrados através do sequenciamento.

Tabela 30: Abundância Relativa dos principais gêneros *Archaea*

Gêneros	Abundância Relativa (%)
Candidatus nitrosocaldus	28,29
Methanosaeta	18,65
Methanolinea	14,83
Methanobacterium	13,39
Thermogymnomonas	8,19
Methanobrevibacter	5,48
Methanocalculus	4,25
Methanofollis	2,34
Methanospirillum	1,27
Methanoculleus	1,02

Fonte: A autora

Inesperadamente, *Candidatus nitrosocaldus* é o gênero das arqueias mais abundante no inóculo sendo 28,29% do total. É uma arqueia oxidante de amônia para nitrito, aeróbia e autotrófica. Utiliza amônia como fonte energia e o CO_2 como fonte de carbono, termófilica com melhor temperatura de crescimento entre 65 e 72º C, e pH neutro ou levemente alcalino, geralmente encontrada em fontes geotermais (DE LA TORRE *et al*., 2008). Porém de acordo com Daebeler *et al*. (2018) existem espécies dentro do gênero que podem ser capazes de fermentar aminoácidos em condições anaeróbias.

A *Methanosaeta*, com 18,65% de abundância relativa, é a única metanogênica acetoclástica dos principais gêneros encontrados, obrigatoriamente anaeróbica, gram-negativa, utilizando acetato como única fonte de energia e CO_2 como fonte de carbono (GIRISHCHANDRA B. PATEL; G. DENNIS SPROTT, 1990).

Sendo seguida pelas demais arqueias hidrogenotróficas, gram-negativas *Methanolinea* (14,83%), *Methanocalculus* (4,25%), *Methanofollis* (2,34%) e *Methanoculleu*s (1,02%), que são da mesma família *Methanomicrobiaceae*, e a Methanospirillum (1,27%). E as gram-positivas, *Methanobacterium*, (13,39%) e *Methanobrevibacter* (5,48%) que também são da mesma família, a *Methanobacteriaceae*. Todas são anaeróbias estritas, e se utilizam de H_2/CO_2 e formato para crescimento e produção de metano (FERRY; SMITH; WOLFE, 1974; BALCH et al., 1979; MAESTROJUAN et al., 1990; OLLIVIER et al., 1998; ZELLNER et al., 1999; WASSERFALLEN et al., 2000; IMACHI et al., 2008)

Porém a *Methanocalculus* tem seu crescimento em concentrações de NaCl variando de 0 a 12,5% com ótimo a 5% de NaC1 (OLLIVIER, *et al*. 1998), e algumas espécies de

Methanofollis e *Methanoculleu*s também pode usar álcoois (propanol, metanol, butanol) como forma de energia (ZELLNER, *et al*. 1999; MAESTROJUAN, *et al*. 1990).

O Gênero *Thermogymnomona* com 8,19% de abundância relativa, é estritamente aeróbico, acidofílico, moderadamente termofílico e heterotrófico. Crescem em uma faixa de pH entre 1,8 e 4,0 com ideal de 3,0. Para crescimento é necessário extrato de levedura e as fontes de carbono e energia são glicose e manose (ITOH, 2016), considerando suas condições de crescimento, é uma *Archaea* que deve ter se desenvolvido na vinhaça utilizada como alimentação do reator de origem do inóculo.

As arqueias capazes de produzir metano pela rota acetogênica identificadas, corresponderam a 18,65% (só o gênero *Methanosaeta*), contra 61,5% das utilizadoras de hidrogênio, ao contrário do que aconteceu na seção 5.5.1. A hipótese levantada é que existe um acúmulo de acetato nos frascos reatores, devido a predisposição das bactérias para a rota acetogênica, já que a pressão parcial de hidrogênio é bem controlada pela quantidade de arqueias hidrogênotroficas existentes no inóculo, sendo assim, a produção de metano também foi influenciada pela velocidade de síntese de novas arqueias metanogênicas acetoclásticas.

6. CONCLUSÕES

A presença de sulfato nos intervalos de concentrações testados não inibiu a metanogênese ou a sulfetogênese. As relações DQO/Sulfato observadas nos testes permitiram a realização dos processos de remoção de matéria orgânica pelas vias metanogênica e sulfetogênica, sendo a participação da sulfetogênese maior para menores relações DQO/sulfato e maiores concentrações de sulfato, associada ao aumento da pressão de seleção para BRS.

O sulfato influenciou negativamente na produção de metano, pelo desvio dos elétrons para a sulfetogênese, provocando redução na produção. Porém, o sulfato pode influenciar na transformação da matéria orgânica, se no inoculo estiver disponível comunidades de BRS oxidátivas incompletas, que facilitariam o acesso ao acetato para as arqueias metanogênicas, considerando as condições ambientais do meio sendo propícias para este fim.

A origem da vinhaça não afetou a remoção de matéria, entretanto a vinhaça da Usina de Pedra possuía mais condições para a comunidade de BRS na remoção de sulfato, fazendo com que houvesse um desvio do fluxo de elétrons, causando redução na produção de metano.

O planejamento experimental realizado foi importante para avaliar a resposta conjunta dos fatores interferentes e permitiram concluir as hipóteses levantadas nas seções iniciais. Dentro do planejamento, o Ensaio 4, com 2063 $mgDQO.L^{-1}$, 416 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ e relação DQO/Sulfato de 5, obteve as melhores eficiências de remoção de sulfato com 94%. O Ensaio 1, com 4670 $mgDQO.L^{-1}$, 2387 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ e relação DQO/Sulfato de 2, obteve a melhor remoção de matéria orgânica, com 94%. E o Ensaio 2, com 4466 $mgDQO.L^{-1}$, 357 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$ e relação DQO/Sulfato de 12,5, obteve a maior produção de metano medida com 332 mL.

Todos os fatores avaliados: DQO, sulfato, e a interação entre os fatores foram significativos para produção de metano, sendo a concentração da matéria orgânica o fator mais influente. O sulfato e a interação dos fatores afetaram negativamente a resposta representando a perda de elétrons da matanogênese que são direcionados a sulfetogênese.

Todos os fatores avaliados foram significativos para remoção de matéria orgânica, com o maior efeito na interação dos fatores, confirmando que o auxílio das BRS foi importante para a eficiência de remoção da matéria orgânica. Ambas as rotas de biodegradação foram significativas e o estabelecimento da sulfetogênese contribuiu positivamente para remoção de matéria orgânica. Entretanto, a rota metanogênica foi a mais relevante, tendo em vista as concentrações de sulfato e matéria orgânica (DQO) testadas.

A eficiência de remoção de sulfato tem apenas ele próprio como um fator significativo. Quanto maior for a concentração de sulfato, menor será sua eficiência de remoção. A remoção de sulfato acima dos 90% só ocorreu quando a concentração inicial esteve abaixo de 600 $mgSO_4^{2-}.L^{-1}$, possivelmente, associado ao sulfeto produzido e à toxicidade inerente.

As arqueias capazes de produzir metano pela rota acetogênica representaram 18,65% (só o gênero *Methanosaeta*), contra 61,5% das utilizadoras de hidrogênio. E a porcentagem de bactérias capazes de produzir o acetato foi de 54,75%, contra 18,5% das produtoras de hidrogênio.

7. RECOMENDAÇÕES

- Realização de estudos com a utilização de modelos quadráticos em um intervalo mais amplo entre os fatores;
- Realização de estudos considerando outros fatores como a produção de sulfeto, e a remoção de metais;
- Realização de análises cromatográficas dos ácidos orgânicos voláteis para incrementar a compreensão do funcionamento das rotas de biodegradação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, M. A. T.; MIRANDOLA, C. A. S.; PIMENTA, D. F. N.; TOMITA, I. N. **Development and validation of a method (GC/TCD) to determine N2, CH4, CO2 and H2S in biogas.** In: XI Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion, 2014. Palacio de Convenciones de La Habana. *Resumos*...Cuba: Comité Organizador. 2014. p. 1972.

ALLISON, M. J.; MACGREGOR, B. J.; STAHL, D. A. Synergistes. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1993–1995, 2015.

BALCH, W. E.; FOX, G. E.; MAGRUM, L. J.; WOESE, C. R.; WOLFE, R. S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiol Rev**, v. 43, n. 2, p. 260–296, 1979. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281474/>.

BARROS NETO B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

BELTRAN, F. J.; GARCIA-ARAYA, J. F.; ALVAREZ, P. M. Wine distillery wastewater degradation. 2. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (ozone)-biological treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3919–3924, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Cana-de-açúcar.** Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> acesso em: 29 jan. 2017.

CAMPOS, J. R.; C., A.; HAANDEL, V.; AUGUSTO, C.; CHERNICHARO; ONOFRE, C.; NETO, A.; MARQUES, D. da M.; NOUR, E. A.; FORESTI, E.; NADAI, F. de; ANDREOLI; SOUZA, H. N. de; MELO; RODRIGUES, J. A.; PEREIRA; DAVILSON, J.; PAGLIUSO; MARCELO; ZAIAT; LOURDINHA; FLORÊNCIO; FERNANDO, L.; CYBIS; OLINTO, L.; MONTEGGIA; MANUEL; LUCAS FILHO; MARCOS; VON SPERLING; TAKAYUKI, M.; KATO; MANSUR, M.; AISSE; FEITOSA, P. F.; CAVALCANTI; ALÉM, P.; SOBRINHO; DE, R. F.; FIGUEIREDO; RONALDO; STEFANUTTI. **Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo**. Rio de Janeiro: ABES, 1999.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4516–4522, 2011. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000080107>.

CESTESB. **Decisão de Diretoria nº 045/2015/C, de 12 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre a homologação da 2ª versão da 3ª edição da Norma Técnica CETESB P 4.231 - Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola – outubro/2014. Diário Oficial do Estado de São Paulo.** Brasil, 2015. Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2014/12/DD-045-2015-C.pdf>

CHANG, J. J.; CHOU, C. H.; HO, C. Y.; CHEN, W. E.; LAY, J. J.; HUANG, C. C. Syntrophic co-culture of aerobic Bacillus and anaerobic Clostridium for bio-fuels and bio-

hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5137–5146, 2008.

CLERCK, E. De; VANHOUTTE, T.; HEBB, T.; GEERINCK, J.; DEVOS, J.; VOS, P. De. Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts Isolation , Characterization , and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. **American Society For Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3664–3672, 2004.

COELHO, S. T.; GOLDEMBERG, J.; LUCON, O.; GUARDABASSI, P. Brazilian sugarcane ethanol: lessons learned[1]. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, n. 2, p. 26–39, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0973-0826(08)60529-3>.

COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J. J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J. A. E. The Phylogeny of the Genus Clostridium: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 812–826, 1994. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-44-4-812>.

COMBET-BLANC, Y.; OLLIVIER, B.; STREICHER, C.; PATEL, B. K. C.; DWIVEDI, P. P.; POT, B.; PRENSIER, G.; GARCIA, J.-L. Bacillus thermoamylovorans sp. nov., a Moderately Thermophilic and Amylolytic Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 1, p. 9–16, 1995. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/15341040_Bacillus_thermoamylovorans_sp._nov._a_moderately_thermophilic_and_amylolytic_bacterium>.

COPPI, M. V; LEANG, C.; SANDLER, S. J.; LOVLEY, D. R. Development of a Genetic System for Geobacter sulfurreducens Development of a Genetic System for Geobacter sulfurreducens. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3180–3187, 2001.

DAEBELER, A.; HERBOLD, C. W.; VIERHEILIG, J.; SEDLACEK, C. J.; PJEVAC, P.; ALBERTSEN, M.; KIRKEGAARD, R. H.; DE LA TORRE, J. R.; DAIMS, H.; WAGNER, M. Cultivation and genomic analysis of “Candidatus Nitrosocaldus islandicus,” an obligately thermophilic, ammonia-oxidizing thaumarchaeon from a hot spring biofilm in Graendalur valley, Iceland. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–16, 2018.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Anaerobic Degradation of Synthetic Wastewaters at Different Levels of Sulfate and COD/Sulfate Ratios in Horizontal-Flow Anaerobic Reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 3, p. 383–393, 2007. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ees.2006.0067>.

DAMIANOVIC, M. H. R.; SAIA, F. T.; DE GODOI, L. A. G.; FORESTI, E. Long-term operation of anaerobic immobilized biomass reactor treating organic wastewater containing sulfate. **Journal of Water Process Engineering**, v. 13, p. 100–106, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.08.009>.

DE LA TORRE, J. R.; WALKER, C. B.; INGALLS, A. E.; KÖNNEKE, M.; STAHL, D. A. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 810–818, 2008.

DE SMUL, A.; GOETHALS, L.; VERSTRAETE, W. Effect of COD to sulphate ratio and temperature in expanded-granular- sludge-blanket reactors for sulphate reduction. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 407–416, 1999.

DIAS, M. F.; COLTURATO, L. F.; DE OLIVEIRA, J. P.; LEITE, L. R.; OLIVEIRA, G.; CHERNICHARO, C. A.; DE ARAÚJO, J. C. Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 58–66, 2016.

DIAS, M. O. de S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>.

DIPIPPO, J. L.; NESBØ, C. L.; DAHLE, H.; DOOLITTLE, W. F.; BIRKLAND, N. K.; NOLL, K. M. Kosmotoga olearia gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic heterotroph isolated from an oil production fluid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 2991–3000, 2009.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste management & research : the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA**, v. 29, n. 12, p. 1235–50, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242176>.

FEITOSA CAVALCANTI, P. F.; SOUTO MEDEIROS, E. J.; MENEZES SILVA, J. K.; VAN HAANDEL, A. Excess sludge discharge frequency for UASB reactors. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 211–219, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00628-9>.

FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; SAAVEDRA DEL AGUILA, N. K.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, n. 2, p. 143–148, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.esd.2010.03.004>.

FERRY, J. G.; SMITH, P. H.; WOLFE, R. S. Methanospirillurn, a new genus of methanogenic Bacteria , and characterization of Methanospirillurn hungatii sp . nov . **International journal of systematic bacteriology**, v. 24, n. 4, p. 465–469, 1974.

GIRISHCHANDRA B. PATEL; G. DENNIS SPROTT. Methanosaeta concilii gen. nov. sp. nov. (“Methanothrix concilii”) and Methanosaeta thermoacetophila nom. rev., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 1, p. 79–82, 1990.

GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater L. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p. 1644–1652, 2015.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O&APOS;DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

HAO, O. J.; CHEN, J. M.; HUANG, L.; BUGLASS, R. L. Sulfate-reducing bacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 155–187, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10643389609388489>.

HAO, T. wei; XIANG, P. yu; MACKEY, H. R.; CHI, K.; LU, H.; CHUI, H. kwong; VAN

LOOSDRECHT, M. C. M.; CHEN, G. H. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, v. 65, p. 1–21, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.043>.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent Developments in Hydrogen Management During Anaerobic Biological Wastewater Treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 585-602, 1986.

HIRSCH, P. Two Identical Genera of Budding and Stalked Bacteria: Planctomyces Gimesi 1924 and Blastocaulis Henrici and Johnson 1935. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, n. 2, p. 107–111, 1972. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00207713-22-2-107>.

HU, Y.; JING, Z.; SUDO, Y.; NIU, Q.; DU, J.; WU, J.; LI, Y. Y. Effect of influent COD/SO42- ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. **Chemosphere**, v. 130, p. 24–33, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.019>.

IMACHI, H.; SAKAI, S.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. Methanolinea tarda gen. nov., sp. nov. a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 294–301, 2008.

ITOH, T. Thermogymnomonas. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 2016.

JEONG, T. Y.; CHA, G. C.; SEO, Y. C.; JEON, C.; CHOI, S. S. Effect of COD/sulfate ratios on batch anaerobic digestion using waste activated sludge. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 693–697, 2008.

KIYUNA, L. S. M.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 103–112, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.028>.

KNOBTAUCH, C.; SAHM, K.; JCBRGENSEN, B. B. Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of Desulfofrigus oceanense gen. nov., sp. nov., Desulfofrigus fragile sp. nov., Desulfofaba gelida gen. nov., sp. nov., Desulfotalea psychrophila g. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1631–1643, 1999.

KUEVER, J.; SCHINK, B. Syntrophus. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–5, 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118960608.gbm01064>.

LAANBROEK, H. J.; GEERLIGS, H. J.; SIJTSMA, L.; VELDKAMP, H. Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 2, p. 329–34, 1984. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

LENS, P. N. L.; VISSER, A.; JANSSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G.

Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.

LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N. P. Microbiology of £ ooded rice paddies. v. 24, 2000.

MAESTROJUAN, G. M.; BOONE, D. R.; XUN, L.; MAH, R. A.; ZHANG, L. . Transfer of Methanogenium bourgense, Methanogenium marisnigri, Methanogenium olentangyi, and Methanogenium thermophilicum to the Genus Methanoculleus gen. nov., Emendation of Methanoculleus marisnigri and Methanogenium, and Description of New Strains of M. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 2, p. 117–122, 1990.

MARTINS, T. H. **Apostila sobre o uso de teste manométrico para determinação de atividade específica em lodos biológicos.** Rotina de operação e análise de biodegradação manométrica, v. 02. 2015.

MASON, R.L.; GUNST, R. F.; HESS, J. L. **Statistical Design and Analysis of Experiments, with Applications to Engineering and Science**. 2. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc., 1989.

MCCARTY, P.L. (1964) Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. **Public Works**, v.95, n.9, 10, 11 e 12.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>.

MOSEY, F.E. Mathematical modeling of the anaerobic process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p 209-232, 1983.

MOTTERAN, F. **Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada.** 2013. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–454, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1892>.

NAKAGAWA, A. L. Cytophaga. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 2015.

OLLIVIER, B.; FARDEAU, M.; CAYOL, J.; MAGOT, M.; PATEL, B. K. C.; PRENSIEP, G.; GARCIA, J. Methanocalculus halotolerans gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 48, n. 1 998, p. 821–828, 1998.

OMIL, F.; LENS, P.; HULSHOFF POL, L.; LETTINGA, G. Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 7, p. 699–710, 1996.

OUDE ELFERINK, S.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L. W.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2–3, p. 119–136, 1994. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00130.x>.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, 2007.

PEIXOTO, G.; PANTOJA-FILHO, J. L. R.; AGNELLI, J. A. B.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012.

PELLETIER, E.; KREIMEYER, A.; BOCS, S.; ROUY, Z.; GYAPAY, G.; CHOUARI, R.; RIVIÈRE, D.; GANESAN, A.; DAEGELEN, P.; SGHIR, A.; COHEN, G. N.; MÉDIGUE, C.; WEISSENBACH, J.; LE PASLIER, D. "Candidatus Cloacamonas acidaminovorans": Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2572–2579, 2008.

POL, L. W. H.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. **Biodegradation**, v. 9, n. 182655, p. 213–224, 1998a.

PORTAL ACTION. **Experimento Composto Central**. Disponivel em: <http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/611-experimento-composto-central>. Acesso em: 16 Fev. 2018.

PRASAD, R. K.; KUMAR, R. R.; SRIVASTAVA, S. N. Design of optimum response surface experiments for electro-coagulation of distillery spent wash. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 191, n. 1–4, p. 5–13, 2008.

REIS, M. a; ALMEIDA, J. S.; LEMOS, P. C.; CARRONDO, M. J. Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, n. 5, p. 593–600, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601155>.

ROBINSON, J. A.; TIEDJE, J. M. Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H2 under resting and growing conditions. **Archives of Microbiology**, v. 137, p. 26–32, 1984.

ROTARU, A.-E.; SHRESTHA, P. M.; LIU, F.; SHRESTHA, M.; SHRESTHA, D.; EMBREE, M.; ZENGLER, K.; WARDMAN, C.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. 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.**, v. 7, n. 1, p. 408–415, 2014. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3EE42189A>.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov and Parabacteroides merdae comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1599–1605, 2006.

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 9, p. 1101–1107, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.03.001>.

SHAH, A. L.; LIU, C.; HWY, R. H.; FINEGOLD, S. M.; MEDICAL, V. A.; F, I. D. S.;

ANGELES, L. Bacteroides. 2015.

SHIN, H. S.; JUNG, J. Y.; BAE, B. U.; PAIK, B. C. Phase-separated anaerobic toxicity assays for sulfate and sulfide. **Water Environment Research**, v. 67, n. 5, p. 802–806, 1995. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029329266&partnerID=tZOtx3y1>.

SPEECE, R.E. Environmental requirements for anaerobic digestion of biomass. In: Böer, K.W.; Duffie, J.A. (Ed.). **Advances in Solar Energy - An annual review of research and Development**. Boston: Springer, 1985, v. 2, p. 51-123.

VILELA, R. S.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 8, p. 1669–1675, 2014.

VISSER, A.; BEEKSMA, I.; VAN DER ZEE, F.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 549–556, 1993.

VISSER, A.; GAO, Y.; LETTINGA, G. Effects of pH on Methanogenesis and Sulfate Reduction in Thermophilic (55 °C) UASB Reactors. **Bioresource Technology**, v. 44, n. 2, p. 113–121, 1993.

VISSER, A.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 99–110, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0273-1223(96)00324-1>.

WASSERFALLEN, A.; NÖLLING, J.; PFISTER, P.; REEVE, J.; DE MACARIO, E. C. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic Methanobacterium isolates supports the Phylogenetic analysis of 18 thermophilic Methanobacterium isolates supports the proposals to create a new genus, Methanothermobacter gen. nov., and to reclassify several isola. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 43–53, 2000.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; LING, T. C.; SHOW, P. L.; LEE, S. Y.; CHANG, J. S.; IBRAHIM, S.; JUAN, J. C. Evaluating new bio-hydrogen producers: Clostridium perfringens strain JJC, Clostridium bifermentans strain WYM and Clostridium sp. strain Ade.TY. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 5, p. 590–598, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.012>.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y. Bellilinea. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 4–6, 2018.

YIN, Q.; ZHU, X.; ZHAN, G.; BO, T.; YANG, Y.; TAO, Y.; HE, X.; LI, D.; YAN, Z. Enhanced methane production in an anaerobic digestion and microbial electrolysis cell coupled system with co-cultivation of Geobacter and Methanosarcina. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 42, n. Daping Li, p. 210–214, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.07.006>.

YODA, M.; MIYAJI, Y.; KITAGAWA, M. Long Term Competition Between Sulfate Reducing and Methane Producing Bacteria for Acetate in Anaerobic Biofilm. **Water Research**, v. 21, n. 12, p. 1547–1556, 1987.

ZELLNER, G.; BOONE, D. R.; K, J.; WHITMAN, B.; TINDAL, B. J.; STACKEBRANDT, E.; W, C. R. and Methanogenium liminatans as Methanofollis tationis gen . nov ., comb . now and Methanofollis lirninatans comb . nov . and limina tans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 1 999, p. 247–255, 1999.

ZHAO, Z.; ZHANG, Y.; WANG, L.; QUAN, X. Potential for direct interspecies electron transfer in an electric-anaerobic system to increase methane production from sludge digestion. **Scientific Reports**, v. 5, n. June, p. 1–12, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep11094>.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.

APÊNDICE A

MONTAGEM DOS FRASCOS REATORES

Antes de início da montagem é necessário já ter os dados de DQO solúvel da vinhaça bruta que vai ser utilizada, DQOsv (mg/L), o SVT (mg/L) ou PSVT do lodo e a concentração do sulfato na vinhaça, Csv (mg/L).

Considerando que o volume útil do frasco reator é de 600 mL ou 0,6 L, e a concentração de DQO proveniente da vinhaça que se quer obter no frasco reator é F (mg de DQO/L).

$$Volume\ de\ vinhaça\ (mL) = \frac{(F * 600)}{DQOsv}$$

A quantidade de microrganismo depende da relação F/M escolhida. Considerando um F/M de 0,5.

$$M\ (mg/L) = \frac{F}{0{,}5}$$

Com o M, para saber volume de lodo que será utilizado divide o valor pelo o SVT.

$$Volume\ de\ Lodo\ (mL) = \frac{M}{SVT}$$

Se for utilizar a Massa, usa o PSTV explicado no material e métodos (p.31).

$$Massa\ de\ Lodo = \frac{M}{PSTV}$$

Para ajustar a concentração de sulfato inicial no reator, se subtrai a concentração já existente na vinhaça (Csv) da concentração pretendida pelo planejamento (Csp).

$$Sulfato\ a\ ser\ adicionado\ (mg/L) = Csp - Csv$$

Sabendo a concentração de sulfato a ser adicionada, o reagente utilizado para essa suplementação foi o Na_2SO_4 anidro, onde:

142g/mol de Na_2SO_4 = 96 g/mol de SO_4^{2-}

$$Massa\ de\ sulfato\ \ (mg) = \frac{142 * Sulfato\ a\ ser\ adicionado * 0{,}6}{96}$$

Sendo 0,6 L correspondente aos 600 mL do volume útil do frasco. Para o ajuste de pH da vinhaça com bicarbonato se utilizou $NaHCO_3$ anidro, onde:

84g/mol $NaHCO_3$ = 61g/mol HCO_3

$$Massa\ de\ Bicarbonato\ (g) = \frac{\frac{F * 84}{61}}{1000}$$

O volume das soluções de macro e micronutrientes também é feito com base na DQO inicial do frasco (F), baseados na metodologia de Martins *et al.* (2015), onde se utiliza 1µl a cada 100 mL de volume útil, em uma concentração de 5 mg DQO/L.

$$Volume\ das\ Soluções\ (\mu l) = \frac{\left(\frac{F}{1000}\right) * 100}{5}$$

O volume de água para a diluição de todos os componentes e completar o volume do fraco para 600 mL, era feito sem considerar a massa dos sólidos, partindo do princípio que eles seriam solubilizados nos 600 mL do frasco.

$$Volume\ de\ água = 600 - \left(V_{Vinhaça} + V_{Lodo} + \left(\left(\frac{V_{soluções}}{1000}\right) * 2\right)\right)$$

MEDIÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO

Para saber os valores de produção de metano, era necessário se fazer duas medições, a pressão dentro do frasco reator, e a composição do gás através da cromatografia gasosa. A

pressão era medida antes e depois de colhimento de uma amostra de gás para a cromatografia. A variação de pressão é dada por ΔP, onde:

ΔP = Pressão antes da amostra - Pressão depois da amostra anteriormente feita

No colhimento de cada amostra existe uma perda do biogás, tanto pela remoção da agulha da vedação, como a própria amostra em si, então a Perda na amostra é dada por:

Perda = Pressão antes da amostra atual - Pressão depois da amostra atual

Para saber a pressão real (o medidor de pressão mede diferença de pressão entre a pressão atmosférica e a pressão no frasco), é necessário somar com a pressão atmosférica local.

$$P_R = (\Delta P + Perda\ na\ medição\ anterior + Pressão\ Atmosférica\ local)$$

Para o cálculo do volume de metano se utiliza os dados fornecidos pela cromatografia, que forneceu as quantidades de N_2, CH_4, CO_2, e H_2S na amostra em µmol. O método utilizado foi usando a fração parcial, que seria, considerar a soma do mol de todos os gases como 100%, e cada gás ser uma fração dessa porcentagem. Para encontrar a fração de metano no biogás:

$$f_{CH4} = \frac{Mol_{CH4}}{Mol_{N2} + Mol_{CH4} + Mol_{CO2} + Mol_{H2S}}$$

Depois se utiliza PV=nRT para encontrar o número de mol do biogás ($n_{biogás}$), onde R ($atm.L.K^{-1}.mol^{-1}$) = 0,082, T_e = temperatura do ensaio (K), V_h = volume do headspace do frasco reator (L)

$$n_{biogás} = \frac{P_R\ x\ V_h}{R\ x\ T_e}$$

Sabendo $n_{biogás}$, multiplica o valor da fração de metano (f_{CH4}), para saber o número de mol do metano (n_{CH4}), e utilizando PV=nRT novamente, mas agora para descobrir o volume de metano produzido na CNTP.

$$Volume\ de\ Metano\ (L, CNTP) = \frac{n_{CH4}\ x\ R\ x\ 273{,}15}{Pressão\ local}$$

APÊNDICE B

DADOS UTILIZADOS

Reator	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/ Sulfato	F/M (g.DQO/ g.SVT)	DQO Final (mg/L) (Com ZnSO4)	Sulfato Final (mg/L)	DQO removida total (mg/L)	Sulfato removido total (mg/L)	DQO removida via Sulfetogênica (mg/L)	DQO removida via Metanogênica (mg/L)	Metano Real produzido (mL) (CNTP)
R1	4320	628	6,88	0,54	429	10	3891	618	248	3643	305
R2	4135	708	5,84	0,52	347	10	3788	698	281	3507	301
R3	4950	2189	2,26	0,62	213	1242	4737	947	381	4356	292
R4	4670	2387	1,96	0,58	286	1203	4384	1184	476	3908	259

Reator	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/ Sulfato	F/M (g.DQO/ g.SVT)	DQO Final (mg/L) (Com ZnSO4)	Sulfato Final (mg/L)	DQO removida total (mg/L)	Sulfato removido total (mg/L)	DQO removida via Sulfetogênica (mg/L)	DQO removida via Metanogênica (mg/L)	Metano Real produzido (mL) (CNTP)
R1.1	1610	156	10,32	0,36	160	40	1450	116	47	1404	207
R1.2	1607	158	10,19	0,36	142	51	1465	107	43	1422	198
R1.3	2052	438	4,69	0,46	104	10	1948	428	172	1776	176
R1.4	2063	417	4,95	0,46	154	26	1910	390	157	1753	178
R2.1	1692	163	10,36	0,23	168	103	1524	60	24	1500	246
R2.2	1735	171	10,16	0,23	137	91	1598	80	32	1566	242
R2.3	1525	755	2,02	0,20	177	108	1348	648	260	1088	201
R2.4	2010	773	2,60	0,27	180	124	1830	649	261	1569	206
R3.1	2375	715	3,32	0,59	339	152	2036	563	377	1659	236
R3.2	2397	741	3,23	0,59	238	48	2159	694	465	1694	233

Reator	DQO Inicial (mg/L)	Sulfato Inicial (mg/L)	DQO/ Sulfato	F/M (g.DQO/ g.SVT)	DQO Final (mg/L) (Com ZnSO4)	Sulfato Final (mg/L)	DQO removida total (mg/L)	Sulfato removido total (mg/L)	DQO removida via Sulfetogênica (mg/L)	DQO removida via Metanogênica (mg/L)	Metano Real produzido (mL) (CNTP)
RP1.1	4670	366	12,78	0,64	1072	39	3598	327	219	3379	331
RP1.2	4250	331	12,84	0,58	940	11	3310	320	215	3095	368
RP2.1	3507	306	11,46	0,62	731	30	2775	276	185	2590	322
RP2.2	3275	238	13,74	0,58	678	5	2597	234	157	2440	317
RP3.1	2375	715	3,32	0,59	339	152	2036	563	377	1659	236
RP3.2	2397	741	3,23	0,59	238	48	2159	694	465	1694	233

ANEXO A

COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES

Tabela 31: Composição das soluções de macro e micronutrientes

Solução I: Macronutrientes	**Massa para 1,0 litro (mg)**
NH_4Cl	73,6
KH_2PO_4	13,6
$(NH_4)_2SO_4$	13,6
Solução II: Micronutrientes	
$FeCl_2.4H_2O$	2000
$CoCl_2.6H_2O$	2000
$MnCl_2.4H_2O$	500
$CuCl_2.2H_2O$	30
$(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$	50
$NiCl_2.6H_2O$	10
$ZnCl_2.H_2O$	50
H_3PO_3 (Solução saturada)	1 mL