UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MOARA YURI UTINO BARBOSA

**Reator anaeróbio alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar: avaliação dos efeitos
causados pela interrupção na alimentação e estratégias para mitigação.**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2017

MOARA YURI UTINO BARBOSA

Reator anaeróbio alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar: avaliação dos efeitos causados pela interrupção na alimentação e estratégias para mitigação.

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

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

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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

B228r Barbosa, Moara Yuri Utino
Reator anaeróbio alimentado com vinhaça de
cana-de-açúcar: avaliação dos efeitos causados pela
interrupção na alimentação e estratégias para
mitigação. / Moara Yuri Utino Barbosa; orientador
Márcia H.R. Zamariolli Damianovic. São Carlos, .

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

1. UASB. 2. Entressafra. 3. Repartida. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **MOARA YURI UTINO BARBOSA**.

Título da dissertação: "Reator anaeróbio alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar: avaliação dos efeitos causados pela interrupção na alimentação e estratégias para mitigação".

Data da defesa: 04/08/2017.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof. Dr. **Erich Kellner**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Prof. Dr. **Rafael Brito de Moura**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

APROVADO

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

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

Dedico esse trabalho aos meus pais Marco
Aurélio e Elisa Yassuko.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por estar sempre presente na minha vida e por ter me iluminado nessa jornada, por permitir conhecer pessoas incríveis no qual tive o imenso prazer de conviver nesses anos de mestrado.

À minha família que ofereceram todo apoio emocional e condições financeiras para conclusão da graduação e pelo incentivo de continuar a estudar e ingressar no mestrado.

À Universidade de São Paulo (USP), à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento (PPG-SHS) e ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB).

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Márcia Helena Damianovic por ter depositado tanta confiança em minha pessoa, por acreditar no meu potencial e por sempre estar disposta a ajudar. É uma pessoa maravilhosa que desde o primeiro dia que a conheci já comecei a admirá-la, tanto pelo seu lado profissional como ser humano. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, pela preocupação não só com o trabalho mas com a vida pessoal dos seus orientados, tornou-se o meu maior exemplo.

À Valeria Del Nery por todo o suporte e ajuda, por todos os conhecimentos transmitidos, por me acalmar nos momentos de dificuldades o que me fez crescer ainda mais como pesquisadora e pela paciência. Uma pessoa sensacional que dispensa comentários, um dos maiores exemplos de profissionais que tive o prazer de conhecer e conviver.

À minha melhor amiga e irmã Inaê Alves por toda ajuda no laboratório e na casinha, pela paciência, palavras de apoio, conselhos, conhecimentos transmitidos, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis e alegres, pelos momentos de diversão e companheirismo, por ter se tornado não só colega de trabalho, mas uma amiga para vida. Nunca vou conseguir agradecer tudo que fez por mim e continua fazendo, te admiro profissionalmente e por ser essa pessoa linda e sensacional.

À família “Sancabadalada” Wesley, Rogrigo, Ju Argente, Ju Silva, Julinda Albuquerque, Sayuri, Alejandra, Raíssa, Giz, Alana, Inaê, Ulisses, Carol Granato, Carol Ferreria, Paulo, Elias, Cebola, Tainá, Mirian, Jéssica, Mayara, Eliza, Léo, Bárbara pela amizade linda e sincera que construímos, por deixar essa jornada mais leve e divertida e pelos vários momentos alegres e inesquecíveis que compartilhamos.

Aos amigos do LPB, Carla Diniz, Carol Gil, Cristiane Arruda, Drica Maluf, Fabrício Motteran, Guilherme Oliveira, Juliana Kawanishi, Laís Américo, Leandro Godoi, Lucas Fuess, Marcus Vinicius, Vanessa Silva, Rogério Vilela, Rodrigo Carneiro, Ana Flávia, Fiaz,

Jéssica “Foresti”, Inaê, Alejandra, Raíssa, Elias, Alana, Léo, Carol Granato, Cebola, Tainá, Jéssica Soares, Mirian, Giz, Rafa, profissionais exemplares, todo dia aprendia algo com vocês.

À Carla Diniz pela ajuda no inglês em vários trabalhos.

Ao pessoal do SHS pela amizade construída e pelos momentos de festa e diversão.

Aos meus velhos amigos de escola e graduação Felipe, Patrícia, Nati, Dayane, Mylena e Fer.

À Gabi Barbosa pela ajuda, conselhos e companheirismo que apesar da distância sempre se fez presente e acompanhou essa jornada São Carlense.

À Eloisa Pozzi e a Isabel Sakamoto, que auxiliaram nas técnicas de Biologia Molecular.

À Janja, Inês e Carol Sabatini pela paciência e ajuda nos laboratórios de cromatografia e de análises físico químicas.

Aos professores do LPB, Eugenio Foresti, Marcelo Zaiat, Maria Bernadete, pelos ensinamentos.

À CAPES pela bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

BARBOSA, M.Y.U. **Reator anaeróbico alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar: avaliação dos efeitos causados pela interrupção na alimentação e estratégias para mitigação.** 2017. 146 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O tratamento biológico anaeróbico aparece como uma opção importante para remover a carga orgânica poluidora da vinhaça, e vem despertando interesse entre pesquisadores do mundo todo devido aos sucessos já alcançados, principalmente em trabalhos científicos. O interesse científico aponta para o aprimoramento do processo de degradação desse efluente em taxas elevadas, além de promover a produção de biogás, com potencial para produção de energia. A tecnologia de tratamento anaeróbico mais utilizada para o tratamento da vinhaça é o reator UASB, apresentando resultados satisfatórios inclusive em unidades em escala plena. A interrupção do funcionamento do reator em períodos de entressafra é, indubitavelmente, um problema a ser enfrentado na operação do reator UASB, cujo período de partida é lento. A repartida do sistema é agravada nos reatores de alta taxa, requerendo estratégias adequadas para reduzir o período necessário permitindo mitigar prontamente os efeitos do aporte de vinhaça ao ambiente e recuperar energia a partir dessa matriz. Diante disso, um reator anaeróbico de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) em escala piloto foi utilizado para o estudo da repartida do sistema e do tratamento da vinhaça e do melaço, sendo o último utilizado como fonte de carbono no período relativo à entressafra. O reator UASB foi operado durante 335 dias. Na Fase I utilizou-se a vinhaça como afluente, na Fase II o melaço de cana-de-açúcar e na Fase III novamente a vinhaça. Após período de interrupção de 30 dias, o período de repartida do sistema em estudo foi de 69 dias. Logo no início da repartida do reator, a eficiência de remoção de DQO foi superior a 80%, alcançando eficiência de 89,95 % em apenas oito dias de operação. O reator UASB apresentou valor médio de eficiência de remoção de DQO para as Fases I (vinhaça), II (melaço) e III (vinhaça) de $84 \pm 3,35$ %; $82 \pm 5,12$ % e $80 \pm 9,22$ %, para cargas aplicadas de 5 a $34 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e 5 a $19 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Em relação à produção de metano, de todo o período operacional, a Fase I referente à repartida do reator utilizando vinhaça como substrato após um mês sem alimentação foi a que apresentou a maior produção média no período, $7,93 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$, devido aos maiores valores de carga orgânica volumétrica (COV) aplicadas (5 a $34 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). A Fase II referente ao período de entressafra utilizando o melaço, foi de $7,28 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$ devido ao acúmulo de ácidos voláteis totais. A Fase III com retorno da safra utilizando a vinhaça, foi de $1,23 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$ devido aos menores valores de carga aplicada ao reator (5 a $8,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). As análises microbiológicas mostraram elevada diversidade microbiana e permitiu observar que com a utilização do melaço ocorreu alteração da população de microrganismos presente no reator, que apresentaram longo período de adaptação quando submetidos novamente à vinhaça, na última fase de operação. De forma geral, os resultados apontam que a tecnologia UASB é adequada no tratamento de vinhaça e melaço de alta carga orgânica e na geração de biogás. A substituição por melaço permitiu obter produção de biogás semelhante ao uso da vinhaça, entretanto dificultou a repartida, quando substituído pela vinhaça novamente (Fase III).

Palavras – chave: UASB. Entressafra. Repartida.

ABSTRACT

BARBOSA, M.Y.U. **Anaerobic reactor fed with sugarcane vinasse: evaluation of the effects caused by interruption in feeding and strategies for mitigation.** 2017. 146 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Biological anaerobic treatment systems are a promising approach for the removal of organic loading content of vinasse. Previous studies have demonstrated the optimization of the vinasse degradation process at high rates, promoting the biogas production with potential for energy use. Upflow anaerobic with sludge blanket (UASB) is the most applied anaerobic technology for the treatment of vinasse. Such reactor configuration presents satisfactory results even in full-scale units. The interruption of reactor operation during the off-season is undoubtedly an operational problem to be faced, whose restarting period is slow. The system restarting is intensified in high-rate reactors, requiring adequate strategies to reduce the time needed to mitigate the environmental effects of vinasse supply and to recover energy from that matrix. Therefore, a pilot-scale UASB was used to investigate the system restart and the treatment of vinasse and molasses. Sugarcane molasses was used as the carbon source during the off-season period. The system was operated during 335 days. The operational procedure consisted of three phases, in which different streams were used as carbon source: vinasse (Phases I), sugarcane molasses (Phases II) and vinasse (Phases III). After an interruption period of 30 days, the restarting period was 69 days. At the beginning of the restarting period, the average COD removal efficiency was higher than 80%, reaching COD removal efficiencies of 89.95% in only eight days of operation. The average COD removal efficiencies for Phases I (vinasse), II (molasses) and III (vinasse) were $84 \pm 3.35\%$; $82 \pm 5.12\%$ and $80 \pm 9.22\%$, respectively. Those removal efficiencies were achieved with organic loading rate 5 to $34 \text{ kgCOD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, $33 \text{ kgCOD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ and 5 to $19 \text{ kgCOD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectively. Regarding methane (CH_4) production, Phase I (vinasse as substrate after one month without feeding) presented the highest average CH_4 production ($7.93 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$), due to the higher values of OLR (5 to $34 \text{ kgCOD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). The CH_4 production during Phase II (off-season using molasses as substrate) was $7.28 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$, due to the accumulation of volatile fatty acids (VFA). In Phase III, in which vinasse was applied again as substrate the CH_4 production was $1.23 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$, due to the lower values of organic loading rate to the reactor (5 to $8.5 \text{ kgCOD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). Microbiological analyses showed high microbial diversity in biomass developed at UASB reactor. Moreover, it was possible to observe that with molasses used as carbon source probably promotes changes in the microorganisms population. After period with molasses feeding, such microbiota presented a long adaptation period when resubmitted to vinasse, as the main carbon source in the feeding. In general, the results indicate that the UASB configuration was adequate for the vinasse and molasses treatment at high organic loading rate, resulting in high biogas production. In which the feeding with sugarcane molasses resulted in a biogas production similar to that obtained by vinasse feeding, but it made it difficult to divide when replaced by vinasse (Phase III).

Keywords: UASB. Off – season. Restart-up.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima.....	25
Figura 2. Opções tecnológicas para a destinação da vinhaça.	28
Figura 3. Instalação Experimental a) Fluxograma do sistema de tratamento b) Reator UASB utilizado na pesquisa (A).	50
Figura 4. Bomba.....	51
Figura 5. Sistema de medição de biogás.	51
Figura 6. Fluxograma das fases experimentais.	52
Figura 7. Tanques contendo vinhaça.....	55
Figura 8. Vinhaça concentrada.....	56
Figura 9. Peneira.	56
Figura 10. Melaço concentrado utilizado na pesquisa.	57
Figura 11. Variação temporal do consumo de alcalinidade no período operacional.	58
Figura 12. Teste AME. a) Sistema Oxitop [®] b) Estufa	62
Figura 13. Controle Oxitop [®]	64
Figura 14. Variação temporal da eficiência de remoção da DQO (em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator	70
Figura 15. Gráfico temporal da eficiência de remoção de DQO em função da COV na Fase III.	76
Figura 16. Gráfico <i>boxplot</i> da eficiência de remoção de DQO em relação à carga orgânica volumétrica aplicada.	77
Figura 17. Eficiência da relação entre carga orgânica removida e aplicada em todo o período operacional.....	79
Figura 18. Carga orgânica aplicada e removida durante o período operacional.....	79
Figura 19. Variação temporal da vazão de biogás e metano em função da COV	80
Figura 20. Variação temporal da produção volumétrica de CH ₄ em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator	81
Figura 21. Gráfico <i>boxplot</i> da produção teórica e medida de metano.	82
Figura 22. Variação do rendimento medido e teórico	84
Figura 23. Gráfico <i>boxplot</i> do rendimento medido e teórico.....	84
Figura 24. Porcentagem de metano contido no biogás em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator.	85
Figura 25. Variação temporal dos valores de pH efluente	88
Figura 26. Variação da relação AI/AP em função da variação da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator.	89
Figura 27. Variação da concentração de ácidos voláteis afluente e efluente em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator	91
Figura 28. Gráfico <i>boxplot</i> da concentração de Ácidos Voláteis afluente e efluente.	91
Figura 29. Variação da alcalinidade bicarbonato efluente da vinhaça e melaço.	96
Figura 30. Gráfico <i>boxplot</i> da eficiência de remoção de carboidratos de todo o período operacional.	98
Figura 31. Valores médios de Sólidos Totais, Voláteis e Fixos afluente e efluente.....	99
Figura 32. Valores médios de Sólidos Suspensos Totais, Voláteis e Fixos afluente e efluente.....	100
Figura 33. Avaliação da AME dos lodos no decorrer da operação.....	101
Figura 34. Gráficos temporais do conteúdo orgânico e carboidratos do perfil do lodo...	106

Figura 35. Dendograma.	108
Figura 36. Dendograma.	110
Figura 37. MEV do grânulo: a) imagem panorâmica do grânulo e b) imagem panorâmica do corte do grânulo.	112
Figura 38. Imagens da superfície do grânulo: c) imagem com dimensão de 30 μ e d) imagem com dimensão de 15 μ m.	112
Figura 39. Seção transversal do grânulo.	113
Figura 40. Imagens dos pontos escolhidos para análise detalhada.	113
Figura 41. MEV do grânulo: a) imagem panorâmica do grânulo e b) imagem panorâmica do corte do grânulo.	115
Figura 42. Imagens da superfície externa do grânulo: c) imagem com dimensão de 30 μ m e d) imagem com dimensão de 30 μ m.	115
Figura 43. Seção transversal do grânulo.	116
Figura 44. Imagens dos pontos escolhidos para análise detalhada.	116
Figura 45. MEV do grânulo: a) imagem panorâmica do grânulo e b) imagem panorâmica do corte do grânulo.	118
Figura 46. Imagens da superfície do grânulo: c) imagem com dimensão de 75 μ m e d) imagem com dimensão de 30 μ m	118
Figura 47. Seção transversal do grânulo.	119
Figura 48. Imagens dos pontos escolhidos para análise detalhada.	119
Figura 49. Microscopia óptica de contraste de fase na COV 33 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	122
Figura 50. Microscopia óptica de contraste de fase na COV 33 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	124
Figura 51. Microscopia óptica de contraste de fase na COV 19 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Legislações pertinentes à disposição de vinhaça ao meio ambiente.	26
Tabela 2. Vantagens e desvantagens das aplicações da vinhaça.....	28
Tabela 3. Características da vinhaça	30
Tabela 4. Composição do melaço de cana-de-açúcar.	31
Tabela 5. Levantamento de pesquisa da digestão anaeróbia da vinhaça segundo diferentes abordagens.	36
Tabela 6. Caracterização do inóculo quanto à concentração de sólidos.	52
Tabela 7. Procedimento para troca do substrato.	54
Tabela 8. Parâmetros operacionais aplicados à unidade experimental.	59
Tabela 9. Variáveis que foram analisadas durante a pesquisa.	59
Tabela 10. Soluções de macro e micronutrientes utilizados no ensaio de AME.	62
Tabela 11. Solução estoque concentrada de ácidos orgânicos utilizados como fonte de carbono.....	63
Tabela 12. Condições do programa de PCR.	65
Tabela 13. Condições do programa de PCR.	66
Tabela 14. Caracterização da vinhaça.	68
Tabela 15. Caracterização físico-química do melaço.	69
Tabela 16. Valores médios da porcentagem de CH ₄ contido no biogás, da produção volumétrica e do rendimento.....	81
Tabela 17. Valores da média, mediana e desvio padrão da concentração de ácidos voláteis afluente e efluente em função da carga orgânica volumétrica aplicada.....	92
Tabela 18. Metanol, ácido acético, propiônico e butírico presentes no efluente.	94
Tabela 19. Valores da média e desvio padrão da alcalinidade a bicarbonato efluente.	95
Tabela 20. Média das concentrações de carboidratos afluente e efluente do período operacional.	98
Tabela 21. Valores médios da AME no decorrer da operação.....	101
Tabela 22. Concentração de metais afluente e efluente ao reator com vinhaça (mg.L ⁻¹).	103
Tabela 23. Concentração de metais afluente e efluente ao reator com melaço (mg.L ⁻¹).	103
Tabela 24. Índice de diversidade de Shannon para o Domínio <i>Archaea</i>	108
Tabela 25. Índice de diversidade de Shannon para o Domínio <i>Bacteria</i>	110

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Indústria Sucroalcooleira	22
3.1.1 Etapas de produção de álcool e açúcar: geração do melaço e vinhaça.....	24
3.2 Vinhaça	25
3.2.1 Legislação referente à vinhaça	25
3.3 Melaço	30
3.5 Entressafra e interrupção da alimentação no reator UASB	41
3.6 Repartida do reator UASB	42
3.7 Geração de energia a partir do biogás	44
3.8 Avaliação do lodo do reator UASB	46
3.8.1 Atividade Metanogênica Específica (AME)	46
3.8.2 Técnicas de biologia molecular em reator anaeróbio.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Descrição da instalação experimental.....	49
4.2 Inóculo.....	51
4.3 Procedimento experimental	52
4.3.1 Fases experimentais.....	52
4.3.1.1 Fase I: Repartida do reator.....	53
4.3.1.2 Mudança da concentração do substrato	53
4.3.1.3 Fase II: Mudança do substrato de vinhaça para melaço	53
4.3.1.4 Fase III: Avaliação do desempenho do reator frente à alteração da matriz orgânica de melaço para vinhaça.....	55
4.4 Água residuária.....	55
4.4.1 Vinhaça.....	55
4.6 Análises Físico – Químicas e microbiológicas	59
4.6.1 Análises físico-químicas	60
4.6.1.3 Determinação de Ácidos Voláteis Totais	60
4.6.1.4 Determinação do carboidrato	61
4.7 Análises microbiológicas	65
4.7.1 PCR e DGGE	65
4.7.1.1 Amostragem da biomassa para as análises microbiológicas	65
4.7.1.2 Extração do DNA total.....	65

4.7.1.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	65
4.7.1.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	66
4.8 Expressões matemáticas e tratamento estatísticos dos dados para avaliação de desempenho do reator durante as fases experimentais	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 Caracterização da vinhaça	68
5.2 Caracterização do melaço.....	69
5.3 Desempenho do reator.....	69
5.3.1 Geração de biogás.....	80
5.3.2 Rendimento de Metano.....	83
5.3.3 pH, ácidos voláteis e alcalinidade.....	87
5.3.4 Relação AI/AP.....	88
5.3.5 Ácidos Voláteis Totais.....	90
5.3.6 Carboidratos.....	97
5.3.7 Sólidos	98
5.3.7.1 Sólidos Totais, Fixos e Voláteis.....	98
5.3.7.2 Sólidos Suspensos Totais, Fixos e Voláteis	99
5.4 Atividade Metanogênica Específica (AME)	100
5.5 Avaliação da remoção de metal presentes na vinhaça e no melaço	102
5.6 Caracterização do perfil da manta de lodo granular.....	104
5.6.1 Conteúdo orgânico e carboidrato.....	105
5.7 Análises microbiológicas	107
5.7.1 PCR e DGGE.....	107
5.8 Caracterização microbiana por meio de microscopia eletrônica de varredura.....	111
5.8.1 Fase I: Lodo granular com vinhaça ($\text{COV } 33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$).....	111
5.8.2 Fase II: Lodo granular com melaço ($\text{COV } 33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	114
5.8.3 Fase III: Lodo granular com vinhaça (retorno da safra) ($\text{COV: } 19 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	117
5.9 Microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência.....	121
5.9.1 Fase I: Lodo granular com vinhaça ($\text{COV } 33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$).....	121
5.9.2 Fase II: Lodo granular com melaço ($\text{COV } 33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	123
5.9.3 Fase III: Lodo granular com vinhaça (retorno da safra) ($\text{COV: } 19 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	125
6. CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS.....	128

1. INTRODUÇÃO

Reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) têm sido utilizados para o tratamento da vinhaça proveniente de destilarias de etanol a partir de matérias-primas fermentadas (AKARSUBASI et al., 2006), e no Brasil, desde 1982, tratando vinhaça de cana-de-açúcar (SOUZA et al., 1992). Essa tecnologia traduz-se em uma opção ambientalmente sustentável para a mitigação dos impactos negativos da vinhaça, reduzindo sua carga orgânica, promovendo a geração de biogás, que pode ser utilizada como fonte de energia. Do ponto de vista empresarial, a inserção da digestão anaeróbia da vinhaça na indústria sucroalcooleira pretende proporcionar economia de recursos naturais e financeiros. Além disso, os sistemas UASB apresentam vantagens por ser um sistema compacto e com baixa demanda de área e operação relativamente simples; baixa produção de lodo; baixo consumo de energia; possibilidade de recuperação de energia; reinício após longas paralisações e boa desidratabilidade do lodo (RAJESHWARI et al., 2000).

Sabe-se que nas indústrias sucroalcooleiras a produção da cana-de-açúcar é sazonal. A interrupção da safra de cana-de-açúcar, e conseqüentemente da produção de etanol e açúcar, pode interferir no balanço energético regional, em função da interrupção da produção de metano em reatores anaeróbios alimentados com vinhaça.

A opção de utilização de subprodutos da indústria sucroalcooleira, com baixo valor agregado na época de entressafra, tem sido pouco explorada como opção tecnológica, principalmente em função da escassez de dados operacionais com respeito à geração de biogás e estabilidade do sistema com a troca da fonte orgânica, como também pelo retorno à utilização da vinhaça.

Em alguns trabalhos como Barros (2013) e Santana Junior (2013), a substituição da vinhaça pelo melaço não foi eficiente na manutenção de eficiência do sistema, embora permaneçam dúvidas quanto às causas, uma vez que os autores relataram problemas operacionais. Dessa forma, mais estudos referentes à concepção e ao desempenho do reator UASB, utilizando o melaço para alimentação do reator no período de entressafra, devem ser realizados a fim de verificar os potenciais de remoção de DQO e produção de biogás.

A hipótese para implantação da alternativa de substituição temporária da vinhaça, proposta nesta dissertação, é que além da manutenção da geração de metano, a repartida do reator no período de safra poderia ser minimizada. Entende-se que a repartida do sistema deve ser a mais rápida possível visando explorar o potencial de geração de metano a partir da vinhaça e mitigação dos efeitos ambientais do aporte dessa ao ambiente.

A avaliação da permuta de substrato na produção de metano, para fornecer resultados satisfatórios, precisa estar atrelada à operação estável do reator e dada a importância dos microrganismos no processo, a estrutura e dinâmica microbiana, estudada com o uso das técnicas de biologia molecular pode contribuir para o julgamento da estratégia proposta.

Assim, a presente pesquisa foi realizada avaliação do desempenho do reator UASB tratando subprodutos da indústria sucroalcooleira, vinhaça e melaço, e a capacidade dos microrganismos participantes do processo na mudança desses substratos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o desempenho do reator UASB na repartida após período de interrupção de 30 dias, utilizando como substrato a vinhaça, com incremento da carga orgânica volumétrica (COV).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da troca de substrato por melaço durante entressafra na eficiência do sistema e o retorno da utilização da vinhaça.
- Identificar grupos de microrganismos relacionados às etapas de degradação.
- Avaliar a diversidade das bactérias e arqueias submetidas às condições de mudança do substrato e variação de carga orgânica volumétrica (COV), por meio da técnica de DGGE, microscopia óptica de contraste de fase e microscopia de varredura (MEV).
- Avaliar a atividade metanogênica específica (AME) do lodo utilizando a vinhaça e o melaço como substrato ao final de cada fase de operação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria Sucroalcooleira

O Brasil é o segundo produtor de bioetanol do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, que utiliza como matéria-prima o milho (LAIME et al.,2011). Porém, o Brasil lidera a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, matéria - prima renovável que apresenta alta eficiência energética e baixo custo. Por outro lado, o processo de produção de etanol gera elevada quantidade de resíduos, como a vinhaça, necessitando de um tratamento antes de ser lançada ao meio ambiente.

A cana-de-açúcar foi introduzida no país no ano de 1532 e sempre teve sua importância destacada na economia brasileira. Ela é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Como produtos obtidos da industrialização da cana, tem-se o açúcar e o álcool e os seus principais subprodutos são o bagaço e a vinhaça. A vinhaça é oriunda da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, mel e melaço, sendo estes últimos subprodutos da fabricação de açúcar (LAMONICA, 2006).

O etanol, um dos subprodutos da cana-de-açúcar, gera menos impacto ao meio ambiente comparado à utilização da gasolina como combustível. Sua produção, a partir de culturas agrícolas tem atraído o interesse no mundo todo, devido à crescente demanda por recursos energéticos não renováveis e a variabilidade dos preços de gás natural e do petróleo (PANT e ADHOLEYA, 2007), além da poluição ambiental por eles causada (PACHECO, 2011). O seu uso como fonte alternativa de energia, do ponto de vista sustentável, apresenta vantagens como a redução de emissão de gases de efeito estufa em cerca de 12,7 milhões de toneladas de carbono equivalente ou redução em 70% de emissão de dióxido de carbono na atmosfera (VIEIRA et al., 2007; CONAB, 2014), minimizando assim as consequências danosas do efeito estufa (GOES et al.,2008).

O governo brasileiro para reduzir o impacto da elevação dos preços do petróleo na década de 1970, criou o programa Proálcool em 14 de novembro de 1975, com o objetivo de promover a substituição parcial da gasolina utilizada em veículos leves por álcool hidratado. Desde meados da década de 70 até o final dos anos 80, o estímulo à produção de álcool combustível deu novo impulso à agroindústria canavieira no país. Dos 638 milhões de litros anuais, que se produzia em média na primeira metade da década de 70, a produção aumentou significativamente atingindo, no final dos anos 90, o volume aproximado de 16 bilhões de

litros anuais. Deste volume total, cerca de 15 bilhões são álcool combustível (CORAZZA, 2006).

De acordo com o programa, a produção do álcool proveniente da cana-de-açúcar ou de outro insumo deveria ser incentivada por meio da expansão da oferta de matérias-primas, com ênfase no aumento da produção agrícola, da modernização e ampliação das destilarias existentes e da instalação de novas unidades produtoras, anexas a usinas ou autônomas, e de unidades armazenadoras. Além desse fato, em 2003, a indústria automotora introduziu no Brasil a tecnologia dos motores *Flex-Fuel*, em que os carros eram movidos com etanol, gasolina ou uma mistura dos dois combustíveis.

Nestes últimos vinte anos, o Proálcool promoveu elevada expansão da indústria sucroalcooleira brasileira, contudo os danos ambientais causados à flora e à fauna dos mananciais superficiais adquiriram uma dimensão preocupante devido a elevadas quantidades de vinhaça produzida, que se trata de um subproduto dos processos de fermentação e de destilação do álcool, sendo sua disponibilidade diretamente proporcional à escala de produção da mesma (SZMRECSÁNYI, 1994).

O mercado brasileiro de açúcar e álcool tornou-se altamente competitivo a partir do Proálcool, da obrigatoriedade de misturar o álcool com a gasolina, às legislações ambientais que obrigam o uso de biocombustíveis em meios de transportes, ao cumprimento das exigências do Protocolo de Kyoto e a disponibilização crescente de automóveis biocombustíveis, fazendo com que a produção brasileira de álcool se expandisse (CARVALHO e OLIVEIRA, 2006; PACHECO, 2011).

O complexo sucroalcooleiro brasileiro é considerado o mais moderno e competitivo do mundo (GOES et al., 2008), tornando o Brasil o maior produtor da cultura de cana-de-açúcar, açúcar e etanol. Embora mais da metade da produção de cana-de-açúcar esteja concentrada no estado de São Paulo, a cultura é cultivada em todas as regiões do país. Há dois calendários de colheita, um para a região Nordeste que vai de setembro a abril e outro para o restante do país, de maio a novembro (CONAB, 2014).

A área cultivada com cana-de-açúcar que é destinada à atividade sucroalcooleira soma cerca de nove milhões de hectares distribuídos em todos os estados brasileiros produtores. O estado de São Paulo é o maior produtor, com 52% da área plantada, seguido por Goiás com 9,5%, Minas Gerais com 8,9%, Mato Grosso do Sul com 7,4%, Paraná com 7,1%, Alagoas com 4,3% e Pernambuco com 2,9%. Esses estados são responsáveis por 92,1% da produção nacional e os outros estados produtores possuem menor área de cultivo, abaixo de 3%. A

produção de etanol para a safra de 2014/15 está estimada em 28,66 bilhões de litros, 705,92 milhões de litros ou 2,53% a mais do que os 27,96 bilhões de litros da safra 2013/14 (CONAB, 2014).

O Brasil dentre os países é o que possui as melhores condições para a ampliação da produção de cana, por possuir mais terras e melhores condições climáticas para o desenvolvimento da cultura. Além disso, o país domina a tecnologia de ponta para a fabricação de etanol (GOES et al., 2008).

3.1.1 Etapas de produção de álcool e açúcar: geração do melaço e vinhaça

Dentre todas as alternativas de matéria-prima para produção de açúcar e álcool, a cana-de-açúcar é a mais simples e produtiva, o que dá ao Brasil uma grande vantagem, visto ser esse o principal produto de extração de etanol no país. Na indústria a cana-de-açúcar pode ser destinada à produção de açúcar e álcool ou somente a álcool.

O processo de fabricação do álcool inicia-se com as etapas de lavagem e moagem. Na primeira etapa a cana é lavada, picada e encaminhada às moendas para a obtenção do caldo. Como subproduto dessa etapa é gerado o bagaço que é utilizado como combustível pela própria usina, em quase sua totalidade, através da sua queima em caldeira para geração de vapor, produzindo toda energia térmica e eletromecânica necessária ao processamento da cana-de-açúcar, gerando uma grande economia de energia, sendo seus excedentes comercializados como combustível ou possibilitando ainda a geração de excedentes de energia elétrica para venda. O caldo obtido é tratado por processos químicos como coagulação, floculação e sedimentação para remoção de impurezas. Os sólidos sedimentados passam por filtros rotativos originando a torta que é utilizada na lavoura como complemento de adubação e fonte de matéria orgânica. O caldo tratado é concentrado em evaporadores de múltiplo efeito e cozedores para cristalização da sacarose. O resíduo final desta operação, chamado de melaço que consiste numa solução de 40% (aproximadamente), em massa, de sacarose e contém elevado teor de açúcar redutores, é utilizado através da fermentação como matéria prima para a produção de etanol.

Da fermentação do melaço, do mosto (mistura do caldo com o melaço) ou do caldo de cana é acrescentado fermentos biológicos, como *Saccharomyces cerevisiae*, que é um tipo de levedura que faz com que a sacarose se transforme em etanol. A ação de enzimas é que realiza esse trabalho. Após esse processo, se obtém o vinho (mosto fermentado, que já contém até 12% de seu volume total em etanol). As leveduras são recuperadas por centrifugação e o

vinho é enviado para as colunas de destilação. No processo de destilação, o etanol é recuperado na forma hidratada 96° GL (Gay-Lussac), gerando a vinhaça ou vinhoto como efluente líquido. A Figura 1 representa um fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria prima.

Figura 1. Fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima

Fonte: adaptado de SEABRA, 2008.

Já o açúcar é produzido da evaporação, cozimento, centrifugação e secagem do caldo tratado pelos processos químicos.

3.2 Vinhaça

3.2.1 Legislação referente à vinhaça

A vinhaça é um subproduto que se origina do processo de fermentação e destilação do álcool (SZMRECSÁNYI, 1994; SANTOS et al., 2013).

Até a década de 1970, as principais destinações da vinhaça eram os corpos hídricos e “áreas de sacrifício”, nos quais são áreas que não possuem nenhuma utilidade. Os impactos associados a essa atividade era a destruição da fauna e flora aquáticas decorrente da

proliferação de microrganismos que esgota o oxigênio dissolvido na água, prejudicando também o abastecimento de água potável. Além desses impactos, o lançamento de vinhaça ocasiona poluição nos mananciais, devido ao seu elevado efeito poluidor, pois ela apresenta elevadas concentrações de DBO e DQO, ocasiona também mau cheiro e concorre diretamente para o agravamento e disseminação de diversas endemias como a malária, a amebíase e a esquistossomose (CORAZZA, 2006; SZMRECSÁNYI, 1994).

Em 1978, os impactos ambientais decorrentes da descarga de vinhaça nos corpos hídricos, levaram o Ministério do Interior (MINTER) a instituir a Portaria n° 323 e após essa legislação, vieram outras em âmbito federal e estadual. A Tabela 1 mostra o resumo das legislações pertinentes à disposição de vinhaça ao meio ambiente:

Tabela 1. Legislações pertinentes à disposição de vinhaça ao meio ambiente	
Legislação	Descrição
Portaria n°323, de 29/11/1978	Proíbe o lançamento, direto ou indireto, do vinhoto em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias do álcool.
Portaria n° 158, de 03/11/1980	Proíbe o lançamento de vinhaça nos mananciais superficiais.
Resolução CONAMA n° 0002, de 05/06/1984	Dispõe sobre a poluição causada pelos efluentes das destilarias de álcool"
Resolução CONAMA n° 0001, de 23/01/1986	Obriga as novas indústrias instaladas a realizar a avaliação de impacto ambiental (AIA) e seu respectivo relatório de impacto ambiental (RIMA).
Lei n° 6134, de 02/06/1988	Dispõe sobre a preservação dos depósitos naturais de águas subterrâneas do Estado de São Paulo, e dá outras providências
Norma técnica P4.231 CETESB, de dezembro de 2006	Estabelece Critérios e procedimentos para aplicação da vinhaça no solo agrícola

3.2.2 Características da vinhaça, sua aplicação e seu potencial poluidor

Os principais produtos da indústria de cana-de-açúcar são o açúcar e o etanol, e os principais subprodutos gerados são o bagaço, resíduo sólido obtido da extração de caldo de cana e a vinhaça, efluente líquido proveniente do processo de destilação, esta última por ser um efluente altamente poluidor e apresentar-se em grande volume, dificultando seu transporte e eliminação (OLIVEIRA, 2005; GUNKEL et al., 2007).

A vinhaça é um resíduo líquido de cor escura e apresenta uma elevada demanda química de oxigênio, elevada corrosividade, elevada temperatura na saída dos destiladores, baixo valor de pH entre 3 e 4 e valores de DQO de até 30 000 mg.L⁻¹. A geração de vinhaça em termos de quantidade e composição depende de diversos fatores como substrato utilizado na fermentação do etanol, concentração inicial de açúcar, sistema de destilação, condições operacionais, do processo de produção do etanol e das condições de processamento quanto à eficiência e insumos adicionados, etc. É gerado uma proporção média de 12 a 15 litros por cada litro de álcool produzido (CRAVEIRO et al., 1987; WILKIE et al., 2000; WOLMARANS e Villiers, 2002; RIBAS, 2006; PEREIRA et al., 2009 ; SANTOS et al., 2013).

A composição da vinhaça é de 93,2% de água e 6,8% de sólidos em suspensão, sendo que 5,1% desses últimos são constituídos de matéria orgânica e 1,7% de substâncias minerais como nitratos, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e sulfato, entretanto, estes últimos pode causar inibição dos microrganismos presentes no reator (CRAVEIRO et al., 1987; SZMRECSÁNYI, 1994).

Contudo, este resíduo é rico em nutrientes e minerais, e é utilizado como fertilizante, nas próprias plantações de cana-de-açúcar, sendo essa uma alternativa de baixo custo e eficiente para sua destinação final, além de substituir os fertilizantes químicos que são prejudiciais ao meio ambiente (PEREIRA et al., 2009). Entretanto, o uso da vinhaça em solos não pode ser excessivo nem indiscriminado, sob pena de vir a comprometer irremediavelmente o meio ambiente e a própria rentabilidade agrícola e industrial da produção açucareira e alcooleira (SZMRECSÁNYI, 1994).

Devido à grande quantidade de vinhaça produzida, foram desenvolvidos tratamentos e usos alternativos, como por exemplo, a reciclagem desse resíduo na fermentação, fertirrigação, concentração por evaporação, produção de levedura e de energia (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A Figura 2 demonstra as opções tecnológicas para a destinação da vinhaça.

Figura 2. Opções tecnológicas para a destinação da vinhaça

Fonte: adaptado de CORAZZA, 2006.

A Tabela 2 mostra as vantagens e desvantagens de algumas aplicações da vinhaça

Tabela 2. Vantagens e desvantagens das aplicações da vinhaça

Processos/ uso final	Vantagens	Desvantagens
Fertirrigação	Baixo custo Fácil implementação	Custo de transporte Efeito desconhecido a longo prazo
Alimentação animal	Baixo custo Fácil implementação	Pouco estudado
Biodigestão/ Biogás	Produção de energia Redução da DBO Efluente continua sendo usado como fertilizante	Alto custo Requer alta tecnologia
Combustão em caldeira	Eliminação completa Produção de energia Recuperação de potássio em cinzas	Pouco estudado
Produção de proteína	Alimento Sem resíduo	Alto custo Pouco estudado

Fonte: adaptado de CHRISTOFOLETTI et al., 2013.

A disposição inadequada e indiscriminada da vinhaça de cana-de-açúcar em solos e corpos hídricos tem recebido muita atenção desde décadas atrás, devido a problemas ambientais associados a essa prática e ao fato desta apresentar elevadas concentrações de matéria orgânica, nitrato e potássio apresentando alto potencial poluidor. A sua aplicação ao

solo provoca alterações nas suas características resultando em modificações em suas propriedades químicas e físicas, como o aumento da disponibilidade de alguns elementos para os vegetais, aumento da probabilidade de lixiviação de íons e elevação do escoamento superficial. As consequências desses impactos resultam principalmente na contaminação das águas superficiais e subterrâneas (CRAVEIRO et al., 1986; SILVA et al., 2007; BARROS et al., 2010; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

O tratamento da vinhaça antes da sua disposição final é fundamental para fazer da fertirrigação uma técnica ambientalmente adequada (FUESS e GARCIA, 2014).

A quantidade de vinhaça disposta ao solo deve ser mensurada de acordo com as características de cada solo, uma vez que este apresenta quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos, podendo ocorrer a lixiviação desses íons, principalmente do nitrato e do potássio (SILVA et al., 2007).

Segundo Wilkie et al.,(2000) outras importante características da vinhaça incluem a cor, presença de metais pesados e de poluentes orgânicos como clorofórmio, pentaclorofenol, fenol e cloreto de metileno. A coloração do efluente pode causar impacto ambiental negativo se lançado ao corpo hídrico, e como consequência pode perturbar o crescimento normal da flora aquática. Estas características podem impor caráter inibidor em sistemas de tratamento de efluentes líquidos por processos biológicos.

De acordo com Driessen et al.,(1994) a vinhaça, em certos casos é concentrada por evaporação e aplicada na agricultura. O líquido residual da evaporação é um condensado que apresenta compostos orgânicos voláteis e com teor orgânico elevado e, se lançado sem tratamento, pode causar impactos negativos ao meio ambiente, requerendo que este seja considerado na escolha de alternativa.

Segundo Fuess e Garcia (2014) amostras de vinhaças analisadas por Nandan et al., (1990), Pandey et al., (2003); Chandra et al., (2008) e Previna e Saravanan (2013), evidenciaram a presença de metais tóxicos como cádmio, chumbo, cobre, cromo e níquel em concentrações acima da recomendada, o que pode causar riscos para a saúde humana (potencial carcinogênico) e às culturas (perda de produtividade quando atingem o ambiente).

Devido aos impactos ambientais descritos, o Ministério do Interior (MINTER) instituiu a Portaria 323, de 29/11/78, que proíbe o lançamento direto e indireto da vinhaça em qualquer coleção hídrica.

No nordeste brasileiro, a maior parte da vinhaça é utilizada para fertirrigação nas plantações de cana-de-açúcar, e na maioria dos casos, sem nenhum tratamento desse efluente (GUNKEL et al., 2007).

No estado de São Paulo a norma que regula, orienta e fiscaliza a aplicação da vinhaça na fertirrigação é a P4.231 da CETESB, sendo adotada também em outros estados. Entretanto, em outras localidades não há uma fiscalização e controle rigoroso na aplicação desse resíduo na fertirrigação (PEREIRA et al., 2009).

A Tabela 3 apresenta os principais parâmetros de caracterização da vinhaça gerada na produção de álcool proveniente dos diferentes tipos de mosto de cana-de-açúcar.

Tabela 3. Características da vinhaça

Tipo de mosto	pH	DBO (g/L)	DQO (g/L)	N (total) (g/L)	SO ₄ (g/L)	P (total) (g/L)	K (g/L)	Referência
Caldo	3,5	12	25	0,4	0,2	0,8	/	VanHaandeleCatunda,(1994)
Caldo	3,5	12	25	0,4	0,2	0,8	/	Driessen et al.(1994)
Melaço	3,9	39	100	1,03	0,03	7	9,5	Driessen et al.(1994)
Caldo	4,2	16,5	33	0,7	0,09	1,74	0,76	Costa et al. (1986)
Misto	4,5	19,8	45	0,71	0,09	3,82	3,73	Costa et al. (1986)
Melaço	4,6	25	65	1,61	0,13	6,5	6,4	Costa et al. (1986)
Misto	3,9	/	31,5	0,37	0,03	1,3	0,42	Souza et al. (1992)

Fonte: Resultados de diversos autores apresentados por Longo, 2015.

3.3 Melaço

O melaço é um subproduto da etapa de centrifugação no processo de produção de açúcar, sendo produzido na proporção de 40 a 60 kg por tonelada de cana-de-açúcar processada e também é uma das matérias-primas importante utilizado na produção do etanol, devido ao volume gerado no processo de produção do açúcar. Além disso o melaço é um substrato rico em açúcares fermentescíveis, vitaminas e elementos minerais que favorecem o crescimento dos microrganismos (OLIVEIRA, 2005; DUDA et al., 2011).

Apresenta-se como um líquido de cor escura, viscoso e muito doce, e apresenta em sua composição uma elevada quantidade de açúcares que não podem ser cristalizados por métodos convencionais. No Brasil, o melaço é enviado para as destilarias como substrato para a produção de etanol. Os principais componentes do melaço de cana-de-açúcar são os carboidratos, a água, compostos de origem orgânica como os aminoácidos, ácidos carboxílicos, proteínas, fenóis, vitaminas e outros. Sua composição é muito variável, uma vez

que depende de fatores agrícolas e industriais (OLIVEIRA, 2005; SILVA, 2008; BARROS, 2013).

O melaço é considerado um resíduo de fácil manipulação, economicamente viável, com grande potencial e muitas aplicações a nível industrial. O melaço é utilizado nas indústrias de fermentação alcoólica, de panificação e de rações para animais. Dessa forma, sua utilização, no período de entressafra, para alimentação de reatores utilizados no tratamento da vinhaça precisa ser criteriosamente avaliada e preencher as necessidades nutricionais dos microrganismos presentes no reator, para seu crescimento e desenvolvimento (LIMA, 1987; FELTRIN et al., 2000; SILVA, 2008).

Na Tabela 4 é mostrada a composição média do melaço de cana-de-açúcar

Tabela 4. Composição do melaço de cana-de-açúcar

Composição do melaço	Teor
Concentração de sólidos – Brix (°B)	79,5
Sólidos totais (%)	75,0
Açúcares totais (%)	46,0
Proteínas (%)	3,0
Extrato livre de nitrogênio (%)	63,0
Lipídeos totais (%)	0,0
Fibras totais (%)	0,0
Cinzas (%)	8,1
Minerais	
Cálcio (%)	0,8
Fósforo (%)	0,08
Potássio (%)	2,4
Sódio (%)	0,2
Cloro (%)	1,4
Enxofre (%)	0,5
Minerais Traço	
Cobre (mg/kg)	36,0
Ferro (mg/kg)	249,0
Manganês (mg/kg)	35,0
Zinco (mg/kg)	13,0
Vitaminas	
Biotina (mg/kg)	0,36
Colina (mg/kg)	745,0
Ácido pantotênico (mg/kg)	21,0
Riboflavina (mg/kg)	1,8
Tiamina (mg/kg)	0,9

Fonte: adaptado de Curtin, 1983.

Faria (2014) avaliou o desempenho de um reator UASB em escala piloto, apresentando volume de 150 L, sob temperatura mesofílica utilizando o melaço de cana-de-

açúcar como substrato na entressafra. O reator foi operado com TDH de 24 horas, aplicando-se COV de até $15 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e foi utilizada a recirculação total do efluente do reator para diluir o melaço que apresentava concentração de DQO total média de 1090 g.L^{-1} . Em virtude das características do mesmo, houve a necessidade de realizar a suplementação com nitrogênio e fósforo. Como resultado, obteve-se produção volumétrica e específica de metano sob condições normais de temperatura e pressão (1 atm a 0°C) de até $0,97 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$ e de $0,194 \text{ LCH}_4(\text{gDQO total removida})^{-1}$ e valores médios de remoção de DQO de 64 a 72%.

González et al., (1998) utilizaram melaço de cana-de-açúcar como substrato com o objetivo de obter lodo anaeróbio granulado em condições controladas de alcalinidade e micronutrientes. O experimento foi realizado no reator UASB em escala laboratorial com 16,5 litros de capacidade. Como resultado, obteve-se eficiência de remoção de DQO de 78,8% com COV aplicada de $7,1 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e de 91% com COV aplicada de $6,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A granulação do lodo foi obtida depois de um curto período de adaptação e após 120 dias os grânulos cresceram de partículas dispersas para microflocos de diâmetro médio de 4,3 mm.

Santana Junior (2013) operou um sistema de reatores em série, UASB termofílicos em escala piloto, com cargas crescentes de 0,15 a $12,50 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com o objetivo de produzir metano a partir de vinhaça e melaço de cana-de-açúcar. A última fonte, para uso durante a entressafra. A remoção de DQO foi da ordem de 50% para cargas de até $7 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ utilizando vinhaça. Quando foi substituído por melaço, a remoção caiu para 43% em relação à DQO para cargas de até $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A máxima produção média de metano no sistema utilizando vinhaça foi de $0,102 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$, para COV entre 0,15 e $3,50 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. No período de entressafra com melaço como fonte orgânica foi de $0,097 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$ para COV de 7,0 a $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e após a retomada com a vinhaça de $0,275 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$ para COV de 7,5 a $12,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Vilela (2017) estudou um sistema de reatores anaeróbios que possuíam leito fixo estruturado, de duas fases (acidogênico seguido de metanogênico) operados em condições termofílicas (55°C), alimentados com melaço de cana-de-açúcar. No trabalho, aplicou-se COV que variou de 1 a $26,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A eficiência de remoção de DQO do sistema de reatores foi de aproximadamente 90%, com contribuição de 80% para o reator metanogênico e produção de metano de $5,90 \text{ LCH}_4.\text{dia}^{-1}$.

Duda et al.,(2011) avaliaram o desempenho de reatores UASB instalados em série, com volumes de 35 e 28,1 L, para o primeiro e segundo reatores, respectivamente, tratando melaço diluído com esgoto. Nos primeiros 35 dias de operação o afluente utilizado para a alimentação dos reatores foi o melaço de cana-de-açúcar diluído com água potável

apresentando concentração de DQO de 25000 mg.L⁻¹ e posteriormente com esgoto doméstico. Obteve-se para o sistema eficiências médias de remoção de DQO de 58,7% e produção volumétrica de metano de 0,06 LCH₄ (L.d)⁻¹, sendo que os valores médios do percentual de CH₄ no biogás no R₁ e R₂ foram de 38% e de 61%, respectivamente.

Park et al., (2010) avaliaram dois reatores de duas fases, um reator acidogênico seguido de um reator metanogênico, utilizando como substrato o melaço que possuía concentração de DQO de 28 g.L⁻¹. Cada reator possuía volume de 2,5 L e foram submetidos a diferentes TDH. Para o reator metanogênico o TDH variou de 4 a 15 dias e os autores concluíram que o TDH de 6 dias obteve o melhor resultado, com eficiência de remoção de DQO máxima de 75,1% e taxa de produção volumétrica de metano de 1,48 LCH₄.(L.d)⁻¹.

Diante do exposto, a utilização do melaço na entressafra apresenta o potencial de maximizar a produção de biogás em sistema anaeróbio de uma única fase, pois possui potencial para produção biológica de metano devido à presença de elevada quantidade de açúcares fermentescíveis em sua composição (Cazetta e Celligoi, 2005) e à sua concentração e conteúdo nutricional, constituindo assim, uma excelente fonte de carbono para o metabolismo microbiano.

3.4 Reatores UASB para o tratamento de vinhaça

A digestão anaeróbia é frequentemente a mais atrativa solução para o tratamento de efluentes devido às seguintes vantagens: alta redução de DBO, produção de energia como biogás, produção de biofertilizante, menor produção de um lodo biológico já estabilizado, baixo custo de investimento e operação, possibilidade de sistemas descentralizado, baixa energia requerida ao processo, baixa demanda de nutrientes, entre outros (CRAVEIRO et al., 1986; RINTALA, 1991).

Para o Brasil, além destas vantagens gerais, as condições climáticas são favoráveis, e há uma capacidade considerável para desenvolver e otimizar o processo em institutos de pesquisa e universidades (CRAVEIRO et al., 1986).

Desde o desenvolvimento da tecnologia UASB na década de 1970 tem sido amplamente aplicado para o tratamento de efluentes industriais, para tratamento de efluentes de destilaria, em unidades de processamento de alimentos, curtumes, esgotos municipais e vem ganhando cada vez mais espaço para o tratamento da vinhaça apresentando resultados satisfatórios (DRIESSEN et al., 1994; RAJESHWARI et al., 2000). Além disso, apresenta

melhor aceitação comercial e alta eficiência, sendo o biodigestor mais estudado e utilizado no mundo. Podem constituir de unidades únicas, ou seguidas de alguma forma de pós-tratamento (GRANATO, 2003; SPERLING, 2005).

Desenvolvido inicialmente na Holanda, o sistema essencialmente consiste de um fluxo ascendente de águas residuais através de um lodo denso e de alta atividade. Nos reatores UASB, a biomassa cresce dispersa no meio formando grânulos, devido à aglutinação de várias espécies microbianas. Esses grânulos podem servir de material suporte para outras bactérias.

Para este trabalho, o enfoque principal é para o tratamento de efluentes de destilaria de cana-de-açúcar. Estas utilizam diferentes tipos de matérias-primas, como o suco de cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, vinho ou milho para a produção de álcool. O uso dessas matérias-primas e os diferentes processos aplicados resultam em uma ampla variedade de efluentes produzidos. As condições do processo sob as quais são obtidos bons resultados do processo anaeróbio dependem fortemente do tipo de efluente a ser tratado. Desse modo, é importante a escolha do conjunto correto de parâmetros de processo para cada tipo de efluente da destilaria (DRIESSEN et al., 1994).

A viabilidade da aplicação da digestão anaeróbia mesofílica da vinhaça utilizando o reator UASB em escala piloto tem sido estudada por muitos anos atrás por Craveiro et al., (1982) e Hirata et al., (1988) e esta tecnologia vem despertando enorme interesse entre pesquisadores do mundo todo devido aos sucessos já alcançados, ao interesse científico no aprimoramento do processo de degradação desse efluente e finalmente, devido ao elevado potencial de produção de energia alternativa pela produção de metano. Além desses fatores, soma-se o fato de que, durante o tratamento anaeróbio cerca de 50 % da DQO contida na vinhaça pode ser convertida em biogás e apenas 10 % em geração de lodos (WILKIE, 2000).

Apenas algumas plantas em grande escala foram implantadas no Brasil, devido a pequena vantagem econômica associada aos baixos custos relativos do diesel e da eletricidade, frente as incertezas da produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da vinhaça. Além disso, a maioria dessas plantas utilizam reatores UASB mesofílicos, que atingem COV máxima relativamente baixa de $15 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e exigem elevada demanda de energia elétrica e equipamentos para refrigerar a vinhaça, uma vez que esta é gerada a 85-90°C (CRAVEIRO et al., 1986; HIRATA et al., 1988; SOUZA et al., 1992).

Segundo Fuess (2017) apesar dos vários trabalhos realizados em escala de bancada, com eficiências de remoção de DQO superiores a 70% para a aplicação de cargas entre 20 a $25 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a transposição para escala plena encontra dificuldades. Além do mais, na maior parte dos casos reportados, o TDH empregado nos reatores é da ordem de dias,

inviabilizando a utilização direta das informações, considerando a elevada vazão de vinhaça gerada na destilaria.

A Tabela 5 apresenta a comparação dos resultados da presente pesquisa com diversos estudos, utilizando a tecnologia UASB sob variação de cargas orgânicas, visando avaliar a eficiência de remoção de matéria orgânica e/ou a produção de metano.

Tabela 5. Pesquisa sobre digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar

AUTOR	UNIDADE EXPERIMENTAL	PARÂMETROS APLICADOS	RESULTADOS
Rieira et al., (1985)	Reator UASB	DQO: 35-100g.L ⁻¹	Ef.DQO: 75%
	V=100L	COV: 24kgDQO.m ³ .d ⁻¹	%CH ₄ : 58%
Craveiro et al., (1986)	Reator UASB	DQO: 31g.L ⁻¹	Ef.DQO: 88%
	V=11000L	COV _{máx} : 40kgDQO.m ³ .d ⁻¹	%CH ₄ : 60%
Souza et al., (1992)	Reator UASB	DQO: 31,5g.L ⁻¹	Ef.DQO: 72%
	V= 70000L	COV _{máx} : 26,5 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	Coef.rend: 0,42 LCH ₄ gDQO ⁻¹ removida
Driessen et al., (1994)	Reator UASB	DQO: 60-160 g.L ⁻¹	Ef.DQO: 88%
	V= 1500000 L	COV: 22 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	
Harada et al., (1996)	Reator UASB	DQO: 10g.L ⁻¹	Ef.DQO: 39-67%
	V= 140L	COV _{máx} : 28 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	
Costa (2012)	Reator UASB (R ₁ ,R ₂ ,R ₃ ,R ₄) V = 23L	R ₁ - COV _{máx} : 14 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	Ef.DQO- R ₁ : 58-92% R ₂ :48%, R ₃ : 80%,R ₄ : 65%.
		R ₂ - COV _{máx} : 28 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	
		R ₃ - COV _{máx} : 35 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	
		R ₄ - COV _{máx} : 45 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	
Espanña-Gamboa et al., (2012)	Reator UASB em escala de bancada (V= 3L)	DQO: 110-130g.L ⁻¹	Ef.DQO: 69%
		COV: 17,05 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	%CH ₄ : 84%
Alves (2015)	Reator UASB	DQO: 20g.L ⁻¹	Ef.DQO: 95%
	V = 120L	COV: 2,5-10 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	%CH ₄ : 70%

Longo (2015)	Reator UASB	DQO: 20g.L ⁻¹	Ef.DQO: 92%
	V = 120L	COV: 0,7-7 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	%CH ₄ : 70%
Almeida et al.	Reator UASB	DQO: 34,7-112g.L ⁻¹	Ef.DQO: 43%
	V = 18L	COV: 60,6-248,8 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	
Autora (2017)	Reator UASB	DQO: 20-27g.L ⁻¹	Ef.DQO: 91%
	V = 120L	COV: 5-34 kgDQO.m ³ .d ⁻¹	%CH ₄ : 80%

Riera et al., (1985) estudaram a viabilidade da aplicação do reator UASB com capacidade de 100 litros para o tratamento anaeróbio de vinhaça com DQO entre 35 e 100 g.L⁻¹ e COV de 24 kg.m⁻³.d⁻¹ proveniente de destilaria de açúcar. Obteve-se remoção de DQO de 75% e uma produção de biogás de mais de 9 L.(L.d)⁻¹ com teor médio de metano de 58%.

No estado de Alagoas, na cidade de Penedo, foi instalado um reator UASB com volume de 11000 L em uma destilaria, com o objetivo de tratar vinhaça gerada pelo caldo de cana-de-açúcar. O reator foi operado na faixa de temperatura entre 28 e 30°C e inicialmente o reator foi inoculado com esterco bovino digerido. Em cerca de um mês de operação foi atingida COV máxima de 40 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, com eficiência de remoção de DBO e DQO, de 95% e 88%, respectivamente e produção de biogás de 14 L.(L.d)⁻¹ com teor de 60 % de metano. Os autores concluíram que é industrialmente viável operar um reator UASB para tratamento da vinhaça aplicando COV de 15 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (CRAVEIRO et al., 1986).

Souza et al., (1992) avaliaram um reator UASB mantido sob temperatura termofílica em escala piloto com volume de 75000L, tratando vinhaça de cana-de-açúcar e monitorado por um período de 280 dias. A granulação do lodo foi essencial para a estabilidade do processo, possibilitando que a carga do reator fosse dobrada de 15 para 30 kg.m⁻³.d⁻¹, sem que fosse observado aumento nos valores de ácidos voláteis e redução do pH do efluente. Aplicando-se COV de 25 a 30 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, o reator alcançou uma eficiência de remoção de DQO de 72%.

Driessen et al., (1994) discute a experiência de tratamento anaeróbio em efluentes de diferentes indústrias produtoras de álcool durante um período de longo prazo, com especial atenção ao tratamento de efluentes de destilarias à base de cana-de-açúcar com uma concentração de DQO de 60 a 160 g.L⁻¹. No Brasil, foi construído um reator UASB em escala piloto com volume de 1500000 L com o objetivo de tratar a vinhaça proveniente da cana-de-açúcar. Aplicando-se COV de 22 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, alcançou-se eficiência de remoção de DQO de 88%, de remoção de DBO de 96% e rendimento de 0,5 L CH₄ (g DQO removida)⁻¹. O autor concluiu que apesar dos problemas de toxicidade esperados decorrentes das altas concentrações de DQO, sulfeto e sais, o tratamento anaeróbio com o processo UASB provou ser bem sucedido no tratamento de efluentes de destilaria.

Harada et al., (1996) estudaram a viabilidade do tratamento anaeróbico termofílico (55 °C) de uma destilaria de álcool utilizando um reator UASB de 140 L por um período de 430 dias. A carga orgânica aplicada foi de 28 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ com reduzido tempo de detenção hidráulico e uma concentração fixa de DQO afluente de 10 g.L⁻¹. Como resultado, obteve-se baixa remoção de DQO durante todo o período na faixa de 39 a 67%, enquanto que a remoção

de DBO foi mais satisfatório, apresentando resultados superiores a 80%, aplicando COV entre 19 e 24 kgDQO.m⁻³.d⁻¹.

Costa (2012) avaliou a aplicabilidade em reatores UASB tratando vinhaça a fim de avaliar uma estratégia operacional para a maximização da produção de metano. Nesse sentido, foram operados quatro reatores UASB (R₁, R₂, R₃ e R₄), com volume de 23 L cada, sendo que os dois primeiros foram submetidos à temperatura ambiente e os dois últimos à temperatura constante de 37°C. Esses reatores foram submetidos a diferentes processos operacionais, sendo que os reatores R₁ e R₃ foram operados com elevada eficiência e os reatores R₂ e R₄ sob sobrecarga orgânica com o objetivo de produzir nesses últimos um lodo rico em bactérias metanogênicas que possuem elevadas taxas de degradação do substrato. Como resultado, a COV máxima alcançada pelo R₁ foi de 14 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e a eficiência de remoção de DQO variou entre 58% e 92%; o R₂ foi submetido a COV de 28 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, apresentando uma eficiência média de 48%; por outro lado, os reatores R₃ e R₄, alcançaram respectivamente COV máxima de 35 e 45 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ apresentando eficiência de remoção de DQO de 80 e 65%, respectivamente.

España-Gamboa et al., (2012) utilizaram um reator UASB em escala de bancada tratando vinhaça sob condição de temperatura mesofílica por 70 dias a fim de produzir metano. Aplicou-se COV de até 22 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ porém para essa carga os resultados não foram satisfatórios. A COV ótima para este estudo foi de 17 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ com TDH de 7,5 dias, alcançando uma eficiência de remoção de DQO de 69%, teor de metano de 84% e rendimento de metano na ordem de 0,263 L CH₄ (g DQO removida)⁻¹.

Alves (2015) estudou o reator UASB em escala piloto com volume total de 120 L, utilizado para o tratamento anaeróbico da vinhaça. A concentração da vinhaça esteve na faixa de 18 a 20 gDQO.L⁻¹. O reator foi submetido ao aumento gradativo de COV de 2,5 a 10 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Para COV de 10 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, a eficiência de remoção de DQO foi de 92%, e a produção volumétrica de biogás foi de 2,08 LCH₄. (L.d)⁻¹, apresentando 66% de metano em sua composição. O reator alcançou maior eficiência de remoção de DQO no valor de 95% e 70% de metano no biogás, para a carga inicial de 2,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹.

Longo (2015) utilizou um reator UASB em escala piloto equipado de separador trifásico e sem recirculação do efluente a fim de tratar vinhaça proveniente de cana-de-açúcar e explorar o potencial de geração do metano. O sistema foi inoculado com lodo granular e alimentado com vinhaça na concentração média de 20 g.L⁻¹. Como resultado, obteve-se eficiência de remoção de DQO de 92%, para cargas aplicadas até 4,8 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e

produção média de metano de $5 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$, correspondendo a 70% no biogás. O lodo manteve-se granulado no período de operação do reator de 300 dias.

Almeida et al., (s.d.) avaliaram a aplicabilidade do reator UASB com volume de 18 L a fim de reduzir a DQO da vinhaça, bem como avaliar qualitativamente o biogás produzido para a geração de energia. As DQO da vinhaça variaram de 34,7 a 112 g.L^{-1} e como resultado, obteve-se eficiência média em torno de 43%.

Outras configurações de reatores já foram estudadas como alternativas para o tratamento da vinhaça operados sob condições diferentes a este trabalho, como no trabalho de Fuess et al., (2017) que estudaram um sistema termofílico de duas fases no qual era composto de um reator acidogênico seguido de dois reatores metanogênicos de leito estruturado (ASTBR) e UASB, operados em paralelo utilizando a vinhaça como substrato. Aplicou-se COV de 15 a $30 \text{ kgDQO.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ a esses reatores. Como resultado, houve uma eficiência de remoção global de DQO superior a 80.

Thanikal et al., (2007) utilizaram um reator anaeróbio de leito fixo de 23 L composto de material suporte de polietileno durante seis meses de operação para tratar a vinhaça. Com carga orgânica máxima de $30 \text{ kg DQO.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, a eficiência de remoção de DQO foi superior a 80% e a DQO solúvel inferior a $3,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Segundo Moletta (2005) tratando efluentes provenientes de indústria de vinho, como a vinhaça, a eficiência de remoção de DQO é muito elevada, aplicando-se COV que varia entre 5 e $15 \text{ kgDQO.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, o sistema consegue alcançar uma eficiência entre 90 a 95% e uma produção de biogás entre 0,4 e $0,6 \text{ L CH}_4 \cdot (\text{g DQO removida})^{-1}$ com teor de metano entre 60 a 70 %.

Ribas (2006) avaliou o uso do tratamento anaeróbio termofílico e mesofílico utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar em um reator contendo biomassa imobilizada preenchido com espuma de poliuretano operado em bateladas sequenciais (ASBBR) em escala de bancada com volume de 7,2 L. O reator termofílico alcançou carga orgânica máxima de $5,7 \text{ kgDQO.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e 46% de eficiência de remoção de DQO. Entretanto em temperatura mesofílica o reator apresentou estabilidade operacional em COV máxima de $36 \text{ kgDQO.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, com 79% de remoção.

Cabello et al.,(s.d.) avaliaram a aplicabilidade do reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) sob condições mesofílicas para avaliar a diminuição da carga orgânica da vinhaça. As concentrações de DQO afluente variaram de 17 g.L^{-1} até 28 g.L^{-1} e a produção de biogás foi de apenas $0,018 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$. Como resultado, o reator alcançou eficiência máxima de 57,1% aplicando-se COV de $19,5 \text{ kgDQO.m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ sob TDH de 1 dia.

Diante do exposto, observa-se o potencial de aplicação do reator UASB para tratamento de vinhaça, mitigando os efeitos do lançamento *in natura* no ambiente e geração de metano. O biogás produzido apresenta elevado potencial energético, podendo participar do balanço energético da indústria sucroalcooleira. Para tanto, ajustes nas cargas aplicadas e estabilidade do processo precisam ser alcançadas, considerando as interrupções de alimentação com vinhaça, em função da entressafra da produção de cana-de-açúcar.

3.5 Entressafra e interrupção da alimentação no reator UASB

As indústrias sucroalcooleiras de cana-de-açúcar trabalham sazonalmente durante a época da safra da cultura que, no Estado de São Paulo, compreende o período de março a dezembro.

Na entressafra que compreende o período entre o fim da colheita até o início da outra, a moagem e a produção industrial param e dão espaço a uma rigorosa manutenção das máquinas e equipamentos agrícolas. As usinas aproveitam essa oportunidade para substituir componentes desgastados, como rolamentos, borrachas, discos de cortes e mangueiras, entre outros.

Logo, no período de entressafra, não há produção de águas residuais, ou seja, não há produção de vinhaça para alimentar o reator e a interrupção na alimentação de reatores anaeróbios por intervalo de tempo longo, pode acarretar necessidade de longo período de repartida, o que causaria transtornos pelo acúmulo de vinhaça. Outro aspecto importante é que durante a entressafra há a interrupção na geração de metano, o que pode acarretar problemas no balanço energético no período, uma vez que a energia gerada pode ser usada em operações e processo na industrialização posterior à safra e mesmo no abastecimento doméstico na região da usina.

Além dos fatores citados, a interrupção da alimentação do reator pode induzir mudanças na dinâmica microbiana, tais como o estado fisiológico e a composição da comunidade que afetam o desempenho do processo. Também pode causar alterações no crescimento microbiano, na atividade e nas propriedades das superfícies celulares (CASTELLANOS et al., 2000; COX e DESHUSSES, 2002; SANIN et al., 2003; CARRERO-COLÓN et al., 2006; KOUTINAS et al., 2006; LI et al., 2006).

Konopka et al., (2002) relataram que a limitação do substrato por menos de um dia resulta em modestas mudanças no teor de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e nos níveis de

biomassa, enquanto que um período de limitação de 32 dias resultam em mudanças substanciais na estrutura da comunidade microbiana.

Liu e Tay, (2008) afirmaram que a longa fase sem alimentação reduz a eficiência de tratamento de águas residuais.

A fim de mitigar esses problemas, um dos objetivos deste trabalho, é utilizar o melaço de cana-de-açúcar em substituição da vinhaça para alimentação do reator. O melaço é um subproduto da produção de açúcar e álcool, com potencial de deslocamento para produção de energia. Além disso, o melaço pode ser estocado em elevadas quantidades, sem alterar sua composição dada sua elevada concentração de matéria orgânica. A digestão anaeróbia apresenta vantagem no tratamento de efluentes gerados sazonalmente, como em processos de produção vinícola, em que a produção de águas residuais ocorre principalmente durante a colheita e a produção de vinho. Nesta situação, Moletta (2005) relatou que o digestor anaeróbio pode iniciar-se rapidamente após um desligamento de 15 dias, período, em geral, requerido para reiniciar o processo.

3.6 Repartida do reator UASB

Repartida de um reator é o retorno da operação do sistema, após o mesmo permanecer sem alimentação por um determinado período, até que se consiga atingir a mesma carga orgânica volumétrica quando o sistema encontrava-se em operação.

Uma vez que o conceito do reator UASB foi proposto em 1970, este se tornou o reator de alta taxa mais popular para o tratamento anaeróbio de águas residuais conhecido mundialmente. No entanto, a partida e a repartida de tal reator é complicada devido à alta sensibilidade dos microrganismos participantes do processo, em geral, limitação creditada às arqueias metanogênicas ou a bactérias hidrolíticas, quando a hidrólise for uma etapa limitante. Devido à alta sensibilidade a variações de carga orgânica e outras perturbações externas, o sistema de digestão anaeróbia é frequentemente propenso a mudanças/adequação da população microbiológica, causando instabilidade ao processo (DONG et al., 2010).

Sabe-se que a metanogênese é um processo limitante e muito importante na operação de sistemas anaeróbios porque as arqueias metanogênicas são estritamente sensíveis e apresentam crescimento lento. Assim, a obtenção de uma partida estável e rápida depende da formação de uma comunidade metanogênica ativa no interior do reator (KOBAYASHI et al., 2009). Isso se aplica também à repartida do sistema, embora o reator permaneça meses sem

alimentação, a biomassa contida no seu interior permanece ativa e a repartida torna-se muito mais rápida se essa biomassa estiver resiliente e adaptada ao meio.

Jáuregui-Jáuregui et al., (2014) estudaram o desempenho de um bioreator anaeróbio de leito fixo para o tratamento de vinhaça de tequila sob condições operacional sazonal como a partida, a operação e a repartida do reator após um longo período de interrupção da alimentação e operação deste. A fase de partida alcançou carga orgânica volumétrica de 8 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e a operação, 7,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Em seguida, o reator foi mantido sem alimentação por 6 meses e após esse período ocorreu a repartida do reator utilizando a vinhaça de tequila. A repartida do sistema durou 28 dias e a COV foi aumentada de 2,2 para 5,2 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Os resultados mostraram melhor desempenho do reator como alta remoção de DQO e produção de metano, bem no início da repartida, ou seja, depois que houve o período sem alimentação e foi principalmente devido à estabilização das arqueias e da população bacteriana que mostrou ser resiliente após o reator ter permanecido sem alimentação por 6 meses. O reator alcançou COV de 7 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ no final da operação.

Dong et al., (2010) estudaram a repartida do reator UASB em escala de bancada para o tratamento de águas residuais de processamento de soja. O reator permaneceu por 4 meses sem alimentação após 6 meses de operação estável. Durante o período de repartida que durou aproximadamente 40 dias, houve o aumento da eficiência de remoção da DQO e da produção de biogás.

Molina et al., (2007) estudaram o reator USBF (UASB+ filtro anaeróbio) em escala piloto para o tratamento de vinho e demonstraram o desempenho da estação de tratamento de águas residuais durante a repartida e operação. No final da operação (após 60 dias), obteve-se uma carga de 5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, com eficiência de remoção de 98% de DQO e uma acumulação insignificante de ácidos voláteis no sistema. Posteriormente, com o objetivo de analisar o desempenho e a estabilidade do mesmo, a fim de simular o período sazonal, este foi programado para permanecer sem alimentação por um período de 45 dias. Como resultado, o reator alcançou COV de 6,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, após 20 dias de operação.

Wolmarans e Villiers (2002) avaliaram a operação sazonal do reator UASB tratando águas residuais de destilaria de vinho. Foi realizado o monitoramento do reator durante os anos de 1998, 1999 e 2000. A operação do reator era de 24 horas por dia, com operação contínua enquanto tinha efluente disponível. A cada ano, após a conclusão de cada período, o reator permanecia sem alimentação, em repouso com o lodo e o efluente em seu interior, até a temporada seguinte. No ano de 1999 o reator ficou sem alimentação por duas vezes, por um

período de 19 e 12 dias, respectivamente. As COVs antes da interrupção da alimentação eram de aproximadamente 10 e 6 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, respectivamente. E no ano de 2000 o reator permaneceu sem alimentação somente uma vez, por um período de 31 dias, semelhante à este estudo, com COV de aproximadamente 12 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, antes da interrupção da alimentação. Os autores concluíram que eficiências de remoção de DQO superiores a 90% foram alcançadas e o período de interrupção e repartida não afetou significativamente a eficiência de tratamento do sistema.

O desempenho da repartida do reator no presente estudo, foi avaliado principalmente pela eficiência de remoção de DQO, da produção de biogás, e estabilidade do sistema.

3.7 Geração de energia a partir do biogás

A necessidade de melhorar a sustentabilidade da produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar no Brasil tem intensificado a busca pela geração de energia contida em subprodutos, juntamente com a adequação ambiental do efluente gerado. Nesse sentido, a digestão anaeróbia da vinhaça surge como uma alternativa viável, pois além de promover a degradação da matéria orgânica, anteriormente ao seu aporte ao ambiente permite também a produção de energia a partir do biogás gerado (MORAES et al., 2014).

Devido ao elevado conteúdo orgânico da vinhaça, a digestão anaeróbia permite uma perspectiva de retorno financeiro a partir da produção de metano. A digestão anaeróbia pode remover até 95% de DBO, produzindo um gás que poderia suprir as necessidades de uma destilaria em termos de eletricidade e combustível (WILLINGTON e MARTEN, 1982).

O rendimento estimado de biogás a partir de 1 tonelada de vinhaça é de 55000L com teor de metano de pelo menos 55%. A sua combustão é capaz de cobrir uma parte significativa da demanda de energia na produção de etanol e processos para o tratamento da vinhaça (TOMCZAK-WANDZEL et al., 2008).

Moraes et al., (2014) avaliaram a aplicação da digestão anaeróbia da vinhaça em biorrefinarias de cana-de-açúcar do Brasil. Biorrefinarias são unidades que utilizam processo sustentável que permitem a conversão da biomassa em uma ampla variedade de bioprodutos e bioenergia, fornecendo informações sobre a rentabilidade e potencial de gastos em termos de energia, benefícios ambientais e impactos econômicos. Supondo a safra de 2009/2010, e considerando a conversão anaeróbia do volume total de vinhaça por etanol de cana-de-açúcar, a energia produzida pelo biogás potencialmente gerado atingiria cerca de 7,5 % da energia produzida pela maior usina hidrelétrica do mundo.

Segundo Moraes et al.,(2014) como combustível, o biogás pode substituir até 40% do fornecimento anual de diesel nas operações agrícolas de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar e ainda fornecer aproximadamente 14 MWh anualmente. Além dessas vantagens há o benefício financeiro devido à comercialização de créditos de carbono pela não emissão de gases causadores do efeito estufa, o que seria suficiente para cobrir o custo operacional de um sistema de digestão anaeróbia. Os autores concluíram que a avaliação energética do biogás revelou ganhos consideráveis em termos de eletricidade e como um combustível alternativo. Dessa forma, a adoção de tal processo em biorrefinarias potencialmente levaria a lucros de energia, benefícios ambientais e perspectivas econômicas.

Granato (2003) estimou uma produção de energia elétrica de 971 MWh por safra, por meio da digestão anaeróbia da vinhaça, em destilaria anexa a uma usina de açúcar com capacidade de produção diária de 600 m³ de álcool. Foram analisadas doze safras (de 1990/1991 até 2001/2002), das quais se obteve dados referentes à produção de álcool e de vinhaça, permitindo a estimativa do potencial de energia a ser produzida pela biodigestão anaeróbica deste efluente. Compararam-se as quantidades de energia elétrica gerada pela queima do bagaço, de energia elétrica adquirida da concessionária e da energia elétrica a ser gerada pela biodigestão anaeróbica da vinhaça. Concluiu-se que o potencial energético estimado pela biodigestão anaeróbica da vinhaça representaria 5,75 % do total de energia consumida na usina ou uma redução de 62,7% na aquisição de energia elétrica da concessionária.

Lamônica (2006) estimou o potencial de geração de energia elétrica da indústria sucroalcooleira pela biodigestão da vinhaça em moto - geradores a combustão interna com a utilização do biogás produzido. O potencial de geração de energia elétrica com os dados de produção de álcool da safra 2004/2005 é de 2600000 MWh/ano , representando 0,75% do consumo nacional de energia elétrica no ano de 2003. Considerando a safra de produção de álcool de 2004/2005, o potencial de geração de energia elétrica foi de 2600000 MWh/ano representando 0,75% do consumo nacional de energia elétrica no ano de 2003.

Apesar da viabilidade da utilização do biogás produzido pela digestão anaeróbia para geração de energia elétrica, essa prática ainda não é difundida no Brasil. Segundo Salomon e Lora (2009), os principais obstáculos sobre o uso de biogás no Brasil são: o alto custo de investimento; falta de financiamento; ausência de um programa nacional de biogás, de financiamento específico e de incentivos do governo; dificuldades para as pequenas unidades de biogás para vender seus créditos de carbono; falta de informação e recursos para os

agricultores; a necessidade de definir a tecnologia de biodigestão para cada caso individualmente; ausência de materiais pedagógicos para seleção e avaliação de viabilidade econômica; e o uso da vinhaça para fertirrigação como disposição final e finalmente, estudo insuficiente na área da digestão anaeróbia dessa matriz. Em resposta a esses questionamentos, pesquisas vêm sendo realizadas no laboratório de processos biológicos, destacando-se trabalhos de Longo (2015) e Alves (2015) com o objetivo de esclarecer e fornecer subsídios para operação eficiente e estável de reatores UASB tratando vinhaça. A avaliação do funcionamento dos reatores UASB na degradação anaeróbia da vinhaça nos períodos de safra, entressafra e repartida dos reatores são aspectos fundamentais para proposição de estratégias operacionais que permitam a geração da maior quantidade de metano possível, contribuindo para o balanço energético das usinas de açúcar e álcool.

3.8 Avaliação do lodo do reator UASB

3.8.1 Atividade Metanogênica Específica (AME)

Nos últimos anos, com o crescimento do usos da tecnologia anaeróbia de alta taxa juntamente com o aumento do conhecimento da microbiologia e bioquímica do processo, tem-se observado uma crescente utilização dessa tecnologia para tratamento de águas residuais diversas. Entretanto, para se obter uma elevada eficiência em reatores anaeróbios, é necessário a manutenção de uma biomassa adaptada, com elevada atividade microbiológica, e resistente a choques. A fim de que essa biomassa possa ser preservada e monitorada, o desenvolvimento de técnicas para a avaliação da atividade microbiana de reatores anaeróbios foi necessária.

Nesse sentido, a avaliação da capacidade metanogênica do lodo de um reator anaeróbio em produzir metano pode ser realizada por meio do teste da Atividade Metanogênica Específica (AME).

A AME é um parâmetro que avalia a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de microrganismos anaeróbios, sob condições controladas de laboratório, com o objetivo de viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de substratos orgânicos a biogás. Assim, mostra-se como um importante parâmetro de monitoramento da “eficiência” da população metanogênica presente no lodo de um reator anaeróbio, constituindo-se, dessa forma, em uma importante ferramenta para o controle operacional do sistema (CHERNICHARO, 1997; AQUINO et al., 2007).

Na prática, o teste AME, possui diversas aplicações para o monitoramento de reatores, permitindo estabelecer a capacidade máxima de remoção de DQO da fase líquida, e com isso, permitir estimar a carga orgânica máxima que pode ser aplicada ao reator, evitando colapsos nos sistemas anaeróbios. Outras aplicações do teste AME é avaliar o comportamento da biomassa sob o efeito de compostos potencialmente inibidores, determinar a toxicidade de compostos químicos presentes em águas residuais e resíduos, estabelecer a capacidade de degradabilidade dos substratos, entre outras aplicações (CHERNICHARO, 1997).

O teste consiste em incubar uma determinada quantidade de biomassa, determinada concentração de substrato e uma concentração suficientes de nutrientes em frascos, medindo-se a quantidade de gás produzido por unidade de tempo e por unidade de massa microbiana, mantidos sob faixas de temperatura e pH ideais ao máximo desempenho das arqueias metanogênicas (MONTEGGIA, 1997).

O tipo de substrato utilizado entre os pesquisadores para o teste de AME costuma divergir. Para avaliação da atividade metanogênica de uma determinado lodo é preciso alimentá-lo com substrato adequado que suporte apenas a atividade dos microrganismos metanogênicos. Tendo em vista que 70% do metano produzido advém da clivagem do acetato pelos microrganismos metanogênicos acetoclásticos, muitos pesquisadores utilizam sais de acetato ou ácido acético como substrato. Entretanto, o uso exclusivo de acetato pode subestimar o valor de AME em 30 %, já que essa fração corresponde ao restante do metano produzido pelos microrganismos hidrogenotróficos para conversão de CO_2 em metano (AQUINO et al., 2007).

Este teste ainda não foi objeto de uma padronização, sendo que cada grupo de pesquisa adota uma metodologia mais apropriada para o seu trabalho (POETSCH e KOETZ, 1998). As metodologias diferem entre si tanto nos procedimentos adotados para incubação do lodo (concentração de biomassa, tipo e concentração do substrato, relação alimento/microrganismo, tipo e concentração de nutrientes, tempo de incubação, entre outros), quanto para a medição do metano produzido, o que acaba dificultando a comparação dos resultados obtidos a partir de cada metodologia disponível nas pesquisas (AQUINO et al., 2007).

Assim, uma vez escolhido um determinado procedimento para o teste de AME, os resultados obtidos por meio do mesmo serão mais úteis em termos comparativos, como neste estudo, em que se aplicou o teste AME nas mesmas condições, porém em fases operacionais

diferentes com intuito de investigar o efeito da mudança do substrato na capacidade das arqueias metanogênicas presente no reator, em produzir metano.

3.8.2 Técnicas de biologia molecular em reator anaeróbio

As técnicas de DGGE e PCR foram utilizadas para avaliar a comunidade microbiana presente no lodo do reator, verificar a similaridade entre as amostras e o índice de diversidade microbiana para os domínios *Bacteria* e *Archaea*.

A técnica Reação de polimerização em cadeia (PCR) permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA obtido a partir das amostras, sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação das amostras, obtendo assim, maior precisão (BUSTIN, 2002).

A técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) é uma técnica molecular comumente utilizada para o estudo das comunidades microbiológicas, sua diversidade e dinâmica possibilitando a separação dos produtos de PCR (fitas de DNA) de cadeia dupla de comprimento semelhante, mas composição de sequência diferente (GREEN et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em reator UASB (escala piloto) que estava em operação por 600 dias. O reator encontrava-se estabilizado, com vazão de alimentação de 70 L.d⁻¹ de vinhaça (DQO média de 20 g.L⁻¹), recirculação do efluente de 200%, tempo de detenção hidráulica de aproximadamente 13,7 horas e carga orgânica volumétrica de aproximadamente 32 kgDQO.m⁻³.d⁻¹.

Longo (2015) utilizou a mesma instalação do presente estudo para o tratamento da vinhaça, porém sem recirculação do efluente e Alves (2015) utilizou a mesma configuração de reator, com recirculação do efluente de 200%, igual a este estudo.

4.1 Descrição da instalação experimental

A instalação experimental foi implantada na área de reatores de escala piloto do Laboratório de Processo Biológicos (LPB) do Departamento de Hidráulica e Saneamento, localizado na área 2 no campus da USP de São Carlos. A instalação era composta por um reator UASB (configuração baseada em Cavalcanti, 2003), tanques de armazenamento de vinhaça, sistema de medição de biogás e bomba dosadora.

O reator UASB foi construído em PVC, apresentando volume total de 120 litros e 4 metros de altura, sendo 60 litros (2 metros) destinados à área de reação. Os diâmetros externo e interno do reator eram de 20 e 19,5 cm e do dispositivo de sedimentação de sólidos de 10 e 9,5 cm, respectivamente. O corpo do UASB contava com 18 torneiras para a coleta das amostras, das quais nove situavam-se na região de reação do reator (Figura 3).

O dispositivo de sedimentação de sólidos, que impede a saída de partículas junto ao efluente, localizava-se na parte superior do reator (Figura 3) com inclinação de 47°.

Figura 3. Instalação Experimental a) Fluxograma do sistema de tratamento b) Reator UASB utilizado na pesquisa (A)

a)

b)

Fonte: autora (2017).

O sistema foi operado em escoamento ascendente e alimentação contínua. Para a alimentação do reator, uma bomba dosadora *Grundfos* modelo DDA 30-4 AR foi utilizada (Figura 4).

Figura 4. Bomba

Fonte: autora (2017).

O reator dispunha de dispositivo para medição de vazão e de coleta de amostras do biogás: selo hídrico, sistema de captação, distribuição, e gasômetro (Ritter ® Drum-type Gas Meter TG05/5), utilizado para medição do volume do biogás produzido (Figura 5).

Figura 5. Sistema de medição de biogás

Fonte: autora (2017).

4.2 Inóculo

O inóculo utilizado quando o reator encontrava-se em operação por 600 dias para partida foi o lodo granular proveniente do abatedouro de frango “Abatedouro Ideal Ltda”, localizado na cidade de Pereiras-SP. A escolha se justifica devido a diversidade microbiana

apresentada neste inóculo. O reator foi preenchido com lodo anaeróbio até dois metros de sua altura (60 litros).

Na ocasião da realização da presente pesquisa, avalia-se que o lodo presente no reator apresentava a seguinte constituição (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização do inóculo quanto à concentração de sólidos

Sólidos	Concentração média (g.L ⁻¹)
Sólidos Totais (ST)	32,42
Sólidos Totais Voláteis (STV)	28,75
Sólidos Totais Fixos (STF)	3,67

Fonte: Longo (2015).

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Fases experimentais

O estudo foi dividido em três fases (Figura 6):

Fase I: Repartida do reator utilizando vinhaça como substrato após um mês sem alimentação e mudança da concentração da vinhaça.

Fase II: Utilização do melaço como substrato e sua caracterização.

Fase III: Retorno da alimentação com vinhaça.

Figura 6. Fluxograma das fases experimentais

Foi realizado o monitoramento da eficiência do sistema a fim de verificar o desempenho do reator em cada etapa de estudo.

4.3.1.1 Fase I: Repartida do reator

A primeira fase da pesquisa consistiu em avaliar o período de repartida do reator UASB, após interrupção da alimentação do sistema no período de 30 dias.

A repartida do reator ocorreu aplicando-se carga orgânica crescente de vinhaça. Essa etapa ocorreu, inicialmente, com aplicação de carga orgânica volumétrica de $5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e aumentou, gradativamente, até atingir $20 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. O aumento progressivo de carga orgânica aplicado ao reator, esteve atrelado à eficiência de remoção de DQO maior que 80%, pH do efluente entre 7 e 8, concentração de ácidos voláteis estabilizados e percentagem de metano mínima de 60%.

Em seguida, realizou-se o aumento de cargas fixando-se a concentração de DQO da vinhaça em torno de 20 g.L^{-1} . A concentração adotada foi baseada nos menores valores produzidos em destilarias, mantendo assim a presente pesquisa condizente com as condições reais de operação de reatores anaeróbios.

4.3.1.2 Mudança da concentração do substrato

Inicialmente a concentração de matéria orgânica da vinhaça era em média de 20 g.L^{-1} , porém a partir do 124º dia de operação, decidiu-se aumentar a concentração da DQO da vinhaça para 27 g.L^{-1} . Logo, as cargas orgânicas volumétricas aplicadas (COV) ao reator foram incrementadas pelo aumento da concentração da vinhaça, mantendo a vazão constante de 222 L.d^{-1} .

Devido à dificuldade de armazenar a vinhaça diluída em volume superior a 74 L, necessária para prosseguir o aumento de carga orgânica, optou-se pelo aumento da concentração de matéria orgânica da vinhaça de alimentação para 27 g.L^{-1} adequando a vazão para 222 L.d^{-1} e volume diário de vinhaça ou melaço diluídos de 74 L.

4.3.1.3 Fase II: Mudança do substrato de vinhaça para melaço

4.3.1.3.1 Caracterização do melaço

A caracterização prévia do melaço (dados apresentados na seção 5.2) foi realizada para verificar a sua composição e atingir os valores de DQO afluente estipulados nas fases

experimentais (valor fixo de 27 g. L⁻¹). Para a caracterização físico-química, foram pesadas inicialmente 12 g de melaço e diluídas em 1 litro de água de abastecimento.

4.3.1.3.2 Avaliação do desempenho do reator frente à alteração da matriz orgânica de vinhaça para melaço

Após a repartida do reator e de sua estabilização (Fase I), foi realizada a troca do substrato escalonadamente, permutando-se 10% de vinhaça por melaço, durante 16 dias (Tabela 7).

Para manter a concentração desejada, pesava-se cerca de 30,78 g de melaço concentrado e diluía em 1 litro de água de abastecimento.

Tabela 7. Procedimento para troca do substrato

Melaço diluído		Vinhaça diluída	
Porcentagem (%)	Volume (L)	Porcentagem (%)	Volume (L)
10	7,4	90	66,6
20	14,8	80	59,2
30	22,2	70	51,8
40	29,6	60	44,4
50	37,0	50	40,0
60	44,4	40	29,6
70	51,8	30	22,2
80	59,2	20	14,8
90	66,6	10	7,4
100	74,0	0	0

A troca gradual de vinhaça por melaço permitiu a adaptação da biomassa presente no reator com as novas condições impostas ao meio. A substituição gradual foi baseada na manutenção da eficiência de remoção de DQO superior a 80%. Inicialmente, adicionou-se 10 % do melaço diluído à alimentação do reator e 90 % de vinhaça diluída, ambos com a mesma concentração de DQO, no valor de 27 g.L⁻¹ (Tabela 7). Essa relação permaneceu até ser atingido 100% de melaço.

4.3.1.4 Fase III: Avaliação do desempenho do reator frente à alteração da matriz orgânica de melaço para vinhaça

A Fase III visou simular o período corresponde ao fim do período de entressafra, e o retorno do período de safra nas indústrias sucroalcooleiras. Desse modo, interrompeu-se o uso do melaço de forma gradual, por substituição do melaço por vinhaça. A vinhaça foi adicionada gradualmente ao reator, porém devido à instabilidade do reator (discutidos na parte dos resultados), decidiu-se diminuir a COV da vinhaça para $5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e a concentração de DQO para 20 g.L^{-1} , mesma concentração utilizada no começo da operação do sistema, na repartida.

4.4 Água residuária

4.4.1 Vinhaça

A vinhaça foi coletada na usina Rio Pardo, localizada em Cerqueira César-SP, e acondicionada em tanques durante todo o período operacional (Figura 7). A vinhaça era concentrada (DQO: 200 g/L) devido ao processo de evaporação na indústria (Figura 8) e diluída na ocasião da sua utilização no LPB.

Figura 7. Tanques contendo vinhaça

Fonte: autora (2017).

Figura 8. Vinhaça concentrada

Fonte: autora (2017).

A vinhaça, por conter sólidos grosseiros e elevada concentração de matéria orgânica, precisou ser peneirada e diluída antes de sua utilização. A peneira utilizada apresentava abertura de tela de 0,59 mm (Figura 9). A diluição foi de 10 vezes, com objetivo de manter a concentração de carga orgânica próxima à concentração da vinhaça gerada no processo produtivo de álcool, 20 g.L^{-1} .

Após 124 dias de operação do reator, decidiu-se pelo aumento da concentração da vinhaça para 27 g.L^{-1} (justificado na seção 4.3.1.2), logo, o incremento da carga orgânica volumétrica não foi mais pelo aumento da vazão de vinhaça e sim, pelo aumento da concentração da mesma.

Figura 9. Peneira

Fonte: autora (2017).

4.4.2 Melaço

O melaço *in natura* da cana-de-açúcar, utilizado durante a pesquisa, era proveniente da Usina São Martinho, localizada na cidade de Pradópolis, São Paulo. Este foi armazenado durante todo o período de operação a 4°C. A escolha da utilização do melaço como fonte orgânica, a ser utilizada durante o período de entressafra, se deu pelo fato deste substrato ser também um subproduto da indústria sucroalcooleira, apresentar potencial para produção de biogás a partir de reatores UASB e, o excedente não utilizado na produção de etanol apresentar baixo custo de comercialização.

O melaço, composto de consistência pastosa (Figura 10), foi diluído em água de abastecimento para adequação da concentração orgânica ao processo de tratamento. A diluição foi de 10 vezes, com objetivo de manter a concentração de carga orgânica próxima à concentração de 27 g.L⁻¹, a mesma utilizada anteriormente, quando a vinhaça era o substrato.

Figura 10. Melaço concentrado utilizado na pesquisa

Fonte: autora (2017).

4.4.3 Adição de tampão

A vinhaça apresentava pH baixo, entre 3 e 4, e o melaço, entre 5 e 6. Utilizou-se bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para elevar o pH das matrizes orgânicas utilizadas no estudo para faixa entre 7 e 8, com a finalidade de manter ambiente ideal para atividade metanogênica no sistema.

A dosagem mínima aplicada em todo o período foi de 0,3 e a máxima 0,7 g de bicarbonato por g de DQO, com o objetivo de suportar eventuais acúmulos de ácidos orgânicos no reator (Figura 11).

Figura 11. Variação temporal do consumo de alcalinidade no período operacional

4.5 Procedimento Operacional

4.5.1 Variação dos parâmetros operacionais

No decorrer de cada fase operacional, variou-se COV, vazão da água residuária, vazão de recirculação, vazão total, TDH e velocidade ascensional (Tabela 8) visando atingir a carga de $32 \text{ kg.m}^{-3}\text{dia}^{-1}$.

O aumento gradativo da vazão de vinhaça (Fases I e III) e melaço (Fase II) adicionado ao reator esteve associado à remoção de DQO superior a 80%, pH do efluente entre 7 e 8,

concentração de ácidos voláteis estabilizados (valor inferior a aproximadamente 600 mg.L^{-1}) e percentagem de metano mínima de 60%. Essa metodologia foi utilizada para todo o período de operação do sistema e foi fundamental para adaptação da biomassa ao substrato, evitando assim, sobrecarga orgânica, além de manter a alcalinidade do sistema.

Tabela 8. Parâmetros operacionais aplicados à unidade experimental

Fases	Duração de operação (d)	COV ($\text{kgDQO.m}^3.\text{d}^{-1}$)	Q vinhaça/melaço (L.d^{-1})	Q recirculação (L.d^{-1})	Q total (L.d^{-1})	TDH (d)	Va (m.h^{-1})
I (vinhaça)	190	5-34	15-74	30-148	45-222	2,67-0,54	0,06-0,31
II (melaço)	69	33	74	148	222	0,54	0,31
III (vinhaça)	62	5-19	15-60	30-120	45-180	2,67-0,67	0,06-0,25

*COV= carga orgânica volumétrica; Q = vazão; TDH = tempo de detenção hidráulica; Va = velocidade ascensional.

4.6 Análises Físico – Químicas e microbiológicas

Análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas para monitoramento do afluente, efluente e manta de lodo do sistema durante o experimento (Tabela 9).

Tabela 9. Variáveis que foram analisadas durante a pesquisa

Variável	Unidade	Metodologia
ST	(mg.L^{-1})	Gravimétrico (APHA, 2012)
STF	(mg.L^{-1})	Gravimétrico (APHA, 2012)
STV	(mg.L^{-1})	Gravimétrico (APHA, 2012)
SST	(mg.L^{-1})	Gravimétrico (APHA, 2012)
SSF	(mg.L^{-1})	Gravimétrico (APHA, 2012)
SSV	(mg.L^{-1})	Gravimétrico (APHA, 2012)
DQO (total e filtrada)	(mg.L^{-1})	Colorimétrico (APHA, 2012)
pH	-	Potenciométrico (APHA, 2012)
Ácidos voláteis totais	(mg.L^{-1})	Titulométrico (Dilallo e Albertson, 1961)
Ácidos voláteis	(mg Hac.L^{-1})	Cromatografia a gás LPB-EESC/USP

Alcalinidade	mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	Titulométrico (Dilallo e Albertson, 1961 modificado por Ripley <i>et al.</i> , 1986)
Composição do biogás	-	Cromatografia a gás LPB-EESC/USP
Carboidrato	(mg.L ⁻¹)	Colorimétrico (APHA, 2012)
AME	(gDQO _{CH4} /g SSV.d)	Martins et al., (s.d)

4.6.1 Análises físico-químicas

4.6.1.1 Determinação dos sólidos, DQO, pH

Foram realizadas análises para determinação de sólidos Totais, Fixos e Voláteis, de maneira a obter dados relacionados às características físicas da biomassa anaeróbia presentes no reator. As análises foram determinadas de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2012), bem como as análises referentes à DQO e pH.

4.6.1.2 Determinação da alcalinidade

A determinação da alcalinidade foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Dilallo e Albertson (1961), modificado por Ripley et al. (1986), que por titulação mensura a alcalinidade total, parcial, intermediária e a bicarbonato (AT, AP, AI e AB). A partir dos resultados, o monitoramento foi realizado pela razão da Alcalinidade Intermediária e Alcalinidade Parcial (relação AI/AP).

4.6.1.3 Determinação de Ácidos Voláteis Totais

A concentração dos ácidos totais foi determinada pelo método da titulação acidimétrica proposto por Dilallo e Albertson (1961) que consiste em reduzir o pH da amostra de 4,3 a 3,3 com ácido sulfúrico e manter sob fervura por 3 minutos para remoção de CO₂.

A especiação dos compostos intermediários de interesse na digestão anaeróbia (ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico e solventes metanol, etanol e n-butanol) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

4.6.1.4 Determinação do carboidrato

Proposto por Dubois et al. (1956), a concentração dos carboidratos totais foi determinada pelo método fenol-sulfúrico que consiste na desidratação destas substâncias pela ação do ácido sulfúrico concentrado e na complexação dos compostos formados (furfural para pentoses e hidroximetilfurfural para hexoses) com o fenol, levando à produção de uma substância de coloração alaranjada, com pico de absorbância próximo de 490 nm.

A concentração de carboidratos da amostra é determinada através de uma reta de calibração previamente construída com uma solução do carboidrato de interesse.

4.6.1.5 Produção de biogás

O volume de biogás produzido foi mensurado durante a operação do reator por meio do medidor Ritter ® Drum-type Gas Meter TG05/5.

4.6.1.6 Análise da composição do biogás

A análise da composição do biogás foi realizada semanalmente em cromatógrafo a gás *Shimadzu* (modelo GC 2014), com detector de condutividade térmica e coluna HPPLLOTQ (30m x 0,53mm), para determinação dos teores de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂).

4.6.1.7 Atividade Metanogênica Específica (AME)

A atividade metanogênica específica do lodo foi determinada por meio do sistema Oxitop®, de acordo com metodologia desenvolvida por Martins et al., (s.d). A AME foi realizada a partir de alíquotas de lodo retiradas do reator antes da interrupção da operação com vinhaça, após um mês sem alimentação, com a vinhaça (Fase I), com o melaço (Fase II) e por fim, no final da operação com a vinhaça novamente (Fase III) .

O sistema Oxitop® é um equipamento manométrico que consiste de um frasco de vidro com duas aberturas laterais, provido de um transdutor de pressão localizado em uma cabeça de medição, selados por um septo de borracha e por uma válvula de teflon hermético, que são utilizados para injeções de substrato e para a descarga de biogás. Durante o teste, esses frascos são mantidos em estufa a temperatura desejada e permanecidos sob agitação (Figura 12).

Figura 12. Teste AME. a) Sistema Oxitop® b) Estufa

Fonte: autora (2017).

A sobrepressão devida a acumulação de biogás no headspace é automaticamente registrado pelas cabeças de medição. A partir dos dados acumulados de sobrepressão é realizado o cálculo do volume de biogás gerado em cada frasco.

A fim de garantir que o gás a ser medido nos frascos seja somente metano, existe uma cesta de borracha no *headspace* dos frascos onde são adicionadas lentilhas de NaOH para adsorção do CO₂ produzido pelos processos biológicos.

O teste de AME foi realizado sob as seguintes condições de ensaio: concentração de lodo de 5 gSTV.L⁻¹, 100µL de macronutrientes e de micronutrientes (Tabela 10), temperatura de 30°C.

Tabela 10. Soluções de macro e micronutrientes utilizados no ensaio de AME

Macronutrientes	Concentração (g.L⁻¹)
NH ₄ Cl	0,0736
KH ₂ PO ₄	0,0136
(NH ₄) ₂ .SO ₄	0,0136
Micronutrientes	Concentração (g.L⁻¹)
FeCl ₂ .4H ₂ O	2,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,03
(NH ₄) ₆ .Mo ₇ .O ₂₄ .4H ₂ O	0,05
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,01
ZnCl ₂ .H ₂ O	0,05
H ₃ PO ₃ (solução saturada)	1 mL

Fonte: Adaptado de Martins et al.,(s.d).

Os microrganismos sintróficos acetogênicos convertem compostos orgânicos intermediários como propionato e butirato, em acetato, hidrogênio e CO₂ (AQUINO et al., 2007). Dessa forma, a fim de avaliar a produção de metano por ambas as populações metanogênicas e a capacidade sintrófica do sistema, neste trabalho, fez-se o uso de uma mistura de AGVs (acetato, propionato e butirato), utilizados como substrato no teste de AME (concentração de 3000 mg.L⁻¹) (Tabela 11) .

Tabela 11. Solução estoque concentrada de ácidos orgânicos utilizados como fonte de carbono

Substratos Orgânicos Voláteis	q.s.p. 50 mL	Concentração da solução
Acetato de sódio	4,69 g	93,8 g/L (0,469 g/L)
Propionato de sódio	3,307 g	66,14 g/L (0,3307g/L)
Butirato de sódio	2,753g	55,06 g/L (0,2753g/L)

Fonte: Adaptado de Martins et al.,(s.d)

Para dar início ao teste de AME, foi realizada, primeiramente, a determinação da concentração (g.L⁻¹) de STV presentes nos lodos analisados segundo APHA (2012) e, assim, foi definido o volume de lodo a ser adicionado em cada frasco, a fim de se obter uma concentração final de lodo correspondente a 5 gSTV.L⁻¹. Posteriormente, foram acrescentados ao lodo, 100 microlitros de macronutrientes e micronutrientes (Tabela 10) e completou-se com água destilada até 100 mL. Em seguida, foi realizada a purga do oxigênio presente nos frascos através de borbulhamento com nitrogênio gasoso durante 5 minutos e foram adicionadas cinco pastilhas de NaOH em cada cabeçote para reter o dióxido de carbono (CO₂) proveniente da digestão anaeróbia. As fórmulas utilizadas para a determinação da AME é apresentada com maior detalhamento no Apêndice B.

Os frascos foram, então, colocados em estufa sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30°C e foram aguardados 60 minutos para retirada da sobrepressão devida à expansão dos gases pela temperatura. Depois de 24 horas, adicionou-se 1 mL da fonte de carbono aos frascos (Tabela 11). Em seguida, iniciou-se a determinação da pressão com o controle Oxitop[®] (Figura 13).

Figura 13. Controle Oxitop®

Fonte: autora (2017).

4.6.1.8 Caracterização química do perfil da manta de lodo granular

A região de reação do reator contou com 18 pontos para coleta de amostras do lodo ao longo da altura. A fim de garantir que a amostra de lodo granular representasse todo o perfil reacional do sistema, a coleta de cada amostra analisada foi realizada colhendo a mesma quantidade de material em cada ponto de coleta da região de reação. As amostras foram coletadas da parte superior à inferior da manta de lodo.

Foi realizada a caracterização química da manta de lodo granular, com o objetivo de avaliar o conteúdo orgânico, por meio das análises de DQO, ácidos voláteis e carboidratos. A análise do perfil da manta de lodo granular foi realizada somente quando foi utilizada a vinhaça como substrato, nas COV de 25 e 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase I) e de 19 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase III).

4.7 Análises microbiológicas

4.7.1 PCR e DGGE

4.7.1.1 Amostragem da biomassa para as análises microbiológicas

As técnicas de PCR e DGGE foram utilizadas para verificar a diversidade microbiológica nas amostras de manta de lodo para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, nas seguintes condições: 1) amostra do lodo após um mês sem alimentação (entressafra) na COV de $32 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$; 2) amostra de lodo na COV de $25 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e 3) na COV $33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, ambos utilizando a vinhaça como substrato e 4) amostra de lodo na COV de $33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, utilizando o melão como substrato.

4.7.1.2 Extração do DNA total

Primeiramente foi realizada a extração do DNA total das amostras utilizando pérolas de vidro ($150\text{-}212 \mu\text{m}$ Sigma), por meio do rompimento das células sob forte agitação (vortex), liberando seus componentes celulares na solução de PBSx1, fenol tamponado com tris e clorofórmio. A extração foi finalizada com fases de recuperação e purificação do DNA liberado na solução.

A purificação do DNA foi realizada por meio do kit de purificação Ultra Clean PCR Clean-up, de acordo com as instruções do fabricante a fim de eliminar ou reduzir possíveis interferentes para realizar a reação de polimerização em cadeia (PCR).

4.7.1.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA obtido a partir das amostras foi amplificado pela reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando set de “primers”.

Para o domínio *Bacteria* utilizou-se o “primer” 968 FGC-1401 R. (NUBEL et al., 1996). As condições do programa de PCR utilizado foram (Tabela 12):

Tabela 12. Condições do programa de PCR

Temperatura	Tempo	Fases
95°C	7 min	Pré-desnaturação
94°C	45s	Desnaturação
56°C	45s	Anelamento
72°C	1 min	Extensão
72°C	10 min	Extensão final

Já para o domínio *Archaea* utilizou-se o “primer” 1100 FGC-1400 R (NUBEL et al., 1996). As condições do programa utilizado foram (Tabela 13):

Tabela 13. Condições do programa de PCR

Temperatura	Tempo	Fases
94°C	5 min	Pré-desnaturação
94°C	1 min	Desnaturação
55°C	1 min	Anelamento
72°C	1 min	Extensão
72°C	7 min	Extensão final

Nas fases de desnaturação, anelamento e extensão foram realizados 35 ciclos tanto para o domínio *Bacteria* quanto para *Archaea*.

4.7.1.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE possibilita a separação dos produtos de PCR (fitas de DNA) de acordo com suas sequências de pares de bases. Dessa forma, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de microrganismos, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão de “códigos de barra”, referente à comunidade de microrganismos presente nas amostras estudadas.

Primeiramente foram confeccionados os géis da eletroforese com poliacrilamida com um gradiente linear desnaturantes de 45 % a 65%. Após a polimerização dos géis, estes foram acoplados ao aparelho de DGGE (LOCCUS biotecnologia), que comporta, no máximo, dois géis por corrida e foram aplicadas as amostras.

As condições da eletroforese foi de 75 V a 60 °C por 16 horas. Após esse período, realizou-se a coloração com brometo de etídeo, em seguida, a leitura do perfil padrão das bandas no sistema de Fotodocumentação (L.PixTouch - LoccusBiotechnology) sob a exposição de 254 nm UV.

O software BioNumerics V.3.5 foi utilizado para analisar os padrões de bandas de DGGE, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, e método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) para a construção do dendrograma e obtenção do coeficiente de similaridade das amostras. Já o software Past V.3.06 foi utilizado para obter o índice de diversidade de Shannon (H) e a dominância da comunidade microbiológica presente nas amostras.

4.8 Expressões matemáticas e tratamento estatísticos dos dados para avaliação de desempenho do reator durante as fases experimentais

De acordo com os resultados das análises utilizou-se o *software* Microsoft Office Excel® 2017, a fim de obter os resultados de eficiência de remoção dos parâmetros previamente descritos, para avaliação do comportamento do reator UASB utilizado nesta pesquisa. As fórmulas utilizadas são apresentadas com maior detalhamento no Apêndice A.

Quanto à análise estatística, os resultados foram avaliados com o auxílio do software PAST (Paleontological Statistics) e o software Microsoft Excel ®2017. Foi utilizado o teste Mann-Whitney que é indicado para comparação de dois grupos não pareados a fim de verificar a existência de diferença estatística entre os parâmetros, apresentando nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da vinhaça

A vinhaça apresentou elevado conteúdo orgânico da ordem de 18750 mg.L^{-1} e pH da ordem de 4,72. Dentre os macronutrientes analisados, o potássio teve a maior concentração, com teores razoáveis de cálcio, sulfato e nitrogênio total, com baixa concentração de magnésio. Dos micronutrientes o ferro é predominante, sendo que manganês, cobre, zinco, chumbo, cádmio, níquel e cromo total aparecem em menores concentrações (Tabela 14).

Tabela 14. Caracterização da vinhaça

Parâmetros	Unidade	Resultado
Ácidos voláteis	$\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$	1286
Alcalinidade total	$\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$	307
DBO bruta	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$	7314
DQO bruta	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$	18750
Fenol	$\text{mgC}_6\text{H}_5\text{OH.L}^{-1}$	0,688
Nitrogênio amoniacal	mgN.L^{-1}	64
Nitrogênio nitrato	$\text{mgN-NO}_3^{-1}.\text{L}^{-1}$	260,70
Nitrogênio nitrito	$\text{mgN-NO}_2^{-1}.\text{L}^{-1}$	<0,001
Nitrogênio Total	mgN.L^{-1}	614
Kjeldahl		
pH	—	4,72
Sólidos Totais	mg.L^{-1}	17989
Sólidos Totais Fixos	mg.L^{-1}	3913
Sólidos Totais Voláteis	mg.L^{-1}	14076
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	$\text{mgSO}_4^{2-}.\text{L}^{-1}$	625
Sulfeto	$\text{mgS}^{2-}.\text{L}^{-1}$	3,600
Zinco	mgZn.L^{-1}	1,291
Chumbo	mgPb.L^{-1}	0,40
Cádmio	mgCd.L^{-1}	0,032
Níquel	mgNi.L^{-1}	0,482
Ferro	mgFe.L^{-1}	59,8
Manganês	mgMn.L^{-1}	5,61
Cobre	mgCu.L^{-1}	0,363
Cromo Total	mgCr.L^{-1}	0,052
Cálcio	mgCa.L^{-1}	773
Magnésio	mgMg.L^{-1}	134

Sódio	mgNa.L ⁻¹	26,1
Potássio	mgK.L ⁻¹	1140

Fonte: Alves (2015).

5.2 Caracterização do melaço

Na Tabela 15, encontra-se a caracterização do melaço utilizado na presente pesquisa. As amostras coletadas são referentes à safra de 2015 e 2016 e foram pesadas inicialmente 12 g de melaço e diluídas em 1 litro de água de abastecimento para a caracterização físico-química.

Tabela 15. Caracterização físico-química do melaço

Parâmetros	Coleta 2015	Coleta 2016	Método/referência
Carbono Orgânico total (mg C /L)	1503	2423	SM 5310 B
Cádmio (mgCd/Kg)	0,46	0,59	SM 3111 B
Chumbo (mgPb/Kg)	<LD	<LD	SM 3111 B
Cobre (mg Cu/Kg)	<LD	<LD	SM 3111 B
Cromo (mg Cr/Kg)	0,85	0,59	SM 3111 B
Ferro (mg Fe/Kg)	61,90	97,53	SM 3111 B
Manganês (mg Mn/Kg)	30,67	24,60	SM 3111 B
Níquel (mgNi/Kg)	<LD	<LD	SM 3111 B
Zinco (mg Zn/Kg)	5,35	5,41	SM 3111 B
Sulfato (mg/L)	320	272	Cromatografia de íons (Dionez, ICS 5000)
Fosfato (mg/L)	ND	ND	Cromatografia de íons (Dionez, ICS 5000)
DQOt (g O ₂ /L)	87,7	83,3	APHA, 2012
NTK (mg N –NH ₄ ⁺ /L)	36,0	37,0	APHA, 2012
Amônia (mg N –NH ₄ ⁺ /L)	1,0	1,0	APHA, 2012

Fonte: Análise externa.

<L/D abaixo do limite de detecção do método

ND não detectável

5.3 Desempenho do reator

A Figura 13 demonstra a eficiência de remoção de DQO em relação as COV aplicadas ao reator, durante todo o período operacional dos sistema, considerando:

Fase I: período relativo ao retorno da alimentação do reator após 1 mês fora de operação utilizando vinhaça como substrato.

Fase I -A: período relativo à repartida do reator.

Fase I-B: fase estacionária.

Fase II: período relativo à utilização do melaço como substrato.

Fase III: período relativo à volta da utilização da vinhaça como substrato.

Figura 14. Variação temporal da eficiência de remoção da DQO (◆) em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator (■)

Na Figura 14, a Fase I compreende a repartida do sistema, com vinhaça, após 30 dias de interrupção na alimentação. Essa fase durou aproximadamente 190 dias e iniciou-se com COV de 5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. À medida que a eficiência de remoção do sistema atingia valores a 80%, a COV foi aumentada gradualmente até atingir 34 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. A princípio a DQO afluente era em média de 20 g.L⁻¹, porém a partir do 124º dia de operação, decidiu-se aumentar a concentração de DQO afluente para 27 g.L⁻¹ por razões operacionais. O aumento de volume afluente estava limitado às instalações de preparo e armazenamento existentes.

A partir do aumento da COV durante o período de operação, pode-se inferir sobre sua influência na eficiência de remoção da DQO do sistema. Na Figura 14, pode-se observar que a eficiência de remoção de DQO foi superior a 80% em todas as cargas aplicadas, alcançando 90% de eficiência em 190º dias de operação.

Logo no início da repartida do reator (Fase I-A), este apresentou eficiência de remoção de DQO superior a 80%, alcançando uma eficiência de 89,95 % em apenas oito dias de operação. O reator manteve essa mesma eficiência em todo o período, com remoção média de $84,52 \pm 3,35$ %, e surpreendentemente com o aumento da concentração da vinhaça para 27 g.L⁻¹, esta eficiência manteve-se elevada, atingindo no último dia de operação, eficiência de 90,94% na COV de 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹.

Jáuregui-Jáureguiet al., (2014) estudaram a repartida de um bioreator de leito fixo para o tratamento anaeróbio de vinhaça de tequila. O período de repartida do reator foi de 28 dias e apesar de 6 meses sem alimentação, o sistema demonstrou uma excelente estabilização e resiliência do biofilme bacteriano. A carga orgânica volumétrica foi aumentada de 2,2 a 5,2 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e nesse período o reator alcançou eficiência de remoção de DQO superior a 90%, valor maior que na fase de partida do reator que foi de 80%. Esta maior eficiência de remoção de DQO no começo da repartida pode ser explicada pela estabilidade do biofilme previamente formado, e consequentemente o fluxo de carbono foi principalmente dirigido em direção à cadeia sintrófica dos microrganismos aumentando assim, a remoção de DQO. Em contrapartida, na fase da partida do reator, o fluxo de carbono foi direcionado principalmente ao glicocálise ou exopolímero para o desenvolvimento e crescimento do biofilme.

No presente trabalho, apesar do período sem alimentação, os grânulos formados por microrganismos presentes no reator UASB encontravam-se adaptados e resilientes ao meio, e consequentemente quando iniciou-se a repartida, o fluxo de carbono pode ter sido dirigido em direção à cadeia sintrófica dos microrganismos para seu crescimento, desenvolvimento e na formação de grânulos, metano e CO₂.

Wolmarans e Villiers (2002) avaliaram a operação sazonal do reator UASB tratando águas residuais de destilaria de vinho por período de 3 anos. No segundo ano de operação houve duas paralisações, por um período de 19 e 12 dias, respectivamente. As COVs antes da interrupção da alimentação eram 10 e 6 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e a COVs da repartida do reator eram 6 e 3 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. No terceiro ano, o reator permaneceu sem alimentação somente uma vez, por um período de 31 dias, com COV antes da interrupção do reator de 12 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e de repartida de 6 kg.m⁻³.d⁻¹. Os autores concluíram que mesmo após um período longo de inatividade, o reator alcançou eficiência de remoção de DQO superior a 90 % em poucos dias de operação.

No presente trabalho, na fase anterior à interrupção do reator, este encontrava-se estabilizado, com COV de 32 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e eficiência de remoção de DQO de 87%. Na repartida do sistema, após 69 dias de operação o reator atingiu a carga referente ao período anterior à interrupção de alimentação e remoção média de DQO de 85%.

A menor eficiência do período foi de 70 % com COV de 34 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, devido ao aumento da carga orgânica de 29 a 34 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, juntamente com a queda brusca da temperatura no dia e consequente aumento dos ácidos na faixa de 1813 mg.L⁻¹. Associa-se o acúmulo de ácidos pelo aumento de carga orgânica à inibição dos microrganismos

hidrogenotróficos responsáveis por retirar o hidrogênio do meio e favorecer a formação de acetato, condição essencial para que as bactérias metanogênicas prevaleçam. A consequência deste fato seria a queda na eficiência do processo e menor conversão da matéria orgânica em metano. Para o reestabelecimento do processo anaeróbio fez-se o uso de recirculação com água da rede municipal acrescida com bicarbonato de sódio, de forma a neutralizar os ácidos produzidos, permitindo que os microrganismos mantivessem a integridade celular e consumissem os ácidos acumulados.

Longo (2015) utilizou a mesma configuração de UASB apresentado neste trabalho para tratamento da vinhaça proveniente de cana-de-açúcar. O autor verificou que o aumento da carga orgânica gerou acúmulo de ácidos no sistema e consequentemente uma queda na eficiência do mesmo. Durante o período de partida, quando aplicou COV de $4,8 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, o reator apresentou eficiência de remoção média de DQO de 92%. Porém, quando aumentou a COV para $7 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, obteve-se valor médio de eficiência de 65,8%. Barros (2013) utilizou dois reatores UASB (R1 e R2), operados respectivamente, para o tratamento do melaço e vinhaça para geração de biogás sob condições mesofílicas. Avaliou-se a aplicação de COV de até $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no R1 e de até $11,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no R2. Aplicando-se COV de 5 a $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no R1 a eficiência média de remoção de DQO foi de 68%. Comparando-se com o resultado de R2, aplicando-se COV de 5 a $11,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a eficiência média de remoção de DQO foi de 79 %. No presente trabalho, para as faixas de cargas similares as eficiências de remoção de DQO obtidas foram de 88%.

Santana Junior (2013) operou um sistema de reatores em série, composto por dois reatores UASB termofílicos em escala piloto, com cargas crescentes de 0,15 a $12,50 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Na entressafra da colheita da cana-de-açúcar avaliou-se o uso do melaço e depois, novamente a vinhaça para a produção de metano. A remoção de DQO foi da ordem de 50% para cargas de até $7 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, utilizando vinhaça no início da operação. Neste trabalho a remoção de DQO foi da ordem de 87% para cargas de até $8 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Longo (2015) ao aplicar COV de 5,3 a $7 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ utilizando a vinhaça, obteve valor médio de eficiência de remoção de DQO de 65,8%. Para este trabalho, aplicando-se COV de 5 a $8 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a eficiência de remoção de DQO foi de 88%.

Souza et al., (1992) avaliaram um reator UASB termofílico em escala plena com volume de 75000L. O reator foi operado por 280 dias e aplicou COV de 25 a $30 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, alcançando eficiência média de remoção de DQO de 72%. Para este trabalho, porém, trabalhando com reator UASB sob condições mesofílicas tratando vinhaça, nas mesmas condições de carga a eficiência média de remoção de DQO foi de 84%.

Craveiro et al., (1986) operaram um reator UASB em escala plena com volume de 11000L em condições mesofílicas para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar de uma destilaria localizada em Penedo, Alagoas. A concentração da DQO da vinhaça era de aproximadamente de 31 g.L^{-1} (próxima a este trabalho que foi de 27 g.L^{-1}) e o TDH era de 1,7 dias. No período total de 140 dias de operação, obteve-se eficiência de remoção de DQO de 88% aplicando-se COV de até $40 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Alves (2015) obteve valor médio de eficiência de remoção de DQO maior que 92% para cargas até $10 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. No referido trabalho, os resultados alcançados foram obtidos durante o processo de partida, em que o aumento de cargas foi realizado por pequenos incrementos, demandando cerca de 2 meses e meio, permitindo que os microrganismos se adaptassem às cargas recebidas. Para este trabalho, para cargas até $10 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, o reator atingiu 89%, pois um dos objetivos era reduzir o período de repartida, havendo aumento significativo de carga no começo da operação. Dessa forma, os microrganismos não tiveram tempo suficiente para assimilar toda fonte orgânica recebida.

España-Gamboa et al., (2012) utilizaram um reator UASB mesofílico em escala de bancada tratando vinhaça proveniente do melaço de cana-de-açúcar, que apresentava concentração de DQO entre 110 a 130 g.L^{-1} , similar à este estudo. Os valores médios de COV aplicados foram de 7 a $22 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Os autores observaram que até COV de $17 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, houve aumento da eficiência de remoção de DQO, alcançando eficiência de 69%. Porém ao aplicar COV variando de 18 a $22 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a eficiência de remoção caiu consideravelmente para 55%. Comparando-se com este trabalho, ao aumentar a COV progressivamente de 8 a $23 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ aproximadamente, a eficiência de remoção de DQO foi de 86%.

Dong et al., (2010) estudaram a repartida do reator UASB após quatro meses sem alimentação, a fim de tratar águas residuais do processamento de soja, com DQO de 10 g.L^{-1} . Durante este período, o lodo granular foi mantido no reator à temperatura ambiente de 14-16°C. Na repartida, a concentração do substrato foi mantida, o TDH foi fixado em 24 horas e a COV aplicada foi de $10 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A fase da repartida do sistema, com a mesma carga aplicada, durou aproximadamente 40 dias. Após 35 dias, a eficiência de degradação da DQO atingiu um nível estável de 87%, indicando uma melhoria da atividade microbiana. No presente trabalho, após 13 dias de operação, aplicando-se COV de $10 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ a eficiência de remoção de DQO foi de 89%, com concentração da vinhaça na ordem de 20 g.L^{-1} . Para atingir a carga anterior ao período de interrupção o período de repartida foi de 69 dias.

Molina et al., (2007) investigaram o desempenho de um reator piloto híbrido USBF (UASB + filtro anaeróbio) implantado no tratamento de águas residuais de vinho em uma operação de longo prazo. A planta piloto foi iniciada com COV de $0,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Uma vez que o processo foi estável e a concentração de DQO efluente foi inferior a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, a carga orgânica foi gradualmente aumentada. No final da operação (após 60 dias), obteve-se COV de $5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com eficiência de remoção de 98% de DQO e uma acumulação insignificante de ácidos voláteis no sistema. Posteriormente, foi programada parada longa (várias semanas) da planta da estação para a simulação desses eventos sazonais que ocorrem nas indústrias. Após um período longo de interrupção da alimentação do reator (45 dias), a repartida foi de 5 dias. Iniciou-se com COV de $1 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e no quinto dia de operação a carga aumentou para $4 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, mantendo-se estável até o décimo dia. Logo após o dia dez, a carga aumentou para $6,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, durante 20 dias. Como resultado dessa etapa, obtiveram produção de metano superior a 100 L.h^{-1} , carbono orgânico dissolvido no efluente abaixo de 100 mg.L^{-1} e pH apresentou-se estável na faixa entre 7,2 e 6,9.

A Fase II compreende o período da troca da fonte orgânica. Neste período não há produção de vinhaça e um dos objetivos do presente trabalho foi utilizar o melaço e evitar um período de interrupção da operação do reator.

Esta fase durou 65 dias e foi mantida COV de aproximadamente $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ durante toda a operação com o melaço. A DQO do melaço diluído foi mantida fixa durante toda a fase operacional, em torno de 27 g.L^{-1} , mesma concentração utilizada anteriormente no final da Fase I. A eficiência média de remoção de DQO no período foi de aproximadamente 82% e a maior eficiência alcançada foi de 91% em 239 dias de operação.

Outros autores utilizaram o melaço como fonte de carbono em reatores anaeróbios, entretanto, em condições diferentes a este trabalho e em outras configurações de reatores.

Santana Junior (2013) ao utilizar o melaço no período da entressafra para operar os reatores UASB sob condições termofílicas alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar, verificou que a eficiência de remoção da DQO do sistema caiu para 43% para cargas orgânicas aplicadas de até $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

No trabalho de Barros (2013) o melaço foi diluído com o efluente do reator e adicionou-se nitrogênio e fósforo em sua composição. Ao utilizar o melaço como substrato no R1, obteve-se eficiência de remoção de DQO de aproximadamente 34%, aplicando-se COV decrescente de 7,5 a $5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Já o R2 atingiu maior eficiência, no valor de 49%, aplicando-se COV de 11,5 a $5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A troca de substrato não possibilitou a

manutenção da carga anteriormente aplicada ($11 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), mesmo com a redução da carga o reator apresentou baixa remoção de DQO.

Duda et al., (2011) avaliaram o desempenho de reatores UASB instalados em série, com volumes de 35 e 28,1 L, para o primeiro e segundo reatores, respectivamente, tratando melaço diluído com esgoto. Nos primeiros 35 dias de operação o afluyente utilizado para a alimentação dos reatores foi o melaço de cana-de-açúcar diluído com água potável apresentando concentração de DQO de 25 g.L^{-1} e posteriormente com esgoto doméstico. Obteve-se para o sistema eficiências médias de remoção de DQO de 58,7%.

Eficiências de remoção de DQO superiores à 70%, como as do presente trabalho, foram obtidas em sistemas anaeróbios tratando melaço de cana-de-açúcar, entretanto, sob COV bem inferiores. Exceção foi observada no trabalho de Kuroda et al., (2015) que avaliaram um sistema combinado de tratamento que consistia de reatores UASB termofílicos de múltiplos estágios, com o objetivo de tratar o melaço produzido em um processo de refinação do açúcar em uma fábrica no Japão. As unidades de tratamento eram compostas especificamente de um tanque de acidificação, dois reatores UASB e um reator de fluxo descendente no qual era composto por espumas de poliuretano. Os volumes dessas unidades eram de 13, 10, 11 e 13L, respectivamente. O sistema total obteve eficiência de remoção de DQO de 85% e DBO de 95%, com carga orgânica volumétrica máxima de $42 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Faria (2014) aplicou COV de melaço de cana-de-açúcar entre 5,9 a $15,2 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, para avaliar o desempenho de um reator UASB na faixa de temperatura mesofílica. O resultado mostrou que a maior eficiência alcançada foi de 72% na COV de $15,2 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

González et al., (1998) utilizaram melaço de cana-de-açúcar como substrato em reator UASB em escala de bancada com 16,5 litros de capacidade. Como resultado, obteve-se eficiência de remoção de DQO de 78,8% com COV aplicada de $7,1 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e de 91% com COV aplicada de $6,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Vilela (2017) estudou um sistema de reatores anaeróbios que possuíam leito fixo estruturado, de duas fases (acidogênico seguido de metanogênico) operados em condições termofílicas (55°C), alimentados com melaço de cana-de-açúcar. No trabalho, aplicou-se COV que variou de 1 a $26,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A eficiência de remoção de DQO do sistema de reatores foi de aproximadamente 90%, com contribuição de 80% para o reator metanogênico.

Park et al., (2010) avaliaram dois reatores de duas fases, um reator acidogênico seguido de um reator metanogênico, utilizando como substrato o melaço de cana-de-açúcar

gerado no processo de fabricação de açúcar, que possuía concentração de DQO de 28g.L^{-1} , valor próximo a este trabalho (27g.L^{-1}). Cada reator possuía volume de 2,5 L e foram submetidos a diferentes TDH. Para o reator metanogênico o TDH variou de 4 a 15 dias e os autores concluíram que o TDH de 6 dias possibilitou o melhor resultado, com eficiência de remoção de DQO máxima de 75,1% .

A Fase III compreende o período de retorno da alimentação do reator com vinhaça. Aplicou-se COV que variou na faixa de $5\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ a $19\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A eficiência média de remoção de DQO foi de 79,97%, sendo que em todo período operacional a eficiência do sistema esteve superior a 60% e a maior eficiência alcançada foi de 92%, aplicando-se COV de $10\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

No começo da operação prosseguiu-se com o incremento da COV, iniciando com $10\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e alcançando $17\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Entretanto, a eficiência de remoção de DQO diminuiu, então se decidiu diminuir a COV para $5\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ o que fez com que a eficiência de remoção de DQO do sistema se elevasse. Porém na tentativa novamente do incremento da COV a eficiência de remoção começou a diminuir e observou-se instabilidade do sistema em estudo (Figura 15).

Figura 15. Gráfico temporal da eficiência de remoção de DQO (◆) em função da COV (■) na Fase III

No trabalho de Santana Junior (2013), aplicando-se COV de 7,5 a $12,5\text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ de vinhaça, a eficiência de remoção de DQO do sistema aumentou de 43 a 48%, após a troca do substrato do melaço para vinhaça. Isso também foi observado por Barros (2013) que ao

aplicar COV de 5 a 11 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ de vinhaça, verificou que a eficiência de remoção de DQO aumentou de 34 a 61%, após a torca para a vinhaça.

A Figura 16 representa o gráfico *boxplot* referente à eficiência de remoção de DQO para cada carga orgânica volumétrica aplicada, para as diferentes fases operacionais, relacionadas aos substratos utilizados.

Figura 16. Gráfico *boxplot* da eficiência de remoção de DQO em relação à carga orgânica volumétrica aplicada

Comparando-se as três fases, pode-se observar que na Fase I, utilizando a vinhaça como substrato, houve menor dispersão dos dados, ou seja, o reator encontrava-se mais estabilizado. O longo período operacional e os critérios utilizados para aumento de carga contribuíram para elevada estabilidade do sistema.

Aplicando-se a análise estatística de Mann-Whitney, analisando todas as cargas aplicadas na Fase I, constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na eficiência de remoção de DQO, para as cargas orgânicas volumétricas aplicadas de 5 a 10 kg.m⁻³.d⁻¹ e maior que 30 kg.m⁻³.d⁻¹. Pode-se observar que o incremento da carga orgânica volumétrica reduziu a eficiência de remoção de DQO (Figura 16). O reator quando estava sendo operado na carga maior que 30 kg.m⁻³.d⁻¹ apresentou desempenho instável, como pode ser corroborado pelos dados de ácidos voláteis (seção 5.3.5).

Entretanto, quando houve a troca pelo melaço (Fase II), pode-se observar na Figura 16 que houve maior dispersão dos dados, apresentando instabilidade do reator e um decréscimo na eficiência de remoção da DQO.

A fim de analisar se a eficiência de remoção de DQO foi alterada pela troca da vinhaça pelo melaço, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, sob COV de 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fases I e II). O resultado demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) à eficiência de remoção de DQO.

Aplicando-se a análise estatística de Mann-Whitney entre as COV de 5 a 10 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, utilizando a vinhaça, porém no começo da operação (Fase I) e no final da operação (Fase III), constatou-se que não houve diferença significativa e isso foi constatado também ao aplicar COV de 11 a 20 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase I) e de 11 a 19 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase III).

Apesar das eficiências médias de DQO serem similares nas três fases estudadas, a Fase III apresentou grande dispersão dos dados. Para a geração de biogás, relacionada à eficiência de remoção de DQO, o desempenho do reator pode ser considerado adequado, uma vez que a eficiência média de remoção manteve-se em 80%. Além disso, a carga orgânica removida foi inferior, levantando a hipótese de que o melaço modificou a população dos microrganismos presentes no reator como discutido na seção 5.7.1.

De todo o período operacional, a maior eficiência de remoção de DQO foi na COV de 5 a 10 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase I), apresentando média de 88,07% e a menor eficiência de DQO no período foi na COV de 11 a 20 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase III), apresentando média de 77,54%, indicando satisfatória remoção de DQO em todo período operacional do sistema. Cabe destacar que a interrupção da operação com carga de 19 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ na Fase III deveu-se a finalização do tempo para realização da pesquisa e instabilidade do sistema em estudo.

A eficiência da relação entre a carga orgânica removida e aplicada é representada pela Figura 17:

Figura 17. Eficiência da relação entre carga orgânica removida e aplicada em todo o período operacional

De todo o período avaliado, a Fase I, utilizando a vinhaça, apresentou maior eficiência e estabilidade, entretanto, a troca da vinhaça pelo melaço, diminuiu a eficiência média da relação entre carga orgânica removida e aplicada, de 84 para 82%. E com a retomada da vinhaça ao reator (Fase III), houve a desestabilização do mesmo, fazendo com que dessa forma a eficiência média decrescesse para 80% (Figura 17).

A carga orgânica aplicada e removida durante o período operacional para cada Fase é representada a seguir (Figura 18):

Figura 18. Carga orgânica aplicada e removida durante o período operacional

Pode-se concluir que de todo período operacional, somente nas Fases I e II, o sistema conseguiu absorver a carga orgânica, podendo inferir que a carga orgânica removida

acompanhou a carga orgânica aplicada ao reator, indicando o potencial do sistema em absorver as cargas crescentes no intervalo de cargas avaliadas.

5.3.1 Geração de biogás

A partir da análise do volume produzido e da composição do biogás, gerado da conversão da matéria orgânica pela digestão anaeróbia, foram obtidos resultados em função das COV aplicadas (Figura 19). Durante todo período operacional, o reator produziu uma vazão média de biogás de 626 L.d^{-1} , no qual 408 L.d^{-1} corresponderam ao gás metano.

Na presente pesquisa, observou-se que do dia 232 a 281, o gasômetro apresentou problema na medição do biogás.

Figura 19. Variação temporal da vazão de biogás (◆) e metano (◆) em função da COV (■)

Até o 99º dias de operação, o incremento das COV implicou no aumento da vazão de biogás e de metano. Entretanto, ao aplicar COV de aproximadamente $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a produção de biogás inicialmente aumentou e em seguida sofreu um decréscimo variando entre $666,24$ e $1170,48 \text{ L.d}^{-1}$.

De todo o período operacional, a Fase I foi a que apresentou maior vazão média de biogás. A Fase I-A, referente ao começo da repartida do sistema, apresentou vazão média de

biogás 575,19 L.d⁻¹ e metano de 374,57 L.d⁻¹ e a Fase I-B, referente à fase estacionária, 942,88 L.d⁻¹ de biogás e metano de 612,91 L.d⁻¹.

Ao utilizar o melaço, Fase II, a produção de biogás e metano decresceu apresentando vazão média de biogás 681 L.d⁻¹ e de metano, 436 L.d⁻¹.

A Fase III foi a que apresentou a menor produção de biogás e metano do período, 98 e 74 L.d⁻¹, respectivamente, devido aos menores valores COV aplicadas ao reator.

A Tabela 16 a seguir, representa o valor médio da porcentagem de CH₄ contido no biogás, da produção volumétrica e do rendimento de todas as Fases em função da COV.

Tabela 16. Valores médios da porcentagem de CH₄ contido no biogás, da produção volumétrica e do rendimento

Reator UASB	COV (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	% CH ₄	Prod. volumétrica L _{CH₄} (L.d) ⁻¹	Rendimento L _{CH₄} (gDQOremov) ⁻¹
Fase I-A	5-29	65	6,02	0,35
Fase I-B	33	65	10,22	0,35
Fase II	33	64	7,28	0,26
Fase III	5-8,5	75	1,23	0,26

Da análise do volume produzido e da composição do biogás, gerado a partir da conversão da matéria orgânica pelo processo anaeróbio, foram obtidos resultados em função das COV aplicadas (Figura 20).

Figura 20. Variação temporal da produção volumétrica de CH₄ (◆) em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator (■)

Na Fase I, a produção volumétrica de metano foi crescente com o aumento da COV, nos 85 dias iniciais de operação, alcançando valor de até $11,7 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$ (Figura 20), em virtude da maior disponibilidade de substrato a ser convertido a biogás. Entretanto, ao atingir COV de aproximadamente $33 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ os valores de produção de metano diminuíram, oscilando entre 6,48 e $12,17 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$.

De todo o período operacional, a Fase I foi a que apresentou a maior produção média no período. A Fase I-A obteve produção média de $6,02 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$ e a Fase I-B de $10,22 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$.

Na Fase II, com a utilização do melaço após 190 dias de operação, a produção volumétrica de metano medido foi similar quando se aplicou a vinhaça na mesma carga (COV $33 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$). A produção média de metano foi um pouco inferior $7,28 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$ devido ao aumento de ácidos voláteis totais nessa fase.

Contudo, na Fase III houve uma queda significativa na produção de metano $1,23 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$, devido aos menores valores de carga aplicada ao reator (5 a $8,5 \text{ kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$).

O gráfico *boxplot* representa a produção teórica, calculada estequiometricamente em função da DQO removida, e a produção medida de metano de todo o período operacional (Figura 21).

Figura 21. Gráfico *boxplot* da produção teórica e medida de metano

Nas fases I e II, ambas com valores médios similares de produção de metano, 8 e $7,28 \text{ LCH}_4 \cdot (\text{L.d})^{-1}$ respectivamente, observou-se também maiores valores médios de carga orgânica removida (1333 e 1600 g.d^{-1}), respectivamente. Portanto, houve conversão da matéria orgânica pelos microrganismos presentes no reator para geração de metano.

Entretanto, na Fase III, a reduzida produção de metano esteve associada à baixa aplicação de carga orgânica no sistema, apresentando valor médio de 470 g.d^{-1} .

Cabello et al., (2009) utilizou um reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF), em escala piloto, sob condições mesofílicas, com o objetivo de diminuir a carga orgânica da vinhaça. Obteve-se produção máxima de biogás no reator de apenas $0,046 \text{ L.d}^{-1}$, aplicando-se COV máxima de $19,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

5.3.2 Rendimento de Metano

O rendimento de metano de todo o período operacional apresentou valor médio de $0,35 \text{ LCH}_4 (\text{gDQOremovida})^{-1}$, com aplicação de COV de até $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (Figura 22 e 23), e valor próximo ao do teórico ($0,39 \text{ LCH}_4 (\text{gDQOremovida})^{-1}$). Os dados indicaram que o sistema apresentou bom desempenho em relação à produção de energia em todas as fases operacionais.

Alguns valores de rendimento obtidos na Fase I, ficaram acima do valor teórico, $0,39 \text{ LCH}_4 (\text{gDQOremovida})^{-1}$, indicando que a produção de metano foi superior ao potencial de geração em função da carga orgânica aplicada, associado à solubilização da matéria orgânica particulada retida na manta de lodo. Ao entrar em contato com o leito de lodo em suspensão na base do reator, a população de bactérias hidrolíticas fermentativas inicia o processo da digestão anaeróbia por meio da conversão de polímeros orgânicos complexos a monômeros facilmente assimilados pelas bactérias acidogênicas. A dispersão dos dados observados (Figura 22), especialmente na Fase I, indicam que o processo de acúmulo e hidrólise do material particulado da vinhaça é natural para a degradação anaeróbia da vinhaça. Com a utilização do melaço, com reduzida participação da fração sólida, não houve relação entre a geração de biogás e hidrólise. O mesmo pode ser observado com o retorno da alimentação com a vinhaça, que possivelmente acarretou retenção de sólidos, porém, não houve tempo para estabelecimento do processo de hidrólise. Corroborando com essas afirmativas, a parte da DQO devida aos sólidos foram de 1130, 588 e 733 mg.L^{-1} , para as fases I, II e III, respectivamente.

Figura 23. Gráfico *boxplot* do rendimento medido e teórico

Nas Fases II e III, com a utilização do melão e com a retomada da vinhaça respectivamente, os valores médios de rendimento de metano foram decrescentes e apresentaram em ambas as fases, valor médio de $0,26 \text{ LCH}_4 (\text{gDQOremovida})^{-1}$, abaixo do valor teórico, logo, o metano produzido foi inferior ao potencial obtido pela carga que foi removida, indicando o desvio do uso de energia para readaptação das populações dos microrganismos presentes no reator devido as novas condições impostas ao meio, como a mudança do substrato (discutido na seção 5.7.1) e supostamente parte da DQO devida aos sólidos ficou retida no reator e ainda não foi processada na hidrólise, 588 e 733 mg.L^{-1} , correspondentes às Fases II e III, respectivamente.

Barros (2013) operou dois reatores UASB mesofílicos utilizando vinhaça e melaço e ao utilizar a primeira, obteve rendimento de metano máximo de $0,190 \text{ (gDQOremovida)}^{-1}$ ao aplicar COV de até $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Ao utilizar o melaço, o rendimento diminuiu para valores médios de $0,081 \text{ LCH}_4 \text{ (gDQOremovida)}^{-1}$, aplicando COV de $11,5$ a $5,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Com a retomada da vinhaça, os valores continuavam diminuindo até $0,054 \text{ LCH}_4 \text{ (gDQOremovida)}^{-1}$, aplicando COV de 5 a $7 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente, devido aos elevados valores de ácidos voláteis totais. Os autores creditaram os baixos valores obtidos à perda de biogás no sistema de coleta e à presença de gases dissolvidos no efluente.

Faria (2014) alcançou rendimento de metano máximo de $0,194 \text{ LCH}_4 \text{ (gDQOremovida)}^{-1}$, utilizando o melaço, com aplicação de COV média de $9,9 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

A Figura 24 demonstra a porcentagem de metano contido no biogás em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator.

Figura 24. Porcentagem de metano contido no biogás (◆) em função da carga orgânica volumétrica aplicada (■) ao reator

Pode-se observar, na Fase I, que até o 84º dia de operação com COV crescente, o biogás produzido apresentou média de $66 \pm 4\%$ de metano (COV: 5 a $29 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). A partir da aplicação de maiores cargas (COV de aproximadamente $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), a média da fração de metano não sofreu alteração ($66 \pm 5\%$). Nessa fase a porcentagem de metano contido no biogás atingiu valor mínimo de 59% e máximo de 80% . Ao substituir a vinhaça pelo melaço na Fase II, sob a mesma carga (COV de aproximadamente $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), a

média da fração de metano diminuiu, no entanto, foi próxima ao período anterior, quando a vinhaça era o substrato ($64 \pm 4\%$). Então pode-se concluir que a troca da vinhaça pelo melaço não alterou de forma significativa a fração de metano contido no biogás, apresentando porcentagem mínima e máxima de 60 e 74%, respectivamente. No entanto, na Fase III, ao aplicar menores cargas (COV: 5 a $8,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) ao reator, a média da fração de metano sofreu acréscimo ($75 \pm 4\%$), alcançando porcentagem mínima e máxima de 69 e 80%, respectivamente (Figura 24).

Segundo Grover et al.,(1999) o aumento da COV ao sistema implica no aumento de produção de biogás, devido ao fato da maior disponibilidade de substrato a ser convertido a biogás, e resulta na queda do teor de metano, no qual pode ser atribuído ao rápido crescimento dos microrganismos acidogênicos, quando comparado à baixa velocidade de crescimento das arqueias metanogênicas.

Barros (2013) ao elevar COV de 7,5 a $11,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, observou que as porcentagens de metano no biogás decresceram de 85 para 61%, com produção volumétrica de metano atingindo $1,3 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$ ao utilizar a vinhaça como substrato. Ao diminuir a COV para $5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, utilizando melaço, houve um decréscimo do teor de metano atingindo 52% e a produção volumétrica de metano atingiu $0,16 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$. A partir da retomada da alimentação com vinhaça e COV até $11 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, as concentrações de metano permaneceram na faixa de 47%, diminuindo a produção volumétrica de metano para $0,3 \text{ LCH}_4(\text{L.d})^{-1}$. Portanto, no trabalho do referido autor, mesmo aumentando a COV no final da operação, a produção volumétrica de metano continuou a diminuir e atrelado a isso a eficiência de remoção de DQO foi baixa (discutido anteriormente), quando da troca da vinhaça pelo melaço e com a retomada da vinhaça no final da operação, mostrando que a troca do substrato diminuiu a eficiência do sistema.

Craveiro et al., (1986) ao operarem um reator UASB tratando vinhaça em condições mesofílicas obtiveram produção de biogás próxima a este estudo, de $14 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$ com teor de 60% de metano, ao aplicar COV máxima de $40 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

España-Gamboa et al., (2012) utilizaram um reator UASB em escala de bancada no tratamento da vinhaça em condições de temperatura mesofílica ($30 \pm 5^\circ\text{C}$), durante 70 dias. O objetivo do estudo foi determinar a COV ideal para a operação do reator UASB modificado para tratamento da vinhaça obtida a partir da produção de etanol hidratado. A eficiência de remoção de DQO obtido foi de 69%, os valores médios de COV variaram de 7,3 a $22,2 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A COV considerada ideal foi de $17,1 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com rendimento de metano de $0,263 \text{ LCH}_4 (\text{gDQOremovida})^{-1}$ e concentração de metano no biogás de 84%.

Faria (2014) utilizou um reator UASB em condições mesofílicas utilizando o melaço de cana-de-açúcar e foram observadas produção volumétrica e rendimento específico de metano de até $0,97 \text{ LCH}_4 (\text{L.d})^{-1}$ e de $0,194 \text{ LCH}_4 (\text{g DQO removida})^{-1}$, respectivamente, com COV média de até $15 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

A produção máxima de biogás e volumétrica de metano alcançadas por Fuess et al., (2017) operando sistema de duas fases em condições termofílica foram de $0,0843 \text{ L.d}^{-1}$ e $0,0199 \text{ LCH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente, aplicando-se COV de $25 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e o rendimento máximo de metano foi de $0,334 \text{ LCH}_4 (\text{gDQOremovida})^{-1}$, com COV de $15 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Molina et al., (2007) utilizaram um reator USBF (UASB+ filtro anaeróbio) em escala piloto para tratamento da vinhaça e obtiveram concentração de metano no biogás de 70 a 74%, produção volumétrica de $2,83 \text{ LCH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ quando o reator permaneceu sem alimentação por 45 dias e alto rendimento de metano de $0,33 \text{ LCH}_4(\text{gDQOremovida})^{-1}$. Os autores consideram a unidade adequada para recuperação de energia.

Souza et al., (1992) obtiveram produção específica de metano de $0,37 \text{ LCH}_4(\text{gDQOremovida})^{-1}$, produção volumétrica de $9,8 \text{ LCH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e porcentagem de 60% com COV de $26,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e TDH de 10,8 horas em reator UASB termofílico tratando vinhaça.

Santana Junior (2013) obteve produção volumétrica máxima de metano $0,102 \text{ LCH}_4 (\text{L.d})^{-1}$, aplicando-se COV de 0,15 a $3,50 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e rendimento de $0,290 \text{ LCH}_4(\text{gDQOremovida})^{-1}$. Em seguida, ao utilizar o melaço como substrato, a produção volumétrica decresceu para $0,097 \text{ LCH}_4 (\text{L.d})^{-1}$ e o rendimento foi de $0,062 \text{ LCH}_4(\text{gDQOremovida})^{-1}$, com COV de 7 a $7,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e com a retomada com a vinhaça e aplicando-se COV de 7,5 a $12,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a produção volumétrica de metano foi de $0,275 \text{ LCH}_4 (\text{L.d})^{-1}$ e o rendimento foi de $0,093 \text{ LCH}_4(\text{gDQOremovida})^{-1}$.

5.3.3 pH, ácidos voláteis e alcalinidade

Os valores de pH afluente foram medidos antes da adição de alcalinizante e variaram entre 3,86 e 4,48 (Fase I), 4,44 e 6,47 (Fase II) e 4,33 e 5 (Fase III). A dosagem de bicarbonato de sódio foi realizada avaliando o pH efluente, pois tinha-se por objetivo mantê-lo próximo a 8,0. Na Fase I, utilizando a vinhaça como substrato, o valor de pH efluente variou entre 7,39 e 8,43. Na Fase II, com a substituição gradativa da vinhaça por melaço,

entre 7,17 e 8,72. O retorno da vinhaça como substrato, na Fase III, proporcionou ao reator pH efluente entre 7,89 e 8,3 (Figura 25).

O pH efluente se manteve relativamente estável, com desvio padrão de 0,27, durante todo o período operacional (340 dias) (Tabela 17). Portanto, associado aos dados de ácidos voláteis no efluente, pode-se concluir que o processo de digestão anaeróbia foi completo e que o acúmulo de ácidos foi tamponado pela alcalinidade existente, mantendo o pH do meio.

Tabela 17. Valores máximos, mínimos, média e desvio padrão do valor de pH afluente e efluente

pH	Efluente
Valores mínimos	7,17
Valores máximos	8,72
Média	7,87
Desvio padrão	0,27

5.3.4 Relação AI/AP

A Figura 26 representa a evolução dos valores da razão entre Alcalinidade Intermediária (equivalente a alcalinidade dos ácidos voláteis) e Alcalinidade Parcial (equivalente a alcalinidade a bicarbonato) em função da variação de COV aplicada ao reator.

Figura 26. Variação da relação AI/AP (◆) no efluente do reator em função da variação da carga orgânica volumétrica aplicada (■) ao reator

A alcalinidade é uma medida da capacidade de neutralizar ácidos formados no processo de digestão anaeróbia. Ripley et al.,(1986) determinaram as parcelas de alcalinidade a bicarbonato e de ácidos voláteis por meio de titulação. A titulação de uma amostra centrifugada até o pH de 5,75 fornece a alcalinidade parcial (AP) equivalente à maior parcela da alcalinidade a bicarbonato e depois até o pH de 4,3 fornece a alcalinidade intermediária (AI) equivalente à maior parcela da alcalinidade de ácidos voláteis.

A relação AI/AP fornece um indicativo sobre o acúmulo de ácidos no sistema e a disponibilidade de alcalinidade. A instabilidade no valor dessa relação é um indicativo do desequilíbrio dos processos de produção e consumo dos ácidos pelo consórcio de microrganismos participantes da digestão anaeróbia.

A correção de pH, baseada nas determinações de ácidos voláteis e alcalinidade são realizadas visando a proteção imediata dos microrganismos, que têm seu metabolismo associado à faixas de pH determinadas. Aumento na relação AI/AP requer a adição de produtos químicos como hidróxido de sódio (NaOH), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃), que fornecem alcalinidade a bicarbonato ao sistema. Os produtos químicos que reagem com gás carbônico para produzir alcalinidade a bicarbonato são óxido de cálcio (CaO), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) e amônia (NH₃). Entretanto, o equilíbrio do processo de digestão anaeróbia é regido pelas reações de produção e consumo dos ácidos, os quais são controlados apenas pela atividade dos microrganismos em função das cargas aplicadas.

Diante disso, na Fase I houve variação entre 0,10 e 0,42 para relação AI/AP. Na Fase II foi entre 0,10 e 0,51 e na Fase III foi entre 0,07 e 0,16.

Da análise do período operacional, verificou-se que o reator se manteve estável em todas as fases analisadas do sistema, com relação AI/AP entre 0,1 e 0,3. Além da relação apresentar-se praticamente constante no período de estudo, os baixos valores indicaram equilíbrio entre as fases ácida e metanogênica, uma vez que não houve acúmulo de ácidos no sistema. Entretanto foi constatada a presença de alguns *outliers* no período operacional do sistema (Figura 26). Na Fase I, utilizando a vinhaça como substrato, o maior valor da relação AI/AP foi de 0,42 devido ao começo da operação do reator, contudo, a relação diminuiu para valores menores que 0,3 rapidamente com o incremento da COV aplicada ao sistema. Depois de 98 dias de operação, houve o aumento novamente da relação AI/AP no valor de 0,38 em razão do aumento da concentração dos ácidos no valor de 2719 mg.L^{-1} , juntamente ao fato da queda brusca da temperatura no dia. Já na Fase II a maior relação AI/AP no período foi de 0,51 no final do período de operação com o melaço, em razão do aumento de ácidos voláteis, 920 mg.L^{-1} .

5.3.5 Ácidos Voláteis Totais

Para o controle operacional do reator UASB, foi realizado o monitoramento das concentrações de ácidos voláteis afluentes e efluentes, por meio de métodos analíticos titulométricos (AVT) e por cromatografia gasosa. A Figura 27 mostra a variação da concentração de ácidos voláteis afluente e efluente do reator e a COV ao longo do período operacional.

Figura 27. Variação da concentração de ácidos voláteis afluente (▲) e efluente (▲) em função da carga orgânica volumétrica aplicada ao reator (■)

Nota-se que na Fase I, quando a vinhaça era o substrato, até a carga de aproximadamente $22 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ o aumento na COV aplicada foi acompanhado pelo aumento na concentração de ácidos voláteis e que a partir dessa carga, o reator se manteve estável, com concentração de ácidos voláteis perto de 400 mg.L^{-1} , indicando estabilidade do sistema em estudo e, além disso, pelo gráfico *boxplot* abaixo (Figura 28), observa-se que 75 % dos dados possuem concentração de ácidos voláteis menor que aproximadamente 500 mg.L^{-1} .

Figura 28. Gráfico *boxplot* da concentração de Ácidos Voláteis afluente e efluente

Entretanto, houve alguns períodos de instabilidade do reator, alcançando concentração de ácidos voláteis próximos a 900 mg.L^{-1} depois de 48 dias de operação. No 99º dia de operação, a concentração de ácidos voláteis aumentou consideravelmente, alcançando 2719 mg.L^{-1} , consequência do aumento da carga aplicada de 32 para $34 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e além do mais soma-se o fato que nesse dia ocorreu queda brusca da temperatura, indicando desequilíbrio entre a produção e consumo de ácidos.

Molina et al., (2007) observaram também aumento dos ácidos voláteis por sobrecarga orgânica. Ao aplicar COV de $20 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ o reator se manteve estável e o efluente apresentou boa qualidade, para o tempo de detenção hidráulica de 20 horas. Porém, para este mesmo tempo, e aplicando-se carga orgânica volumétrica de $25 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, o reator sofreu desestabilização, creditada à sobrecarga orgânica. O pH diminuiu para 5 e a população metanogênica foi inibida. Uma vez que a carga foi reduzida, o reator precisou de um período de 5 dias para a completa recuperação, indicando que o limite da biomassa foi atingido e que a forma em que se deu o aumento de carga não possibilitou a adaptação dos microrganismos presentes no reator.

A Fase II, com a utilização do melaço, resultou na maior concentração de ácidos de todo o período operacional, alcançando valores acima de 500 mg.L^{-1} e próximos a 1000 mg.L^{-1} (Figura 27), consequência da manutenção de uma elevada carga orgânica ($25\text{-}35 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). A composição do melaço, constituído por elevada concentração de carboidratos, facilmente biodegradados no início do processo da digestão anaeróbia, precisamente na acidogênese, resulta no aumento de ácidos no sistema, até o desenvolvimento da biomassa metanogênica capaz de absorver a carga excedente.

Pelo gráfico *boxplot* (Figura 28) e Tabela 17, nota-se na Fase II, maior variabilidade e aumento dos valores médios na concentração de ácidos efluente.

Tabela 17. Valores da média, mediana e desvio padrão da concentração de ácidos voláteis afluente e efluente em função da carga orgânica volumétrica aplicada

Fases de operação	Dias de operação	COV ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	Ácidos Voláteis (mg.L^{-1})			Ácidos Voláteis (mg.L^{-1})		
			Afluente			Efluente		
			Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão
I	190	5-34	2860,11	2695,00	945,81	374,41	424,81	387,29
II	66	25-35	403,73	956,54	1024,49	357,69	470,68	399,22
III	57	5-19	2915,84	2660,99	863,88	158,19	154,20	36,98

Observa-se na Figura 27, no 251º dia de operação a instabilidade do processo, aumento na concentração de ácidos efluente, alcançando $1653,8 \text{ mg.L}^{-1}$, ao aplicar carga máxima de $35 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Porém o reator se recuperou em dois dias, após a recirculação com água da rede municipal acrescida de bicarbonato de sódio, de forma a neutralizar os ácidos produzidos e restaurar a concentração de alcalinidade do meio, diminuindo assim a concentração de ácidos para $151,10 \text{ mg.L}^{-1}$.

Devido à maior concentração de ácidos voláteis do período, houve o acréscimo da quantidade de bicarbonato de sódio adicionado à alimentação do reator, alcançando a dosagem máxima aplicada ao reator no trabalho de $0,7 \text{ g NaHCO}_3.\text{gDQO}$. Porém, ao verificar a diminuição da concentração de ácidos voláteis, a dosagem foi reduzida para $0,5 \text{ g NaHCO}_3.\text{g DQO}$.

Na Fase III, retornando à alimentação com vinhaça, observa-se pela Figura 27, que a concentração dos ácidos efluente diminuiu, em consequência do decréscimo da carga aplicada, alcançando valores próximos a 200 mg.L^{-1} . Nota-se pelo gráfico *boxplot* (Figura 28) e Tabela 17, menor variabilidade e decréscimo dos valores médios na concentração de ácidos efluente.

Analisando-se a concentração de ácidos afluente, observa-se que a vinhaça resultou na maior concentração quando comparado ao melaço, justificando o menor valor de pH afluente. Nota-se que as médias da concentração de ácidos da vinhaça são próximas (2695 e 2660 mg.L^{-1}) e do melaço foi de 956 mg.L^{-1} (Tabela 17), entretanto pelo gráfico *boxplot* (Figura 28), observa-se maior variabilidade na concentração de ácidos quando o melaço foi utilizado como substrato, tanto afluente como efluente.

Apesar dos valores elevados de ácidos voláteis afluente, tanto da vinhaça como do melaço, os valores do efluente foram inferiores, indicando que as condições predominantes favoreceram o consumo de AVT contido na vinhaça ou melaço e principalmente produzido no processo de digestão anaeróbia.

No processo de digestão anaeróbia de compostos orgânicos existe um consórcio entre microrganismos acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos. O equilíbrio desse consórcio pode ser averiguado pela análise dos ácidos voláteis, pois estes são os principais substratos e produtos dos microrganismos que participam desse consórcio. Os valores médios dos ácidos voláteis por cromatografia gasosa, que discrimina os ácidos formados, estão presentes na Tabela 18.

Tabela 18. Metanol, ácido acético, propiônico e butírico presentes no efluente

Fases	Metanol	Ácido Acético	Ácido Propiônico	Ácido Butírico e Isobutírico
I	16 ± 6,7	63 ± 33	9 ± 6	<LD
II	33 ± 12,3	172 ± 131	91 ± 61	20 ± 13,6
III	36 ± 3,5	28 ± 20	<LD	<LD

<LD: abaixo do limite de detecção

No começo da digestão anaeróbia, há a etapa da acidogênese em que ocorre a formação de ácidos orgânicos, principalmente, acético, propiônico e butírico, pelos microrganismos acidogênicos que possuem elevadas taxas de crescimento.

Em seguida, há a etapa da acetogênese, em que as bactérias sintróficas acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos ácidos formados, em substrato apropriado para os microrganismos metanogênicos (acetato, hidrogênio e dióxido de carbono). As reações acetogênicas só poderão ocorrer se a concentração de produtos (hidrogênio e acetato) for mantida em baixas concentrações, e isso é conseguido pela ação dos microrganismos consumidores de acetato (arqueas metanogênicas acetoclásticas) e hidrogênio (arqueas metanogênicas hidrogenotróficas).

Diante disso, na Fase I com a utilização da vinhaça, não houve acúmulo dos ácidos, indicando equilíbrio entre as populações de bactérias acetogênicas e de arqueias metanogênicas (Tabela 18).

Contudo, na Fase II, com a utilização do melaço, houve maior acúmulo de ácidos comparado com outras fases, devido à conversão mais rápida do carboidrato presente na composição do melaço, que faz com que haja formação mais rápida de ácidos no sistema, ao contrário da vinhaça que possui composição mais complexa, presença de metais traços e contêm inibidores.

Espinosa et al., (1996) avaliaram um reator UASB em escala de bancada, volume de 2,3 L, alimentado com melaço de cana-de-açúcar sob COV de 5 a 21,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Na carga de 17,4 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, houve acúmulo de ácidos voláteis, principalmente ácido propiônico. Os autores concluíram que foi devido à reduzida disponibilidade ou falta de metais como ferro, níquel, cobalto e molibdênio (Fe, Ni, Co e Mo) na composição do melaço. Ao adicionar esses elementos, o desempenho do reator melhorou reduzindo significativamente a concentração de ácido propiônico (5291 a 251 mg.L⁻¹) e acético (1100 a 158 mg.L⁻¹). Segundo Thanh (2016) os metais traços são essenciais para o crescimento de microrganismos anaeróbios, no entanto, na prática são adicionados em quantidades excessivas, o que pode levar à inibição.

Entretanto, o sistema em estudo manteve o equilíbrio entre a produção e utilização de ácidos voláteis. Pode-se concluir que a substituição da vinhaça pelo melaço, não criou condições ambientais adversas no interior do reator, indicando que essas populações se encontravam presentes em quantidades suficientes e que houve a adaptação desses microrganismos com a troca do substrato.

Já na Fase III pode-se observar que o sistema não acumulou ácidos (Tabela 18). No início, a carga aplicada foi da ordem de $10 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, inferior à aplicada nas fases anteriores, permitindo que os microrganismos presentes no sistema desempenhassem o processo anaeróbico completo. Nesse período operacional não foi possível atingir as cargas anteriores, uma vez que a operação de readaptação com a vinhaça demandou períodos de tempo elevados e estratégias de aumento lento de carga e também devido à falta de tempo disponível no programa de mestrado.

No monitoramento de reatores anaeróbios, a avaliação sistemática da alcalinidade torna-se mais importante que a avaliação do pH. Devido ao fato que pequenos abaixamentos de pH implicam no consumo de elevada quantidade de alcalinidade, isso se deve à escala logarítmica do pH, diminuindo a capacidade de tamponamento do meio. Por meio da análise da Tabela 20 nota-se a variabilidade nos valores de alcalinidade a bicarbonato efluente, durante o período operacional.

Tabela 19. Valores da média e desvio padrão da alcalinidade a bicarbonato efluente

Alcalinidade Efluente (mg.L⁻¹)	Média	Desvio padrão	cv (%)
Fase I	5256	954	18
Fase II	5380	1418	26
Fase III	8151	1497	18

Foram analisados os valores de alcalinidade a bicarbonato efluente ao reator tratando vinhaça e melaço, de forma a monitorar a estabilidade do processo anaeróbico, por meio da capacidade de tamponamento do meio (Figura 29).

Na Fase I, utilizando a vinhaça como substrato, observa-se que até 27 dias de operação, houve o aumento da alcalinidade a bicarbonato no sistema, até uma concentração de 8065,23 mg.L⁻¹ CaCO₃. No começo dessa fase, o sistema ainda se encontrava em adaptação e além do mais o pH da vinhaça apresentava valores muito baixos, entre 3,86 e 4,48. A estratégia adotada foi a manutenção de elevada dosagem de bicarbonato ao afluente 0,5 g NaHCO₃.g DQO e a manutenção do pH afluente entre 7 e 8, evitando queda de pH provenientes de possíveis sobrecargas orgânicas ao reator (Figura 29). Quando o reator se estabilizou, a dosagem de bicarbonato diminuiu para 0,3 g NaHCO₃.g DQO até o final dessa fase.

Ainda na Fase I, do 29º ao 57º dia de operação a alcalinidade a bicarbonato apresentou decréscimo, com valores máximos e mínimos, respectivamente, de 7381,44 e 3116,88 mg.L⁻¹ CaCO₃. Esse decréscimo pode ser explicado pelo aumento dos ácidos voláteis totais no 48º dia de operação (832,03 mg.L⁻¹) que implicou no consumo de bicarbonato do sistema.

Do 62º ao 91º dias de operação, o valor da alcalinidade aumentou, com a diminuição dos ácidos voláteis ao sistema. Entretanto, houve algumas situações em que observou-se acúmulo de ácidos e redução da alcalinidade e assim foram tomadas atitudes que resolveram o problema, como a interrupção da alimentação e recirculação do efluente. Por fim, o sistema se recuperou apresentando valor médio de 5399 ± 255 mg.L⁻¹ CaCO₃, no final da Fase I.

Na Fase II ao utilizar o melaço como substrato, houve aumento da alcalinidade a bicarbonato no sistema. Devido ao aumento de ácidos no reator, aumentou-se a dosagem de bicarbonato ao afluente, para manter o tamponamento do meio e evitar a diminuição do pH e azedamento do mesmo, até que o consumo de ácido se estabelecesse.

Os valores mínimo e máximo obtidos da alcalinidade a bicarbonato no período, foram de 2765 e 8257 $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$, respectivamente (Figura 29). No começo da operação manteve-se a dosagem de bicarbonato de 0,3 g NaHCO_3 .g DQO, a mesma referente na Fase I. Observou-se o aumento da alcalinidade a bicarbonato do 195º ao 197º dia de operação e logo em seguida, o decréscimo até valor de 3747 $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$, devido ao aumento de ácidos voláteis totais no reator (708,30 mg.L^{-1}).

Observou-se que a utilização do melaço implicou na instabilidade dos ácidos voláteis totais, e dessa forma, adotou-se a estratégia de aumentar a dosagem de bicarbonato até o 251º dia de operação, atingindo a maior dosagem de bicarbonato do período (0,7 g bicarbonato g DQO) o que implicou no maior valor de alcalinidade (8257,72 $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$) do sistema.

Em seguida houve o decréscimo da alcalinidade a bicarbonato alcançando valor de 2765 $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$ devido à diminuição da dosagem de bicarbonato à alimentação do reator para 0,5 g NaHCO_3 .g DQO no final do período, devido à diminuição dos ácidos voláteis totais.

Na Fase III, com a retomada da vinhaça, houve a maior concentração média de alcalinidade a bicarbonato. Porém nessa fase, com o decréscimo da COV, permanecendo no intervalo de 5 a 19 $\text{kgDQO.m}^{-3}.\text{d}$, obteve-se a menor concentração de ácidos voláteis totais efluente de todo o período operacional ($154 \pm 37 \text{ mg.L}^{-1}$) e menores valores da relação AI/AP.

Entretanto, entre o dias 274º ao 323º dia de operação manteve-se a dosagem de bicarbonato no valor de 0,5 g NaHCO_3 .g DQO reduzida para 0,3 g NaHCO_3 .g DQO, diminuindo assim a alcalinidade a bicarbonato a partir do dia 322. Nesse período, pode-se constatar que o bicarbonato de sódio no começo da operação foi adicionado em excesso, podendo ter diminuído essa dosagem já no início, evitando gastos relativos à pesquisa.

5.3.6 Carboidratos

A eficiência de conversão de carboidratos de todo o período operacional foi superior a 80% (Figura 30).

Na Fase I, período equivalente à repartida utilizando a vinhaça como substrato, a eficiência média de conversão de carboidrato foi de $91,07 \pm 3,34 \%$, na Fase II utilizando o melaço, a eficiência média foi de $97,63 \pm 2,78\%$ e na Fase III com o retorno da safra utilizando a vinhaça foi de $92,75 \pm 2,94\%$.

Figura 30. Gráfico *boxplot* da eficiência de remoção de carboidratos de todo o período operacional

Observou-se que o melaço apresentou em sua composição concentração de carboidrato bem mais elevada que a vinhaça (Tabela 20). Os dados indicam que a etapa de digestão ácida não foi limitante ao processo em nenhuma das condições estudadas. O melaço foi mais facilmente acidificado, como citado anteriormente.

Tabela 20. Média das concentrações de carboidratos afluente e efluente do período operacional

Fases da operação	Concentração afluente (mg.L ⁻¹)	Concentração efluente (mg.L ⁻¹)
I	2006,20	168,27
II	23155,56	565,78
III	1994,59	123,50

5.3.7 Sólidos

5.3.7.1 Sólidos Totais, Fixos e Voláteis

Neste item foi realizada uma análise comparativa entre a vinhaça e o melaço referente à quantidade de sólidos presentes nesses substratos e a capacidade do sistema em termos de remoção de sólidos. Foi realizado o monitoramento das concentrações afluente e efluente de sólidos totais (Figura 31). A importância dessa análise está associada ao fato de águas residuárias com elevado teor de sólidos limitar o processo de reatores UASB (METCALF e EDDY, 2003).

Figura 31. Valores médios de Sólidos Totais, Voláteis e Fixos afluente e efluente

Ao analisar a vinhaça e o melaço, observa-se inicialmente que a vinhaça continha em sua composição maiores quantidade de sólidos totais que o melaço, sendo que a maior parte dos sólidos se encontrava na forma de sólidos totais voláteis (Figura 31), os quais representam uma estimativa da matéria orgânica.

A remoção de sólidos totais para a Fase I utilizando a vinhaça apresentou valor médio de 37%, a Fase II utilizando o melaço foi próxima, 35% e na Fase III com a retomada da vinhaça houve menor remoção, 15%.

A maior remoção de sólidos totais voláteis no período operacional foi nas Fases II e III, com valor médio de 84%, embora na Fase I, esse valor se manteve elevado, 75%. Supostamente, os sólidos totais voláteis foram biodegradados, sofrendo hidrólise, ou se mantiveram no reator adsorvido no grânulo.

Quanto aos sólidos totais fixos, pode-se observar a incapacidade do sistema em remover a matéria inorgânica ou mineral, acumulando-se no reator, indicando que elementos de interesse, como o potássio, foram mantidos no efluente após a digestão anaeróbia.

5.3.7.2 Sólidos Suspensos Totais, Fixos e Voláteis

Neste item foi realizado o monitoramento das concentrações afluente e efluente do reator, quanto à remoção de sólidos suspensos totais, voláteis e fixos (Figura 32).

Figura 32. Valores médios de Sólidos Suspensos Totais, Voláteis e Fixos afluente e efluente

Pode-se observar que na composição da vinhaça continha mais sólidos suspensos que no melaço, sendo que boa parte dos sólidos se encontrava na forma de sólidos suspensos voláteis.

A remoção de sólidos suspensos totais na Fase I apresentou valor médio de 23%, na Fase II de 20% e para a Fase III de 27% e a remoção de sólidos suspensos voláteis na Fase I foi de 35%, na Fase II foi de 30% e na Fase III 41%.

Pela análise de SSV pode-se inferir que a perda de sólidos voláteis, associada à perda de biomassa, foi de 796 e 516 mg.L⁻¹ nas Fases I e III com vinhaça como substrato e de 414 mg.L⁻¹ quando o reator foi alimentado com melaço (Figura 32). Não se pode precisar qual a característica dos SSV, uma vez que pode se relativo à perda de biomassa ou lavagem de sólidos advindos do próprio afluente.

Supostamente, os sólidos suspensos voláteis foram quebrados, biodegradados e digeridos através de uma transformação anaeróbia, resultando na produção de biogás e no crescimento da biomassa bacteriana.

5.4 Atividade Metanogênica Específica (AME)

Ao longo da operação, os lodos de todo período operacional foram submetidos a testes de AME a fim de verificar a capacidade específica do lodo em produzir metano. Estão apresentados os valores médios de AME obtidos em testes realizados antes da interrupção da alimentação do reator, após um mês sem alimentação, com vinhaça (Fase I), com melaço (Fase II) e no final da operação com a vinhaça novamente (Fase III) (Tabela 21 e Figura 33).

Tabela 21. Valores médios da AME no decorrer da operação	
Período	AME (gDQO/gSTV.d)
Antes da interrupção da alimentação	0,59
Após um mês sem alimentação	0,45
Fase I (vinhaça)	0,57
Fase II (melaço)	0,75
Fase III (vinhaça)	0,09

Figura 33. Avaliação da AME dos lodos no decorrer da operação

Como observado, o lodo do reator não perdeu sua atividade metanogênica e sua capacidade de produzir metano quando o sistema permaneceu sem alimentação por um mês (0,45 gDQO/gSTV.d), supostamente porque os microrganismo metanogênicos encontravam-se adaptados e resilientes às condições de substrato limitado (Tabela 21 e Figura 33).

Com a repartida do sistema houve o aumento da AME para 0,57 gDQO/gSTV.d, devido à realimentação do reator com vinhaça, potencializando a conversão de matéria orgânica em metano e CO₂ pelos microrganismos metanogênicos.

Com a substituição da vinhaça pelo melaço, a AME aumentou (0,75 gDQO/gSTV.d), e foi a maior dentre todas as fases. Pelos resultados obtidos pelo DGGE, quando se utilizou o

melaço na operação do sistema, houve o aumento da diversidade da população de bactéria, supostamente houve o aumento da atividade dos microrganismos sintróficos acetogênicos que convertem compostos orgânicos intermediários como propionato e butirato, em acetato, hidrogênio e CO_2 que são substratos utilizados pelos microrganismos metanogênicos para formar metano e CO_2 .

Contudo, na Fase III, o valor de AME diminuiu para 0,09 gDQO/gSTV.d , ou seja, nessa fase a capacidade do sistema em produzir metano foi baixa. Segundo Aquino (2007), como os microrganismos metanogênicos não produzem metano a partir de propionato e butirato, a diminuição da eficiência do sistema anaeróbio pode estar mais relacionada à baixa atividade dos microrganismos sintróficos produtores de acetato do que à atividade de microrganismos metanogênicos consumidores de acetato.

Isso foi verificado pelos resultados obtidos pelo DGGE (seção 5.7.1), com retorno da alimentação do sistema com a vinhaça (Fase III), a diversidade das populações de bactérias e arqueias diminuíram. A manutenção da atividade dos microrganismos envolvidos, mesmo a baixas taxas associado à manutenção da eficiência de remoção de DQO, indica que a concentração de biomassa no sistema era elevada. Redução na geração de metano sugere que a população ativa estava utilizando sua energia para readaptação à vinhaça novamente e síntese celular.

5.5 Avaliação da remoção de metal presentes na vinhaça e no melaço

As concentrações dos metais presentes tanto na vinhaça como no melaço foram avaliadas com o objetivo de verificar a sua remoção, bem como avaliar sua interferência no desenvolvimento do processo de digestão anaeróbia e comparar as concentrações de metais presentes na vinhaça e no melaço.

As análises foram obtidas por Absorção Atômica para quantificação dos seguintes parâmetros: cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês, níquel e zinco.

Nas Tabelas 22 e 23 estão apresentadas os resultados obtidos da amostra do dia 01/12 com vinhaça e da amostra do dia 15/09 com melaço, tanto afluente como efluente.

Tabela 22. Concentração de metais afluente e efluente ao reator com vinhaça (mg.L⁻¹)

	Cádmio	Chumbo	Cobre	Cromo	Ferro	Manganês	Níquel	Zinco
Afluente	0,022	0,20	0,180	<LD	56,10	4,31	0,019	0,475
Efluente	0,019	0,22	0,154	<LD	35,63	2,19	<LD	0,377

Tabela 23. Concentração de metais afluente e efluente ao reator com melaço (mg.L⁻¹)

	Cádmio	Chumbo	Cobre	Cromo	Ferro	Manganês	Níquel	Zinco
Afluente	0,016	0,09	0,024	<LD	3,149	0,810	<LD	0,182
Efluente	0,021	0,10	<LD	<LD	1,467	0,102	<LD	0,144

Um fator importante para o sucesso do processo de digestão anaeróbia é o atendimento aos requisitos nutricionais. A presença de íons na alimentação é um parâmetro crítico, uma vez que afeta o processo de granulação e estabilidade de reatores como UASB. As bactérias no processo de digestão anaeróbia requerem macronutrientes e elementos traços como nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, ferro, níquel, cobalto, zinco, manganês e cobre para viabilizar o crescimento celular. Embora estes elementos sejam necessários em concentrações extremamente baixas, a falta destes nutrientes tem um efeito adverso sobre o crescimento e o desempenho microbiano. Os macronutrientes participam na composição das células, enquanto os micronutrientes são necessários para a composição de enzimas e coenzimas, responsáveis pela ativação da energia necessária às reações de conversão que ocorrem no processo.

As bactérias formadoras de metano têm concentrações internas relativamente altas de ferro, níquel e cobalto. Esses elementos podem não estar presentes em concentrações suficientes em fluxos de águas residuais provenientes do processamento de um único produto agroindustrial, como o milho ou as batatas ou as águas residuais derivadas de condensados. Nesses casos, as águas residuais têm de ser suplementadas com os elementos traços antes do tratamento (RAJESHWARI et al., 2000; GRANATO, 2003).

Para que os processos biológicos de tratamento sejam operados com êxito, os nutrientes inorgânicos, necessários ao crescimento dos microrganismos, devem ser fornecidos em quantidades suficientes. Pode-se observar que a concentração dos mesmos apresentam-se em concentrações superiores na vinhaça quando comparado ao melaço (Tabelas 22 e 23). Sendo o ferro e o níquel micronutrientes necessários à estimulação nutricional de microrganismos metanogênicos que formam o metano a partir de acetato (SPEECE, R.E. 1996).

Outra condição que interfere no desempenho do processo da digestão anaeróbia é a presença de compostos químicos potencialmente tóxicos na água residuária. Grande variedade de substâncias inibidoras é a principal causa do fracasso da digestão anaeróbia, pois estas estão presentes em concentrações significativas nos resíduos industriais. Os principais inibidores encontrados na vinhaça são os compostos de enxofre e o potássio solúvel, e apresentam elevadas concentrações nas vinhaças provenientes de mosto de melaço e misto de caldo e melaço (GRANATO, 2003).

Alguns estudos realizados utilizando melaço tiveram que suplementá-lo com minerais como Santana Junior (2013), Faria (2014) e Espinosa et al., (1996). Os últimos estudaram um reator UASB, volume de 2,3 L, tratando melaço de cana-de-açúcar submetido a elevadas cargas orgânicas, 5 a 21,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Na COV de 17,4 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ foi observado acúmulo de ácidos, principalmente ácido propiônico, baixa eficiência de remoção de DQO (44%) e relação AI/AP acima de 0,4. Entretanto, ao adicionar metais no afluente (Fe, Ni, Co e Mo), com concentração de DQO do melaço de 68,9 g.L⁻¹ e aplicar COV de 21,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, não foi observado acúmulo de ácidos, a eficiência de remoção de DQO aumentou de 44 a 58%, a produção de biogás de 10,7 a 14,8 L.d⁻¹ e a AME de 0,085 a 0,32 gDQO/gSSV.d.

Schmidt et al., (2014) desenvolveram uma estratégia de dosagem de elementos traços para a digestão anaeróbia da vinhaça. Os reatores CSTR mesofílicos foram operados em alguns casos sob deficiência de elementos traços e verificaram que a depleção de Fe e Ni resultou numa rápida acumulação de ácidos voláteis.

Paulo et al., (2004) e Fermoso et al., (2008a, 2008b) verificaram que a exclusão de Co, Zn e Ni da alimentação à base de metanol de um reator UASB induziu menor atividade metanogênica específica (AME) e a acumulação de ácidos voláteis.

Os valores das concentrações dos metais afluente e efluente estão próximos, tanto na vinhaça como no melaço, exceto para ferro e manganês, indicando que a maioria dos micronutrientes não foram removidos no reator.

Os resultados mostra a incapacidade do sistema UASB em remover micronutrientes que são compostos difíceis de serem degradados pela via anaeróbia.

5.6 Caracterização do perfil da manta de lodo granular

Foi realizada a caracterização química da manta de lodo granular, com o objetivo de avaliar o conteúdo orgânico, por meio das análises de DQO e carboidratos. A análise do perfil

da manta de lodo granular foi realizada somente quando foi utilizada a vinhaça como substrato, nas COV de 25 e 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase I) e de 19 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ (Fase III).

5.6.1 Conteúdo orgânico e carboidrato

As amostras do lodo granular proveniente do reator UASB foram coletadas das torneiras localizadas na parte inferior à superior do corpo do reator. Para a análise do conteúdo orgânico, os pontos que estão representados nos gráficos abaixo (Figura 34-a,b,c) foram: afluente (vinhaça), P1, P2, P3, P4,P5, P6, P7, P8 e efluente. Somente no último gráfico não foi coletado o P8 pois não havia amostra suficiente. Para a análise de carboidratos foram coletadas amostras de todos os pontos (Figura 34-d,e,f)

Pode-se observar que o sistema conseguiu remover a matéria orgânica presente na vinhaça nas três condições analisadas. Os pontos P1 a P4 estão localizados na parte inferior do reator, onde se localiza o leito de lodo e a manta de lodo, caracterizados pelo compartimento de digestão. Portanto, há a conversão mais rápida da matéria orgânica pelos microrganismos nos pontos iniciais e nos demais pontos localizados na parte superior do reator houve a estabilização da degradação.

Em relação aos carboidratos, houve a rápida conversão pelos microrganismos no sistema em estudo nas três condições estudadas (Figura 34-d,e,f), em razão do fato que os carboidratos são facilmente assimiláveis no começo da digestão anaeróbia pelas bactérias fermentativas, precisamente nas etapas de hidrólise e acidogênese. Logo em seguida ocorreu a estabilização da conversão de carboidratos ao longo da altura do reator.

Figura 34. Gráficos temporais do conteúdo orgânico e carboidratos do perfil do lodo

5.7 Análises microbiológicas

5.7.1 PCR e DGGE

As técnicas de PCR e DGGE foram utilizadas como ferramentas para avaliar a comunidade microbiana das amostras da manta de lodo do reator nas seguintes condições estudadas:

- 1: amostra na COV de $32 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ quando o reator permaneceu sem alimentação por um mês.
- 2: amostra na COV de $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ utilizando a vinhaça como substrato.
- 3: amostra na COV de $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ utilizando o melaço como substrato.
- 4: amostra na COV de $19 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ utilizando a vinhaça novamente .

Estatisticamente foi realizado o índice de correlação de Pearson, que demonstrou quais amostras são similares e qual a porcentagem desta similaridade. Os resultados obtidos auxiliaram na construção do dendograma (Figura 35).

Domínio *Archaea*

O coeficiente de similaridade entre amostra1 (COV $32 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) quando o reator permaneceu sem alimentação com a amostra 2 (COV $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) , carga final atingida logo após a repartida do sistema com vinhaça, foi de 95% para o domínio *Archaea* (Figura 35). Pode-se inferir que 95% das arqueias permaneceram no reator, mesmo sem alimentação por um mês. Possivelmente, o que tornou a repartida mais rápida, pois essa biomassa já estava bem resiliente e adaptada ao meio.

A similaridade da comunidade de arqueias da amostra 2 (COV $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) utilizando a vinhaça como fonte de carbono com a amostra 3 (COV $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) utilizando o melaço , foi de 94% (Figura 35). Portanto, quando houve a troca da vinhaça pelo melaço, 94% das populações de arqueias permaneceram no reator, ou seja, as mesmas conseguiram se adaptar à troca da fonte de carbono e a outras condições do meio. Isso pode ser explicado também, pelo fato de que a COV permaneceu a mesma, quando aplicou-se vinhaça e melaço ao reator. Importante ressaltar que as arqueias metanogênicas utilizam substratos específicos (acetato, dióxido de carbono e hidrogênio) e dessa forma, são menos

susceptíveis à alteração do substrato original. Além disso, a presença de componentes tóxicos é bem menor no melaço, substrato utilizado posteriormente à vinhaça.

Com a retomada da vinhaça, a similaridade das amostras entre COV de 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ utilizando o melaço e COV de aproximadamente 19 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ utilizando a vinhaça, foi de 94% (Figura 35). Logo, quando houve troca novamente do substrato, 94% das populações de arqueias permaneceram no reator, ou seja, as mesmas conseguiram se manter e adaptar à troca da fonte de carbono.

A Figura 35 representa o Dendograma referente aos perfis de banda do DGGE do Domínio *Archaea* e os respectivos coeficiente de similaridade em percentagem (correlação de Pearson).

Figura 35. Dendograma

O índice de Shannon e a Dominância da comunidade de arqueia para cada amostra da manta de lodo do reator aplicados à técnica de DGGE estão apresentadas a seguir (Tabela 24):

Tabela 24. Índice de diversidade de Shannon para o Domínio *Archaea*

Índices Aplicados	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Shannon (H)	2,71	2,70	2,69	2,63
Dominância (D)	0,07	0,07	0,07	0,08

Conforme a Tabela 24, pode-se observar que o índice de diversidade de Shannon de arqueias diminuíram de 2,71 para 2,63 ao longo da operação do reator, indicando que a diversidade dessas populações diminuíram quando foi submetida a mudança de substrato e COV.

A diminuição do índice de Shannon foi observado principalmente na troca da vinhaça pelo melaço de 2,70 para 2,69 e com a retomada da vinhaça no final da operação, de 2,69 para

2,63, podendo inferir que houve diminuição da diversidade das populações de arqueias, pois provavelmente essas populações estavam se adaptando as novas condições impostas ao meio provocada pela mudança do substrato, em ambos os casos.

Domínio *Bacteria*

O coeficiente de similaridade entre a amostra 1 (COV 32 kgDQO.m⁻³.d⁻¹) quando o reator permaneceu sem alimentação com a amostra 2 (COV 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹), foi de 75% (Figura 36). Pode-se inferir que 75% das populações de bactérias permaneceram no sistema, portanto quando o reator permaneceu sem alimentação por um mês essas populações já estavam adaptadas e resilientes ao meio, o que provavelmente tornou a repartida rápida.

A similaridade da comunidade bacteriana da amostra 2 (COV 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹) utilizando a vinhaça como fonte de carbono com a amostra 3 (COV 33 kgDQO.m⁻³.d⁻¹) utilizando o melaço, foi de 59%. Portanto, quando houve a troca do substrato por melaço, 59% das populações de bactéria permaneceram no reator, logo, esse menor coeficiente de similaridade comparado com a fase anterior, indica que houve alterações das populações de bactérias, ocasionada provavelmente pela mudança das condições impostas ao meio selecionando dessa forma, os microrganismos com capacidade de metabolizar efetivamente o melaço.

Com a retomada da vinhaça até COV de aproximadamente 19 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, o coeficiente de similaridade da comunidade bacteriana aumentou de 59% para 66%, comparado com a fase anterior. Portanto, quando houve a troca do substrato novamente com a vinhaça, 66% das populações de bactérias permaneceram no reator.

A Figura 36 representa o Dendograma referente aos perfis de banda do Domínio *Bacteria* e os respectivos coeficiente de similaridade em percentagem (correlação de Pearson).

Figura 36. Dendograma

O índice de Shannon e a Dominância da comunidade de bactéria para cada amostra da manta de lodo do reator aplicados à técnica de DGGE estão apresentadas a seguir (Tabela 25):

Tabela 25. Índice de diversidade de Shannon para o Domínio *Bacteria*

Índices Aplicados	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Shannon (H)	2,71	3,01	3,29	2,72
Dominância (D)	0,07	0,05	0,04	0,07

Observa-se que na fase da repartida do reator, o índice de Shannon aumentou de 2,71 a 3,01 (Tabela 25), portanto, houve o aumento da diversidade da população de bactérias.

A mudança da vinhaça pelo melaço ocasionou aumento do índice de Shannon de 3,01 a 3,29, podendo inferir que houve aumento da diversidade das populações de bactérias. E dentre todas as condições estudadas, a operação utilizando o melaço, foi o que apresentou o maior índice de Shannon, logo, a mudança do substrato, ocasionou o aumento da diversidade microbiológica dessa população presente no reator.

Entretanto, com a retomada com a vinhaça, o índice de Shannon decresceu, de 3,29 a 2,72, indicando que houve diminuição da diversidade da população de bactéria, pois provavelmente a população estava se adaptando as novas condições impostas ao meio.

A análise do coeficiente de similaridade do Domínio *Bacteria* variou de 59% a 75%. O que interferiu na mudança da comunidade bacteriana foi justamente a troca da vinhaça pelo melaço. Isso pode ser explicado devido ao fato da população de bactéria atuar no começo da digestão anaeróbia, precisamente nas etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese, onde ocorrem a conversão da matéria orgânica a compostos mais simples, formação de ácidos e conversão de compostos orgânicos intermediários em substrato apropriado para as arqueias metanogênicas. Logo, a troca do substrato pelo melaço selecionou a comunidade bacteriana,

devido à composição do melaço ser diferente da vinhaça, diminuindo o coeficiente de similaridade.

Já nas populações de arqueias os coeficientes de similaridade de todas as fases estão entre 94% a 95%, inferindo que a repartida do reator, a troca do substrato pelo melaço e a retomada novamente com a vinhaça não interferiu nessa população. A etapa final do processo global de conversão anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono praticamente é efetuada pelo domínio *Archaea*. Ressaltando que as populações de arqueias utilizam ácidos graxos de cadeia curta para formação de metano, mantendo assim, o coeficiente de similaridade elevada em todas as fases, demonstrando presença de grupos semelhantes de arqueias entre as amostras estudadas.

Em relação ao índice de diversidade, com a retomada da vinhaça no final da operação do reator, os índices de Shannon diminuíram (Tabelas 24 e 25), inferindo que houve a diminuição da diversidade das populações de bactéria e arqueia, que provavelmente estariam se adaptando ao meio novamente.

5.8 Caracterização microbiana por meio de microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas pelo método de MEV permitiram observar as mudanças na morfologia do grânulo anaeróbio e nas morfologias microbianas, e assim inferir sobre os efeitos da troca de substrato ao longo da operação do reator.

Seguiu-se a ordem das amostras para todas as análises realizadas nos itens subsequentes: Fase I- lodo granular com vinhaça (COV 33 kg.m⁻³.d⁻¹); Fase II- lodo granular com melaço (COV 33 kg.m⁻³.d⁻¹) e Fase III - lodo granular com a vinhaça (retorno da safra)(COV 19 kg.m⁻³.d⁻¹).

5.8.1 Fase I: Lodo granular com vinhaça (COV 33 kg.m⁻³.d⁻¹)

Nas figuras abaixo estão apresentadas as imagem da superfície do grânulo, a imagem panorâmica do corte do grânulo (Figura 37) e a imagem da superfície externa do grânulo (Figura 38).

Figura 37. MEV do grânulo: a) imagem panorâmica do grânulo e b) imagem panorâmica do corte do grânulo

Figura 38. Imagens da superfície do grânulo: c) imagem com dimensão de 30 µ e d) imagem com dimensão de 15 µm

De acordo com a Figura 38-c, na superfície do grânulo foi observado afloramentos de células semelhantes a *Methanosaeta*. Observou-se também a presença de cocos (Figura 38-c) e de bacilos de dimensões variadas (Figura 38-d).

A Figura 39 apresenta uma imagem da seção transversal do grânulo. As áreas destacadas indicam os pontos selecionados do corte transversal do grânulo para a análise das principais morfologias microbianas (Figura 40).

Figura 39. Seção transversal do grânulo

Figura 40. Imagens dos pontos escolhidos para análise detalhada

As imagens representadas pelas letras (e) e (h) foram capturadas nas bordas da seção transversal do grânulo e foi observada a predominância de bacilos em (e) e a presença de afloramentos de células semelhantes a *Methanosaeta* em (h). Já as imagens (f) e (g) foram capturadas no interior da seção transversal do grânulo, e foram observadas células semelhantes a *Methanosaeta*, bacilos diversos e poucos cocos.

Pôde-se observar uma riqueza da diversidade de microrganismos presentes no grânulo quando o reator foi alimentado com vinhaça (COV 25 kg.m⁻³.d⁻¹) após a repartida do sistema. Além disso, aparentemente não houve estratificação na distribuição das morfologias ao longo do corte transversal e também não foi observada a presença de grânulos “ocos”.

5.8.2 Fase II: Lodo granular com melaço (COV 33 kg.m⁻³.d⁻¹)

Nas figuras abaixo estão apresentadas as imagem da superfície do grânulo, a imagem do corte do grânulo (Figura 41) e a imagem da superfície externa do grânulo (Figura 42).

Figura 41. MEV do grânulo: a) imagem panorâmica do grânulo e b) imagem panorâmica do corte do grânulo

Figura 42. Imagens da superfície externa do grânulo: c) imagem com dimensão de 30 µm e d) imagem com dimensão de 30 µm

A superfície externa do grânulo apresentou bacilos e células semelhantes a *Methanosaeta* (imagem c) e na imagem d constatou-se afloramento de células semelhantes a *Methanosaeta*. Observa-se um recobrimento de material polimérico entre as células aparentemente maior do que na Fase I. A Figura 43 apresenta uma imagem da seção transversal do grânulo. As áreas destacadas indicam os pontos de fotos escolhidas para análise detalhada (Figura 44).

Figura 43. Seção transversal do grânulo

Figura 44. Imagens dos pontos escolhidos para análise detalhada

As imagens representadas pelas letras (e), (f) e (h) foram capturadas nas bordas da seção transversal do grânulo onde foram observados bacilos e células semelhantes a *Methanosaeta* em (e) , material polimérico e bacilos em (f) e afloramento de células semelhantes a *Methanosaeta* em (h). No interior da seção transversal do grânulo (g) observou-se densa colonização de células semelhantes a *Methanosaeta*

Tal como na Fase I não foi observada aparentemente estratificação na distribuição das morfologias ao longo do corte transversal, entretanto o grânulo pareceu menos compacto e com regiões ocas no centro (Figura 43).

5.8.3 Fase III: Lodo granular com vinhaça (retorno da safra) (COV: $19 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)

Nas figuras abaixo estão apresentadas as imagem da superfície completa do grânulo e a imagem panorâmica do corte do grânulo (Figura 45).

Figura 45. MEV do grânulo: a) imagem panorâmica do grânulo e b) imagem panorâmica do corte do grânulo

De acordo com as imagens (Figura 45) pôde-se observar que nessa fase o grânulo se apresentou menos compacto ainda quando comparado com as demais fases (I e II).

Figura 46. Imagens da superfície do grânulo: c) imagem com dimensão de 75 µm e d) imagem com dimensão de 30 µm

A superfície externa do grânulo mostrou vários afloramentos de células semelhantes a *Methanosaeta*. Além disso, foi possível perceber um aumento de material polimérico na região e raros bacilos (Figura 46 - c,d).

A Figura 47 apresenta uma imagem da seção transversal do grânulo. As áreas destacadas indicam os pontos de fotos escolhidas para análise detalhada (Figura 48).

Figura 47. Seção transversal do grânulo

Figura 48. Imagens dos pontos escolhidos para análise detalhada.

As imagens (e) e (f) foram capturadas na borda da seção transversal do grânulo e em ambas predominaram células semelhantes a *Methanosaeta*, com destaque para o afloramento dessa espécie na imagem (f).

Já as imagens (g) e (h) foram capturadas no centro do grânulo. Na imagem (g) constatou-se a predominância do *Methanosaeta* e a presença de raros bacilos (representados por uma seta) e na imagem (h) a presença de *Methanosaeta*.

Pode-se concluir pela análise do grânulo com o MEV, que de todas as fases estudadas, a Fase III apresentou menor diversidade de morfologias dos microrganismos, principalmente de bacilos, corroborando que a troca do substrato possivelmente afetou as populações de bactérias (representadas em sua maioria pela forma bacilar) que tiveram que se adaptar novamente com a vinhaça e com outras condições impostas ao meio. Já as populações de arqueias metanogênicas semelhantes à *Methanosaeta* se mostraram mais adaptadas e resilientes com as novas condições, predominando em todas as fases.

Isso foi mostrado pela análise de DGGE (seção 5.7.1), ao avaliar o índice de diversidade, com a retomada da vinhaça no final da operação do reator, os índices de Shannon diminuíram (Tabelas 24 e 25), sugerindo a diminuição da diversidade das populações de bactérias e arqueias, que provavelmente estariam se readaptando ao substrato. Os coeficientes de similaridade para o domínio *Archaea* de todas as fases de operação do reator variaram entre 94% a 95%, indicando que tal microbiota se manteve estável durante a repartida do reator, a troca do substrato pelo melaço e a retomada novamente com a vinhaça.

5.9 Microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência

Foi realizada a microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência das amostras citadas acima nas três fases estudadas.

5.9.1 Fase I: Lodo granular com vinhaça (COV 33 kg.m⁻³.d⁻¹)

Observou-se por meio da análise de microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência, presença de filamentos semelhantes a *Methanosaeta*, bacilos, cocos e cocobacilos com dimensões variadas (Figura 49-a). A figura 49-b mostrou também a presença de cocos, cocobacilos, bacilos em inclusões e *Methanosaeta*. Na figura 49-c observa-se bacilos retos e curvos com dimensões também diferentes, espiroquetas, estruturas com brilho, semelhantes a esporos bacterianos e *Methanosaeta*.

Figura 49. Microscopia óptica de contraste de fase na COV $33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$

5.9.2 Fase II: Lodo granular com melaço (COV 33 kg.m⁻³.d⁻¹)

A Figura 50-a mostrou o arranjo de cocos semelhantes à *Methanosarcina*, confirmada em fluorescência (Figura 50-b) na Fase II. Além disso foram observados bacilos fluorescentes (Figura 50-c) semelhantes a arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. Tal como na Fase I, foram observados bacilos retos e curvos com diferentes dimensões (Figura 50- e), evidenciando-se filamentos retos e finos e células semelhantes à *Methanosaeta* (Figura 50-d).

Figura 50. Microscopia óptica de contraste de fase na COV $33 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$

5.9.3 Fase III: Lodo granular com vinhaça (retorno da safra) (COV: 19 kg.m⁻³.d⁻¹)

Na Figura 51-a foi observada presença de bacilos e *Methanosaeta*. Na Figura 51-b havia presença de bacilos variados, espiroquetas e *Methanosaeta* e a Figura 51-c apresentou diplococos, cocos, bacilos, *Methanosaeta* e bacilos delgados

Os exames microscópicos evidenciaram a aparente predominância de *Methanosaeta* e bacilos com dimensões variadas nas Fases I, II e III de operação do reator. Na Fase II, observou-se bacilos fluorescentes (arqueias hidrogenotróficas), arranjo de cocos fluorescentes semelhantes a *Methanosarcina* comparado com as demais Fases (I e III).

Os gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* são responsáveis por cerca de 60 a 70% de toda a produção de metano, a partir do ácido acético. A presença predominante do gênero *Methanosaeta* em comparação à *Methanosarcina* pode estar relacionada ao fato de que o gênero *Methanosaeta* caracteriza-se por utilizar exclusivamente o acetato, possuindo mais afinidade que as metanosarcinas. Isso pôde ser verificado em relação aos ácidos por cromatografia, no qual o acetato foi utilizado quase que totalmente, indicando bom desempenho das acetoclásticas.

De forma geral, pode-se concluir que os morfotipos celulares foram diversos para todas as fases operacionais. Os perfis de DGGE (seção 5.7.1) indicaram um pequeno aumento na diversidade das populações bacterianas na Fase II (Shannon de 3,29 e Dominância de 0,04) utilizando o melaço como substrato (seção 5.7.1, Tabela 26). Esse fato foi observado também nos exames microscópicos de contraste, evidenciando uma maior diversidade de morfotipos bacilares. A população de arqueias manteve-se mais estável quanto aos índices de diversidade, embora na Fase II tenha sido evidenciada um aparente aumento da população de hidrogenotróficas.

Os exames de MEV dos grânulos indicaram uma aparente alteração na estrutura dos grânulos, principalmente na Fase III, que ficaram mais ocos e quebradiços, portanto mais fáceis de serem desagregados.

Figura 51. Microscopia óptica de contraste de fase na COV $19 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$

6. CONCLUSÕES

O período de repartida do sistema, para alcançar novamente a carga de $32 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e eficiência de remoção de 87%, após interrupção da alimentação por 30 dias, foi de 69 dias. Logo no início da repartida do reator, este apresentou eficiência de remoção de DQO superior a 80%, alcançando eficiência de 89,95 % em apenas oito dias de operação.

O reator UASB, de maneira geral, apresentou desempenho estável, com valor médio de eficiência de remoção de DQO para as Fases I (repartida com vinhaça), II (alimentação com melaço) e a III (retorno da alimentação com vinhaça de $84,52 \pm 3,35 \%$; $82 \pm 5,12 \%$ e $80 \pm 9,22 \%$, para cargas aplicadas de 5 a $34 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, $33 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e 5 a $19 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

Quanto a produção de metano, a Fase I-A, referente à repartida do reator, obteve produção média de $6,02 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$ e a Fase I-B, referente à fase estacionária, de $10,22 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$. A fase com melaço (Fase II) foi um pouco inferior $7,28 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$ devido ao aumento de ácidos voláteis totais e $1,23 \text{ LCH}_4. (\text{L.d})^{-1}$, após o retorno da alimentação com vinhaça, devido aos menores valores de carga aplicada ao reator (5 a $8,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$).

Na fase com retorno da alimentação com vinhaça (Fase III), observou-se a maior instabilidade operacional de todo o período, associada à alteração da microbiota do meio pela alimentação com melaço cuja complexidade da matéria orgânica é bastante reduzida em relação à vinhaça.

Da avaliação do reator em relação aos parâmetros pH, relação AI/AP e ácidos por cromatografia, observaram-se que os valores de pH efluente variaram entre 7,17 e 8,72, a relação AI/AP permaneceu abaixo de 0,3 em todas as fases, indicando que não houve acúmulo de ácidos no sistema, associado à estabilidade do reator.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar a estrutura microbiológica do grânulo. De modo geral, de todas as fases estudadas, a fase com o retorno da vinhaça após a alimentação com melaço apresentou menor diversidade de morfologias dos microrganismos, principalmente de bacilos, corroborando que a troca do substrato possivelmente afetou as populações de bactérias que tiveram que se readaptar novamente com a vinhaça e com outras condições impostas ao meio. Por meio das técnicas de biologia molecular, observou-se que com a retomada da vinhaça no final da operação do reator, os índices de Shannon diminuíram, tanto para o domínio *Bacteria* como *Arqueia*. Já as populações de arqueias metanogênicas semelhantes à *Methanosaeta* se mostraram mais

adaptadas e resilientes com as alterações das condições operacionais. De forma geral, pode-se concluir que os morfotipos celulares foram diversos para todas as fases.

Com relação à atividade metanogênica específica (AME) do lodo utilizando a vinhaça e o melaço como substrato ao final de cada fase de operação, pôde-se observar que o lodo do reator não perdeu sua atividade metanogênica e sua capacidade de produzir metano quando o sistema permaneceu sem alimentação por um mês, supostamente porque os microrganismos metanogênicos encontravam-se adaptados e resilientes às condições de substrato limitado. Com a repartida do sistema houve o aumento da AME, devido ao aumento do período operacional e adaptação e crescimento da biomassa às cargas aplicadas. Com a substituição da vinhaça pelo melaço, a AME aumentou, e foi a maior dentre todas as fases, indicando que os microrganismos absorveram a nova matéria orgânica, mais simples de ser degradada que a vinhaça. Contudo, com o retorno da alimentação com vinhaça, o valor de AME diminuiu, ou seja, nessa fase a capacidade do sistema em produzir metano foi baixa, uma vez que a alteração requereu desenvolvimento da população apta à digestão ácida a vinhaça.

Este trabalho permite afirmar que o sistema UASB se apresenta como uma alternativa viável para a produção de metano a partir de fontes orgânicas de elevada concentração, porém, na entressafra, pode-se concluir que seria melhor ter deixado o sistema fora de operação, pois pelos resultados, pode-se inferir que o melaço, apesar de ter aumentando a diversidade de bactérias e o reator ter permanecido estável no período, modificou a população de microrganismos presentes no reator, que tiveram que se readaptar à vinhaça novamente, utilizando a energia para a readaptação de sua população e síntese celular e não para formação de metano e CO₂, diminuindo assim a eficiência do sistema na última Fase (volta da safra).

REFERÊNCIAS

AKARSUBASI, A. T; INCE, O; OZ, N. A; KIRDAR, B; INCE, B. K. (2006). **Evaluation of performance, acetoclasticmethanogenic activity and archaeal composition of full scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters**. ProcessBiochemistry, Kansas, v.41, n. 1, p. 28-35.

ALMEIDA, T. C. DE; WEBER, D.; HOFFMANN, R. (s.d). **Eficiência de um reator uasb na redução da carga orgânica e na produção de biogas, tendo vinhaça como substrato**. Pôster. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos (PPGEPro) - UFSM.

ALVES, I. (2015). **Caracterização de grânulos de reator UASB empregado no processamento de vinhaça**. 2015.85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

APHA, AWWA, WEF. (2012). **Standard methods for examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, D.C., 22nd ed.

AQUINO, S. F. et al. (2007). **Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios**. Eng. sanit. ambient. v. 12, p. 192–201.

BARROS, V. G. (2013). **Conversão anaeróbia de vinhaça e melaço em reatores uasb inoculados com lodo granulado**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus Jaboticabal, p. 69 p.

BRASIL. Portaria MINTER nº 323, de 29 de novembro de 1978. **Dispõe sobre resíduos, tratamento de resíduos, água e álcool, energia combustível**. São Paulo, 01p.

BRASIL. Lei nº 6134 de 02 de junho de 1988 do estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Lei-6134-88.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

BUSTIN, S.A. (2002). **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (qPCR): trends and problems**. Journal of Molecular Endocrinology, Bristol, v. 29, 29-39p.

CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. (2009). **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado**. Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 321-338, jan/abr 2009.

CARRERO-COLÓN, M.; NAKATSU, C.H.; KONOPKA, A. (2006). **Effect of nutrient periodicity on microbial community dynamics**. Appl. Environ. Microbiol., 72, pp. 3175–3183.

CARVALHO, G.R.; OLIVEIRA, C. (2006). **O setor sucroalcooleiro em perspectiva**. Embrapa Monitoramento por Satélite, Campinas. Boletim Conjuntura agropecuária: sucroalcooleiro, abril de 2006.

CASTELLANOS, T.; ASCENCIO, F.; BASHAN, Y. (2000). **Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum***. FEMS Microbiol. Ecol., 33, pp. 1–9.

CAVALCANTI, P. F. F. (2003). **Integrated application of the UASB reactor and ponds for domestic sewage treatment in tropical regions**. PhD. Thesis. Wageningen, Wageningen University. 139.

CAZETTA E CELLIGOI, (2005). **Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria**. Ciên. Exat. e Tec., v. 26, n. 2, p. 105–112.

CHERNICHARO, C. A. de L. (1997). **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores Anaeróbios**. 2 ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. Belo Horizonte.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. (2013). **Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use.** Waste Management, v. 33, n. 12, p. 2752–2761.

CONAB. (2014). **Acompanhamento de safra brasileira: cana - de - açúcar, terceiro levantamento.** Dezembro 2014. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília.

CORAZZA, R.I. (2006). **Impactos ambientais da vinhaça: controvérsias científicas e lock-In na fertirrigação?.** In: CONGRESSO DA SOBER, 44, 2006, Fortaleza, Ceará, Brazil. No. 147314. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER).

COSTA, J. W. N. DA. (2012). **Estratégia operacional para maximizar a produção de metano em reatores UASB tendo como substrato vinhoto.** 2012.88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, PB.

COX H.H.J. ; DESHUSSES, M.A. (2002). **Effect of starvation on the performance and re-acclimation of biotrickling filters for air pollution control.** Environ. Sci. Technol., 36 (2002), pp. 3069–3073.

CRAVEIRO, A.M., SCHMIDELL, W., VILLEN, R.A. and HIRATA, Y.S. (1982). **Anaerobic treatment of stillage at low retention time-energy and treatment efficiencies.** Proceedings International Fuel Technology Symposium, 5, V.III, 149-154.

CRAVEIRO, A. M.; SOARES, H. M.; SCHMIDELL, W. (1986). **Technical Aspects and Cost Systems Treating Vinasse and Wastewaters Brewery / Soft Drink Estimations for Anaerobic.** Wat.Sci.Tech. v. 18, n. 12, p. 123–134.

CURTIN, L.V. (1983). **Molasses-general considerations.** National Feed Ingredients Association West Des Moines, Iowa. Ambler, Pennsylvania.

DONG, F. et al. (2010). **Monitoring the restart-up of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of a soybean processing wastewater.** Bioresource Technology, v. 101, n. 6, p. 1722–1726.

DOS SANTOS, J. D. et al. (2013). **Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics**. Journal of Environmental Management, v. 114, p. 8–12.

DRIESSEN, W.J.B.M.; TIELBAARD, M.H.; VEREIJKEN, T.L.F.M. (1994). **Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process**. Water Science Technology, v.30, n. 12, p. 193-201.

DUDA ET AL., (2011). **Desempenho de reatores UASB, em série, utilizando esgoto e melaço de cana-de-açúcar**. Ciência & Tecnologia, Fatec-JB, Jaboticabal,v.3. p. 3–6.

ESPAÑA-GAMBOA, Elda I. et al. (2012). **Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor**. Biotechnology for biofuels, v.5, n.1, p.1-9 .

ESPINOSA, A.; ROSAS,L.; ILANGO VAN, K.; NOYOLA, A. **Effect of trace metals on the anaerobic degradation of volatile fatty acids in molasses stillage**. Water Science Technology, London, v.32,p.121-129, 1995.

FARIA, A. A. A. (2014) **.Fermentação metanogênica mesofílica de melaço e termofílica de vinhaça em reatores UASB**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus Jaboticabal, p. 59 p.

FELTRIN, V.P. et al. (2000). **Produção de Lactobacillus plantarum em melaço de cana-de-açúcar**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.43, n.1, 2000.

FERMOSO, F., COLLINS, G., BARTACEK, J., LENS, P.N.L., (2008a). **Zinc deprivation of methanol fed anaerobic granular sludge bioreactors**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 543–557.

FERMOSO, F., COLLINS, G., BARTACEK, J., LENS, P.N.L., (2008b). **Role of nickel in high rate methanol degradation in anaerobic granular sludge bioreactors**. Biodegradation 19, 725–737.

FERRAZ Jr., A.D.N., KOYAMA, M.H., ARAÚJO Jr., M.M., ZAIAT, M. (2016) **Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse**. *Renew Energy* 89, 245–252.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. (2014). **Implications of stillage land disposal : A critical review on the impacts of fertigation**. *Journal of Environmental Management*, v. 145, p. 210-229.

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

FUESS, L.T. (2017). **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**. 2017. 332f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G.S. (2008). **Setor sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas**. *Revista de Política Agrícola*, n. 2, p.13.

GONZÁLEZ, J. S. et al. (1998). **Influence of organic volumetric loading rate, nutrient balance and alkalinity: COD ratio on the anaerobic sludge granulation of an UASB reactor treating sugar cane molasses**. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 41, n. 2, p. 127–131.

GOYAL, S.K., SETH, R., HANDA, B.K. (1996) **Diphasic fixed-film biomethanation of distillery spentwash**. *Bioresour. Technol.* 56, 239–244.

GRANATO, E. F. (2003). **Geração de energia através da biodigestão anaeróbica da vinhaça**. 130 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Industrial– Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2003.

GREEN, S. J.; LEIGH, M. B.; NEUFELD, J. D. (2009). **Denaturing gradient gel**

electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In: Timmis, K.N.(Ed) *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds*. Springer (Heidelberg, Germany), v. 1, n. 519, p. 4137–4158.

GUNKEL, G. et al. (2007). **Sugar Cane Industry as a Source of Water Pollution – Case Study on the Situation in Ipojuca River, Pernambuco, Brazil.** *Water, Air, and Soil Pollution*, v.180, n. (1-4), p. 261-269.

HARADA, H. et al. (1996) **Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor.** *Bioresource Technology* v. 55, p. 215–221.

HIRATA, Y.S., VIANA,C.E. and SCHIMIDELL, W. (1988). **Anaerobic treatment of sugar cane stillage in semi-industrial UASB reactor.** In: *Proceeding of the VIII International Symposium on Alcohol Fuels*, Nov. 13-16, 1988, Tokyo, Japan. pp 149-154.

JÁUREGUI-JÁUREGUI, J. A., MÉNDEZ-ACOSTA, H.O., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ,V., SNELL-CASTRO,R., ALCARAZ-GONZÁLES,V., GODON,J.J. (2014). **Anaerobic treatment of tequila vinasses under seasonal operating conditions: Start-up, normal operation and restart-up after a long stop and starvation period.** *Bioresource Technology*, v. 168, p. 33–40.

KOBAYASHI, T. et al. (2009). **Characterization of start-up performance and archaeal community shifts during anaerobic self-degradation of waste-activated sludge.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 21, p. 4981–4988.

KONOPKA, A.; ZAKHAROVA, T.; NAKATSU, C. (2002). **Effect of starvation length upon microbial activity in a biomass recycle reactor.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29, pp. 286–291.

KOUTINAS,M.; BAPTISTA, I.I.R.; PEEVA,L.G.;JORGE, R.M.F.; LIVINGSTON, A.G. (2006). **The use of an oil absorber as a strategy to overcome starvation periods in degrading 1,2-dichloroethane in waste gas.** *Biotechnol. Bioeng.*, 96 , pp. 673–686.

KURODA, K. et al. (2015). **High organic loading treatment for industrial molasses wastewater and microbial community shifts corresponding to system development.**

Bioresource Technology, v. 196, p. 225–234.

LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; SOUZA, D .C.; FREIRE, E.A. (2011). **Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão.** Revista Trópica, Chapadinha, v.5,n.3,p.16-29.

LAMONICA, H. (2006). **Potencial de geração de excedentes de energia elétrica com o biogás produzido a partir da biodigestão da vinhaça na indústria sucroalcooleira brasileira.** Trabalho apresentado ao 6 ° Congresso internacional sobre geração distribuída e energia no meio rural, Campinas –SP.

LI,Z.H.; KUBA,T.K.; KUSUDA.T. (2006). **The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules.** Enzyme Microb. Technol., 38, pp. 670–674.

LIMA, A.C.; FERRARESI, V.A. (2009). **Análise da microestrutura e da resistência ao desgaste de revestimento duro utilizado pela indústria sucroalcooleira.** Soldagem Insp. São Paulo, v. 14, n. 2, p.140-150.

LIMA, U. A. (1987). **Tecnologia das fermentações**, v. 1. São Paulo : E. Blucher, p. 285

LIU, Y.Q.; TAY, J.H. (2008). **Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors.** Bioresour. Technol., 99, pp. 980–985.

LONGO, R. R. (2015). **Geração de metano em reator UASB: Avaliação de parâmetros de monitoramento para controle do processo de tratamento anaeróbio de vinhaça.** 2015.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlo, Universidade de São Paulo, São Carlos.

MARTINS, T. H. et al. (s.d) **Rapid Specific Methanogenic Manometric System Activity Tests Using a Manometric System.** v. 26, n. Table 2, p. 4–7.

METCALF, E.; EDDY, H. (2003). **Wastewater engineering: treatment and reuse**. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 4th edition. New Delhi, India. Disponível em: <<http://www.lavoisier.fr/notice/fr097556.html>>

MOLETTA, R. (2005). **Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion**. Water Science and Technology, v. 51, n. 1, p. 137–144.

MOLINA, F. et al. (2007). **Winery effluent treatment at an anaerobic hybrid USBF pilot plant under normal and abnormal operation**. Water Science and Technology, v. 56, n. 2, p. 25–31.

MONTEGGIA, L.O. (1997). **Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro “Atividade Metanogênica Específica”**. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, Foz do Iguaçu, de 14 a 19 de setembro de 1997. Anais. Rio de Janeiro-BR: ABES, 1997.p. 754-765.

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

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

MUTOMBO, D.T. (2004). **Internal circulation reactor: pushing the limits of anaerobic industrial effluents treatment technologies**. Water Institute of Southern Africa (WISA) Biennial Conference, 2 – 6 maio.

NUBEL, U. et al. (1996). **Sequence heterogeneities of genes encoding 16 S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis**. J Bacteriol, v. 178, n. 19, p. 5636–5643.

OLIVEIRA, M.R. (2005). **Avaliação estatística da produção de levana por Zymomonas mobilis ATCC 31821 utilizando fontes de carboidratos regionais e de baixo**

custo. 2005.88f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PACHECO, T.F. (2011). **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?**, Embrapa. Brasília, p. 1-6, abril de 2011.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. (2007). **Biological approaches for treatment of distillery wastewater : a review.** Bioresource Technology, v. 98, p.2321-2334.

PARK, M. J. et al. (2010). **Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses.** Renewable Energy, v. 35, n. 12, p. 6194–6202.

PAULO, P.L., JIANG, B.,CYSNEIROS,D., STAMS, A.J., LETTINGA, G. (2004). **Effect of cobalt on the anaerobic thermophilic conversion of methanol.** Biotechnol. Bioeng. 85, 434–441.

PEREIRA, M.C.; ALQUINI, F.; GÜNTHER, W.M.R. (2009). **Fertirrigação com vinhaça, aspectos técnicos, ambientais e normativos.** XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, Campo Grande –MS, novembro de 2009.

POETSCH, P. B.; KOETZ, P. R. (1998). **Sistema de determinação da atividade metanogênica específica de lodo anaeróbios.** Revista Brasileira de Agrociência, n. 0532, p. 161–165.

PORTARIA N° 323, de 29/11/ 1978. Disponível em: <http://abiquim.org.br/restrito/esp/pminter-323-78-rh.pdf>. Acesso em: 25/01/2017.

PORTARIA N° 158, de 03/11/1980. Disponível em: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra14334.pdf>. Acesso em: 10/01/2017.

PORTARIA P4.231-CETESB. **Vinhaça-critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola.** Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf. Acesso em : 10 de janeiro de 2017.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A. LATA, K; KISHORE, V.V.N. **State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 4, n. 2, p. 135–156, 2000.

RESOLUÇÃO CONAMA n° 0001, de 23/01/1986. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res0186.html>. Acesso em: 10/01/2017.

RESOLUÇÃO CONAMA n° 0002, de 05/06/1984. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=2>. Acesso em: 10/01/2017.

RIBAS, M. M. F. (2006). **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio operado em batelada seqüencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas.** 2006. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RIBAS, M.M.F.; MORAES, E.M.; FORESTI, E. (2007). **Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade a bicarbonato para monitoramento de reatores anaeróbios.** Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES 007/06, v. 12, n. 3, p. 240-246.

RIEIRA, F.S.; CÓRDOBA, P.; SIÑERIZT, F. (1985). **Use of the UASB reactor for anaerobic treatment of stillage from sugar cane molasses.** Biotechnology and Bioengineering, v. XXVII, p. 1710-1716.

RINTALA, J. (1991). **High-Rate Anaerobic Treatment of Industrial Wastewaters.** Water Science and Technology, v. 24, n. 1, p. 69–74.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. (1986). **Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high – strength wastes.** Journal of Water Pollution Control Federation, v.58, n. 5, p. 406-411.

SALOMON, K.R.; LORA, E.E.S. (2009). **Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil.** BiomassBioenergy, v.33, p. 1101–7.

SANIN, S.L.; SANIN, F.D.; BRYERS, J.D. (2003). **Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria.** Process Biochem., v.38, pp. 909–914.

SANTANA JUNIOR, A.E. (2013) **Produção de metano a partir de vinhaça e melaço em reatores UASB termofílicos, em dois estágios.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SCHMIDT, T., NELLES, M., SCHOLWIN, F., PRÖTER, J., (2014). **Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage - optimization of metal dosing.** Bioresour. Technol. 168, 80–85.

SETH, R., GOYAL,S.K., HANDA,B.K (1995). **Fixed film biomethanation of distillery spentwash using low cost porous media.** Resour. Conserv. Recy. 14, 79–89.

SEABRA, J.E.A. (2008). **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil.** 274f. 2008. Tese (Doutorado em Planejamento de Sistemas Energéticos) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. (2007). **Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático.** 2007. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,v. 11, n. 1, p. 108-14.

SILVA. C. E. V. (2008). **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir do melaço de cana-de-açúcar.** 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

SPEECE, R.E., (1996). **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters**. Archae Press, US.

SPERLING, M. von. (2005). **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) – UFMG, v. 1. 452 p.

SZMRECSÁNYI, T. (1994). **Tecnologia E Degradação Ambiental: O Caso Da Agroindústria**. Informações Econômicas, v. 24, n. 10, p. 73–82.

THANIKAL, J. V. et al. (2007). **Treatment of distillery vinasse in a high rate anaerobic reactor using low density polyethylene supports**. Water Science and Technology, v. 56, n. 2, p. 17–24.

TOMCZAK-WANDZEL, R.; GORNIACZYK, J.; MEDRZYCKA, K. (2008). **Anaerobic Treatment of Distillery**. v. 5, p. 11–20.

VIEIRA, M.C.A.; LIMA, J.F.; BRAGA, N.M. (2007). **Setor sucroalcooleiro brasileiro: evolução e perspectivas**. Junho de 2007. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/liv_perspectivas/07.pdf> Acesso em: 25 de novembro de 2015.

VILELA, R.S. **Produção de Hidrogênio e Metano a partir de subproduto da indústria sucroalcooleira, em reatores anaeróbios de fases separadas sob condições termofílica**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V. T. (1997). **Use of cane condensed molasses in feeding broilers.** Animal Feed Science Technology, Amsterdam, v.67, 253-258p.

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

WILLINGTON, I. P.; MARTEN, G. G. (1982). **Options for handling stillage waste from sugar-based fuel ethanol production.** Resources and Conservation, v. 8, p. 111-29.

WOLMARANS, B.; de VILLIERS, G.H. (2002) **Start-up of a UASB effluent treatment plant on distillery wastewater.** Water SA, v.28, n.1, p.63-68.

WOLMARANS, B.; DE VILLIERS, G. H. (2002).**Start-up of a UASB effluent treatment plant on distillery wastewater.** Water SA, v. 28, n. 1, p. 63–68.

APÊNDICE A

Fórmulas utilizadas na pesquisa para o monitoramento do reator

Cálculo da eficiência de remoção de DQO

$$\% \text{ DQO} = \frac{\text{DQOf} - \text{DQOef}}{\text{DQO af}} \times 100$$

Em que:

DQO af: concentração de matéria orgânica afluyente(g.L⁻¹)

DQO ef: concentração de matéria orgânica efluente(g.L⁻¹)

Cálculo da eficiência de remoção de carboidrato

$$\% \text{ C} = \frac{\text{Caf} - \text{Cef}}{\text{Caf}} \times 100$$

Em que:

Caf: concentração do carboidrato afluyente (mg.L⁻¹)

Cef: concentração do carboidrato efluente (mg.L⁻¹)

Carga Orgânica Volumétrica (COV)

$$\text{COV} = \frac{\text{DQOaf} - \text{Q}}{\text{V}} \times 100$$

Em que:

DQO af: concentração de matéria orgânica afluyente (g.L⁻¹)

Q: vazão afluyente (L.d⁻¹)

V: volume do reator (L)

Alcalinidade a bicarbonato, Ácidos Voláteis e AI/AP

$$\text{AB} = \text{AT} - 0,71 * \text{AV}$$

$$AV = \frac{N \text{ NAOH} \times 60000 \times V\text{NAOH}}{V \text{ amostra}}$$

$$\frac{AI}{AP} = \frac{\text{Alc. total} - \text{Alc. parcial}}{\text{Alc. parcial}}$$

Em que:

AB = Alcalinidade a Bicarbonato ($\text{mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)

AT = Alcalinidade Total ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

AV = Ácidos Voláteis ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

N NAOH = normalidade do hidróxido de sódio ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

V NAOH = volume do hidróxido de sódio (ml)

Alc.parcial = alcalinidade parcial (titulação até pH de 5,75)

Alc. total = alcalinidade total (titulação até pH de 4,3)

Vazão de biogás medido no Ritter

$$Q_b = \frac{V}{T}$$

Em que:

V : volume de biogás medido no Ritter (L)

T : tempo de intervalo de cada medida (h)

Percentagem de metano produzido

$$\% \text{ CH}_4 = \frac{\text{Teor metano}}{\sum \text{Teor dos gases}} \times 100$$

O teor de metano e dos gases foi medido por cromatografia através das curvas de áreas.

Produção de metano

$$\text{Prod. metano} = Q_b \times \% \text{CH}_4$$

Em que:

Q_b: vazão de biogás ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$)

%CH₄: percentagem de metano contido no biogás

Produção volumétrica de metano

$$\text{Prod. vol. metano} = \frac{Q_b \times \%CH_4}{V}$$

Em que:

Q_b : vazão de biogás ($L.d^{-1}$)

$\%CH_4$: percentagem de metano contido no biogás

V : volume do reator (L)

Rendimento de metano

$$Y_{CH_4} = \frac{Q_b \times \%CH_4}{Q \times (DQO_{af} - DQO_{ef})}$$

Em que:

Q_b : vazão de biogás ($L.d^{-1}$)

$\%CH_4$: percentagem de metano contido no biogás

Q : vazão no reator (L)

DQO_{af} : concentração de matéria orgânica afluenta ($L.d^{-1}$)

DQO_{ef} : concentração de matéria orgânica efluente ($L.d^{-1}$)

APÊNDICE B

Cálculos para Atividade Metanogênica Específica (AME):

$$\text{CH}_4 \text{ massa} = \text{CH}_4 \text{ massa(fasegasosa)} + \text{CH}_4 \text{ massa (faselíquida)} \\ \text{CH}_4 \text{ massa(fasegasosa)} + \text{CH}_4 \text{ massa (faselíquida)}$$

$$\text{CH}_4 \text{ massa (fasegasosa)} = \frac{M \cdot V_{(g)} \cdot P}{R \cdot T} \quad \text{CH}_4 \text{ massa (fasegasosa)} = \frac{M \cdot V_{(g)} \cdot P}{R \cdot T}$$

$$\text{CH}_4 \text{ (faselíquida)} = K \cdot P \cdot M \cdot V_{(l)} \quad \text{CH}_4 \text{ (faselíquida)} = K \cdot P \cdot M \cdot V_{(l)}$$

$$\text{PME}_r = \frac{\text{CH}_4 \text{ massa} \cdot S}{X \cdot V_{(l)}} \quad \text{PME}_r = \frac{\text{CH}_4 \text{ massa} \cdot S}{X \cdot V_{(l)}}$$

$$\text{AE} = \frac{d\text{PME}_r}{dt} \quad \text{AE} = \frac{d\text{PME}_r}{dt}$$

Onde: M é a massa molar do metano (16.04g /mol); V é o volume da fase líquida ou gasosa (L); P é a pressão no *headspace* (atm); R é constante universal dos gases (0.082057L.atm/K.mol); T é a temperatura (K), K é a constante da Lei de Henry (para o metano a 30 °C 0,001436 mol/L.atm); S é o coeficiente estequiométrico a oxidação do metano (4 gDQO/gCH₄) ; X é a concentração de biomassa no ensaio (g STV/L) e; PME é a taxa de produção de metano específica (g DQO CH₄/g VSS) no tempo t.

I