

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO
LABORATÓRIO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS**

LEANDRO AUGUSTO GOUVÊA DE GODOI

**Interferência da sulfetogênese na produção de metano a partir de águas
residuárias ricas em carboidratos**

**VERSÃO CORRIGIDA
SÃO CARLOS
2014**

LEANDRO AUGUSTO GOUVÊA DE GODOI

**Interferência da sulfetogênese na produção de metano a partir de águas
residuárias ricas em carboidratos**

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

SÃO CARLOS

2014

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

Godoi, Leandro Augusto Gouvêa de

G588i Interferência da sulfetogênese na produção de metano a partir de águas residuárias ricas em carboidratos / Leandro Augusto Gouvêa de Godoi; orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. São Carlos, 2014.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. bactérias redutoras de sulfato. 2. reator de leito fixo ordenado. 3. produção de metano. 4. sulfato. 5. sulfeto. 6. vinhaça. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **LEANDRO AUGUSTO GOUVÊA DE GODOI**.

Título da dissertação: "Interferência da sulfetogênese na produção de metano a partir de águas residuárias ricas em carboidratos".

Data da defesa: 11/04/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovado

Prof. Dr. **Ariovaldo José da Silva**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

Prof. Dr. **Sérgio Francisco de Aquino**
(Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP)

Aprovado.

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

*À Natália, minha esposa, amor
que encontrei para compartilhar
a vida, por todo carinho, apoio e
compreensão, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por manifestar sua sabedoria e poder em todas as coisas, chamando-nos sempre para a aventura da fé.

Aos meus pais, José Carlos e Leila, e ao meu irmão Matheus, família querida e tão indispensável para a minha caminhada e crescimento.

À minha esposa, Natália, por todo amor, cumplicidade e carinho, que me fazem tão bem e cada vez melhor e mais feliz.

À professora Márcia Damianovic, pela orientação dedicada e paciente, pelos valiosos conselhos e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus grandes amigos, Eduardo e Amanda, pelo companheirismo e apoio desde os tempos de graduação até hoje.

À Carla, pelos apuros passados em comum e por toda ajuda prestada.

À Priscila e Beatriz, pelo compartilhamento da ‘temível’ câmara do sulfeto, pelos auxílios necessários e, principalmente, pela amizade.

À Carol, Janja e Inês, pela ajuda e colaboração na realização de tantas análises físico-químicas e cromatográficas.

Aos amigos de laboratório, pela convivência descontraída e rica de contribuições, especialmente: Rachel, Paulo, Tiago P., Guilherme O., Ânia, Dago, Cebola, Carol, Lucas, Lívia, Fabrício, Juliana e Mara.

Aos amigos e irmãos da Paróquia São Benedito (São Carlos/SP), pela riqueza da vivência em comunidade e pela partilha de tantos momentos difíceis e alegres: Seria impossível nomear a cada um!

Aos funcionários do SHS, especialmente Rose, Sá e Priscila.

Ao CNPq pela bolsa de amparo concedida.

E a todos que colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

**“O louco não é um homem que perdeu a razão.
O louco é um homem que perdeu tudo,
exceto a razão!”**

G.K. Chesterton (1874-1936)

RESUMO

GODOI, L.A.G. (2014) **Interferência da sulfetogênese na produção de metano a partir de águas residuárias ricas em carboidratos**. 102. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência da sulfetogênese sobre a produção de metano em reator anaeróbio de leito fixo ordenado tratando água residuária orgânica contendo sulfato. A escolha dessa configuração de reator foi devida à possibilidade de manutenção de uma área transversal de escoamento na zona reacional, o que minimiza diversos problemas oriundos da colmatação do leito por acúmulo de polímeros extracelulares e sólidos suspensos nos interstícios do material suporte. Foram utilizados dois sistemas em paralelo com as mesmas características operacionais e alimentados com água residuária sintética simulando alguns componentes da fração solúvel da vinhaça, e matéria orgânica constituída por uma mistura de sacarose, etanol e fenol. Um dos reatores recebeu adição de sulfato apenas como fonte de enxofre requerido pela digestão anaeróbia e o outro recebeu dosagem de sulfato para relações DQO/Sulfato de 3 a 5. O estudo se estendeu por 7 fases operacionais distintas. A concentração afluente de matéria orgânica variou de 800 para 1000, 2000 e 4000 mg.L⁻¹. O tempo de detenção hidráulica (TDH) foi de 24 h. Na última fase operacional (com carga orgânica aplicada de 4 g.L⁻¹.dia⁻¹) as eficiências de remoção de matéria orgânica chegaram a cerca de 97 % no reator metanogênico e de 96 % no reator sulfetogênico. Este último também obteve eficiências de remoção de sulfato da ordem de 97 % nessa fase (com relação DQO/Sulfato de 3 e concentração afluente de sulfato de 1300 mg.L⁻¹), chegando ao máximo de 99 % de remoção em alguns dias de operação. No sistema sulfetogênico a relação DQO/Sulfato que proporcionou maiores eficiências de remoção combinada de matéria orgânica e sulfato, com maior geração de alcalinidade, foi de 3 gDQO / gSO₄²⁻. Os reatores metanogênico e sulfetogênico apresentaram rendimentos de metano próximos ao longo do tempo, tendo o sistema sulfetogênico apresentado rendimento de metano superior ao alcançado pelo sistema metanogênico em alguns dias da operação. Na última fase os rendimentos médios de metano obtidos foram, nas CNTP, da ordem de 320 mLCH₄ / gDQO_{removida} no reator sulfetogênico, e da ordem de 315 mLCH₄ / gDQO_{removida} no reator metanogênico. Esses resultados não indicaram inibição significativa da atividade metanogênica sob as condições impostas no sistema sulfetogênico, viabilizando a recuperação de energia pelo aproveitamento do metano.

Palavras-chaves: bactérias redutoras de sulfato, reator de leito fixo ordenado, sulfato, metano, vinhaça.

ABSTRACT

GODOI, L.A.G. (2014) **Sulphidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater**. 102p. MSc. Dissertation. Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.

The aim of this study was to evaluate the interference of sulphidogenesis on methane production in structured bed anaerobic reactor treating organic wastewater containing sulphate. Choosing this setting reactor was due to the possibility of maintaining a cross-sectional area of flow in the reaction zone, which minimizes several problems caused by the clogging of the bed by accumulation of extracellular polymers and suspended solid in the interstices of support material. Two parallel systems were used with the same operational features and fed with synthetic wastewater simulating some compounds of the soluble fraction of vinasse, and organic matter constituted by a mixture of sucrose, ethanol and phenol. One reactor received sulphate just as a source of sulfur required for anaerobic digestion and another one received sulphate dosage for COD/Sulphate ratios from 3 to 5. Seven distinct operational phases were tested. The influent concentration of organic matter ranged from 800 to 1000, 2000 and 4000 mg.L⁻¹. The hydraulic retention time (HRT) was 24 h. In the last step (with organic loading rate of 4 g.L⁻¹.day⁻¹) the efficiencies of organic matter removal were around 97 % in the methanogenic reactor and 96 % in sulfidogenic reactor. The last one also achieved efficiencies of sulphate removal close to 97 % in this phase (COD/Sulphate ratio of 3 and influent sulphate concentration of 1300 mg.L⁻¹), reaching a maximum removal of 99 % in some operational days. The COD/Sulphate ratio in sulfidogenic system that showed higher efficiencies of combined removal of organic matter and sulphate, with higher generation of alkalinity, was 3 gCOD / gSO₄²⁻. The methanogenic and sulfidogenic reactors showed similar values of methane yield, having the sulfidogenic system presented higher methane yield than achieved by methanogenic system at some operational days. In the last phase the average yields of methane obtained, at NTP, were around 320 mLCH₄ / gCOD_{removed} in the sulfidogenic reactor, and around 315 mLCH₄ / gCOD_{removed} in the methanogenic reactor. These results indicated no significant inhibition of methanogenic activity under the conditions imposed in sulfidogenic system, enabling energy recovery by use of produced methane.

Keywords: sulphate-reducing bacteria, fixed-structured bed reactor, sulphate, methane, vinasse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Esquema da degradação anaeróbia da matéria orgânica na ausência (a) e na presença de sulfato (b) (Adaptado de Muyzer & Stams, 2008).....	7
Figura 3.2. Distribuição das espécies de sulfeto de hidrogênio em função dos valores de pH com indicação das faixas ótimas para a digestão anaeróbia (▨) e metanogênese (▩) (Rintala & Puhakka, 1994).	14
Figura 4.1. Esquema do reator de leito ordenado (a), corte transversal do leito (b) e módulos do sistema (c) (Adaptado de Mockaitis, 2011).	21
Figura 4.2. Imagem dos reatores de leito fixo ordenado.	22
Figura 4.3. Material suporte em processo de inoculação.	23
Figura 4.4. Aparato para medição do biogás (Adaptado de Aquino et al., 2007).....	27
Figura 5.1. Eficiências de remoção de matéria orgânica e concentrações de matéria orgânica remanescente ao longo do tempo.	34
Figura 5.2. Eficiências de remoção de sulfato e concentrações remanescentes de sulfato no efluente do reator sulfetogênico.	35
Figura 5.3. Carga orgânica removida ao longo do tempo (a) e valores médios de carga orgânica removida em cada fase operacional (b).	36
Figura 5.4. Cargas de sulfato aplicadas e removidas no reator sulfetogênico.	38
Figura 5.5. Boxplot da eficiência de remoção de matéria orgânica.	42
Figura 5.6. Boxplot dos dados de eficiência de remoção de sulfato.	42
Figura 5.7. Porcentagem de carga orgânica removida pelas vias metanogênica e de redução do sulfato no sistema sulfetogênico.	46
Figura 5.8. Concentrações das espécies de sulfeto de hidrogênio e valores de pH no efluente do sistema sulfetogênico ao longo do tempo.	49
Figura 5.9. Concentrações de sulfato removido, sulfato total dissolvido e sulfato teórico no reator sulfetogênico ao longo do tempo.	51
Figura 5.10. Imagens dos reatores metanogênico (esquerda) e sulfetogênico (direita). Note-se a diferença de cor entre ambos.	52
Figura 5.11. Formação de tiosulfato no sistema sulfetogênico ao longo do tempo.	54

Figura 5.12. Alcalinidade parcial afluente e efluente ao longo do tempo de operação nos reatores metanogênico (a) e sulfetogênico (b).....	55
Figura 5.13. Alcalinidade a bicarbonato ao longo do tempo nos reatores estudados.	58
Figura 5.14. Concentrações (em termos de DQO) de ácido acético, ácido propiônico e de matéria orgânica remanescente no efluente dos reatores metanogênico (a) e sulfetogênico (b). Obs.: Os eixos verticais foram mantidos em diferentes escalas.	60
Figura 5.15. Produção volumétrica de metano nas CNTP ao longo do tempo.....	63
Figura 5.16. Rendimento de metano nos dois reatores ao longo do tempo.	65
Figura 5.17. Valores médios de rendimento de metano e de cargas orgânicas removidas nos reatores metanogênico (a) e sulfetogênico (b).	66
Figura 5.18. Degradação da matéria orgânica (a) e volume acumulado de metano (b) nos frascos de reação.....	71
Figura 5.19. Ajustes sigmoidais (boltzman) das curvas acumuladas de metano (AME) dos frascos alimentados com acetato.....	72
Figura 5.20. Ajustes sigmoidais (boltzman) das curvas acumuladas de metano (AME) dos frascos alimentados com formiato.	73
Figura 5.21. Ajustes sigmoidais (boltzman) das curvas acumuladas de metano (AME) dos frascos alimentados com meio sintético.....	74
Figura 5.22. Concentração acumulada de sulfeto total dissolvido ao longo do tempo nos frascos contendo sulfato.	75
Figura 5.23. Concentração de ácido acético, ácido propiônico e etanol nos frascos alimentados com meio sintético.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Equações para o cálculo das vias de remoção da matéria orgânica (Adaptado de Visser et al., 1993a).....	12
Tabela 4.1. Dimensões dos diversos módulos do reator.	21
Tabela 4.2. Características da água residuária sintética (Adaptado de Rocha, 2012). ...	25
Tabela 4.3. Metodologias para determinações analíticas.	27
Tabela 4.4. Condições operacionais dos reatores.	28
Tabela 4.5. Condições experimentais dos reatores em batelada.....	30
Tabela 5.1. Estatística descritiva da eficiência de remoção de sulfato em cada fase operacional no sistema sulfetogênico.	37
Tabela 5.2. Estatística descritiva da eficiência de remoção de matéria orgânica nos dois reatores estudados.....	41
Tabela 5.3. Cálculo simplificado das vias de remoção da matéria orgânica em condições sulfetogênicas.	44
Tabela 5.4. Fluxo estimado de elétrons pelas vias metanogênica e sulfetogênica conforme equações propostas na Tabela 5.3.....	45
Tabela 5.5. Parcelas da eficiência de remoção de matéria orgânica pelas vias metanogênica e sulfetogênica.	47
Tabela 5.6. Estatística descritiva das concentrações de sulfeto total produzido.....	48
Tabela 5.7. Valores médios de alcalinidade parcial dos dois reatores estudados.	57
Tabela 5.8. Valores médios da relação A_i/A_p em cada fase operacional.....	58
Tabela 5.9. Rendimento de Metano (mL CH ₄ .g DQOremovida-1) nos reatores em estudo.....	68
Tabela 5.10. Condições iniciais dos frascos de reação.	70
Tabela 5.11. Atividade metanogênica específica (AME).	75
Tabela 5.12. Valores iniciais e finais de pH nos frascos de reação.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

Ai – alcalinidade intermediária

AM – arquéias metanogênicas

AME – atividade metanogênica específica

Ap – alcalinidade parcial

BRS – bactérias redutoras de sulfato

cm – centímetros

CNTP – Condições normais de temperatura e pressão (0°C e 1atm)

DQO – demanda química de oxigênio

HCO_3^- – íon bicarbonato

H_2S – sulfeto de hidrogênio livre

HS^- – sulfeto de hidrogênio ionizado

$\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ – miligramas de carbonato de cálcio por litro

$\text{mg}.\text{L}^{-1}$ – miligramas por litro

$\text{mL}.\text{min}^{-1}$ – mililitros por minuto

mM – milimolar

mm – milímetros

NaHCO_3 – bicarbonato de sódio

Na_2SO_4 – sulfato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

pH – potencial hidrogeniônico

S^{2-} – íon sulfeto

$S_2O_3^{2-}$ – tiosulfato

SSV – sólidos suspensos voláteis

STD – sulfeto total dissolvido

TDH – tempo de detenção hidráulica

UASB – *upflow anaerobic sludge blanket reactor* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. DEGRADAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA PELA VIA METANOGENICA	5
3.2. ROTAS DE CONVERSÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA NA PRESENÇA DE SULFATO.....	6
3.3. INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO E SULFETO NA COMPETIÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS METANOGENICOS E SULFETOGENICOS	12
3.4. TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS ORGÂNICAS RICAS EM SULFATO.....	15
3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS	20
4.2. INOCULAÇÃO DO MATERIAL SUPORTE	22
4.3. ÁGUA RESIDUÁRIA.....	23
4.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	26
4.5. FASES OPERACIONAIS	28
4.6. TESTES DE ATIVIDADE METANOGENICA.....	30
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E SULFATO.....	34
5.2. VIAS DE REMOÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA	44
5.3. SULFETO DISSOLVIDO	48
5.4. ALCALINIDADE.....	54
5.5. PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS	59

5.6.	PRODUÇÃO DE BIOGÁS.....	63
5.7.	ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA	70
6.	CONCLUSÕES.....	83
7.	SUGESTÕES	86
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXO A – CONSTRUÇÃO DOS DIAGRAMAS BOXPLOT.....	I
	ANEXO B – TESTES ESTATÍSTICOS	III

1. INTRODUÇÃO

Águas residuárias contendo compostos oxidados de enxofre (SO_4^{2-} , HSO_3^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) quando expostas a ambientes anaeróbios estão sujeitas à conversão das formas mais oxidadas de enxofre a sulfeto ($\text{S}^{2-} + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{S}_{(\text{aq})} + \text{H}_2\text{S}_{(\text{g})}$), podendo este ser emitido na fase gasosa ou permanecer no meio líquido em função de certas condições ambientais, sabidamente do pH (Visser *et al.*, 1993a; Lens *et al.*, 1998; O'Flaherty *et al.*, 1998a).

Por muitos anos a aplicação de sistemas anaeróbios para o tratamento de águas residuárias contendo sulfato foi considerada indesejável justamente em função da produção do sulfeto de hidrogênio (H_2S), o qual é responsável por problemas como toxicidade, corrosão, mau odor, queda na qualidade do efluente e também por causa da redução na quantidade e qualidade de biogás (metano) produzido (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

Atualmente, depois de diversos avanços no entendimento da bioquímica e microbiologia do processo, a tecnologia anaeróbia já pode ser considerada como uma opção para o tratamento de águas residuárias contendo sulfato e matéria orgânica, desde que certas medidas sejam tomadas para proporcionar uma integração entre os processos de redução do sulfato com a metanogênese (Lens *et al.*, 2002).

A implantação de sistemas de tratamento dessas águas residuárias por via anaeróbia para a remoção simultânea tanto da matéria orgânica quanto do sulfato enfrenta os desafios impostos pela competição entre os microrganismos metanogênicos e os redutores de sulfato por doadores de elétrons, assim como o problema da inibição

da atividade microbiana causada pelas espécies de sulfeto presentes no meio (Damianovic & Foresti, 2007).

Quando se visa a produção de metano como resultado da digestão anaeróbia de efluentes ricos em sulfato é necessário verificar a razão DQO/Sulfato no afluente e a interferência potencial da sulfetogênese na metanogênese. Sistemas que operam sob relações DQO/Sulfato maiores que 10 apresentam a metanogênese como processo predominante, enquanto que a sulfetogênese pode predominar em sistemas com relações DQO/Sulfato menores que 1 (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

Em sistemas que operam sob limitação da concentração de sulfato, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) são capazes de oxidar parcialmente os ácidos voláteis gerados na acidogênese, produzindo acetato, o qual pode ser utilizado nas etapas posteriores pelas arqueias metanogênicas (AM) acetoclásticas (Damianovic & Foresti, 2009; Mulopo *et al.*, 2011), promovendo uma associação sintrófica entre os microrganismos, que pode resultar em um aumento na produção de metano e estabilidade ao final do processo.

Do ponto de vista da remoção da matéria orgânica, as bactérias redutoras de sulfato (BRS), na presença de compostos oxidados de enxofre, podem metabolizar uma ampla faixa de compostos orgânicos sem requererem crescimento balanceado com a acetogênese, uma vez que não dependem da pressão parcial de hidrogênio do meio (Lens *et al.*, 1998), sendo portanto menos sensíveis às sobrecargas orgânicas no sistema.

As BRS podem atuar também na remoção de substâncias inibidoras, tais como compostos aromáticos, alcanos, organoclorados e ácidos graxos de cadeia longa (Colleran *et al.*, 1995), que são prejudiciais aos processos metanogênicos quando acumulados no meio líquido.

A água residuária sintética a ser empregada neste trabalho baseia-se na composição da fração solúvel da vinhaça. Apresenta alta carga orgânica, concentrações residuais de carboidratos, alto potencial de utilização na produção de metano (Salomon & Lora, 2009) e consideráveis concentrações de sulfato (Prada *et al.*, 1998). A presença de fenóis identificados na vinhaça (Wilkie *et al.*, 2000) também desempenha um importante papel nas rotas de degradação anaeróbia da matéria orgânica, possuindo propriedades tóxicas e bactericidas, podendo no entanto ser degradado em ambientes metanogênicos e sob condições redutoras de sulfato (Bolaños, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência da sulfetogênese sobre a produção de metano em reator anaeróbio de leito fixo ordenado tratando água residuária orgânica contendo sulfato.

2.2. Objetivos específicos

Dentro do escopo deste trabalho, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação da estabilidade e da eficiência de remoção de matéria orgânica e sulfato pela via metanogênica combinada com a via sulfetogênica;
- Avaliação do estabelecimento dos processos anaeróbios balanceados sob condições metanogênicas ou sulfetogênicas com relação à manutenção de alcalinidade no meio;
- Avaliação da produção e do rendimento de metano em sistema metanogênico/sulfetogênico combinado comparado com sistema exclusivamente metanogênico;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Degradação da matéria orgânica pela via metanogênica

O tratamento de águas residuárias em reatores anaeróbios pode ser considerado uma tecnologia estabelecida para grande diversidade de águas residuárias, destacando-se os efluentes de indústrias alimentícias, de papel e celulose, frigoríficos e abatedouros, cervejarias e indústrias de açúcar (Franklin, 2001).

O processo de digestão anaeróbia pode ser descrito como uma sequência complexa de etapas que envolvem diversos grupos de microrganismos. A fração mais complexa da matéria orgânica (polímeros) é hidrolisada em compostos mais simples (monômeros) que, em seguida, são metabolizados pelas bactérias fermentativas (acidogênicas), gerando ácidos orgânicos de cadeia curta, álcoois, gás carbônico e hidrogênio. Os ácidos orgânicos que contam com mais de dois carbonos em sua molécula são convertidos a acetato e a hidrogênio pelas bactérias acetogênicas. As arqueias metanogênicas (AM) acetoclásticas convertem, então, o acetato a metano, e as arqueias metanogênicas (AM) hidrogenotróficas produzem metano a partir do gás carbônico e do hidrogênio.

Aproximadamente 70% do metano produzido no processo provêm da conversão do acetato pelas metanogênicas acetoclásticas (McCarty, 1964). Apenas os 30% restantes resultam da metanogênese hidrogenotrófica. A produção de metano depende, portanto, da conversão eficiente da matéria orgânica em acetato na etapa acidogênica.

A conversão dos ácidos orgânicos com mais de dois carbonos na cadeia só é

termodinamicamente favorável se a pressão parcial de hidrogênio no meio for inferior a 10^{-4} atm (Harper & Pohland, 1986), o que torna a eficiência e a estabilidade do processo dependentes da remoção de hidrogênio do meio. Isso se dá por meio do mecanismo denominado transferência de hidrogênio interespécies (Thiele & Zeikus, 1988).

3.2. Rotas de conversão da matéria orgânica na presença de sulfato

Em ambientes anaeróbios a remoção de matéria orgânica também pode ocorrer com a utilização de sulfato como acceptor final de elétrons, sendo este reduzido a sulfeto. Todavia, em ambientes com limitação de sulfato (altas relações DQO/Sulfato), a matéria orgânica remanescente deverá ser removida necessariamente por outra via, como a metanogênica. Assim, a aplicação de processo anaeróbio a águas residuárias com matéria orgânica e sulfato impõe a coexistência de bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) e arqueias metanogênicas (AM), estabelecendo uma situação de competição entre ambos os grupos pelos substratos orgânicos disponíveis, especialmente por acetato e hidrogênio (Omil *et al.*, 1996), o que influenciará diretamente a eficiência do tratamento, a qualidade do efluente, a qualidade e a quantidade de biogás gerado e determinando a proporção na geração de sulfeto (H_2S) e metano (CH_4) (Hulshoff Pol *et al.*, 1998).

As arqueias metanogênicas (AM) transformam o acetato e o hidrogênio em metano e gás carbônico (CH_4 e CO_2). Já as bactérias redutoras do íon sulfato (BRS) utilizam o sulfato (SO_4^{2-}) como acceptor final de elétrons para oxidar os compostos orgânicos e o hidrogênio, reduzindo o sulfato (SO_4^{2-}) a sulfeto (HS^-). Enquanto as AM utilizam limitado número de substratos para seu crescimento, as BRS degradam ampla

faixa de substâncias, tais como hidrogênio, formiato, acetato, metanol, piruvato (Bock *et al.*, 1994), propionato, butirato, ácidos graxos de cadeia longa e ramificada, lactato, álcool, fumarato, succinato, malato e compostos aromáticos (Colleran *et al.*, 1995; Hulshoff Pol *et al.*, 1998), podendo inclusive atuarem como acetogênicas, produzindo substratos para a fase metanogênica (Muyzer & Stams, 2008; Mulopo *et al.*, 2011).

A Figura 3.1 apresenta comparativamente as rotas de degradação da matéria orgânica via metanogênese (a) e sulfetogênese (b). Quando ambas as rotas se processam conjugadas, o acetato produzido pela via sulfetogênica pode ser consumido pelas metanogênicas acetoclásticas, estimulando a produção de metano (Harada *et al.*, 1994).

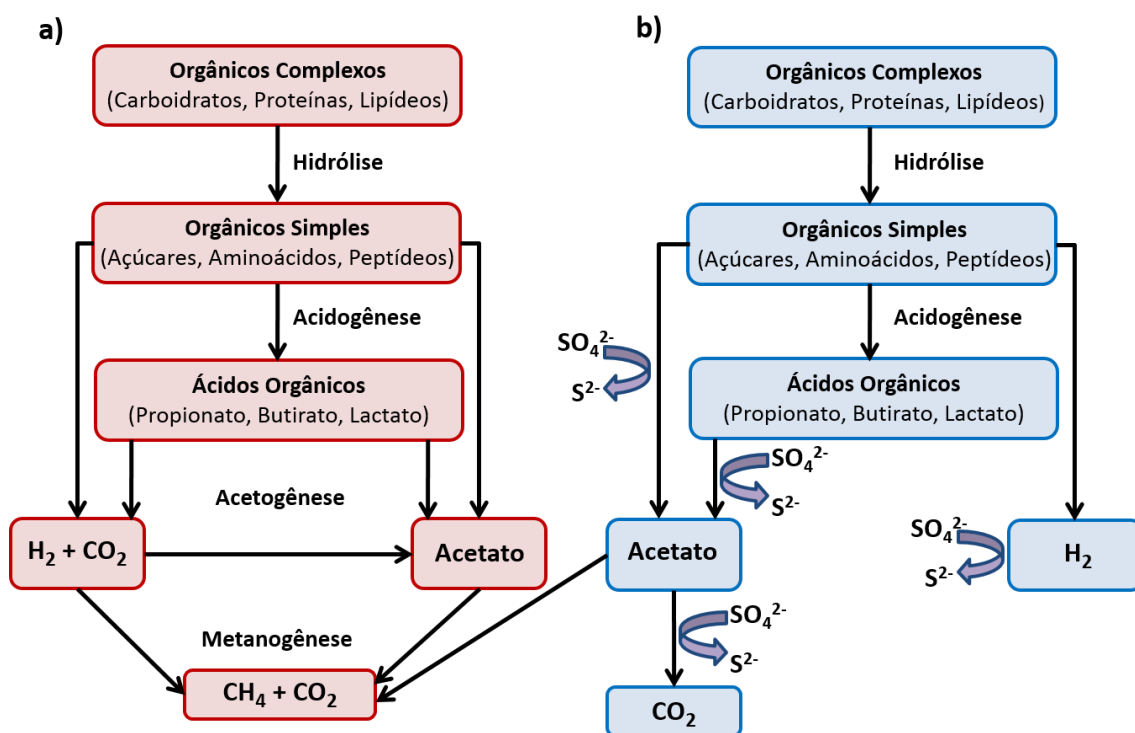


Figura 3.1. Esquema da degradação anaeróbica da matéria orgânica na ausência (a) e na presença de sulfato (b) (Adaptado de Muyzer & Stams, 2008).

A redução de sulfato acoplada à oxidação de matéria orgânica independe da pressão parcial de hidrogênio (Lens *et al.*, 1998), o que torna os sistemas sulfetogênicos menos sensíveis às variações de carga que os metanogênicos, os quais requerem um balanceamento entre a acetogênese e a metanogênese (Hansen, 1994; Hulshoff Pol *et al.*, 1998). Além disso, as BRS consumidoras do hidrogênio são capazes de reduzir a pressão parcial do hidrogênio no meio mais rapidamente que as AM hidrogenotróficas (Stams *et al.*, 2005), vencendo assim a competição pelo hidrogênio.

A razão DQO/Sulfato, por sua vez, é responsável por influenciar diretamente no estabelecimento da rota principal de degradação da matéria orgânica, a qual poderá ser metanogênica, sulfetogênica ou ambas (Lens *et al.*, 1998; Omil *et al.*, 1998).

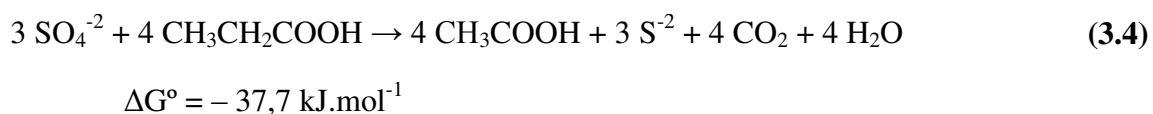
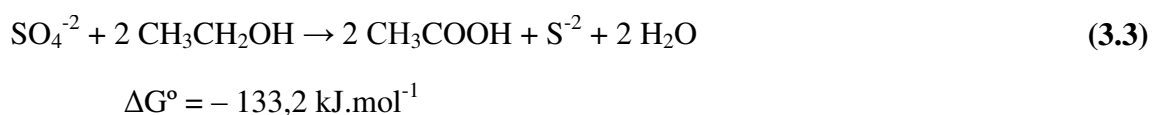
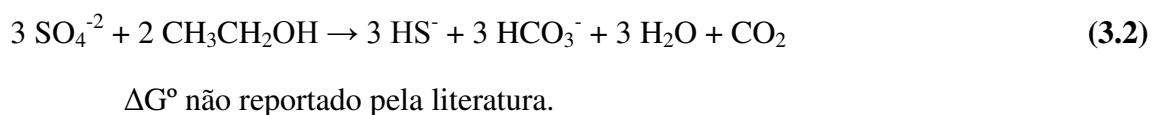
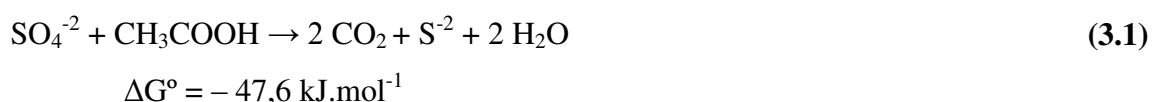
Águas residuárias com relação DQO/Sulfato igual a 0,67 (gDQO/gSO₄²⁻) potencialmente podem promover a oxidação completa da matéria orgânica pela via de redução do sulfato. Já para relações DQO/Sulfato menores que 0,67, a quantidade de matéria orgânica disponível é insuficiente para a completa redução do sulfato, a qual só poderá ser obtida com a adição de mais substrato orgânico. Finalmente, para relações DQO/Sulfato maiores que 0,67, a completa remoção da matéria orgânica só ocorrerá se, além da redução do sulfato, a metanogênese também ocorrer (Lens *et al.*, 1998; Omil *et al.*, 1998).

A relação DQO/Sulfato é uma característica da água residuária a ser tratada. Assim, a previsão dos processos envolvidos está associada a essa relação. Se o objetivo do tratamento for a remoção completa da matéria orgânica e o favorecimento da metanogênese, o sistema deverá operar a relações DQO/Sulfato maiores que 0,67. Se o objetivo do tratamento é a remoção de sulfato, a presença de doadores de elétrons em excesso (razões DQO/SO₄²⁻ > 0,67) é requerida. No caso de águas residuárias sem

conteúdo significativo de matéria orgânica, a adição de doadores de elétrons se faz necessária (Liamleam & Annachhatre, 2007).

A conversão da matéria orgânica pela via sulfetogênica pode ser realizada pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) oxidadoras completas, que apresentam dióxido de carbono, sulfeto e água como produtos finais, como apresentado nas Equações (3.1) e (3.2) (oxidação completa do acetato e do etanol, respectivamente), e pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS) oxidadoras incompletas (Hansen, 1994; Dar *et al.*, 2008), produtoras de acetato, conforme as Equações (3.3), (3.4) e (3.5) (oxidação parcial de etanol, propionato e butirato, respectivamente).

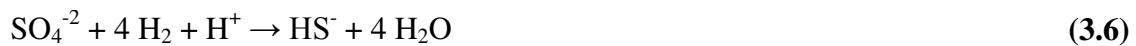
Deve-se levar em conta que a literatura apresenta comumente a indicação limite da relação DQO/Sulfato como sendo de 0,67 exclusivamente pela estequiometria das reações realizadas pelas BRS oxidadoras completas. Damianovic e Foresti (2007) demonstraram que, para as reações conduzidas pelas oxidadoras incompletas, as relações DQO/Sulfato limites são da ordem de 1,92; 1,55 e 1,83; (para as reações representadas pelas Equações (3.3), (3.4) e (3.5), respectivamente).





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

Algumas espécies redutoras de sulfato são autotróficas e utilizam o CO_2 como sua única fonte de carbono, assim como o H_2 como doador de elétrons. As BRS são capazes de obter maior quantidade de energia nas reações de utilização do hidrogênio molecular (Equação (3.6)) que as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Liamleam & Annachhatre, 2007). Por apresentarem maior afinidade pelo hidrogênio, as redutoras de sulfato predominam sobre as metanogênicas hidrogenotróficas na competição por esse substrato (McCartney & Oleszkiewicz, 1993; Esposito *et al.*, 2003).



$$\Delta G^\circ = -152,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Do ponto de vista cinético e termodinâmico, as BRS utilizadoras de acetato também podem levar vantagem na competição com as AM acetoclásticas, uma vez que são capazes de obter maiores ganhos de energia com as reações de consumo do acetato que as metanogênicas. No entanto, o mecanismo dessa competição, principalmente nos atuais reatores de alta taxa baseados em biomassa imobilizada, ainda não está totalmente esclarecido (Lens *et al.*, 1998; Muyzer & Stams, 2008). Alguns autores afirmam que essa vantagem das BRS acetotróficas sobre as AM acetoclásticas não é tão pronunciada, sendo possível às metanogênicas acetoclásticas competirem com as redutoras de sulfato pelo acetato disponível (McCartney & Oleszkiewicz, 1993; Stams *et al.*, 2005).

Até a década de 1990 alguns trabalhos interpretavam a possibilidade de predominância das AM acetoclásticas sobre as BRS no consumo de acetato como sendo devida à melhor aderência das primeiras no material suporte, tendo as outras preferência por crescimento suspenso (Isa *et al.*, 1986b; Yoda *et al.*, 1987). Atualmente, porém, já se demonstrou que ambos os grupos de microrganismos possuem capacidade de adesão similares (Silva *et al.*, 2006; Damianovic *et al.*, 2006) devendo, portanto, o resultado dessa competição ser estudado com base em outros fatores, tais como a população inicial de microrganismos presente no inóculo, as velocidades de crescimento, as taxas de consumo de acetato, bem como a afinidade de cada grupo pelo substrato (Omil *et al.*, 2008).

Diversas observações experimentais têm confirmado a natureza de longo prazo dessa competição (Visser *et al.*, 1993b; Omil *et al.*, 1998), uma vez que as redutoras de sulfato demandam longos períodos de tempo (até 5 anos) antes de se tornarem predominantes no consumo por acetato, mesmo sob altas concentrações de sulfato (O'Flaherty *et al.*, 1998b).

Segundo Yoda *et al.* (1987) e Bhattacharya *et al.* (1996), as arqueias metanogênicas acetoclásticas, por apresentarem velocidades de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e de consumo de acetato (k) maiores que as BRS acetotróficas, podem vencer a competição com as redutoras de sulfato em meios contendo altas concentrações de acetato. Já para concentrações limitantes de acetato, as BRS podem levar vantagem sobre os microrganismos metanogênicos, visto apresentarem maior afinidade por esse substrato (menores valores de K_s).

Para a determinação das eficiências de remoção de matéria orgânica e sulfato efetuadas pelas BRS e pelas AM, Visser *et al.* (1993a) propuseram as equações

apresentadas na Tabela 3.1. Por intermédio desses cálculos torna-se possível quantificar as frações de matéria orgânica utilizadas separadamente pelos microrganismos metanogênicos e pelos redutores de sulfato. Vale ressaltar, todavia, que para efeito de cálculo, os autores *op. cit.* desconsideraram a fração de matéria orgânica demandada pelo crescimento celular dos microrganismos envolvidos.

Tabela 3.1. Equações para o cálculo das vias de remoção da matéria orgânica
(Adaptado de Visser *et al.*, 1993a).

Substrato Removido	Equações*
DQO total removida (%)	$DQO_{removida} (\%) = \left(1 - \frac{DQO_{afl}}{DQO_{efl}}\right) \times 100$
DQO removida via metanogênese (%)	$CH_4 - DQO (\%) = \left(\frac{p_{CH_4} V_{gás} f + Q_{afl} g}{Q_{afl} DQO_{afl}}\right) \times 100$
DQO removida via sulfetogênese (%)	$DQO_{SO_4} (\%) = 0,67 \times \frac{(SO_{4\ afl} - SO_{4\ efl})}{DQO_{removida}} \times 100$

* p_{CH_4} = fração de metano no biogás; $V_{gás}$ = vazão de biogás ($l.d^{-1}$); f = fator de conversão (litros de CH_4 para gramas de DQO); Q_{afl} = vazão afluyente ($l.d^{-1}$); g = solubilidade do metano ($g\ DQO.l^{-1}$).

3.3. Influência das concentrações de sulfato e sulfeto na competição entre microrganismos metanogênicos e sulfetogênicos

A concentração de sulfato no meio pode ser determinante para o estabelecimento da rota principal de degradação da matéria orgânica. Para reatores que operam sob altas concentrações de sulfato, a sulfetogênese pela via de oxidação completa pode se tornar o processo predominante, prejudicando a metanogênese em função do consumo de acetato pelas BRS (Lens *et al.*, 1998).

Todavia, para reatores com biomassa imobilizada ou crescimento granular, a limitação da transferência de massa através do grânulo ou biofilme pode minimizar a

concentração de sulfato disponível e favorecer a atividade metanogênica, restringindo assim a atuação de BRS no interior do biofilme (Nielsen, 1987; Overmeire *et al.*, 1994).

Já para baixas concentrações de sulfato, nas quais se promove a competição entre os grupos predominantes de redutoras de sulfato (oxidadoras completas e incompletas), as BRS oxidadoras incompletas (produtoras de acetato) levam vantagem, favorecendo o processo metanogênico (Visser *et al.*, 1993b; Lens *et al.*, 1998).

A concentração de sulfeto (H_2S) no meio líquido, por sua vez, pode ser benéfica aos processos anaeróbios em baixas concentrações. Por se tratar de importante fonte de enxofre, principalmente para as arqueias metanogênicas (Speece, 1983), baixas quantidades de sulfeto ($1,25 \text{ mM H}_2\text{S}$ ou $42,5 \text{ mg H}_2\text{S.L}^{-1}$) estimulam o crescimento e a atividade desses microrganismos (Mountfort & Asher, 1979).

Outra vantagem da presença do sulfeto no meio líquido é a precipitação de metais pesados sob a forma de sulfetos metálicos insolúveis (Hao, 2003). Todavia, este processo também pode se tornar prejudicial caso ocorra a precipitação de íons metálicos utilizados como nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos (Winfrey & Zeikus, 1977).

No entanto, quando presente em níveis elevados, o sulfeto pode passar a ser tóxico e ocasionar a inibição da atividade dos organismos metanogênicos e das próprias bactérias redutoras de sulfato, responsáveis pela sua produção (McCartney & Oleszkiewicz, 1993; Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 2003).

Alguns estudos apontam que a inibição ocasionada pelo sulfeto é reduzida em reatores que operam com biomassa imobilizada ou granular, o que pode ser devido principalmente à resistência à difusão do sulfeto no interior do grânulo ou biofilme (Lens *et al.*, 1998; O'Flaherty *et al.*, 1998a).

Trabalhos realizados com microrganismos em suspensão obtiveram inibição total da metanogênese a partir de concentrações de sulfeto total dissolvido de 200 mg/L (Lawrence *et al.*, 1966). Já reatores com biomassa imobilizada toleram usualmente maiores concentrações de sulfeto (Maillacheruvu *et al.*, 1993).

Koster *et al.* (1986), por exemplo, observaram inibição de 50% da atividade metanogênica em reatores UASB operando sob concentrações de sulfeto total dissolvido de 810 mg/L (com valores de pH entre 7,0 e 7,2) e 841 mg/L (com valores de pH entre 7,8 e 8,2).

A distribuição das espécies de sulfeto ($S^{2-} + HS^{-} + H_2S_{(aq)}$) varia conforme o pH da solução, conforme mostrado na Figura 3.2. Para valores de pH entre 6,0 e 7,0 a fração predominante é a de sulfeto não-ionizado (H_2S), a qual apresenta maior potencial tóxico por ser facilmente absorvido pelas células (Lens *et al.*, 1998; O'Flaherty *et al.*, 1998a). Assim, uma estratégia para minimizar a presença do sulfeto não ionizado seria manter a operação do reator em faixas de valores de pH mais altas (próximas de 8,0).

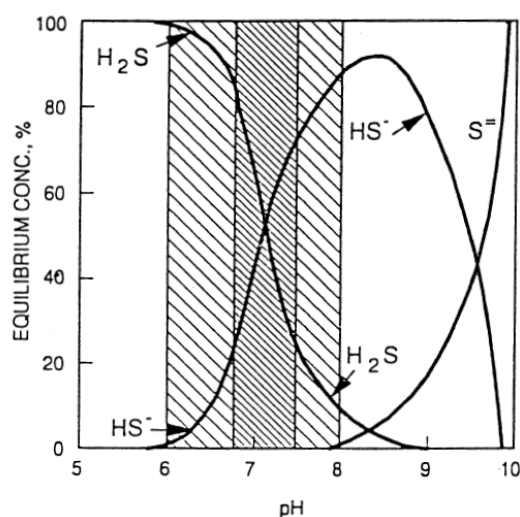


Figura 3.2. Distribuição das espécies de sulfeto de hidrogênio em função dos valores de pH com indicação das faixas ótimas para a digestão anaeróbia (hachuras diagonais) e metanogênese (hachuras horizontais) (Rintala & Puhakka, 1994).

3.4. Tratamento anaeróbio de águas residuárias orgânicas ricas em sulfato

As águas residuárias contendo matéria orgânica e elevadas concentrações de sulfato são originadas, principalmente, pelo uso de compostos sulfurosos na indústria. Entre os compostos sulfurosos mais utilizados tem-se o ácido sulfúrico (H_2SO_4), utilizado pela indústria alimentícia para correção do pH e como agente de digestão em processo Kraft da indústria de papel, o tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), empregado na indústria de fotos e em processos de branqueamento na indústria de papel, o sulfeto (HS^-), em curtumes e na indústria petroquímica, e o dióxido de enxofre (SO_2), utilizado no processo de branqueamento do açúcar ou como sequestrador de oxigênio na produção do amido (Lens *et al.*, 1998).

A vinhaça, resíduo da indústria sucroalcooleira com elevado conteúdo de matéria orgânica e potencial de produção de metano (Salomon & Lora, 2009; España-Gamboa *et al.*, 2011), também apresenta altas concentrações de sulfato (Prada *et al.*, 1998), assim como a presença de compostos de difícil remoção, tais como metais pesados e fenóis (Wilkie *et al.*, 2000; Parnaudeau *et al.*, 2008).

A presença de sulfato na vinhaça se deve principalmente à utilização de compostos oxidados de enxofre no processo de clarificação do caldo para a produção de açúcar (sulfitação), ou ainda pela dosagem de ácido sulfúrico no processo fermentativo da produção de etanol (Barrera *et al.*, 2013).

Quando se visa a aplicação de tratamento anaeróbio a estas águas residuárias ricas em matéria orgânica e sulfato devem ser adotadas estratégias para o controle das

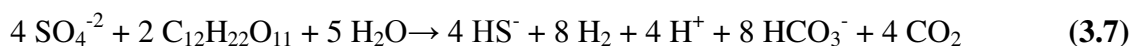
rotas de conversão de matéria orgânica que se estabelecerão no sistema. Estudos conduzidos por Damianovic e Foresti (2007; 2009) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo demonstraram a viabilidade e estabilidade obtidas por meio da integração do processo sulfetogênico à metanogênese para a remoção simultânea de matéria orgânica e sulfato, alcançando eficiências de remoção superiores a 90% para ambos os componentes. Assim, o uso de reatores que combinem tais processos, graças à possibilidade de sintrofismo entre os organismos metanogênicos e os redutores de sulfato, abre novas possibilidades para o tratamento desses efluentes.

Para o controle dos processos envolvidos, além da importância da relação DQO/Sulfato, já apontada por diversos autores (Smul *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002; Vossoughi *et al.*, 2003; Damianovic & Foresti, 2007; Dar *et al.*, 2008), deve-se levar em conta também o tipo da fonte de carbono (doador de elétrons) proporcionada pela água residuária.

Os doadores de elétrons que podem ser oxidados pelas redutoras de sulfato consistem, geralmente, em compostos orgânicos de baixo peso molecular, tais como ácidos orgânicos (lático, propiônico, butírico, pirúvico e acético) e álcoois (principalmente o etanol) (Hao, 2003; Liamleam & Annachhatre, 2007). A maioria destes compostos, como é de conhecimento geral, são produtos da fermentação anaeróbia de carboidratos, proteínas e lipídios.

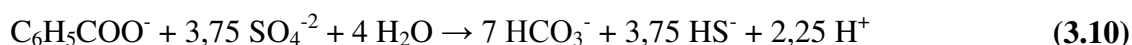
O melão, resultante da produção de açúcar, com suas altas concentrações de sacarose, também pode ser utilizado como fonte de carbono e doador de elétrons na redução de sulfato (Annachhatre & Suktrakoolvait, 2001). A própria sacarose, também presente em concentrações residuais na vinhaça, pode ser utilizada como fonte apropriada de carbono e energia pelas BRS, as quais degradam a sacarose produzindo o

hidrogênio, que depois é completamente oxidado pela via de redução do sulfato, conforme as Equações (3.7) e (3.8) (Greben *et al.*, 2000).



Alguns estudos reportam ainda que certas espécies redutoras de sulfato são capazes de degradar inclusive hidrocarbonetos e compostos aromáticos, tais como o fenol (Back & Widdel, 1986; Boopathy, 1995; Lin & Lee, 2001) e o benzoato (Li *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1997), principal intermediário na degradação do fenol, utilizando-os como fonte de carbono e energia para a sulfetogênese.

Back e Widdel (1986) estudaram a oxidação completa do fenol e propuseram a reação descrita pela Equação (3.9). Já segundo Boopathy (1995), algumas BRS oxidadoras incompletas podem realizar a degradação do fenol com produção de 2 moles de ácido acético para cada mol de fenol metabolizado. Na degradação do benzoato as BRS também podem atuar tanto como oxidadoras completas (Equação (3.10)) quanto incompletas (Equação (3.11)) (Li *et al.*, 1996).



Outras variáveis de importância comumente indicadas para sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes com conteúdo de sulfato são as condições ambientais e de operação do reator (Temperatura, pH, TDH), as estratégias de inoculação e de

manutenção da biomassa no meio (Omil *et al.*, 1996), a cinética de crescimento dos microrganismos envolvidos, condições termodinâmicas, propriedades de imobilização, afinidade pelos substratos, suas velocidades de conversão, inibição por produtos (principalmente de sulfeto), além da limitação de difusão de substrato no biofilme (Lens *et al.*, 1998).

Para o tratamento destas águas residuárias, diversas configurações de reatores têm sido propostas, principalmente as que favorecem elevados tempos de retenção de biomassa e com operação estável por longos períodos de tempo (Omil *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2002; Damianovic & Foresti, 2007 e 2009).

Visando proporcionar alta retenção de biomassa podem ser adotadas diferentes estratégias, tal como a imobilização do biofilme em material suporte. A aplicação de reatores de leito fixo, por sua vez, pode ser prejudicada pela colmatação do leito ao longo do tempo de operação do reator, em consequência da produção de polímeros extracelulares e do acúmulo de sólidos suspensos nos interstícios do material suporte, levando o processo à falência (Mockaitis, 2011).

O recurso ao leito fluidificado, que poderia ser considerada boa alternativa para o processo, implica todavia em custos associados mais elevados, principalmente com o gasto energético devido à recirculação necessária.

Assim, a proposta de utilização de um reator de leito ordenado (ou estruturado) baseia-se na associação entre a alta retenção de biomassa em material suporte com a manutenção de uma área livre na seção transversal do reator, a qual possibilita a autorregulação do biofilme pela própria velocidade superficial do escoamento, minimizando os problemas derivados da colmatação do leito (Mockaitis, 2011).

Essa configuração de reator já teve sua aplicação testada por Camiloti *et al.* (2013) no tratamento de uma água residuária sintética com conteúdo de sulfato e proporcionou a obtenção de uma adequada adesão microbiana ao material suporte (espuma de poliuretano) e estabilidade na remoção combinada de matéria orgânica e sulfato, as quais alcançaram eficiências de 82 % e 89 %, respectivamente.

3.5. Considerações finais

A busca por processos eficientes e estáveis de tratamento de águas residuárias ricas em matéria orgânica e sulfato requer maior aprofundamento do conhecimento sobre as interações entre os diversos grupos de organismos que intervêm na digestão anaeróbia da matéria orgânica e na redução de sulfato. De fato, a aplicação de procedimentos operacionais adequados possibilita a integração entre a metanogênese e a sulfetogênese, segundo rotas complexas de biodegradação (Lens *et al.*, 2002), que necessitam ser mais investigadas e compreendidas.

Reatores baseados na remoção de matéria orgânica por via anaeróbia conjugada à sulfetogênese apresentam geralmente uma perda com relação a uma das vantagens do tratamento metanogênico, que é a recuperação de energia dos poluentes pelo uso do metano (Lens *et al.*, 1998). Assim, é necessário avaliar o potencial apresentado por cada rota metabólica em função das características da água residuária empregada e das condições ambientais de operação, de maneira que seja possível eleger quais processos deverão ser priorizados para o alcance dos objetivos do tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação da influência da sulfetogênese sobre o desempenho e a estabilidade de um reator anaeróbio para produção de metano foi realizada utilizando-se dois sistemas em paralelo, com as mesmas características operacionais e água residuária sintética simulando a fração solúvel da vinhaça. Apenas um reator recebeu afluente enriquecido com sulfato.

4.1. Instalações experimentais

O estudo foi realizado em dois reatores de leito ordenado, cada um com volume total de 1,85 L e volume útil de 1,65 L (Porosidade do leito de 89 %), operados com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 ± 1 h, e mantidos em câmara com temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

O fluxo dos reatores foi contínuo e ascendente. Uma bomba peristáltica foi utilizada para alimentar ambos os reatores com uma vazão próxima de $1,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Na Figura 4.1 tem-se uma representação esquemática de um reator de leito ordenado.

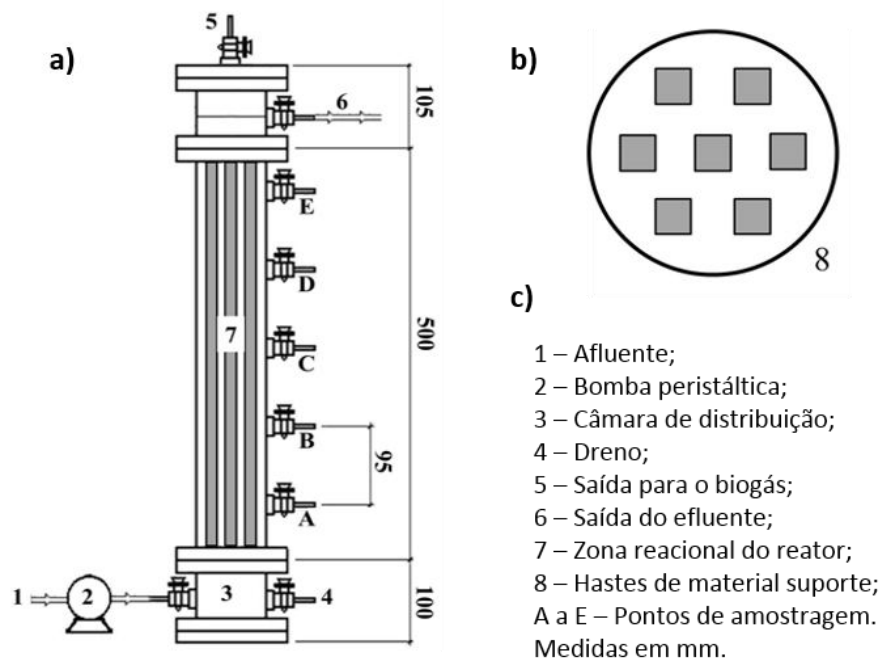


Figura 4.1. Esquema do reator de leito ordenado (a), corte transversal do leito (b) e módulos do sistema (c) (Adaptado de Mockaitis, 2011).

Na Tabela 4.1 estão listadas as principais dimensões estruturais do reator.

Tabela 4.1. Dimensões dos diversos módulos do reator.

Aspecto	Dimensão
Diâmetro interno	60 mm
Altura total	705 mm
Altura útil	500 mm
Headspace	45 mm

A Figura 4.2. apresenta uma imagem dos reatores de leito ordenado já montados com o material suporte ainda não inoculado.



Figura 4.2. Imagem dos reatores de leito fixo ordenado.

4.2. Inoculação do material suporte

A inoculação dos reatores foi realizada com biomassa proveniente de lodo de reator UASB tratando efluente de avícola e com alta atividade metanogênica, a qual foi imobilizada em 7 hastes prismáticas de espuma de poliuretano (PU) para cada reator, cada haste com comprimento de 50 cm, seguindo o protocolo descrito por Zaiat *et al.* (1994), o qual consiste em manter o material suporte imerso na solução do inóculo durante um período de duas horas e realizar após isso a lavagem do material com a água residuária a ser empregue no estudo.

Os reatores foram mantidos inicialmente em recirculação por 5 dias consecutivos.

A Figura 4.3 apresenta uma imagem do material suporte sendo mantido em contato com o inóculo.



Figura 4.3. Material suporte em processo de inoculação.

As hastes de material suporte foram fixadas verticalmente e dispostas de forma equidistante ao longo do volume reacional do reator.

A espuma de poliuretano (PU) foi escolhida por se constituir de material de baixo custo, inerte ao processo, por proporcionar altas concentrações de biomassa e favorecer a aderência de microrganismos metanogênicos e sulfetogênicos (Silva *et al.*, 2006).

4.3. Água residuária

Diante da variabilidade de composição da vinhaça, propôs-se a utilização de uma água residuária sintética, com algumas características similares às apresentadas

pela fração solúvel da vinhaça de cana de açúcar. A composição do meio sintético foi formulada com base nas caracterizações da vinhaça realizadas por Rocha (2012) e está apresentada na Tabela 4.2.

A fração orgânica assumida corresponde exclusivamente à DQO solúvel próxima de 12000 mg.L^{-1} , não estando computados sólidos e outros compostos orgânicos insolúveis. O fenol adicionado foi o ácido fênico, escolhido para representar genericamente os diversos compostos fenólicos existentes na vinhaça e que são originados da degradação de resíduos lignocelulósicos nela presentes (Khardenavis *et al.*, 2008).

Os diversos íons metálicos, bem como o nitrogênio amoniacal, foram adicionados sob a forma de cloretos. O potássio foi dosado na forma de hidrogenofosfato (KH_2PO_4). O cloreto férrico foi adicionado em solução com o ácido nitriloacético (NTA) para evitar a formação de complexos e a sua precipitação no reservatório do afluente.

Tabela 4.2. Características da água residuária sintética (Adaptado de Rocha, 2012).

Parâmetros	Concentrações
<i>Matéria orgânica</i>	
Sacarose (mg.L⁻¹)	7000
Etanol (mg.L⁻¹)	1000
Fenol (mg.L⁻¹)	1000
DQO_{Solúvel} (mg.L⁻¹ O₂)	12300
<i>Nitrogênio, Fósforo e Enxofre</i>	
N-amoniaco (mg N-NH₃.L⁻¹)	800
Fósforo (mg P-PO₄³⁺.L⁻¹)	230
Sulfato (mg S-SO₄.L⁻¹)	Variável
<i>Metais</i>	
Potássio (mg K.L⁻¹)	4900
Cálcio (mg Ca.L⁻¹)	1300
Sódio (mg Na.L⁻¹)	900
Magnésio (mg Mg.L⁻¹)	315
Ferro total (mg Fe.L⁻¹)	15
Manganês (mg Mn.L⁻¹)	4,0
Cobre (mg Cu.L⁻¹)	0,5
Zinco (mg Zn.L⁻¹)	0,5
Chumbo (mg Pb.L⁻¹)	0,4
Níquel (mg Ni.L⁻¹)	0,2
Cádmio (mg Cd.L⁻¹)	0,1
Lítio (mg Li.L⁻¹)	0,002

O meio sintético foi enriquecido com vitaminas (Touzel & Albagnac, 1983) e micronutrientes (Boro, Cobalto, Molibdênio e Selênio) (Torres, 1992) que, embora não tivessem sido quantificados nas caracterizações da vinhaça, são importantes para a manutenção dos processos anaeróbios.

Durante as primeiras etapas, para garantir a capacidade de tamponamento do sistema, a água residuária foi complementada com bicarbonato de sódio na proporção de 1,4 mg NaHCO₃.L⁻¹ para cada 1,0 mg DQO.L⁻¹. Posteriormente ao estabelecimento

dos processos metanogênicos e sulfetogênicos equilibrados essa adição de alcalinidade foi reduzida.

Um dos reatores foi operado com concentração de sulfato mínima para prover o enxofre requerido pelos microrganismos obedecendo a uma proporção C/S (carbono/enxofre) da ordem de 500 e o outro recebeu sulfato suficiente para operar com relações DQO/Sulfato de 3, a qual foi posteriormente elevada para 4 e 5 e em seguida retornada novamente para 3 (gDQO/gSO_4^{2-}). O sulfato foi adicionado na forma de sulfato de sódio (Na_2SO_4).

A razão DQO/Sulfato de 3 foi adotada inicialmente para proporcionar uma pressão de seleção favorável às BRS, de forma a se facilitar o estabelecimento da sulfetogênese a partir de um lodo predominantemente metanogênico.

A frequência de preparo da água residuária foi de 3 vezes por semana, sendo mantida sob refrigeração ($4\text{ }^\circ\text{C}$) para a manutenção das suas características originais.

4.4. Determinações analíticas

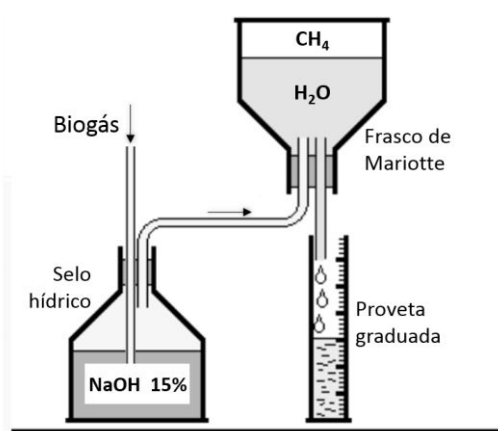
Foram realizadas diversas determinações analíticas para o acompanhamento dos processos da digestão anaeróbia conforme as metodologias apresentadas na Tabela 4.3. As amostras para monitoramento do afluente e efluente do reator foram coletadas 2 vezes por semana.

Tabela 4.3. Metodologias para determinações analíticas.

	Análises	Metodologias	Referências
	DQO	Método Colorimétrico	APHA (2005)
	pH	Método Potenciométrico	APHA (2005)
	Alcalinidade	Método Titulométrico	Ripley <i>et al.</i> (1986)
<i>Fase Líquida</i>	Sulfato	Cromatografia Iônica	APHA (2005)
	Sulfeto	Método do Azul de Metileno	APHA (2005)
	Ácidos Orgânicos Voláteis	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama	Moraes <i>et al.</i> (2000)
	Sólidos	Método Gravimétrico	APHA (2005)
<i>Fase Gasosa</i>	CH₄ e CO₂	Cromatografia Gasosa com detector de condutividade térmica	APHA (2005)

Para a análise de demanda química de oxigênio (DQO) as amostras efluentes do reator sulfetogênico recebiam concentração em excesso de sulfato de zinco ($ZnSO_4$), eram agitadas e centrifugadas, como forma de se remover previamente o sulfeto dissolvido, o qual precipita nessas condições sob a forma de sulfeto de zinco (ZnS).

O volume de metano produzido foi aferido pelo método de deslocamento de líquido utilizando-se um frasco de Mariotte, como ilustrado na Figura 4.4.

**Figura 4.4.** Aparato para medição do biogás (Adaptado de Aquino *et al.*, 2007).

Previamente à passagem pelo frasco de Mariotte, o biogás atravessava o selo hídrico no qual era borbulhado em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH, 15%) para a retenção do gás carbônico (CO₂) e do sulfeto de hidrogênio gasoso (H₂S), possibilitando a aferição direta do volume de metano produzido (Aquino *et al.*, 2007).

4.5. Fases operacionais

O experimento foi dividido em sete fases operacionais com tempo total de operação dos reatores de 213 dias. A Tabela 4.4 apresenta as condições teóricas impostas em cada fase de operação dos reatores e os tempos de duração de cada uma.

Tabela 4.4. Condições operacionais dos reatores.

Parâmetros	Reatores	Fases Operacionais						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
DQO (mg.L ⁻¹)	<i>Metanogênico e Sulfetogênico</i>	800	1000	2000	4000	4000	4000	4000
HCO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)		0*	1000	2000	4000	4000	4000	2000
SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹)	<i>Sulfetogênico</i>	270	330	660	1000	800	1330	1330
DQO/SO ₄ ²⁻		3	3	3	4	5	3	3
Tempo de Operação (dias)		16	28	41	22	40	42	24

*Nesta fase utilizou-se NaOH para o controle do pH do meio.

A carga orgânica foi aplicada de forma progressiva de modo a permitir a partida equilibrada do sistema e a aclimatação da biomassa às crescentes concentrações de sulfeto produzido no sistema sulfetogênico. A operação dos reatores iniciou-se com

concentração de DQO afluente da ordem de 800 mg.L^{-1} (correspondente à diluição na proporção de 1:15 do meio sintético original com DQO de 12000 mg.L^{-1}) e foi aumentada na sequência para cerca de 1000 mg.L^{-1} (correspondente à diluição de 1:12), 2000 mg.L^{-1} (correspondente à diluição de 1:6) e finalmente 4000 mg.L^{-1} (diluição de 1:3), concentração esta que foi mantida até o final do experimento.

A concentração de fenol dosada ao longo das 7 fases operacionais foi mantida em 100 mg.L^{-1} para evitar a inibição dos microrganismos anaeróbios, o que poderia ocorrer a partir de concentrações mais altas desse composto.

Durante a fase de partida dos reatores (Fase I) foi utilizado hidróxido de sódio (NaOH) para o controle do pH do meio. Todavia, como não houve produção adequada de alcalinidade e os reatores apresentaram queda tanto nos valores de pH quanto na eficiência de remoção de matéria orgânica, optou-se por dosar NaHCO_3 para se prover uma fonte externa de alcalinidade.

Da fase II à fase VI o bicarbonato de sódio foi dosado segundo a proporção de $1,0 \text{ mg HCO}_3^-.L^{-1}$ para cada $1,0 \text{ mg DQO.L}^{-1}$. Na última fase essa dosagem foi diminuída para a metade.

No reator sulfetogênico o sulfato foi adicionado na forma de sulfato de sódio (Na_2SO_4) obedecendo às relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ teórica inicial de 3 (Fases I, II, III), para promover uma pressão de seleção favorável ao estabelecimento do processo sulfetogênico. Nas fases seguintes a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ foi elevada para 4 (Fase IV) e 5 (Fase V), com o objetivo de se observar o comportamento do sistema sulfetogênico em condições limitantes de sulfato, e em seguida essa relação retornou a 3 (Fase VI e VII).

4.6. Testes de atividade metanogênica

Ao final do período operacional foram realizados ensaios em batelada para a determinação da atividade metanogênica da biomassa adaptada ao longo do tempo nos dois reatores estudados.

Para efetuar a comparação do potencial de produção de metano dos microrganismos e elucidar as rotas de degradação da matéria orgânica sob condições metanogênica e sulfetogênica foram preparados 6 frascos de reação de 600 mL cada, sendo 300 mL de volume reacional e 300 mL servindo de headspace. Os frascos permaneceram em câmara com temperatura controlada (30 °C) e agitação contínua.

Cada batelada foi submetida a diferentes condições operacionais, as quais estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Condições experimentais dos reatores em batelada.

Frascos	Origem do Inóculo	Matéria Orgânica	Sulfato*
1	<i>Reator Metanogênico</i>		<i>n.a.</i>
2	<i>Reator Sulfetogênico</i>	Acetato	<i>n.a.</i>
3			DQO/SO ₄ ²⁻ ≈ 3
4	<i>Reator Metanogênico</i>		<i>n.a.</i>
5	<i>Reator Sulfetogênico</i>	Formiato	<i>n.a.</i>
6			DQO/SO ₄ ²⁻ ≈ 3
7	<i>Reator Metanogênico</i>		<i>n.a.</i>
8	<i>Reator Sulfetogênico</i>	Meio Sintético	<i>n.a.</i>
9			DQO/SO ₄ ²⁻ ≈ 3

* *n.a.* – Não adicionado.

Cada condição foi testada em um único ensaio, não tendo sido possível a realização de ensaios em duplicata ou triplicata.

Os reatores em batelada foram inoculados com material suporte 7 cm³ de material suporte, o qual foi picotado em diversas fatias de espuma contendo biomassa proveniente do reator metanogênico (Fracos 1, 4 e 7) ou sulfetogênico (Fracos 2, 3, 5, 6, 8 e 9). Todos os frascos receberam dosagem de macro e micronutrientes, bem como de bicarbonato de sódio, em proporções semelhantes às da água residuária sintética.

Os 3 frascos inoculados com biomassa do reator metanogênico não receberam dosagem extra de sulfato para que se avaliasse exclusivamente a atividade metanogênica a partir do acetato (metanogênese acetoclástica), do formiato (metanogênese hidrogenotrófica) ou do meio sintético utilizado na alimentação dos reatores (contendo sacarose, etanol e fenol nas mesmas proporções que da água residuária sintética).

Já os 6 frascos inoculados com biomassa do reator sulfetogênico foram separados em dois grupos. Os 3 primeiros (Fracos 2, 5 e 8) não receberam dosagem extra de sulfato, de modo a permitir a avaliação da atividade metanogênica do lodo desse reator pelas vias acetoclástica e hidrogenotrófica. E os outros 3 (Fracos 3, 6 e 9) receberam dosagem de sulfato visando impor condições sulfetogênicas para se avaliar, além da atividade metanogênica do lodo, também a participação das BRS na degradação da matéria orgânica (acetato, formiato ou meio sintético), em competição ou sintrofismo com os microrganismos metanogênicos.

De tempos em tempos foram extraídas amostras do headspace para a determinação da composição do biogás por cromatografia gasosa, com aferição simultânea da pressão no interior dos frascos.

Partindo da Lei de Henry e seguindo o protocolo de cálculo proposto por Aquino *et al.* (2007) foi possível estimar a quantia de metano dissolvida na fase líquida, a qual

foi acrescentada à quantia de metano no headspace medida por cromatografia gasosa, obtendo-se assim a massa total de metano acumulado ao longo do tempo em cada frasco de reação.

A quantidade de metano acumulado foi então ajustada à *sigmóide de Boltzman* (Equação (4.1)) com o auxílio do software *Microcal Origin*[®] 8.0. As sigmóides obtidas foram então derivadas numericamente, com a ajuda do mesmo software, a fim de se determinar as velocidades máximas de produção de metano em cada reator.

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(X-X_0)/dx}} + A_2 \quad (4.1)$$

O valor máximo obtido na derivação numérica de cada curva de metano acumulado foi dividido pela concentração de biomassa do frasco reacional, obtendo-se assim o valor de atividade metanogênica específica (AME).

4.7. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos referentes às eficiências de remoção de matéria orgânica e sulfato, produção de sulfeto, alcalinidade parcial e rendimento de metano nos dois reatores foram avaliados utilizando-se as estatísticas descritivas de média, máximo, mínimo, desvio padrão e coeficiente de variação.

As eficiências de remoção de matéria orgânica e sulfato também foram analisadas por meio de diagramas tipo *boxplot*.

Os cálculos da estatística descritiva e os gráficos de caixa e bigodes dos *boxplots*

foram gerados com o auxílio do software *Microsoft® Office Excel 2013*.

Para proceder a análise comparativa do rendimento de metano dos dois reatores, em função de falhas ocorridas no aparato de medição do biogás em alguns dias da operação, recorreu-se à técnica de reamostragem *bootstrapping*. Essa técnica estatística permite ampliar o número de amostras de uma determinada população através da formação de pares aleatórios dos dados empiricamente obtidos (amostra mestre). Cada par, escolhido aleatoriamente com reposição, é utilizado para o cálculo de um valor médio, gerando-se assim uma nova amostra representativa da população original. O *bootstrapping* foi aplicado visando obter no mínimo 10 amostras em cada fase operacional de ambos os reatores.

Em seguida à reamostragem foi aplicado o teste estatístico de normalidade de *Lilliefors* (para k amostras, com $\alpha = 0,01$), o qual foi escolhido por se destinar à análise de pequenas amostras com quantidades variáveis de dados em cada amostra.

Por fim realizou-se a análise de variância (ANOVA) de um critério com teste de *Tukey (t de Student)*, comparando-se a similaridade estatística entre as fases operacionais correspondentes dos dois reatores.

As análises de normalidade e variância foram realizadas com o auxílio do software *BioEstat® 5.3*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Remoção de matéria orgânica e sulfato

O gráfico apresentado na Figura 5.1 mostra a eficiência de remoção de matéria orgânica obtida nos dois sistemas ao longo do tempo de operação.

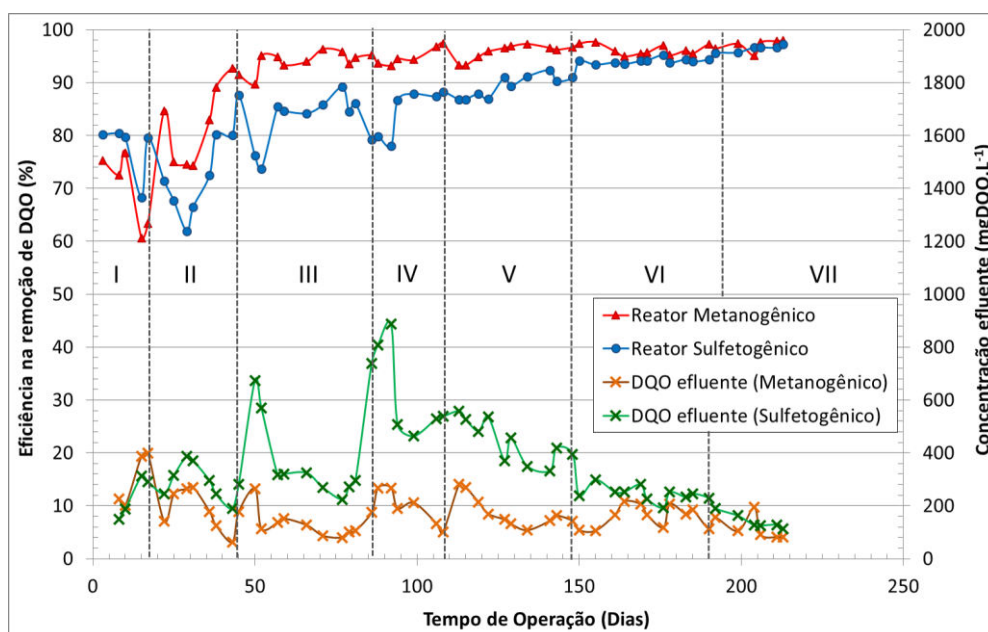


Figura 5.1. Eficiências de remoção de matéria orgânica e concentrações de matéria orgânica remanescente ao longo do tempo.

Apenas durante a fase de partida (Fase I) o sistema sulfetogênico alcançou valores de eficiência de remoção da matéria orgânica maiores que o sistema metanogênico. Neste período ambos os reatores receberam, ao invés do bicarbonato de sódio, uma concentração de 300 mg.L^{-1} de hidróxido de sódio para o controle do pH.

Após a troca do NaOH pelo bicarbonato como agente tamponador o sistema

metanogênico, operado com concentração de sulfato mínima, apresentou maiores valores de eficiência de remoção de matéria orgânica.

Esse resultado pode ser devido à geração de alcalinidade no reator sulfetogênico (Figura 5.12), a qual possibilitaria o melhor desempenho dos microrganismos metanogênicos presentes no sistema, enquanto que no reator metanogênico a ausência de alcalinidade se mostrou limitante para o processo.

A partida do reator sulfetogênico durante essa mesma etapa (Fase I) foi realizada com relação DQO/SO_4^{2-} próxima de 3, tendo o mesmo apresentado já nessa fase uma eficiência de remoção de sulfato maior que 80%, conforme apresentado pela Figura 5.2.

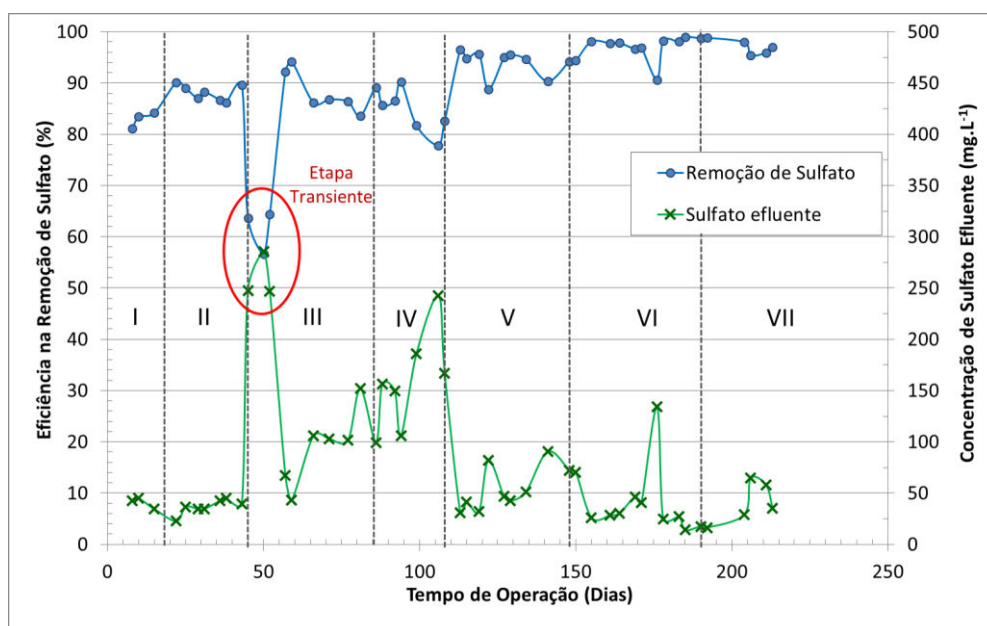


Figura 5.2. Eficiências de remoção de sulfato e concentrações remanescentes de sulfato no efluente do reator sulfetogênico.

Durante a segunda fase de operação (Fase II), mantida uma concentração de DQO afluente próxima de 1000 mg.L^{-1} nos dois reatores, foi observada uma aparente instabilidade na eficiência de remoção da matéria orgânica, com a diminuição dessa

eficiência nos dois sistemas ao longo dos primeiros dias dessa etapa e a sua recuperação em seguida. Todavia, como os valores de carga orgânica removida apresentados na Figura 5.3 mostram uma tendência estável na remoção da DQO ao longo da Fase II, esse comportamento pode ser devido a erros na dosagem da matéria orgânica (sacarose, etanol e fenol) no meio sintético.

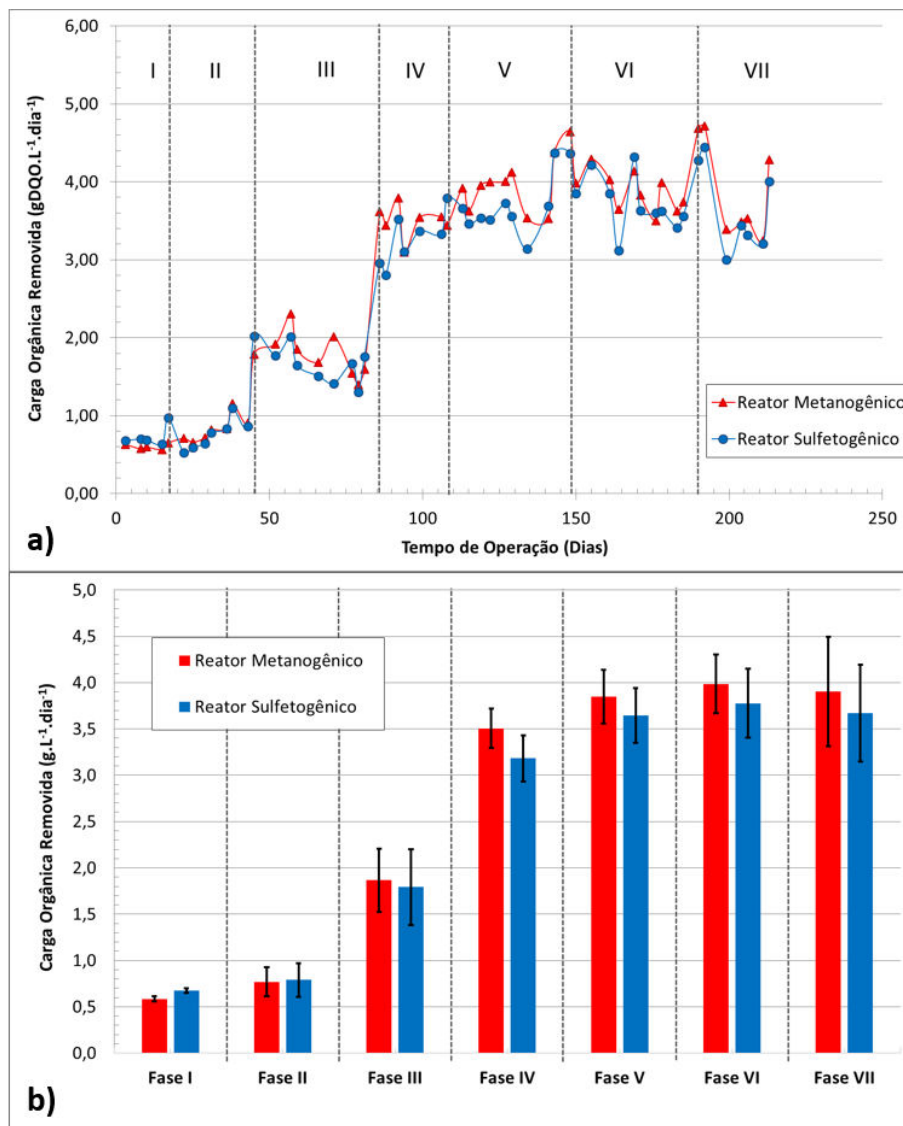


Figura 5.3. Carga orgânica removida ao longo do tempo (a) e valores médios de carga orgânica removida em cada fase operacional (b).

Com o consequente aumento na concentração do sulfato afluente na Fase II (de 270 para 330 mg.L⁻¹) para manter a relação DQO/SO₄²⁻ do reator sulfetogênico próxima de 3, houve aumento no desempenho do sistema com relação à remoção de sulfato, a qual chegou a próximo de 90% conforme mostrado pela Tabela 5.1, indicando o adequado estabelecimento do processo sulfetogênico.

Tabela 5.1. Estatística descritiva da eficiência de remoção de sulfato em cada fase operacional no sistema sulfetogênico.

Reator Sulfetogênico						
Fase de Operação	Relação DQO/SO ₄ ²⁻	Sulfato afluente (mgSO ₄ ²⁻ .L ⁻¹)	Eficiência na Remoção de Sulfato (%)			
			Média	Mínima	Máxima	CV*
I	3,4 ± 0,1	238 ± 23	82,9 ± 1,3	81	84	2
II	3,4 ± 0,5	307 ± 45	88,1 ± 1,4	86	90	2
III	2,9 ± 0,6	763 ± 81	79,3 ± 13,1	57	94	16
IV	3,7 ± 0,1	1054 ± 67	85,2 ± 4,3	78	90	5
V	4,8 ± 0,4	875 ± 89	92,6 ± 4,3	83	96	5
VI	3,1 ± 0,2	1350 ± 64	96,5 ± 2,4	91	99	2
VII	2,9 ± 0,3	1376 ± 87	97,3 ± 1,3	95	99	1

*Coeficiente de variação (%).

Na Fase III procedeu-se um aumento da concentração de matéria orgânica afluente para cerca de 2000 mg.L⁻¹ nos dois reatores, e também efetuou-se o aumento da concentração de sulfato adicionado ao reator sulfetogênico para cerca de 700 mg.L⁻¹ (o que corresponde a mais que o dobro de ambas as concentrações com relação à Fase II), de forma a se manter a relação DQO/SO₄²⁻ próxima de 3. Nesta fase houve aumento nas eficiências de remoção de DQO em ambos os reatores, sendo que o sistema metanogênico apresentou eficiências maiores que o sistema sulfetogênico (Figura 5.1).

No sistema sulfetogênico configurou-se um período transiente por cerca de 7 dias no início dessa mesma etapa (Fase III), durante os quais houve queda na eficiência

de remoção de sulfato ($61,6 \pm 3,5 \%$), como destacado na Figura 5.2, acoplada à queda na eficiência de remoção de matéria orgânica (Figura 5.1). Todavia, tanto a carga orgânica removida (Figura 5.3) quanto a carga de sulfato removido (Figura 5.4) durante esse período de transição aumentaram com relação à fase anterior, o que indica que o sistema passou por uma etapa de adaptação às novas condições impostas, alcançando maiores eficiências em seguida.

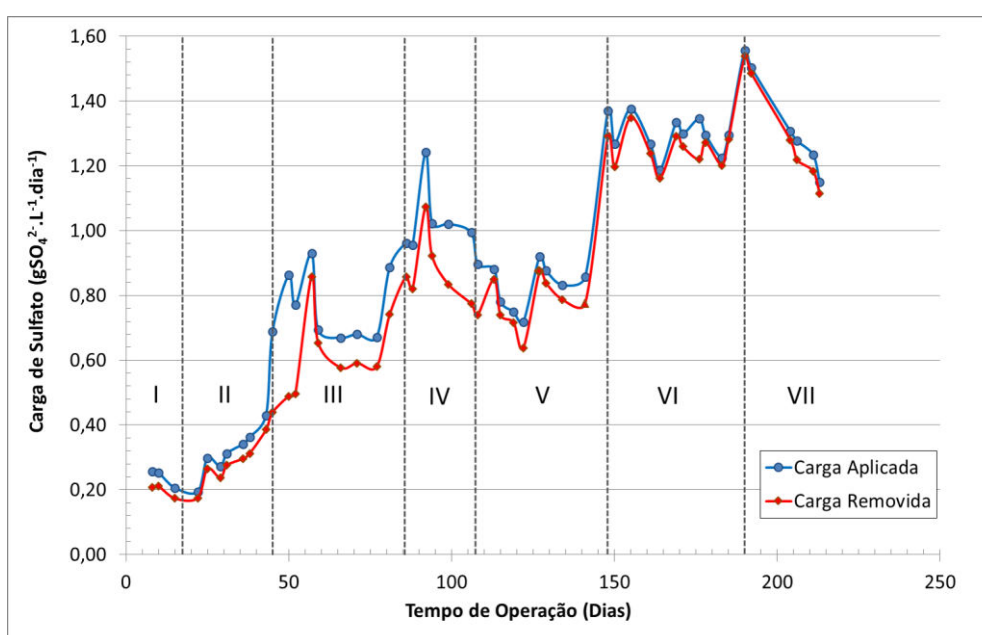


Figura 5.4. Cargas de sulfato aplicadas e removidas no reator sulfetogênico.

Durante a Fase IV impôs-se um novo aumento da carga orgânica aplicada e os dois reatores passaram a receber uma concentração de matéria orgânica afluyente próxima de 3900 mg.L^{-1} . O reator metanogênico apresentou estabilidade na eficiência de remoção de DQO a partir dessa fase e manteve-se estável ao longo das outras fases operacionais (V, VI e VII), nas quais foi ajustada a concentração de matéria orgânica afluyente, que passou a ser da ordem de 4000 mg.L^{-1} nos dois sistemas.

Já o reator sulfetogênico, que passou a receber uma concentração de sulfato

afluente da ordem de 1000 mg.L^{-1} , operando sob relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ próxima de 4, apresentou aumento na eficiência de remoção de sulfato durante a Fase IV (Tabela 5.1). Todavia, o aumento da relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ ocasionou uma limitação na quantidade de sulfato fornecido para as BRS, as quais não puderam manter a oxidação da matéria orgânica na mesma proporção que na etapa anterior, em função da menor disponibilidade do seu acceptor de elétrons (SO_4^{2-}), de maneira que as eficiências de remoção de DQO decaíram ao longo do período inicial dessa fase (Figura 5.1). Em seguida, uma vez que os microrganismos metanogênicos puderam aumentar a sua participação na remoção da matéria orgânica, como apontado pelo cálculo do fluxo de elétrons na Tabela 5.4, o sistema sulfetogênico recuperou sua eficiência.

Na Fase V, com o aumento da relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ para 5 e o ajuste da concentração de matéria orgânica afluente para próxima de 4000 mg.L^{-1} , as eficiências de remoção de sulfato no sistema sulfetogênico cresceram (Tabela 5.1), o que pode ser explicado pela diminuição na concentração do sulfato afluente, que passou de cerca de 1000 mg.L^{-1} para próxima de 900 mg.L^{-1} , com a conseqüente competição entre as BRS pelo acceptor de elétrons disponível.

Nas fases subseqüentes (Fases VI e VII) o sistema sulfetogênico passou a operar novamente sob relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ próximas de 3, apresentando valores crescentes de eficiência de remoção da matéria orgânica, conforme apresentado na Tabela 5.2, chegando a alcançar valores próximos aos obtidos no reator metanogênico, conforme mostrado nos gráficos de eficiência de remoção (Figura 5.1) e de carga orgânica removida (Figura 5.3).

Também aumentaram as eficiências de remoção de sulfato durante a duas últimas fases operacionais (VI e VII), chegando ambas próximas dos 97%, indicando o

aumento da participação das BRS na degradação da matéria orgânica (como visto na Tabela 5.4).

De fato, a relação DQO/SO_4^{2-} que possibilitou as maiores eficiências de remoção combinada de matéria orgânica e sulfato no sistema sulfetogênico foi da ordem de 3. Esse resultado foi proporcionado tanto pelo aumento na concentração do sulfato afluente, como também pela adaptação da biomassa presente no reator, mostrando o potencial dos microrganismos em absorverem a sobrecarga de sulfato, mantendo os processos de redução de sulfato equilibrados.

Vale ressaltar que as maiores eficiências de remoção de matéria orgânica nos dois sistemas foram alcançadas na última fase operacional (Tabela 5.2), muito embora tenha sido diminuída a dosagem de bicarbonato de sódio nessa mesma fase. Pode-se considerar, portanto, que ambos os sistemas se encontravam equilibrados e bem tamponados, de modo que a diminuição da alcalinidade foi realizada sem que ocorressem perturbações da digestão anaeróbia.

A Tabela 5.2 apresenta a estatística descritiva referente aos valores de eficiência de remoção de DQO nos dois reatores para efeito comparativo.

Tabela 5.2. Estatística descritiva da eficiência de remoção de matéria orgânica nos dois reatores estudados.

Reator Metanogênico					
Fase de Operação	DQO afluente (mg.L⁻¹)	Eficiência na Remoção de DQO (%)			
		Média	Mínima	Máxima	CV*
I	845 ± 97	73,9 ± 6,4	60,6	76,8	9
II	1040 ± 86	79,0 ± 8,9	63,4	92,7	11
III	2191 ± 316	93,9 ± 1,9	89,7	96,4	2
IV	3870 ± 278	94,6 ± 1,2	93,2	96,8	1
V	4159 ± 124	95,8 ± 1,4	93,3	97,4	2
VI	4285 ± 226	95,9 ± 0,9	95,0	97,7	1
VII	4021 ± 195	97,1 ± 1,0	95,0	98,0	1
Reator Sulfetogênico					
Fase de Operação	DQO afluente (mg.L⁻¹)	Eficiência na Remoção de DQO (%)			
		Média	Mínima	Máxima	CV*
I	857 ± 89	77,2 ± 5,1	68,3	80,5	7
II	1081 ± 166	72,5 ± 6,5	61,9	80,2	9
III	2147 ± 269	83,8 ± 4,7	73,7	89,2	6
IV	3908 ± 205	83,2 ± 4,2	78,0	87,9	5
V	4202 ± 190	89,1 ± 1,9	86,8	92,4	2
VI	4179 ± 257	93,8 ± 1,0	91,0	95,2	1
VII	3976 ± 198	96,1 ± 0,9	94,4	97,3	1

*Coeficiente de variação (%).

Para os valores de cargas aplicadas, a atividade dos microrganismos metanogênicos se mostrou eficiente, promovendo o balanceamento adequado das fases acidogênica e metanogênica. Todavia, para cargas orgânicas maiores a pressão parcial de hidrogênio pode se tornar um fator limitante, já que o desenvolvimento da metanogênese não acompanha necessariamente a acidogênese. O comportamento do reator sulfetogênico, após um período de adaptação e crescimento da biomassa, indica o maior potencial desse sistema em alcançar eficiências de remoção de matéria orgânica, suportando sobrecargas e com melhor tamponamento do meio.

Para a análise da estabilidade do desempenho dos dois reatores quanto à

eficiência de remoção da matéria orgânica e, no caso do sistema sulfetogênico, para avaliar a estabilidade na remoção do sulfato, procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos por meio dos diagramas de *boxplot* mostrados nas Figura 5.5 e Figura 5.6.

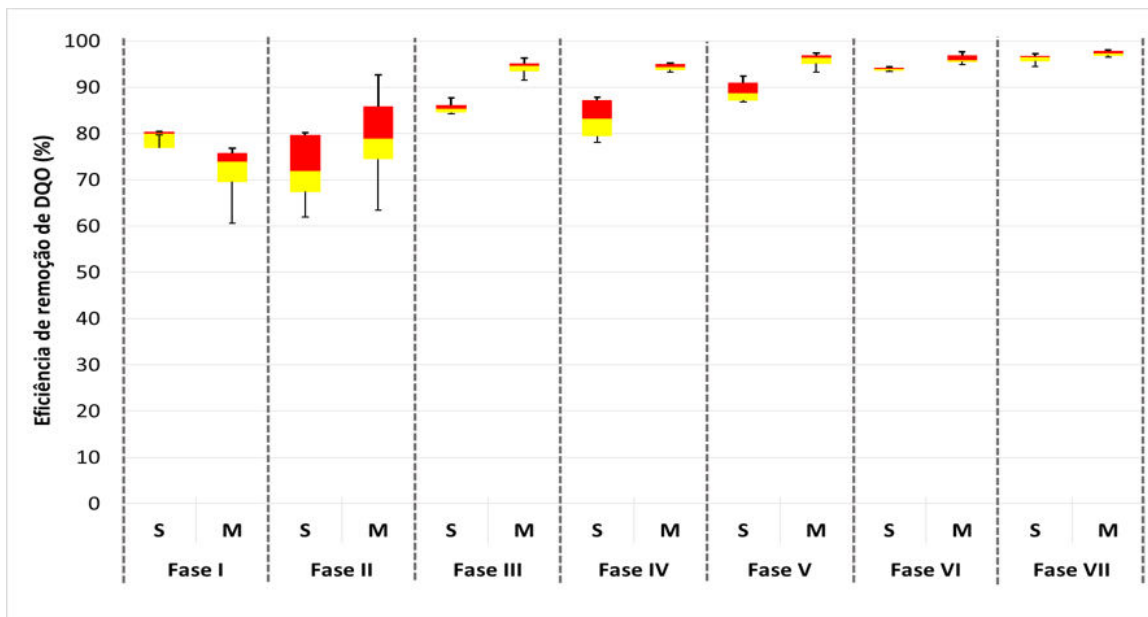


Figura 5.5. *Boxplot* da eficiência de remoção de matéria orgânica.
S: reator sulfetogênico; M: reator metanogênico.

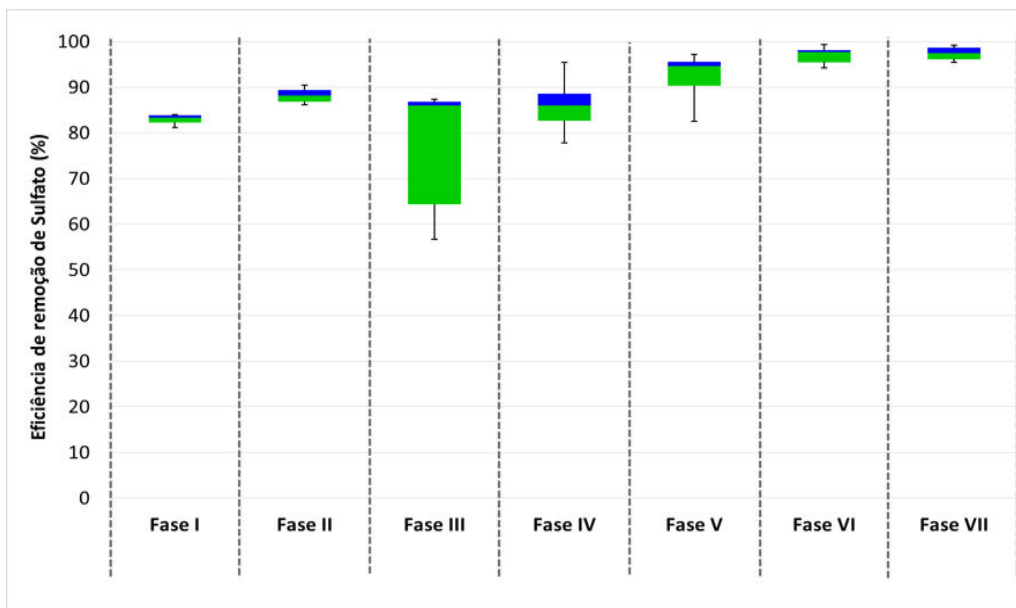


Figura 5.6. *Boxplot* dos dados de eficiência de remoção de sulfato.

Os dados da construção dos diagramas *boxplot* estão mostrados no Anexo A.

A estatística aplicada não identificou pontos *outliers*, estando todos os dados obtidos incorporados nos intervalos dos limites estatísticos de mínimo e máximo, tanto das eficiências de remoção de matéria orgânica como da remoção de sulfato.

As maiores variabilidades nos dados de eficiência de remoção de matéria orgânica nos dois reatores se deram durante as duas primeiras fases operacionais, apontando para a aclimatação do inóculo à nova água residuária a que foi submetido.

Nota-se um comportamento de maior estabilidade na remoção de matéria orgânica no reator metanogênico desde a Fase III, e a manutenção dessa estabilidade nesse sistema ao longo das etapas subsequentes (menores coeficientes de variação, conforme mostrado na Tabela 5.1).

Já o reator sulfetogênico, que havia alcançado estabilidade na eficiência de remoção de DQO nessa mesma etapa (Fase III), se mostrou sensível à diminuição na concentração do sulfato afluyente nas Fases IV e V (aumento da relação DQO/SO_4^{2-} para próxima de 4 e 5, respectivamente), indicando a participação das BRS na remoção da matéria orgânica nesse sistema.

A maior variabilidade na eficiência de remoção de sulfato no sistema sulfetogênico foi observada durante a Fase III, em função do aumento na carga de sulfato aplicada, o que implicou em um período inicial de transição com menores valores de eficiência nos primeiros dias dessa fase. As Fases IV e V também apresentaram instabilidade na eficiência de remoção de sulfato (maiores coeficientes de variação, conforme mostrado na Tabela 5.1), acoplada à instabilidade na remoção de matéria orgânica, embora o sistema também tenha alcançado valores crescentes de

remoção de sulfato nessas fases.

Com o retorno da relação DQO/SO_4^{2-} para o valor de 3, o sistema sulfetogênico recuperou a estabilidade e eficiência na remoção de DQO, aproximando-se do reator metanogênico nas duas últimas fases operacionais (VI e VII), e alcançou também uma maior estabilidade na remoção do sulfato, apresentando menor variação nas eficiências obtidas, confirmando assim a adaptação dos microrganismos metanogênicos às condições sulfetogênicas impostas e a importância da rota de redução de sulfato para a remoção da matéria orgânica aplicada.

5.2. Vias de remoção da matéria orgânica

Partindo das equações apresentadas anteriormente na Tabela 3.1 foram propostos os cálculos simplificados para a determinação das porcentagens de matéria orgânica oxidada pelas vias metanogênica e de redução do sulfato no reator sulfetogênico conforme mostrado na Tabela 5.3. Para efeito dos cálculos foram desprezadas as porcentagens de matéria orgânica degradadas via crescimento celular.

Tabela 5.3. Cálculo simplificado das vias de remoção da matéria orgânica em condições sulfetogênicas.

Substrato Removido	Equações
DQO total removida (%)	$DQO_{removida} (\%) = \left(1 - \frac{DQO_{afl}}{DQO_{efl}} \right) \times 100$
DQO removida via sulfetogênese (%)	$DQO_{SO_4} (\%) = 0,67 \times \frac{(SO_4_{afl} - SO_4_{efl})}{DQO_{removida}} \times 100$
DQO removida via metanogênese (%)	$DQO_{CH_4} (\%) = DQO_{removida} - DQO_{SO_4}$

Os valores calculados permitem avaliar o fluxo de elétrons e a predominância de um ou outro processo (metanogênico ou sulfetogênico) na degradação da matéria orgânica no sistema sulfetogênico/metanogênico combinado.

A Tabela 5.4 apresenta o cálculo do fluxo de elétrons médio estimado em cada fase do sistema sulfetogênico.

Tabela 5.4. Fluxo estimado de elétrons pelas vias metanogênica e sulfetogênica conforme equações propostas na Tabela 5.3.

Reator Sulfetogênico			
Fase Operacional	Relação DQO/SO₄²⁻	DQO removida via metanogênese (%)	DQO removida via redução do sulfato (%)
I	3,4 ± 0,1	80	20
II	3,4 ± 0,5	75	25
III	2,9 ± 0,6	76	24
IV	3,7 ± 0,1	81	19
V	4,8 ± 0,4	85	15
VI	3,1 ± 0,2	78	22
VII	2,9 ± 0,3	77	23

Durante a fase de partida do reator sulfetogênico (Fase I), as BRS foram responsáveis por 20% da matéria orgânica removida, enquanto o restante da remoção era obtida pela via da metanogênese.

Nas fases posteriores, a via de redução de sulfato passou a ser responsável em média por 25% (Fases II) e 24% (Fases III) de toda a matéria orgânica que era removida pelo sistema.

Com a mudança da relação DQO/SO₄²⁻ para próxima de 4 (Fase IV), o fluxo de elétrons pela via de redução do sulfato diminuiu, aumentando assim a fração de matéria orgânica degradada pela metanogênese. Este resultado se acentuou na Fase V, com o novo aumento da relação DQO/SO₄²⁻ para próxima de 5, como mostrado na Figura 5.7.

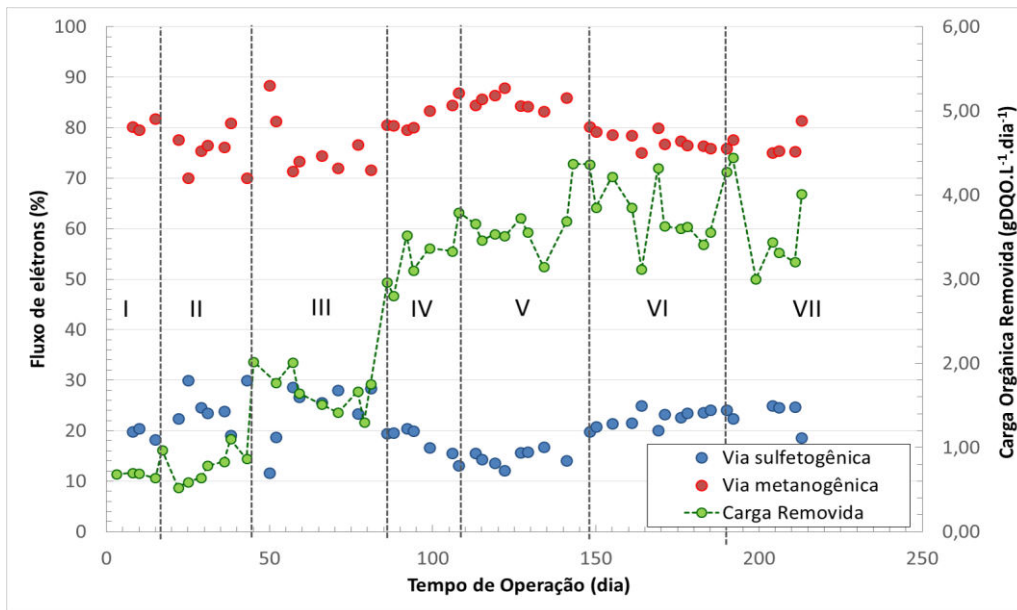


Figura 5.7. Porcentagem de carga orgânica removida pelas vias metanogênica e de redução do sulfato no sistema sulfetogênico.

Com o retorno da relação DQO/SO_4^{2-} ao valor original de 3, a sulfetogênese recuperou o fluxo de elétrons anterior, que voltou a ser maior que 20% pela via de redução do sulfato (Tabela 5.4).

Estes dados indicam a predominância do processo metanogênico no sistema sulfetogênico sob relação DQO/SO_4^{2-} próxima de 3, o que possibilitou a geração de metano como será apresentada no item 5.8.

De fato, Choi e Rim (1991) já demonstraram que a sulfetogênese e a metanogênese podem se tornar praticamente equivalentes sob relações DQO/SO_4^{2-} na faixa de 1,7 a 2,7 ($gDQO/gSO_4^{2-}$), enquanto que a metanogênese se torna predominante em relações maiores.

Relações DQO/SO_4^{2-} da ordem de 3 já foram inclusive apontadas como proporcionadoras de melhores eficiências de remoção combinada de matéria orgânica e sulfato (Vilela, 2012). Isso ocorre por este valor ser maior que as relações DQO/SO_4^{2-}

limites para a ocorrência de oxidação completa ou incompleta da matéria orgânica exclusivamente pela via sulfetogênica (Damianovic & Foresti, 2007), possibilitando o estabelecimento da metanogênese, a qual passa a receber fluxo de elétrons suficiente para a sua atuação, levando à geração de metano, com a consequente remoção da matéria orgânica remanescente.

Vale ressaltar também que em relações DQO/SO_4^{2-} próximas dos limites teóricos para a ocorrência exclusiva da sulfetogênese, o estabelecimento da competição entre as bactérias redutoras de sulfato e arqueias metanogênicas pelo doador de elétrons disponível acarretaria em queda na eficiência de remoção de sulfato pelas BRS (Vilela, 2012).

Partindo das porcentagens estimadas do fluxo de elétrons partilhado entre os microrganismos metanogênicos e sulfetogênicos (Tabela 5.4) foi calculado, para a eficiência média de remoção de matéria orgânica em cada fase operacional, o devido parcelamento dessa eficiência pelas vias metanogênica e de redução do sulfato. O resultado desse cálculo está apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Parcelas da eficiência de remoção de matéria orgânica pelas vias metanogênica e sulfetogênica.

Reator Sulfetogênico				
Fase Operacional	Relação DQO/SO_4^{2-}	Eficiências de Remoção de DQO (%)		
		Média Total	Via Metanogênese	Via Sulfetogênese
I	3,4 ± 0,1	77	62	15
II	3,4 ± 0,5	73	55	18
III	2,9 ± 0,6	84	64	20
IV	3,7 ± 0,1	83	68	15
V	4,8 ± 0,4	89	76	13
VI	3,1 ± 0,2	94	73	21
VII	2,9 ± 0,3	96	74	22

O sistema sulfetogênico, como visto na Tabela 5.5, foi capaz de atingir maiores eficiências de remoção de matéria orgânica mesmo nas condições que proporcionaram maior fluxo de elétrons pela via sulfetogênica (menores relações DQO/SO₄²⁻). Isso indica que o processamento da sulfetogênese não se mostrou prejudicial para o desempenho do sistema com relação à remoção da carga orgânica, possibilitando a remoção combinada de matéria orgânica e sulfato com produção de metano (item 5.6).

5.3. Sulfeto dissolvido

A Tabela 5.6 apresenta os valores referentes à produção de sulfeto total dissolvido (STD) gerado no sistema sulfetogênico em cada fase operacional.

Tabela 5.6. Estatística descritiva das concentrações de sulfeto total produzido.

Reator Sulfetogênico						
Fase Operacional	Relação DQO/SO ₄ ²⁻	Sulfato removido (mgSO ₄ ²⁻ .L ⁻¹)	Sulfeto Total Dissolvido (mgS ²⁻ .L ⁻¹)			
			Média	Mínimo	Máximo	CV*
I	3,4 ± 0,1	197 ± 20	83 ± 8	69	91	10
II	3,4 ± 0,5	270 ± 40	96 ± 11	74	108	11
III	2,9 ± 0,6	612 ± 146	242 ± 22	208	285	9
IV	3,7 ± 0,1	906 ± 67	192 ± 14	176	216	7
V	4,8 ± 0,4	814 ± 83	190 ± 7	178	204	3
VI	3,1 ± 0,2	1303 ± 72	319 ± 25	258	360	8
VII	2,9 ± 0,3	1333 ± 93	289 ± 18	260	311	6

*Coeficiente de variação (%).

A concentração de sulfeto de hidrogênio que permanece dissolvida no meio líquido depende das frações de cada espécie presentes na solução, o que está

diretamente relacionado com os valores de pH do meio (Figura 3.2). No caso, HS^- ou H_2S , uma vez que o S^{2-} não ocorre na faixa de pH em questão.

Para valores de pH próximos de 8,0 o sulfeto tende a estar presente em sua maior parte (90%) sob a forma ionizada (HS^-), a qual é menos tóxica aos microrganismos quando comparado à forma molecular (H_2S), por ser esta facilmente absorvida pelas células e interferirem no metabolismo assimilatório do enxofre e no pH celular (Hulshoff Pol et al., 2001).

No sistema sulfetogênico em questão o pH do efluente foi mantido na faixa de valores entre 7,03 e 8,05, com valor médio de $7,64 \pm 0,22$ ao longo de todo o período da operação. A Figura 5.8 apresenta o gráfico das frações de sulfeto e os valores de pH efluente do reator ao longo das diversas fases operacionais.

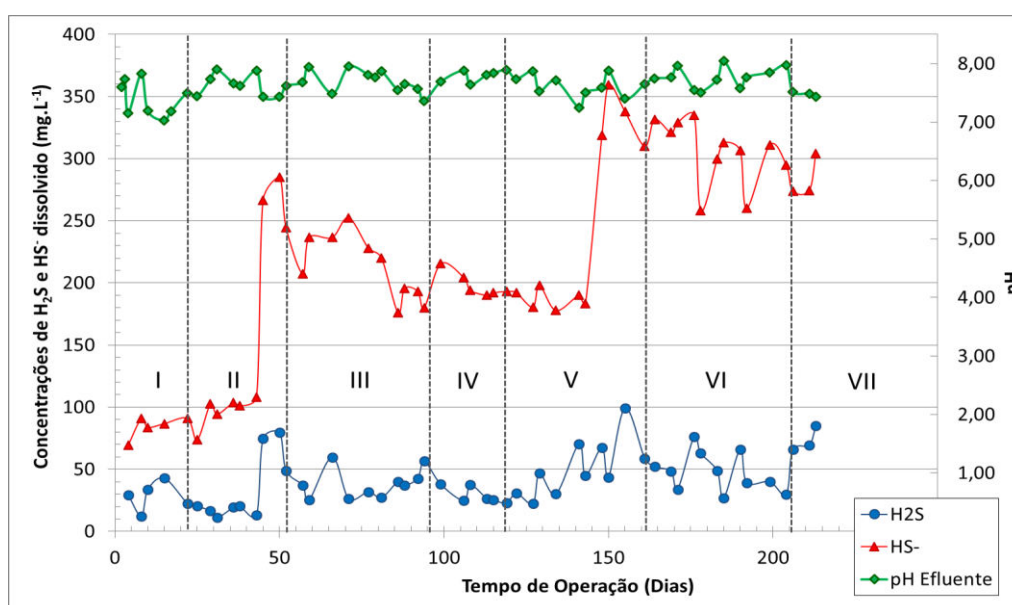


Figura 5.8. Concentrações das espécies de sulfeto de hidrogênio e valores de pH no efluente do sistema sulfetogênico ao longo do tempo.

As concentrações de sulfeto livre (H_2S) e ionizado (HS^-) foram determinadas através das Equações (5.1) e (5.2).

$$H_2S = \frac{STD}{1 + (10^{pH-7,2})} \quad (5.1) *$$

$$HS^- = STD - H_2S \quad (5.2)$$

*STD: Concentração de sulfeto total dissolvido no efluente ($mg.L^{-1}$).

Como pode ser notado, o sulfeto de hidrogênio sob a forma molecular (H_2S) permaneceu abaixo dos $100 \text{ mg } H_2S.L^{-1}$ durante todo o período operacional, evitando-se assim problemas de toxicidade, que em reatores com biomassa imobilizada podem se dar geralmente a partir de concentrações mais elevadas (Isa *et al.*, 1986a; Maillacheruvu *et al.*, 1993).

Entretanto alguns autores apontam que a toxicidade ocasionada pelo sulfeto sobre os microrganismos anaeróbios pode se dever também à concentração do sulfeto total dissolvido (STD), e não apenas à fração ionizada do sulfeto (HS^-), principalmente com relação às próprias BRS (Hilton & Oleszkiewicz, 1988; O'Flaherty *et al.*, 1998a).

A Figura 5.9 apresenta as concentrações de sulfato removida ao longo do tempo, de sulfeto total dissolvido (STD) medido pelo método colorimétrico e de sulfeto teórico esperado para os valores de sulfato removido no sistema sulfetogênico, já tendo sido descontada previamente no cálculo teórico a fração de H_2S emitida na fase gasosa, conforme a Lei de Henry (Lens *et al.*, 1998).

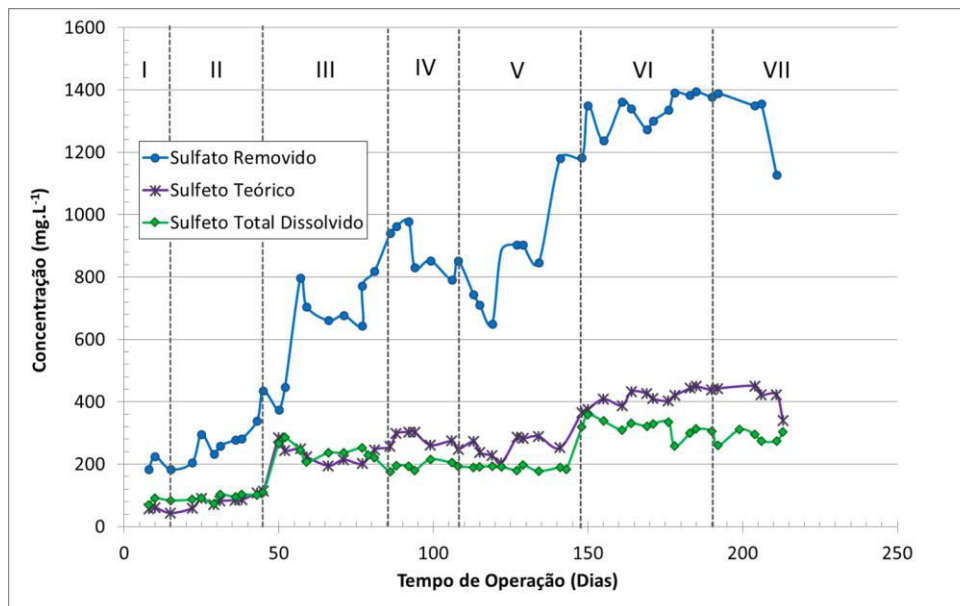


Figura 5.9. Concentrações de sulfato removido, sulfato total dissolvido e sulfato teórico no reator sulfetogênico ao longo do tempo.

Foi observada a partir da Fase IV uma discrepância entre o valor de sulfato total dissolvido (STD) e o valor teórico que seria esperado diante da concentração de sulfato removida pelo reator. Concomitantemente a este fato, também se notou acentuado escurecimento das paredes do reator sulfetogênico, bem como da superfície do seu material suporte, como está retratado na Figura 5.10.



Figura 5.10. Imagens dos reatores metanogênico (esquerda) e sulfetogênico (direita). Note-se a diferença de cor entre ambos.

Uma vez que a partir da Fase IV passou a ser utilizada água residuária sintética mais concentrada que nas fases anteriores (fator de diluição 1:3), não só a concentração de matéria orgânica, mas também as concentrações de cloretos metálicos passaram a ser dosadas duas vezes mais que na Fase III. Assim, uma hipótese que poderia explicar tanto a diminuição na concentração do sulfeto total dissolvido no efluente do reator, quanto o enegrecimento dos componentes físicos do sistema, seria a precipitação do sulfeto sob a forma de sulfetos metálicos.

De fato, o sulfeto biogênico (gerado biologicamente pelas BRS) pode reagir com os metais (Me) presentes em solução (Equação (5.3)) formando sulfetos metálicos insolúveis (MeS), os quais precipitam, permanecendo no interior do reator seja por deposição sobre o material suporte ou pela sedimentação para as partes inferiores do sistema (Sahinkaya & Gungor, 2010).



Problemas referentes à precipitação de sulfetos metálicos em reatores anaeróbios com biomassa imobilizada dizem respeito à toxicidade desses metais depositados diretamente sobre o biofilme, que passam a se concentrar no entorno da biomassa, região na qual sulfeto dissolvido tende a ser maior que no meio líquido, sendo também devidos à diminuição nos processos de transferência de massa, dificultados pela barreira criada pelo sulfeto metálico na superfície do material suporte (Utgikar *et al.*, 2002; Villa-Gomez *et al.*, 2011).

A manutenção de uma área de escoamento transversal livre na configuração de reator utilizado (leito fixo ordenado) pareceu contribuir na prevenção desses problemas, uma vez que parte do sulfeto metálico pode sedimentar para a região inferior do reator, não permanecendo assim totalmente aderido ao material suporte.

Outra hipótese já levantada em outros trabalhos como resultado da mesma observação de uma menor produção de sulfeto que o estequiometricamente esperado, seria a formação de compostos sulfurosos em estados intermediários de oxidação, tais como o sulfito e o tiosulfato (Vilela, 2012).

As análises de cromatografia iônica realizadas para a quantificação do ânion sulfato (SO_4^{2-}) também detectou concentrações variáveis de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) ao longo do período de operação do reator sulfetogênico, conforme apresentado na Figura 5.11. A formação de tiosulfato, como pode ser observado no gráfico, foi mais acentuada no início da Fase III, na qual se dobrou a quantidade de sulfato afluente, e ao longo das Fases VI e VII, nas quais o reator recebeu concentrações afluentes de sulfato da ordem de 1400 mg.L^{-1} .

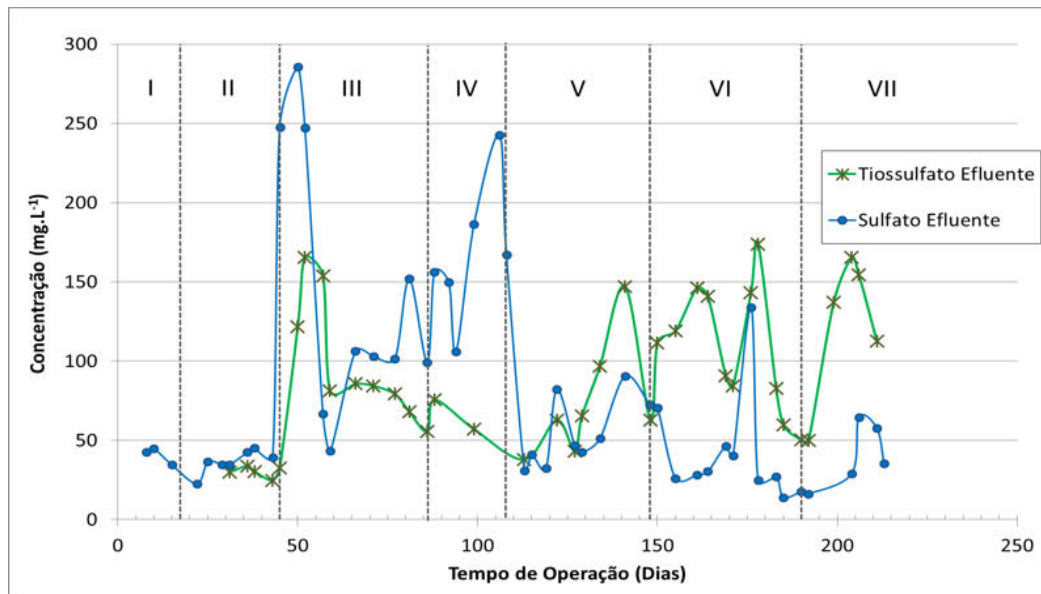


Figura 5.11. Formação de tiosulfato no sistema sulfetogênico ao longo do tempo.

Assim, a formação de tiosulfato no interior do reator sulfetogênico, possivelmente pela oxidação parcial do sulfeto em consequência de microaeração por falhas na vedação das mangueiras do sistema, em conjunto com a precipitação de sulfetos metálicos, podem ser apontadas como as causas principais da quantificação de sulfeto menor que a teoricamente esperada.

5.4. Alcalinidade

Os processos metanogênicos dependem de faixas específicas de pH para se manterem estáveis, de modo que o desequilíbrio entre a produção e o consumo de ácidos orgânicos, levando ao seu acúmulo no sistema e à queda do pH, pode provocar sua falência.

Assim, a alcalinidade presente no meio exerce importante função ao atuar como

agente tamponador dos ácidos produzidos pela acidogênese e mantendo o pH próximo da faixa neutra, ideal para a metanogênese.

Uma vez que as reações de redução do sulfato metabolizadas pelas BRS são geradoras de alcalinidade (Equações (3.1), (3.2) e (3.4)), sistemas sulfetogênicos combinados com metanogênicos apresentam maior produção de alcalinidade que os sistemas exclusivamente metanogênicos, conforme apresentado na Figura 5.12. Esse comportamento possibilita uma a manutenção mais efetiva dos valores de pH do meio.

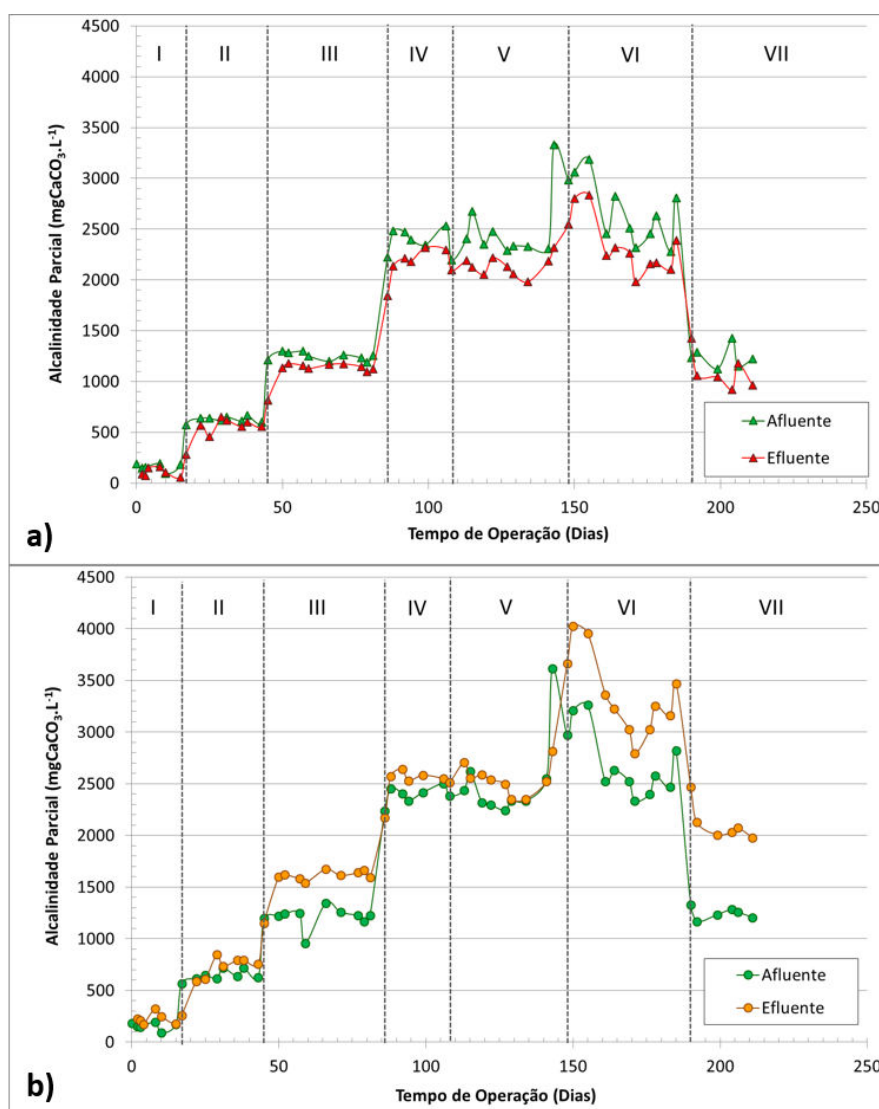


Figura 5.12. Alcalinidade parcial afluente e efluente ao longo do tempo de operação nos reatores metanogênico (a) e sulfetogênico (b).

Durante a Fase I (partida dos reatores) foi dosada uma concentração de 300 mg.L⁻¹ de NaOH para manter sob controle o pH do meio, garantindo da formação do bicarbonato a partir do dióxido de carbono produzido pela digestão anaeróbia.

Todavia, esta fase apresentou um abaixamento dos valores de pH efluente nos últimos dias de operação (de 7,34 para 6,43, no reator metanogênico e de 7,83 para 7,03 no reator sulfetogênico), bem como queda na eficiência de remoção de matéria orgânica (Figura 5.1).

Optou-se então pela substituição do hidróxido de sódio pelo bicarbonato de sódio, de forma a prover uma fonte de alcalinidade externa para promover o tamponamento do sistema.

Da Fase II à Fase VI o NaHCO₃ foi dosado na proporção de 1,4 g para cada 1,0 g de DQO por litro de meio sintético de modo a se prover 1,0 g HCO₃⁻ para cada 1,0 g de DQO afluente.

Vale ressaltar que durante os 7 primeiros dias da Fase VI ocorreram erros na dosagem do bicarbonato, o qual foi adicionado em excesso, gerando maiores índices de alcalinidade afluente e efluente. Passado esse período, a dosagem de bicarbonato foi novamente ajustada para os níveis anteriores.

Pela comparação entre os valores de alcalinidades parciais dos reatores estudados (Tabela 5.7) observou-se que o sistema metanogênico apresentou consumo da alcalinidade adicionada ao meio sintético em todas as fases de operação, todavia o sistema manteve o equilíbrio entre a produção e o consumo de ácidos. Já o sistema sulfetogênico apresentou produção de alcalinidade em excesso, a qual foi mais acentuada nas etapas em que o reator operou com relação DQO/SO₄²⁻ próxima de 3, a

menor relação testada nesse estudo, o que corrobora a relação da produção de alcalinidade com as reações de redução de sulfato metabolizadas pelas BRS.

O comportamento equilibrado observado em ambos os sistemas permitiu que fosse reduzida a adição de alcalinizante durante a última fase operacional (Fase VII), na qual foi dosado metade da concentração de bicarbonato de sódio, correspondendo à proporção de 0,5 g HCO_3^- por 1,0 g de DQO por litro.

Tabela 5.7. Valores médios de alcalinidade parcial dos dois reatores estudados.

Fase Operacional	Reator Metanogênico		Reator Sulfetogênico		Relação DQO/ SO_4^{2-}
	Alcalinidade Parcial (mg CaCO_3/L)				
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	
I	170 ± 34	97 ± 39	157 ± 35	227 ± 52	3,4 ± 0,1
II	626 ± 28	562 ± 110	643 ± 48	674 ± 178	3,4 ± 0,5
III	1248 ± 38	1113 ± 101	1209 ± 96	1568 ± 144	2,9 ± 0,6
IV	2385 ± 94	2139 ± 159	2370 ± 77	2500 ± 168	3,7 ± 0,1
V	2476 ± 297	2150 ± 99	2512 ± 367	2545 ± 128	4,8 ± 0,4
VI	2631 ± 295	2265 ± 265	2702 ± 306	3360 ± 371	3,1 ± 0,2
VII	1241 ± 98	1099 ± 167	1150 ± 244	2068 ± 193	2,9 ± 0,3

Uma vez que a alcalinidade a bicarbonato é a responsável pelo efeito tampão dentro da faixa de pH em que se operam os sistemas anaeróbios (entre 6,0 e 8,0), esse é um importante parâmetro de controle da estabilidade dos processos em questão.

Na Figura 5.13 pode-se observar que a concentração de alcalinidade a bicarbonato ao longo do tempo de operação foi sempre maior no reator sulfetogênico quando comparado ao reator metanogênico. Assim, o sistema sulfetogênico se mostrou mais robusto, podendo manter sob controle os valores de pH mesmo na ocorrência de sobrecargas orgânicas, exigindo menores dosagens de agente alcalinizante.

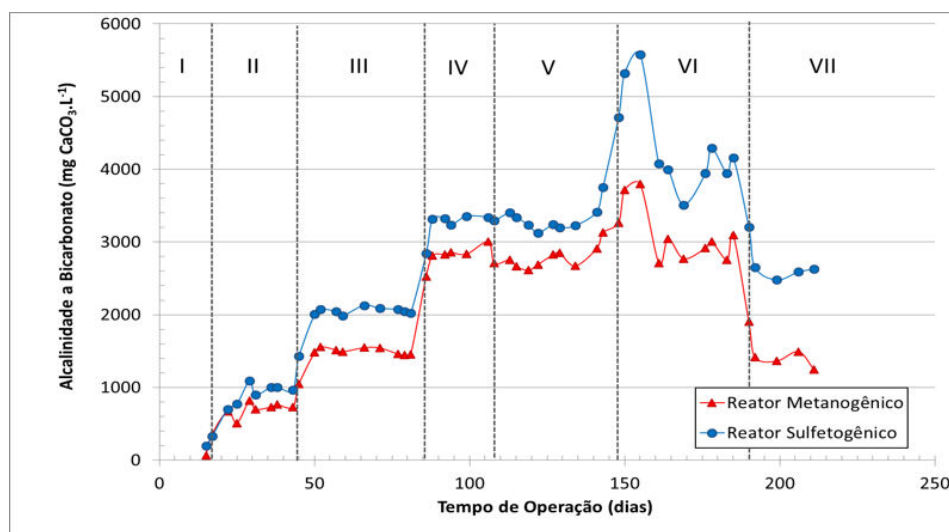


Figura 5.13. Alcalinidade a bicarbonato ao longo do tempo nos reatores estudados.

Após a diminuição na dosagem do bicarbonato de sódio na última fase os dois sistemas permaneceram estáveis, com relações A_i/A_p próximas de 0,3 conforme mostrado na Tabela 5.8. Uma vez que o sistema sulfetogênico foi capaz de manter a produção de alcalinidade a bicarbonato em níveis mais elevados que o reator metanogênico, seria possível reduzir ainda mais a dosagem de alcalinidade externa nesse sistema, sem prejudicar o desenvolvimento equilibrado dos processos anaeróbios.

Tabela 5.8. Valores médios da relação A_i/A_p em cada fase operacional.

Fase Operacional	Reator Metanogênico	Reator Sulfetogênico	
	Relação A_i/A_p	Relação A_i/A_p	Relação DQO/SO_4^{2-}
I*	$0,55 \pm 0,33$	$0,42 \pm 0,10$	$3,4 \pm 0,1$
II	$0,35 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,05$	$3,4 \pm 0,5$
III	$0,36 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,03$	$2,9 \pm 0,6$
IV	$0,34 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,03$	$3,7 \pm 0,1$
V	$0,34 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,04$	$4,8 \pm 0,4$
VI	$0,34 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,07$	$3,1 \pm 0,2$
VII	$0,38 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,05$	$2,9 \pm 0,3$

*Na Fase I procedeu-se a dosagem de NaOH ao invés do bicarbonato de sódio.

5.5. Produtos intermediários

As bactérias redutoras de sulfato são conhecidas pela sua capacidade de metabolizar compostos produzidos pela acidogênese e que não são diretamente utilizados pelas arqueias metanogênicas, tais como propionato, butirato, ácidos graxos de cadeia longa e ramificada, lactato, fumarato e succinato (Colleran *et al.*, 1995; Hulshoff Pol *et al.*, 1998) sem requererem crescimento balanceado com a acetogênese, uma vez que não dependem da pressão parcial do hidrogênio do meio.

Dessa forma, os sistemas sulfetogênicos se mostram menos sensíveis às sobrecargas orgânicas, podendo ainda servir como estimuladores da metanogênese acetoclástica, uma vez que as BRS podem atuar como geradoras de acetato pela via da oxidação incompleta dos compostos orgânicos acima destacados (Muyzer & Stams, 2008; Mulopo *et al.*, 2011).

As análises de ácidos orgânicos voláteis indicaram comportamentos diferenciados entre os dois sistemas estudados. Enquanto no reator metanogênico o acetato é prontamente consumido pelos microrganismos metanogênicos, no reator sulfetogênico ocorre maior produção de acetato, cujo acúmulo no meio líquido pode ser detectado em diversos momentos da operação, como mostrado na Figura 5.14.

De fato, o consumo do acetato é comumente apontado como uma etapa limitante do processo anaeróbio em função das baixas velocidades de crescimento das arqueias metanogênicas acetoclásticas (Aquino & Chernicharo, 2005). No caso dos sistemas sulfetogênicos, isso pode ser agravado em função da maior sensibilidade desses organismos às concentrações do sulfeto de hidrogênio produzido pelas BRS (O'Flaherty & Colleran, 1999).

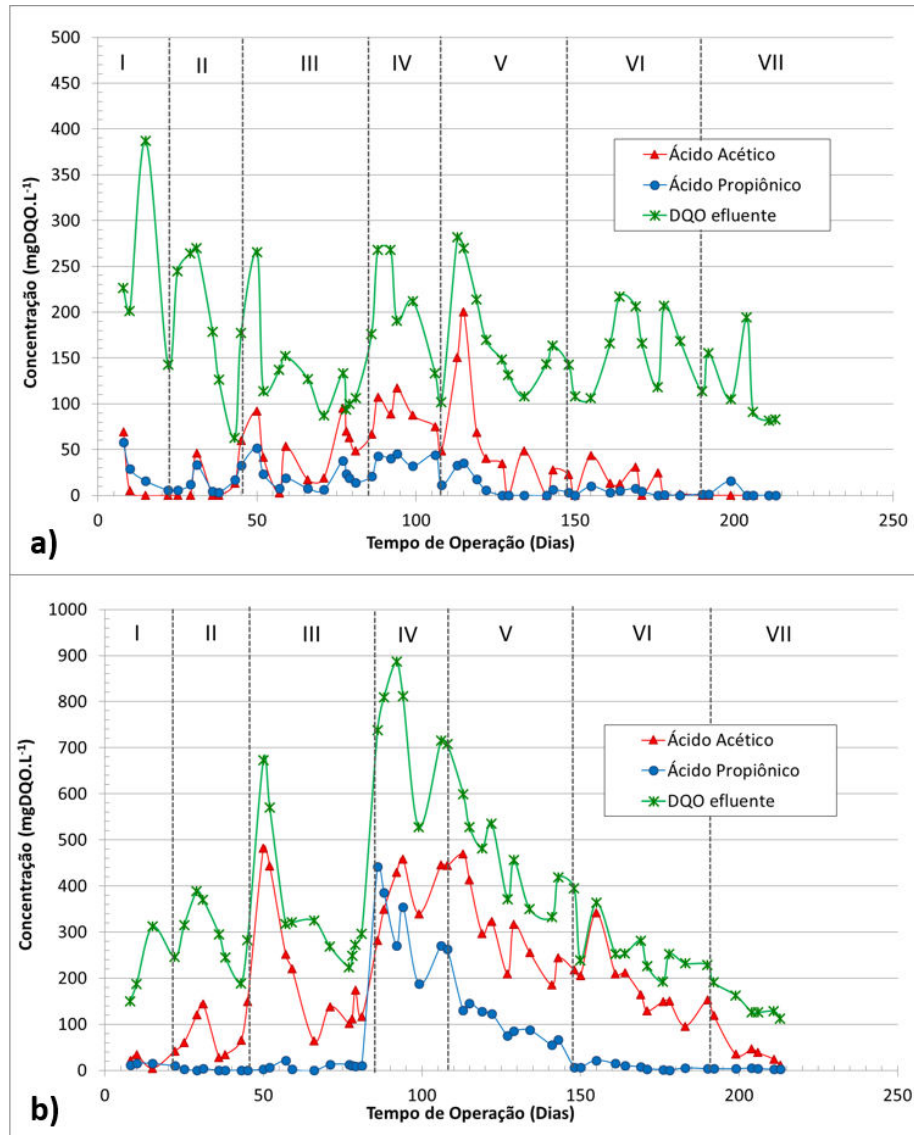


Figura 5.14. Concentrações (em termos de DQO) de ácido acético, ácido propiônico e de matéria orgânica remanescente no efluente dos reatores metanogênico (a) e sulfetogênico (b). Obs.: Os eixos verticais foram mantidos em diferentes escalas.

Após a etapa de partida dos reatores, durante a Fase II, na qual os reatores foram alimentados com concentrações de matéria orgânica da ordem de 1000 mg.L^{-1} , o reator sulfetogênico começou a apresentar acúmulo de ácido acético superior ao reator metanogênico.

Durante a terceira fase de operação (Fase III), na qual foi dobrada a carga

orgânica aplicada a ambos os reatores, o sistema sulfetogênico também apresentou produção e acúmulo de ácido acético, o qual se deu em concentrações mais elevadas que na fase anterior, diferentemente do sistema metanogênico, que manteve a concentração do acetato controlado ao longo de todas as fases de operação. Todavia, no reator sulfetogênico a concentração do ácido acético decresceu com o decorrer dessa etapa, indicando a adaptação e o crescimento dos microrganismos responsáveis pelo consumo do acetato.

Na Fase IV, com a aplicação de uma nova concentração de matéria orgânica próxima de 3900 mg.L^{-1} sobre os dois reatores, houve certo acúmulo de ácido acético no reator metanogênico (próximo a 100 mg.L^{-1}), porém esse acúmulo foi notado mais significativamente no reator sulfetogênico (próximo a 450 mg.L^{-1}).

Esse acúmulo de ácido acético no sistema sulfetogênico, além de resultar em menores eficiência na remoção da carga orgânica, representa um potencial de produção de metano pela via acetoclástica que não foi aproveitado pelas arqueias metanogênicas, o que poderia ser devido a uma inibição parcial desses microrganismos pelo sulfeto de hidrogênio produzido, embora as concentrações de sulfeto nesta fase tenham permanecido próximas às concentrações da fase anterior, a despeito do aumento na concentração afluenta de sulfato (Figura 5.9).

De fato, o acúmulo de acetato em reatores submetidos à condições sulfetogênicas também se deve a uma menor capacidade de oxidação completa desse substrato orgânico pelas BRS, como já foi observado por Cao *et al.* (2012), os quais testaram diferentes ácidos orgânicos como doadores de elétrons para a redução do sulfato e concluíram que o ácido acético, além de ser produzido pela via de oxidação incompleta dos outros ácidos orgânicos, também foi o mais lentamente removido pelo

sistema, apesar da aplicação de concentrações de sulfato em excesso.

Damianovic e Foresti (2009) estudaram reatores anaeróbios horizontais de leito fixo sob condições sulfetogênicas tratando uma mistura de ácidos orgânicos voláteis (acetato, propionato e butirato) com etanol, apenas o etanol ou apenas o acetato. Os autores *op. cit.* observaram que a substituição da fonte de carbono pelo acetato resultou na diminuição da sulfetogênese. A demanda do sistema por longos períodos de adaptação indicou a predominância da sulfetogênese pela via hidrogenotrófica e o lento crescimento das BRS oxidadoras de acetato, o que possibilitou o estabelecimento da metanogênese acetoclástica.

A tendência de queda na concentração do acetato no sistema sulfetogênico ao longo das três próximas fases (V, VI e VII) indica a aclimatação da biomassa, com o estabelecimento da metanogênese, conforme também foi indicado pelo aumento no rendimento de metano ao longo dessas três etapas (Figura 5.16).

Juntamente com o acúmulo de acetato no reator sulfetogênico durante a Fase IV, também foi observado o aumento das concentrações de ácido propiônico (Figura 5.14). Como nos sistemas sulfetogênicos as BRS passam a ser responsáveis por consumir o propionato produzido na acidogênese (O'Flaherty *et al.*, 1998b), esses microrganismos devem ter sofrido com a sobrecarga orgânica imposta (concentração de matéria orgânica afluyente aumentada de 2000 mg.L⁻¹ para 3900 mg.L⁻¹), deixando de acompanhar a acidogênese à taxas satisfatórias.

Além disso é importante notar que durante essa mesma etapa (Fase IV) a relação DQO/SO₄²⁻ foi elevada para próxima de 4, ou seja, o sulfato passou a ser introduzido no sistema em proporções menores que na fase anterior, limitando a participação das BRS na remoção global da matéria orgânica (Tabela 5.4). Todavia, em termos de carga de

sulfato aplicada, a quantidade de sulfato aumentou com relação à fase III (de cerca de 600 mg.L⁻¹ para 1000 mg.L⁻¹), possibilitando o crescimento dos microrganismos redutores de sulfato. Passado o choque inicial, a concentração de propionato começou a diminuir (Figura 5.14), indicando a retomada do equilíbrio da digestão anaeróbia.

Durante a Fase V, com relação DQO/SO₄²⁻ elevada para 5, a concentração de propionato remanescente no sistema continuou diminuindo. Uma vez que a relação DQO/SO₄²⁻ retornou para próximo de 3 a concentração do ácido propiônico decresceu imediatamente, deixando de ser detectado no final da operação. Esse resultado indica a plena retomada da participação das bactérias redutoras de sulfato no processamento do ácido propiônico e no controle da pressão parcial do hidrogênio.

5.6. Produção de biogás

A Figura 5.15 apresenta os dados de produção volumétrica de metano nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP) nos dois reatores estudados.

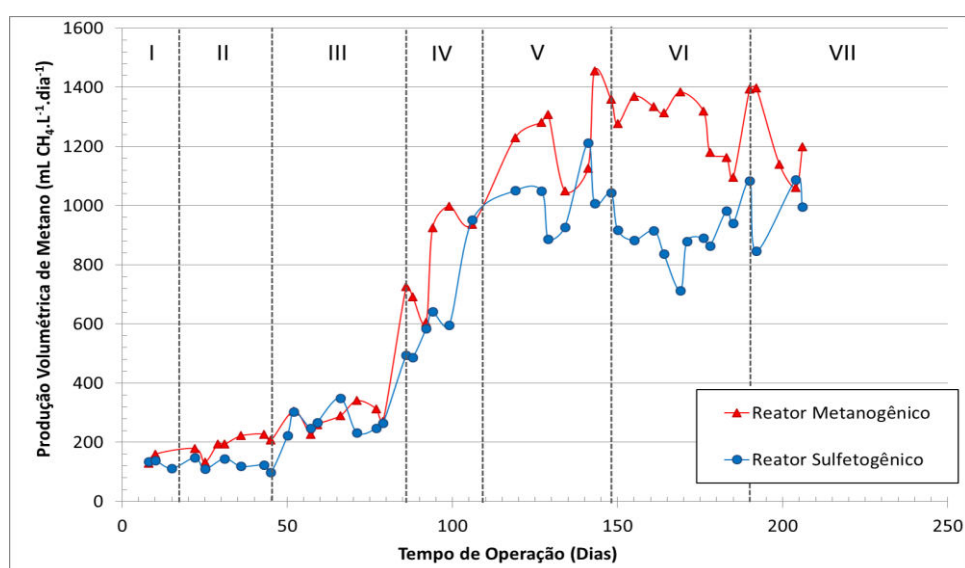


Figura 5.15. Produção volumétrica de metano nas CNTP ao longo do tempo.

A produção volumétrica de metano foi superior no reator metanogênico ao longo de quase todo tempo de operação dos reatores, uma vez que nesse sistema toda matéria orgânica é removida pela via da metanogênese na etapa final da digestão anaeróbia, enquanto no reator sulfetogênico uma parcela significativa de matéria orgânica é convertida pelas BRS, levando à produção de sulfeto de hidrogênio ao invés de metano.

Para avaliar a interferência da sulfetogênese sobre a produção de metano foram efetuados os cálculos de rendimento de metano (volume de metano produzido por quantidade de matéria orgânica removida pela via metanogênica) obtidos nos dois sistemas segundo a Equação (5.4), e em seguida traçou-se o gráfico do rendimento ao longo do tempo mostrado na Figura 5.16.

$$\eta = \frac{V_{CH_4}}{DQO_{CH_4} \times Q_{afl}} \quad (5.4) *$$

* η_{CH_4} : Rendimento de metano ($mL CH_4.gDQO_{removida}^{-1}$); V_{CH_4} : Vazão de metano produzido ($mL.h^{-1}$); DQO_{CH_4} : Concentração de DQO removida pela via metanogênica ($g.L^{-1}$); Q_{afl} : Vazão de alimentação do reator ($L.h^{-1}$).

Os valores de rendimento de metano foram determinados nas CNTP e o valor máximo de rendimento que pode ser obtido pela oxidação da matéria orgânica nestas condições é de $354 mL CH_4.g DQO_{removida}^{-1}$, conforme o cálculo efetuado segundo a metodologia apresentada por Aquino *et al.* (2007).

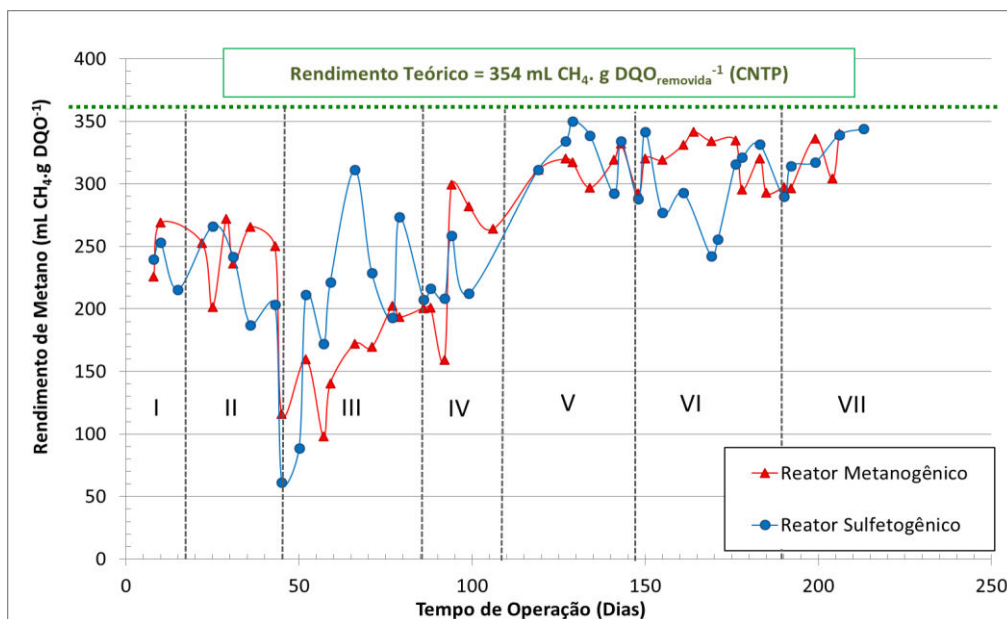


Figura 5.16. Rendimento de metano nos dois reatores ao longo do tempo.

Durante as duas primeiras fases de operação (Fases I e II) o reator metanogênico apresentou maior (Figura 5.15), bem como maiores rendimentos de metano, embora o rendimento em ambos os reatores tenha estado abaixo do valor teórico esperado ($354 \text{ mL CH}_4.\text{g DQO}_{\text{removida}}^{-1}$ nas CNTP), conforme mostrado na Figura 5.16.

Após a mudança da condição experimental para a Fase III, na qual os reatores passaram a operar com o dobro da carga orgânica ($\text{DQO}_{\text{afluente}}$ da ordem de 2000 mg.L^{-1}) houve acréscimo na produção volumétrica de metano nos dois sistemas (Figura 5.15). Todavia o reator metanogênico apresentou uma queda pronunciada no seu rendimento de metano, o que pode ser observada comparando-se os valores médios de rendimento mostrados na Figura 5.17.

Já o reator sulfetogênico, apesar da carga de sulfato aplicada ao sistema também ter aumentado nesta etapa (Fase III), apresentou rendimentos de metano crescentes ao longo dessa fase, atingindo inclusive maiores valores que os obtidos no reator metanogênico (Figura 5.16), alcançando um máximo de $311 \text{ mL CH}_4.\text{g DQO}_{\text{removida}}^{-1}$,

confirmando assim a adaptação dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos no sistema sulfetogênico, os quais também são apontados como responsáveis pelo abaixamento das concentrações de ácido acético acumuladas no início dessa mesma fase (Figura 5.14).

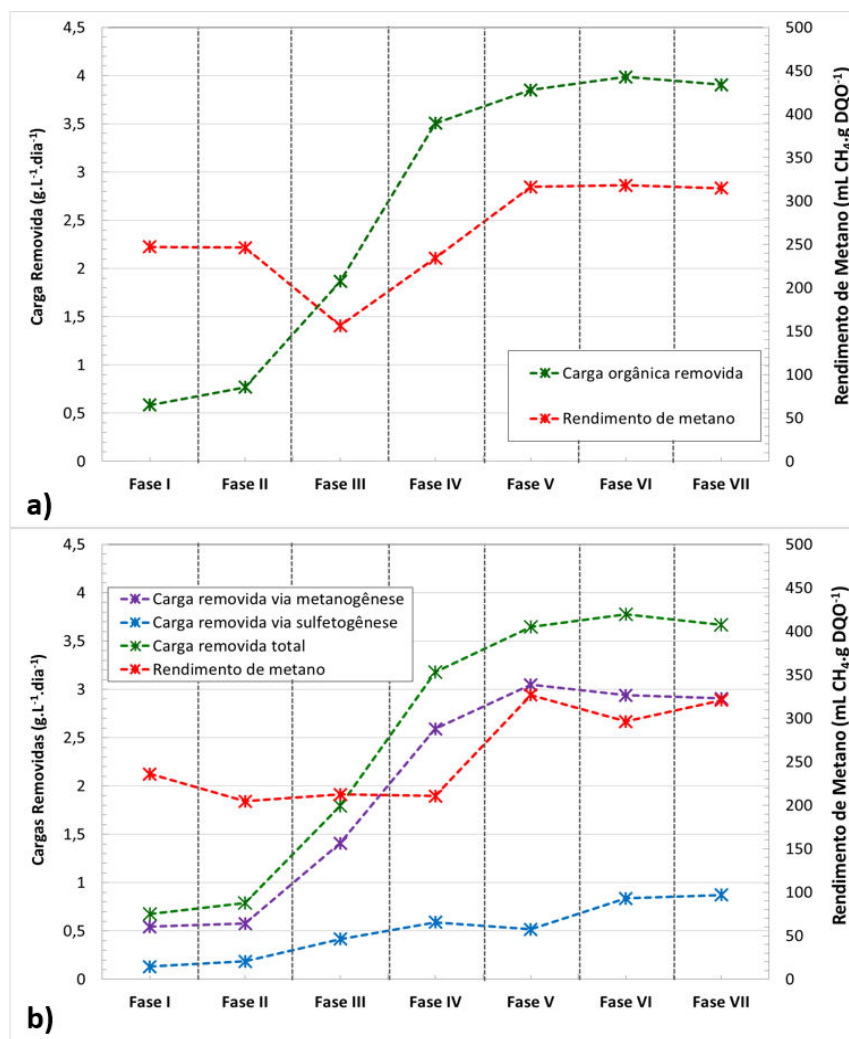


Figura 5.17. Valores médios de rendimento de metano e de cargas orgânicas removidas nos reatores metanogênico (a) e sulfetogênico (b).

Com a mudança para a Fase IV, após novo aumento da concentração de matéria orgânica aplicada (3900 mg.L⁻¹), o reator metanogênico apresentou produção volumétrica de metano crescente (Figura 5.15), com maiores rendimentos, chegando a

um máximo de 299 mL de metano para cada 1,0 g de DQO removida.

Durante esta mesma fase, porém, o sistema sulfetogênico, operando com relação DQO/SO_4^{2-} de 4 (maior que a relação das etapas anteriores), não apresentou aumento substancial no rendimento de metano (Tabela 5.9), o qual permaneceu próximo ao obtido na fase anterior, como apontado pela Figura 5.17. Ainda que o fluxo de elétrons via metanogênese tenha sido favorecido (aumentando de 76 % para 81 %), como mostrado anteriormente na Tabela 5.4, também observou-se nova ocorrência de acúmulo de acetato no sistema (Figura 5.14), provavelmente pela sobrecarga orgânica sofrida pelo reator no início dessa etapa.

Com a mudança para a Fase V e a concentração de matéria orgânica afluenta ajustada para próximo dos 4000 mg.L⁻¹ o reator metanogênico apresentou maiores valores de produção volumétrica (Figura 5.15) e de rendimento de metano (Figura 5.16). Ao longo da Fase VI o sistema metanogênico alcançou o seu maior rendimento de metano (Figura 5.16), chegando ao valor máximo de 342 mLCH₄/gDQO_{removida}. Na etapa final (Fase VII) o sistema metanogênico manteve rendimentos médios de metano em valores próximos aos das duas fases anteriores (Figura 5.17).

Ao longo da Fase V o sistema sulfetogênico, por sua vez, com relação DQO/SO_4^{2-} aumentada para 5, apresentou uma tendência crescente na produção volumétrica (Figura 5.15) e no rendimento de metano, o qual superou em alguns momentos o rendimento do reator metanogênico (Figura 5.16). De fato, com menor fluxo de elétrons demandado pela via de remoção do sulfato (Tabela 5.4), os microrganismos metanogênicos tornaram-se mais efetivos na remoção do ácido acético, o qual decaiu ao longo dessa fase operacional, como visto na Figura 5.14, resultando em uma maior produção de metano.

Na Fase VI, com a mudança na relação DQO/SO₄²⁻, ajustada novamente para próxima de 3, o reator sulfetogênico voltou a produzir menor quantidade de biogás e a apresentar menores rendimentos de metano (Figura 5.16). Uma vez que maiores concentrações de sulfato permitem que as BRS voltem a degradar maiores frações da matéria orgânica, como visto pelo aumento do fluxo de elétrons na direção da sulfetogênese (Tabela 5.4), elas passariam a competir com as arqueias metanogênicas pelos substratos disponíveis. Neste caso a competição se deu provavelmente pelo hidrogênio, já que o ácido propiônico acumulado anteriormente durante a Fase IV (Figura 5.14) indicou o aumento da sua pressão parcial no sistema.

Na última etapa operacional (Fase VII), tendo sido efetuada uma redução na dosagem de alcalinidade externa, o sistema sulfetogênico recuperou maiores rendimentos de metano (Figura 5.16), mantendo um rendimento superior ao do sistema metanogênico, e com concentrações de ácido acético finalmente reduzidas a valores menores que 50 mg.L⁻¹ logo nos primeiros dias dessa etapa (Figura 5.14).

Esse comportamento demonstra o potencial de adaptação das arqueias metanogênicas acetoclásticas no sistema sulfetogênico, não havendo indícios de inibição da atividade desses microrganismos sob as condições impostas.

Tabela 5.9. Rendimento de Metano (mL CH₄.g DQO_{removida}⁻¹) nos reatores em estudo.

Fase Operacional	Reator Metanogênico			Reator Sulfetogênico		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
I	247 ± 22	226	269	236 ± 16	215	253
II	246 ± 23	201	272	225 ± 31	187	266
III	156 ± 34	98	203	213 ± 62	61	311
IV	234 ± 50	159	299	221 ± 19	207	259
V	316 ± 11	297	332	327 ± 19	292	350
VI	318 ± 18	293	342	296 ± 32	242	342
VII	315 ± 19	296	340	321 ± 19	290	344

O rendimento de metano nos dois sistemas cresceu com o aumento das cargas orgânicas aplicadas e removidas (Figura 5.17), acompanhando o aumento da eficiência de remoção de DQO nos dois reatores (Figura 5.1). É possível que ambos reatores tenham atravessado um período de adaptação da biomassa à água residuária utilizada, rica em carboidratos, diferente da matéria orgânica rica em proteínas, à qual o lodo do inóculo estava submetido originalmente.

Para a aplicação de testes estatísticos aos dados de rendimento de metano obtidos nos dois reatores procedeu-se à técnica de reamostragem *bootstrapping*, para o incremento do número de amostras em cada fase, conforme descrito no item 4.7.

Em seguida, a aplicação do teste de normalidade de *Lilliefors* resultou em *p-valor* não significativo em todas as fases operacionais de ambos os reatores, de forma que a hipótese nula (os dados são paramétricos) foi assumida.

Com os dados das fases operacionais obedecendo à distribuição normal pôde-se realizar uma análise de variância (ANOVA) para a comparação fase a fase dos dois reatores.

Os resultados do teste estatístico de normalidade e da análise de variância estão mostrados no Anexo B.

O resultado dessa análise mostrou não haver diferença estatística entre os dois reatores em nenhuma fase operacional, o que indica que ambos os sistemas apresentaram rendimento de metano similares, não sendo o rendimento na produção de metano prejudicado pela ocorrência da sulfetogênese.

A análise estatística corrobora assim o potencial de adaptação dos microrganismos metanogênicos, não sendo a metanogênese inibida nas condições sulfetogênicas testadas neste estudo.

5.7. Atividade metanogênica específica

A Tabela 5.10 apresenta as concentrações iniciais de matéria orgânica e sulfato nos 7 frascos de reação preparados para os ensaios de atividade metanogênica conforme metodologia proposta no item 4.6.

Tabela 5.10. Condições iniciais dos frascos de reação.

Frascos	Inóculo	Matéria Orgânica	DQO inicial (mg.L⁻¹)	SO₄²⁻ inicial* (mg.L⁻¹)
1	Metanogênico		1006	<i>n.a.</i>
2	Sulfetogênico sem sulfato	Acetato	1119	<i>n.a.</i>
3	Sulfetogênico com sulfato		1027	618
4	Metanogênico		1415	<i>n.a.</i>
5	Sulfetogênico sem sulfato	Formiato	1428	<i>n.a.</i>
6	Sulfetogênico com sulfato		1376	340
7	Metanogênico		1039	<i>n.a.</i>
8	Sulfetogênico sem sulfato	Meio	1128	<i>n.a.</i>
9	Sulfetogênico com sulfato	Sintético	1137	779

* *n.a.* – Não adicionado.

Cada frasco recebeu 7 cm³ de espuma picotada retirada dos reatores metanogênico (Frascos 1, 4 e 7) ou sulfetogênico (Frascos 2, 3, 5, 6, 8 e 9). O conteúdo de biomassa avaliado sob a forma de sólidos suspensos voláteis presente nos frascos de reação foi da ordem de 0,16 gSSV, para os frascos com inóculo do reator metanogênico, e 0,14 gSSV, para os frascos com inóculo do reator sulfetogênico.

Os frascos com conteúdo significativo de sulfato (Frascos 3, 6 e 9) deveriam ser iniciados com relação DQO/SO₄²⁻ próximas de 3, semelhante à encontrada no reator sulfetogênico. Todavia, por variações na dosagem inicial dos substratos orgânicos e na

dosagem de sulfato, os frascos alimentados com acetato (3) e meio sintético (9) foram operados com relação próxima de 2, enquanto que o frasco alimentado com formiato (6) foi operado com relação próxima de 4.

A Figura 5.18 apresenta os resultados referentes à degradação de matéria orgânica (DQO) e à quantidade de metano acumulado ($\text{gDQO}_{\text{CH}_4}$) obtidos ao longo do tempo de duração dos experimentos em batelada (86 h para os frascos contendo acetato e meio sintético, e 152 h para os frascos contendo formiato).

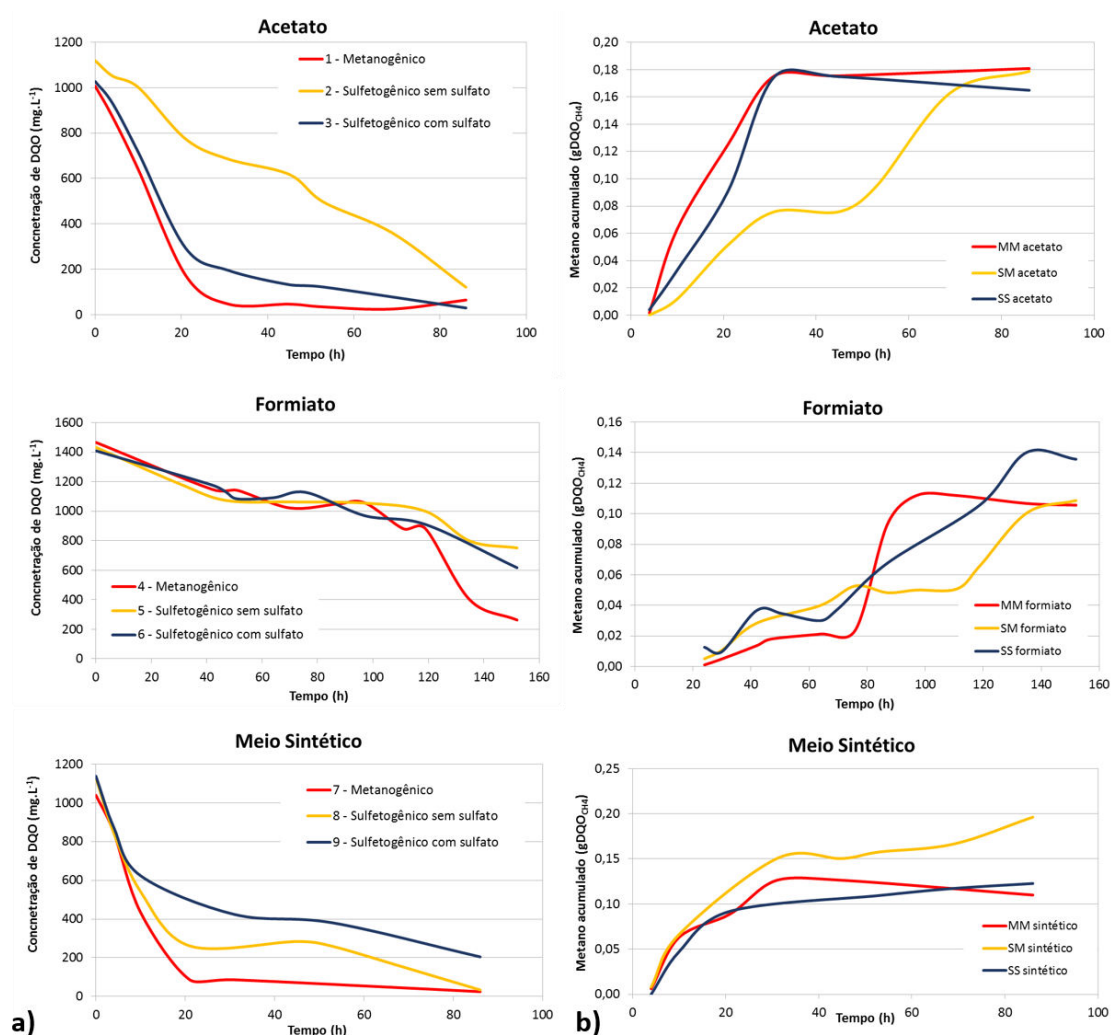
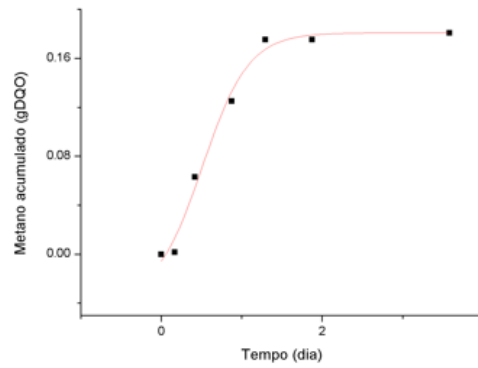


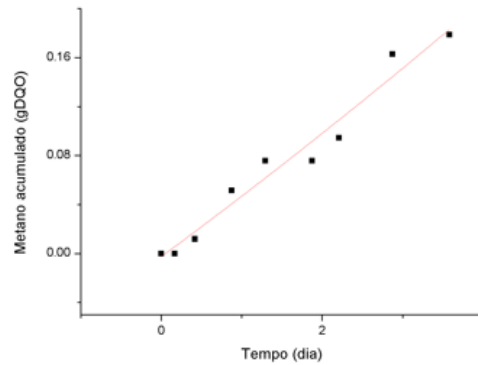
Figura 5.18. Degradação da matéria orgânica (a) e volume acumulado de metano (b) nos frascos de reação.

As curvas obtidas com o ajuste matemático dos dados de metano acumulado à *sigmóide de Boltzman*, bem como seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), estão mostrados na Figura 5.19. (frascos com acetato), na Figura 5.20. (frascos com formiato) e na Figura 5.21. (frascos com meio sintético).

Frasco 1 – Inóculo Metanogênico. $R^2 = 0,98045$.



Frasco 2 – Inóculo Sulfetogênico sem sulfato. $R^2 = 0,94374$.



Frasco 3 – Inóculo Sulfetogênico com sulfato. $R^2 = 0,97135$.

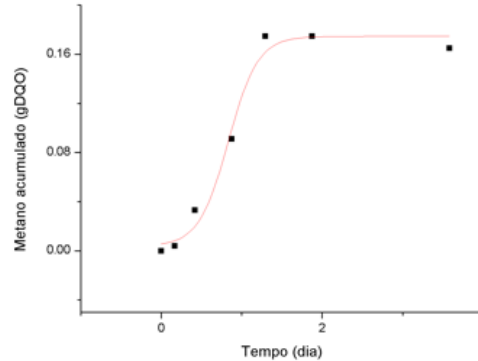


Figura 5.19. Ajustes sigmoidais (*boltzman*) das curvas acumuladas de metano (AME) dos frascos alimentados com acetato.

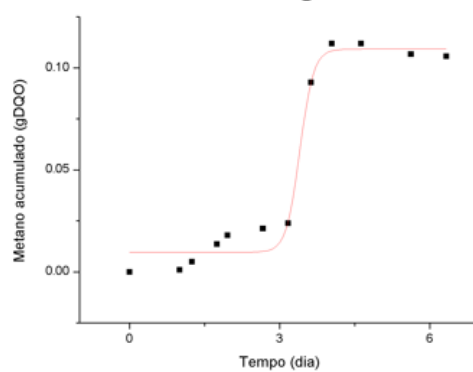
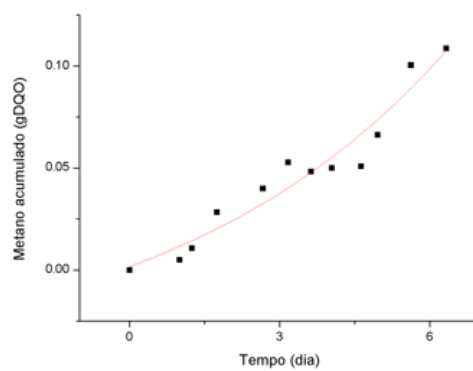
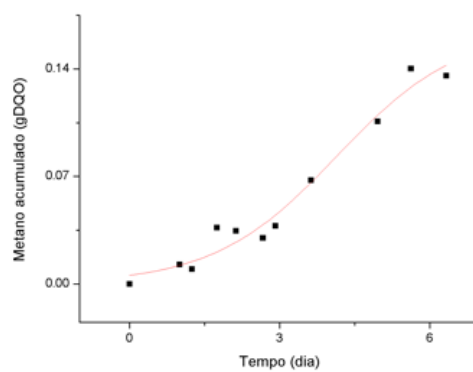
Frasco 4 – Inóculo Metanogênico. $R^2 = 0,97739$.**Frasco 5 – Inóculo Sulfetogênico sem sulfato. $R^2 = 0,91364$.****Frasco 6 – Inóculo Sulfetogênico com sulfato. $R^2 = 0,96036$.**

Figura 5.20. Ajustes sigmoidais (*boltzman*) das curvas acumuladas de metano (AME) dos frascos alimentados com formiato.

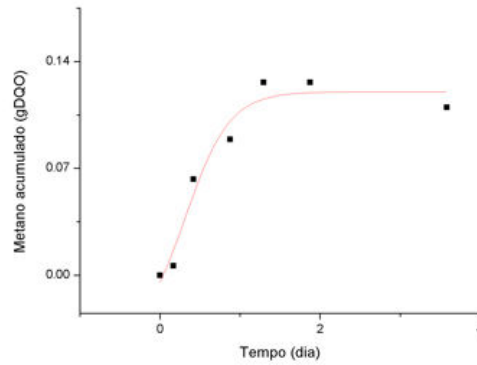
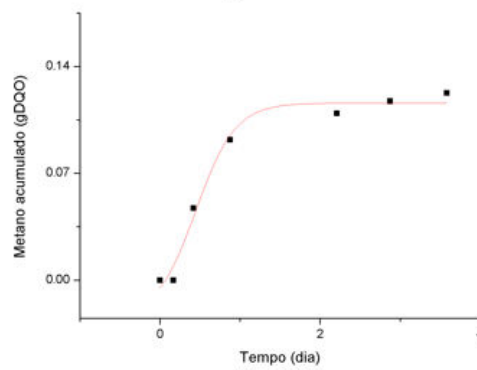
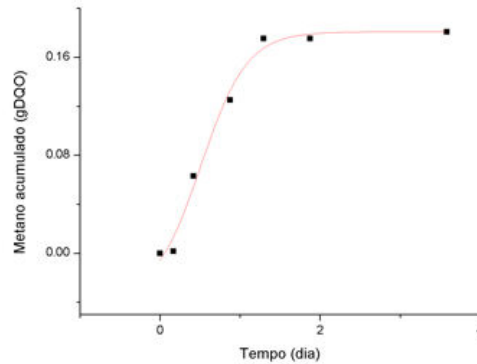
Frasco 7 – Inóculo Metanogênico. $R^2 = 0,92581$.**Frasco 8 – Inóculo Sulfetogênico sem sulfato. $R^2 = 0,95638$.****Frasco 9 – Inóculo Sulfetogênico com sulfato. $R^2 = 0,97174$.**

Figura 5.21. Ajustes sigmoidais (*boltzman*) das curvas acumuladas de metano (AME) dos frascos alimentados com meio sintético.

Partindo dos ajustes sigmoidais das curvas de produção acumulada de metano em cada frasco de reação e seguindo os cálculos indicados no item 4.6 foram estimados os valores de atividade metanogênica específica apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Atividade metanogênica específica (AME).

Frascos	Inóculo	Matéria Orgânica	AME (gDQO _{CH4} ·g SSV ⁻¹ ·d ⁻¹)
1	Metanogênico		1,184
2	Sulfetogênico sem sulfato	Acetato	0,395
3	Sulfetogênico com sulfato		1,656
4	Metanogênico		1,127
5	Sulfetogênico sem sulfato	Formiato	0,198
6	Sulfetogênico com sulfato		0,242
7	Metanogênico	Meio	0,925
8	Sulfetogênico sem sulfato	Sintético	1,407
9	Sulfetogênico com sulfato		1,016

A Figura 5.22 apresenta a concentração acumulada de sulfeto total dissolvido medido ao longo do tempo nos frascos operados com concentração de sulfato.

Vale notar que a aparente queda na concentração de sulfeto total dissolvido observada no Frasco 9 pode ter sido causada pela diminuição no valor de pH do meio (Tabela 5.12), o que ocasionou uma maior liberação de H₂S para a fase gasosa.

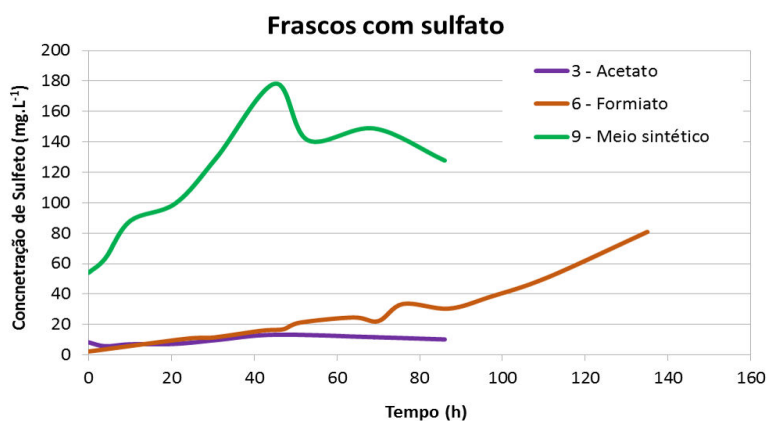


Figura 5.22. Concentração acumulada de sulfeto total dissolvido ao longo do tempo nos frascos contendo sulfato.

A Tabela 5.12 apresenta os valores de pH medidos no início e no final dos ensaios em batelada.

Tabela 5.12. Valores iniciais e finais de pH nos frascos de reação.

Frascos	Inóculo	Matéria Orgânica	pH inicial	pH final
1	Metanogênico		8,28	7,46
2	Sulfetogênico sem sulfato	Acetato	8,40	8,32
3	Sulfetogênico com sulfato		8,28	8,31
4	Metanogênico		8,28	9,37
5	Sulfetogênico sem sulfato	Formiato	8,29	9,30
6	Sulfetogênico com sulfato		8,30	9,31
7	Metanogênico		8,21	6,94
8	Sulfetogênico sem sulfato	Meio Sintético	8,21	6,90
9	Sulfetogênico com sulfato		8,25	7,12

O comportamento observado nos experimentos alimentados com acetato de sódio indicariam uma possível participação das BRS na degradação desse substrato orgânico, uma vez que no frasco inoculado com biomassa do reator metanogênico (Frasco 1) e no frasco que recebeu inóculo do reator sulfetogênico com conteúdo de sulfato (Frasco 3) o acetato decaiu aparentemente a velocidades maiores que no frasco inoculado com biomassa sulfetogênica sem adição de sulfato (Frasco 2) (Figura 5.18).

De fato, no frasco sem a adição de sulfato as BRS teriam sido impossibilitadas de atuar na oxidação do acetato, uma vez que foram privadas do seu aceptor de elétrons, deixando toda a remoção desse substrato a cargo dos microrganismos metanogênicos.

Todavia, não se pode afirmar que no frasco com adição de sulfato uma parcela do acetato foi realmente degradada pelas bactérias redutoras de sulfato, já que não foi detectada produção de sulfeto crescente com o decorrer do experimento (Figura 5.22).

Com relação à produção de biogás, a observação do gráfico do volume de metano acumulado ao longo do tempo (Figura 5.18) revela que o metano foi produzido a partir do acetato mais rapidamente no frasco metanogênico (Frasco 1), seguido do

frasco com biomassa sulfetogênica e alimentado com sulfato (Frasco 3). O frasco com biomassa sulfetogênica sem conteúdo de sulfato (Frasco 2) levou mais tempo para atingir o volume acumulado máximo de metano.

Os valores de AME encontrados para esses frascos (Tabela 5.11) indicaram uma maior atividade metanogênica específica no frasco com inóculo do reator sulfetogênico com concentração de sulfato (Frasco 3, $AME = 1,656 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) seguido do frasco metanogênico (Frasco 1, $AME = 1,184 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$). O frasco com inóculo do sistema sulfetogênico que não recebeu sulfato teve a menor AME (Frasco 3, $AME = 0,395 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$). Assim, a atividade sulfetogênica não se mostrou prejudicial para o estabelecimento da metanogênese acetoclástica. Na ausência da sulfetogênese, porém, a biomassa do reator sulfetogênico não foi capaz de manter a produção de metano às mesmas taxas.

Nos 3 frascos alimentados com formiato foram observadas velocidades de degradação aparentemente próximas nas três condições ao longo das primeiras 120 horas, com menores volumes de metano produzido (Figura 5.18). Esse resultado pode ser devido ao estabelecimento de uma fase inicial de adaptação da biomassa ao substrato orgânico fornecido (*fase lag*). Passado esse período, o frasco inoculado com biomassa do reator metanogênico (Frasco 4) degradou o formiato mais rapidamente que os frascos inoculados com biomassa do reator sulfetogênico.

É compreensível que o frasco com biomassa do sistema sulfetogênico sem adição de sulfato (Frasco 5) fosse menos versátil na degradação do formiato, uma vez que nos sistemas sulfetogênicos operando com baixas relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ a metanogênese hidrogenotrófica é rapidamente suplantada pelas reações de redução do sulfato metabolizadas pelas BRS (Visser *et al.*, 1993c).

Já no caso do frasco inoculado com biomassa do reator sulfetogênico e que recebeu dosagem de sulfato (Frasco 6) seria esperado que essa degradação se processasse em taxas semelhantes ou até mais rápidas que no frasco metanogênico (Frasco 4), uma vez que as BRS seriam capazes de utilizar o hidrogênio mais rapidamente que as arqueias metanogênicas (Stams *et al.*, 2005).

De fato, o aumento na concentração do sulfeto dissolvido comprova a utilização do formiato pelas BRS (Figura 5.22.), todavia essa utilização parece ter se dado em taxas mais lentas que no frasco com inóculo metanogênico.

Uma explicação que pode ser proposta para esse resultado é o fato de nem todos os microrganismos serem hábeis em utilizar o formiato como doador de elétrons (Saia, 2005). Enquanto que alguns microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos foram capazes de converter o formiato a metano, conforme a Equação (5.5), as bactérias redutoras de sulfato presentes no reator sulfetogênico não apresentaram a mesma versatilidade (Isa *et al.*, 1986a).



Outra explicação para esse resultado é que durante o metabolismo de redução do sulfato as BRS podem passar a degradar diretamente os subprodutos da acidogênese, sem a necessidade da formação do hidrogênio como intermediário (Omil *et al.*, 1998). Nesse caso a metanogênese hidrogenotrófica é inibida pela competição entre bactérias acetogênicas e redutoras de sulfato, e não pela competição entre AM e BRS por hidrogênio ou formiato.

Os altos valores de pH ($\geq 9,30$) observados ao final das bateladas dos mesmos

frascos, conforme indicado pela Tabela 5.12, podem também terem sido responsáveis pela inibição da atividade de ambos os grupos de microrganismos (AM e BRS).

Os valores de AME obtidos para os frascos alimentados com formiato (Tabela 5.11) comprovam o estabelecimento da metanogênese hidrogenotrófica no frasco metanogênico, que apresentou a maior atividade metanogênica específica (Frasco 4, $AME = 1,127 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), enquanto que os frascos com biomassa do reator sulfetogênico não foram hábeis em processar o formiato às mesmas taxas, seja na condição sem adição de sulfato (Frasco 5, $AME = 0,198 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), quanto com adição de sulfato (Frasco 6, $AME = 0,242 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$).

No caso dos experimentos realizados com a fração orgânica igual à do meio sintético (sacarose, etanol e fenol), foram observadas maiores velocidades de degradação da matéria orgânica nos frascos sem adição de sulfato (Fracos 7 e 8) (Figura 5.18). Já no frasco com meio sintético e adição de sulfato de sódio (Frasco 9) a remoção da matéria orgânica parece ter sido retardada, podendo isso ser devido à maior geração de acetato proporcionada pelas BRS oxidadoras incompletas (Figura 5.23).

Outra explicação a ser levada em conta seria o aumento nas concentrações do sulfeto total dissolvido (Figura 5.22.), o qual pode ter restringido a atuação das AM, uma vez que em crescimento suspenso os microrganismos se mostram mais suscetíveis à toxicidade causada pelo sulfeto (Maillacheruvu *et al.*, 1993; O'Flaherty *et al.*, 1998a).

Os cálculos das atividades metanogênicas específicas resultaram em maiores valores nos frascos alimentados com meio sintético e inoculados com biomassa do reator sulfetogênico (Tabela 5.11). Enquanto o frasco metanogênico (Frasco 7) alcançou AME de $0,925 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, o frasco com biomassa sulfetogênica sem adição de sulfato alcançou AME de $1,407 \text{ g DQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Frasco 8) e o frasco

com adição de sulfato alcançou AME de 1,016 g DQO_{CH4}.g SSV⁻¹.dia⁻¹.

Esses resultados apontam para o desenvolvimento de uma biomassa metanogênica no reator sulfetogênico adaptada ao meio sintético e capaz de processar o acetato produzido pela fermentação e pela atuação das BRS oxidadoras incompletas à taxas mais altas que a biomassa do reator exclusivamente metanogênico.

Os mesmos frascos, alimentados com conteúdo de sacarose, etanol e fenol também foram analisados quanto à formação e ao consumo de ácidos orgânicos voláteis e álcoois ao longo do tempo de duração das bateladas, sendo os resultados obtidos nessas análises apresentados na Figura 5.23.

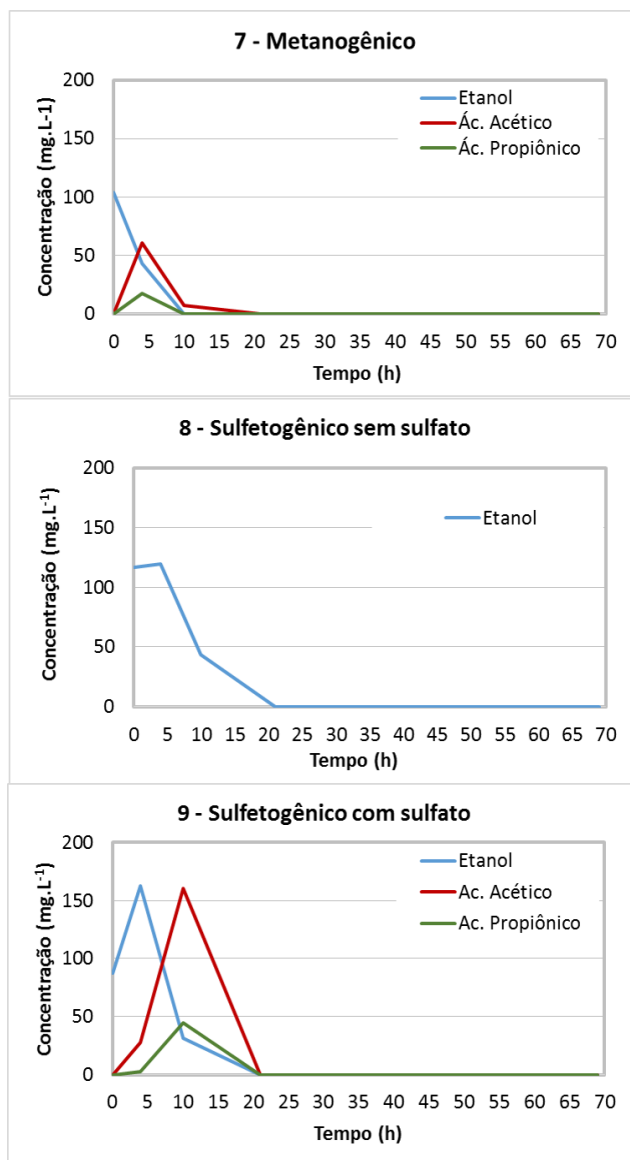


Figura 5.23. Concentração de ácido acético, ácido propiônico e etanol nos frascos alimentados com meio sintético.

O perfil temporal de ácidos e álcoois mostra que no frasco operado com biomassa metanogênica (Frasco 7) o etanol começou a ser consumido logo após a partida da batelada. A produção de ácido acético como produto da fermentação, por sua vez, iniciou após as primeiras 4 h de duração do experimento, chegando a cerca de 60 mg.L⁻¹, sendo removido durante as 6 h seguintes (Figura 5.23).

No caso do frasco inoculado com biomassa sulfetogênica mas sem adição de sulfato (Fracos 8), o etanol só passou a ser consumido após as 4 h iniciais de operação. Isso poderia indicar o fato de, em condições sulfetogênicas, a conversão do etanol ser efetuada preferencialmente pelas BRS (Szewzyk & Pfennig, 1990; Jing *et al.*, 2013). A ausência do sulfato como acceptor de elétrons impediria a atividade das BRS oxidadoras de etanol, o qual passaria a ser convertido pelas bactérias fermentativas. Esse frasco não apresentou concentrações quantificáveis de acetato, o qual foi provavelmente removido via metanogênese acetoclástica, como indicado pela produção de metano, a qual foi superior com relação aos outros dois frascos com meio sintético (Figura 5.18).

Já o frasco inoculado com biomassa sulfetogênica e alimentado com sulfato (Frasco 9) apresentou uma produção de etanol durante as 4 h iniciais da batelada, chegando a uma concentração de cerca de 150 mg.L^{-1} . Foi observada também uma concentração de ácido acético crescente da ordem de 30 mg.L^{-1} às 4 h e 160 mg.L^{-1} às 10 h, o qual foi totalmente consumido em seguida até as 20 h (Figura 5.23), confirmando assim a atuação das BRS oxidadoras incompletas. Às 10 h foi detectada uma concentração de cerca de 40 mg.L^{-1} de ácido propiônico, o qual foi completamente removido na sequência.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O reator sulfetogênico, após um período de adaptação de 145 dias (Fases I a V), apresentou eficiências de remoção de matéria orgânica ($\geq 96\%$) similares às obtidas no reator metanogênico, alcançando também altas eficiências de remoção de sulfato ($\geq 97\%$). Esse resultado indica o potencial dos sistemas sulfetogênicos aplicados à remoção combinada de matéria orgânica e sulfato para as cargas orgânicas aplicadas e relações DQO/SO_4^{2-} testadas neste trabalho;
- ✓ O reator sulfetogênico foi capaz de manter uma maior produção de alcalinidade mesmo após a redução da adição de bicarbonato (Fase VII), comprovando a capacidade de tamponamento superior desses sistemas com relação aos sistemas exclusivamente metanogênicos;
- ✓ A produção volumétrica de metano foi superior no reator metanogênico, confirmando a hipótese da utilização de parte da matéria orgânica pela rota de redução do sulfato, com a produção de sulfeto ao invés de metano nos sistemas sulfetogênicos;
- ✓ O rendimento de metano no sistema sulfetogênico chegou a próximo dos valores alcançados no sistema metanogênico, superando-o inclusive durante a Fase V ($327 \pm 19 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{removida}}^{-1}$ no reator sulfetogênico contra $316 \pm 11 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{removida}}^{-1}$ no reator metanogênico) e também durante a Fase VII

($321 \pm 19 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{removida}}^{-1}$ no reator sulfetogênico contra $315 \pm 19 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{gDQO}_{\text{removida}}^{-1}$ no reator metanogênico), indicando que a rota de oxidação incompleta da matéria orgânica para redução do sulfato, com produção de acetato, foi desenvolvida nesse sistema, viabilizando o estabelecimento dos processos de remoção de sulfato e matéria orgânica acoplados à recuperação de energia via produção de biogás;

- ✓ Os benefícios ocasionados pela sulfetogênese, como a manutenção da capacidade tampão do sistema, bem como a possibilidade de manter a acetogênese pela via de redução do sulfato independentemente da pressão parcial de hidrogênio, fornecendo substratos para metanogênese, compensa o elevado tempo de estabilização do sistema, com o alcance de elevadas eficiências de remoção combinada de matéria orgânica e sulfato nas cargas orgânicas aplicadas e relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ testadas;

- ✓ A imobilização da biomassa e a configuração de reator utilizada permitiram que os microrganismos metanogênicos se aclimassem às condições sulfetogênicas (concentrações crescentes de H_2S , por exemplo) do sistema combinado, possibilitando-lhe apresentar valores de rendimento de metano próximos aos obtidos no reator exclusivamente metanogênico, chegando inclusive a superar o rendimento deste último em alguns dias da operação, ainda que a produção volumétrica de metano seja sempre inferior em sistemas sulfetogênicos, em função do desvio de elétrons na direção da via de redução do sulfato como consequência da participação das BRS na degradação da matéria orgânica;

- ✓ Comparando-se as quatro últimas fases operacionais (IV, V, VI e VII), que foram operadas com o maior valor de carga orgânica aplicada, a relação DQO/Sulfato de 3 foi a que apresentou as maiores eficiências de remoção de matéria orgânica e sulfato, com maior produção de alcalinidade à bicarbonato no sistema sulfetogênico. A etapa V, por sua vez, operada com relação DQO/Sulfato de 5, possibilitou o alcance de maior produção e rendimento de metano nesse sistema, seguida pela etapa VII;

- ✓ O reator de leito fixo ordenado possibilitou o estabelecimento dos processos anaeróbios, metanogênicos e de redução de sulfato satisfatoriamente, sem que houvesse ocorrência de colmatção do leito ou necessidade de realizar a drenagem do reator (purga) ao longo de todo o tempo de operação. A área de escoamento transversal livre, proporcionada por esta configuração de reator, parece ter colaborado com a precipitação dos sulfetos metálicos formados, os quais não se depositaram completamente sobre o biofilme, mas puderam sedimentar nas partes inferiores do reator, evitando possivelmente problemas de transferência de massa no sistema sulfetogênico.

7. SUGESTÕES

- ✓ Realização de estudos comparativos dos dois reatores (metanogênico e sulfetogênico) com aplicação de maiores valores de carga orgânica como forma de se verificar a manutenção do desempenho e equilíbrio alcançado por ambos os sistemas;
- ✓ Avaliar menores dosagens de alcalinidade externa buscando definir valores ótimos que aliem menores custos com suplementação à sustentação de desempenho satisfatório no tratamento pretendido;
- ✓ Realização de análises microbiológicas com o objetivo de se avaliar comparativamente as populações estabelecidas em ambos os reatores (metanogênico e sulfetogênico) como resultado do período de adaptação às diferentes condições e da pressão de seleção a que o inóculo foi submetido;
- ✓ Avaliação do potencial de recuperação de metais a partir do aproveitamento dos sulfetos metálicos insolúveis formados no interior do reator sulfetogênico;
- ✓ Realização de ensaios hidrodinâmicos para a determinação do padrão de escoamento proporcionado pelos reatores de leito fixo ordenado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Annachhatre, A.P.; Suktrakoolvait, S. (2001) **Biological sulfate reduction using molasses as a carbon source.** *Water Environment Research*, v.73, n.1, p.118-126.

APHA (2005) **Standard methods for examination of water and wastewater.** *American Public Health association, Washington, D.C.* 21st Ed.

Aquino, S.F.; Chernicharo, C.A.L., Foresti, E.; Santos, M.L.F.; Monteggia, L.O.; (2007) **Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios.** *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.12, n.2, p.192-201.

Aquino, S.F.; Chernicharo, C.A.L. (2005) **Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle.** *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.10, n.2, p.152-161.

Bekmezci, O.K.; Ucar, D.; Kaksonen, A.H.; Sahinkaya, E. (2011) **Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor.** *Journal of Hazardous Materials*, v.189, n.3, p.670-676.

Bhattacharya, S.K.; Uberoi, V.; Dronamraju, M.M. (1996) **Interaction between acetate fed sulfate reducers and methanogens.** *Water Research*, v.30, n.10, p.2239-2246.

Bock, A.; Prieger-Kraft, A.; Schonheit, P. (1994) **Pyruvate – A novel substrate for growth and methane formation in Methanosarcina barkeri.** *Archives of Microbiology*, n.161, p.33-46.

- Barrera, E.L.; Spanjers, H.; Dewulf, J.; Romero, O; Rosa, E. (2013) **The sulfur chain in biogas production from sulfate-rich liquid substrates: a review on dynamic modeling with vinasse as model substrate.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, n.88, p.1405–1420.
- Bolaños, R.M.L. (2001) **Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas.** 135p. Tese (doutorado). – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Boopathy, R. (1995) **Isolation and characterization of a phenol-degrading, sulfate-reducing bacterium from swine manure.** *Bioresource Technology*, n.54, p.29-33.
- Camiloti, P.R.; Mockaitis, G.; Rodrigues, J.A.D.; Damianovic, M.H.R.Z.; Foresti, E.; Zaiat, M. (2013) **Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, doi:10.1002/jctb.4199.
- Cao, J.; Zhang, G; Mao, Z.; Li, Y.; Fang, F.; Chao, Y. (2012) **Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria.** *International Journal of Mineral Processing*, n.106–109, p.58–64.
- Choi, E.; Rim, J.M. (1991) **Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment.** *Water Science and Technology*, n.23, p.1259–1264.
- Colleran, E.; Finnegan, S.; Lens, P. (1995) **Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams.** *Antonie van Leeuwenhoek*, n.67, p.29-46.
- Damianovic, M.H.R.Z.; Sakamoto, I.K.; Foresti, E. (2006) **Biofilm adaptation to sulfate reduction in anaerobic immobilized biomass reactors subjected to different COD/sulfate ratios.** *Water Science & Technology*, v.54, n.2, p.119-126.

- Damianovic, M.H.R.Z.; Foresti, E. (2007) **Anaerobic degradation of synthetic wastewaters at different levels of sulfate and COD/Sulfate ratios in horizontal-flow anaerobic reactors (HAIB).** *Environmental Engineering Science*, v.24, n.3, p.383-393.
- Damianovic, M.H.R.Z.; Foresti, E. (2009). **Sulfate and organic matter removal from paper recycling plant wastewater in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor.** *Process Biochemistry*, n.44, p.1050-1054.
- Dar, S.A.; Kleerebezem, R.; Stams, A.J.M.; Kuenen, J.G.; Muyzer, G. (2008) **Competition and coexistence of sulphate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulphate ratio.** *Applied Microbiology Biotechnology*, n.78, p.1045-1055.
- España-Gamboa, E.; Barahona-Perez, L.; Dominguez-Maldonado, J.; Mijangos-Cortes, J.; Hernández-Zarate, G.; Alzate-Gaviria, L. (2011) **Vinasses: characterization and treatments.** *Waste Management & Research*, p.1-17.
- Esposito, G.; Weijma, J.; Pirozzi, F.; Lens, P.N.L. (2003). **Effect of the sludge retention time on H₂ utilization in a sulfate-reducing gas-lift reactor.** *Process Biochemistry*, n.39, p.491-498.
- Fang, H.H.P.; Liu, Y.; Chen, T. (1997) **Effect of sulfate on anaerobic degradation of benzoate in UASB reactors.** *Journal of Environmental Engineering*, v.123, n.4, p.320-328.
- Franklin, R.J. (2001) **Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater.** *Water Science and Technology*, v.44, n.8, p.1-6.

- Greben, H.A.; Marae, J.P.; Mnqanqeni, S. (2000) **Comparison between sucrose, ethanol and methanol as carbon and energy sources for biological sulfate reduction.** *Water Science and Technology*, v.41, n.12, p.247-253.
- Hansen, T.A. (1994) **Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes.** *Antonie van Leeuwenhoek*, n.66, p.165-185.
- Hao, O.J. (2003) **Sulphate-reducing bacteria.** In: Mara, D.; Horan, N.J. (Eds.), *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, London, p.459-469.
- Harada, H.; Uemura, S.; Momonoi, K. (1994) **Interaction between sulphate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulphate.** *Water Research*, v.28, n.2, p.355-367.
- Harper, S.R.; Pohland, F.G. (1986) **Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.28, n.4, p.585-602.
- Hilton, B.L.; Oleszkiewicz, J.A. (1988) **Sulfide-induced inhibition of anaerobic digestion.** *Journal of Environmental Engineering*, n.114, p.1377-1391.
- Hulshoff Pol, L.W.; Lens, P.N.L.; Stams, A.J.M.; Lettinga, G. (1998) **Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters.** *Biodegradation*, n.9, p.213-224.
- Isa, Z.; Grusenmeyer, S.; Verstraete, W. (1986a) **Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Technical aspects.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, n.3, p.572-579.

- Isa, Z.; Grusenmeyer, S.; Verstraete, W. (1986b) **Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Microbiological aspects.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, n.3, p.580-587.
- Jing, Z.; Hu, Y.; Niu, Q.; Liu, Y.; Li, Y.; Wang, X.C. (2013) **UASB performance and electron competition between methane-producing archae and sulfate-reducing bacteria in treating sulfate-rich wastewater containing ethanol and acetate.** *Bioresource Technology*, n.137, p.349-357.
- Khardenavis, A.A.; Kapley, A.; Purohit, H.J. (2008) **Phenol-mediated improved performance of active biomass for treatment of distillery wastewater.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, n.62, p.38-45.
- Koster, I.W.; Rinzema, A.; de Vegt, A.L.; Lettinga, G. (1986) **Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at different pH levels.** *Water Research*, v.20, n.12, p.1561-1567.
- Lawrence, A.W.; McCarty, P.L.; Guerin, F. (1966) **The effects of sulfides on anaerobic treatment.** *International Journal of Air and Water Pollution*, n.110, p.2207-2210.
- Lens, P.N.L.; Vallero, G.; Esposito, G.; Zandvoort, M. (2002) **Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology.** *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, n.1, p.311–325.
- Lens, P.N.L.; Visser, A.; Janssen, A.J.H.; Hulshoff Pol, L.W.; Lettinga, G. (1998) **Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.28, n.1, p.41–88.
- Li, Y.Y.; Lam, S.; Fang, H.H.P. (1996) **Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate.** *Water Research*, v.30, n.7, p.1555-1562.

- Liamleam, W.; Annachhatre, A.P. (2007) **Electron donors for biological sulfate reduction.** *Biotechnology Advances*, n.25, p.452–463.
- Lin, Y.H.; Lee, K.K. (2001) **Verification of anaerobic biofilm model for phenol degradation with sulfate reduction.** *Journal of Environmental Engineering*, v.127, n.2, p.119-125.
- Maillacheruvu, K.Y.; Parkin, G.F.; Peng, C.Y.; Kuo, W.; Oonge, Z.I.; Lebduschka, V. (1993) **Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics.** *Water Environment Research*, v.65, n.2, p.100-109.
- McCarty, P.L. (1964) **Anaerobic Waste Treatment Fundamentals.** *Public Works*, v.95, n.9, 10,11 e 12.
- McCartney, D.M.; Oleszkiewicz, J.A. (1993) **Competition between methanogens and sulfate reducers: Effect of COD/Sulfate ratio and acclimation.** *Water Environment Research*, v.65, n.5, p.655-664.
- Mockaitis, G. (2011) **Remoção de Cd²⁺ e Cu²⁺ de águas residuárias utilizando biorreator anaeróbio contínuo de leito fixo ordenado.** 325p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Moraes, E.M.; Adorno, M.A.T.; Zaiat, M.; Foresti, E. (2000). **Assessment of total volatile acids by gas chromatography in anaerobic bioreactor liquid waste.** In: *Proceedings of the VI Latin-American Workshop and Seminar on Anaerobic Digestion*. Recife-Brazil, n.2, p.235-238.
- Mountfort, D.O.; Asher, R.A. (1979) **Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of Methanosarcina barkeri strain DM.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.37, n.4, p.670-675.

- Mulopo, J.; Greben, H.; Sigama, J.; Radebe, V.; Mashego, M.; Burke, L. (2011) **The relationships between sulphate reduction and COD/VFA utilization using grass cellulose as carbon and energy sources.** *Applied Biochemistry Biotechnology*, n.163, p.393-403.
- Muyzer, G.; Stams, A.J.M. (2008) **The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria.** *Nature Reviews: Microbiology*, v.6, p.441-454.
- Nielsen, P.H. (1987) **Biofilm dynamics and kinetics during high-rate sulfate reduction under anaerobic conditions.** *Applied And Environmental Microbiology*, v.53, n.1, p.27-32.
- O'Flaherty, V.; Mahony, T.; O'Kennedy, R.; Colleran, E. (1998a) **Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria.** *Process Biochemistry*, v.33, n.5, p.555-569.
- O'Flaherty, V.; Lens, P.; Leahy, B.; Colleran, E. (1998b) **Long-term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater.** *Water Research*, v.32, n.3, p.815-825.
- O'Flaherty, V.; Colleran, E. (1999). **Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. II: microbial interactions and toxic effects.** *Bioresource Technology*, n.68, p.101–107.
- Omil, F.; Lens, P.N.L.; Hulshoff Pol, L.; Lettinga, G. (1996) **Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor.** *Process Biochemistry*, v.31, n.7, p.699-710.

- Omil, F.; Visser, A.; Hulshoff Pol, L.W.; Lettinga, G. (1997) **Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido en sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares.** *Afinidad*, v.54, n.471, p.353-471.
- Omil, F.; Lens, P.N.L.; Visser, A.; Hulshoff Pol, L.W.; Lettinga, G. (1998) **Long-Term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids.** *Biotechnology bioengineering*, n. 57, p.676-685.
- Overmeire, A.; Lens, P.N.L.; Verstraete, W. (1994) **Mass transfer limitation of sulfate in methanogenic aggregates.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.44, p.387-391.
- Parnaudeau, V.; Condom, N.; Oliver, R.; Cazevieuille, P.; Recous, S. (2008) **Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes.** *Bioresource Technology*, n.99, p.1553–1562.
- Prada, S.M.; Guekezian, M.; Suárez-Iha, M.E.V. (1998) **Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto.** *Química Nova*, v.21, n.3, p.249-252.
- Rintala, J.A.; Puhakka, J.A. (1994) **Anaerobic treatment in pulp-and paper-mill waste management: A Review.** *Bioresource Technology*, n.47, p.1-18.
- 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*, n.58, p.406-465.
- Rocha, V.C. (2012) **Processamento anaeróbico de vinhaça pré-tratada com biopolímero à base de cálcio.** 86p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- Saia, F.T. (2005) **Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: Avaliação do potencial de degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)**. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Salomon, K.R.; Lora, E.E.S. (2009) **Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil**. *Biomass and bioenergy*, n.33, p.1101-1107.
- Sahinkaya, E.; Gungor, M. (2010) **Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater**. *Bioresource Technology*, v.101, p.9508-9514.
- Silva, A.J.; Varesche, M.B.A.; Foresti, E.; Zaiat, M. (2002) **Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor**. *Process Biochemistry*, n.37, p.927–935.
- Silva, A.J.; Hirasawa, J.S.; Varesche, M.B.; Foresti, E.; Zaiat, M. (2006) **Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea**. *Anaerobe*, n.12, p.93–98.
- Smul, A.; Goethals, L.; Verstraete, W. (1999) **Effect of COD to sulphate ratio and temperature in expanded-granular-sludge-blanket reactors for sulphate reduction**. *Process Biochemistry*, n.34, p.407–416.
- Speece, R.E. (1983) **Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment**. *Environmental Science and Technology*, v.17, n.9, p.416A-427A.
- Stams, A.J.M.; Plugge, C.M.; de Bok, F.A.M.; van Houten, B.H.G.W.; Lens, P.N.L.; Dijkma, H.; Weijma, J. (2005) **Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors**. *Water Science & Technology*, v.52, n.1-2, p.13–20.

- Szewzyk, R.; Pfennig, N. (1990) **Competition for ethanol between sulfate-reducing and fermenting bacteria.** *Archives of Microbiology*, v.153, n.5, p.470-477.
- Thiele, J.H.; Zeikus, J.Z. (1988) **Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: Significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs.** *Applied and Environmental Microbiology*, n.54, p.20–29.
- Torres, P. (1992) **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários.** 185p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Touzel, J. P.; Albagnac, G. (1983) **Isolation and characterization of Methanococcus-Mazei strain MC3.** *FEMS Microbiology Letters*, v.16, n.2-3, p.241-245.
- Utgikar, V.P.; Harmon, S.M.; Chaudhary, N.; Tabak, H.H.; Govind, R.; Haines, J.R.; (2002) **Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage.** *Environmental Toxicology*, v.17, n.1, p.40–48.
- Villa-Gomez D., Ababneh H., Papirio S., Rousseau D.P.L., Lens, P.N.L. (2011) **Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inversed fluidized bed reactors.** *Journal of Hazardous Materials*, v.192, p.200-207.
- Vilela, R.S. (2012) **Remoção de matéria orgânica de águas residuárias com elevada concentração de sulfato pelas vias sulfetogênica e metanogênica combinadas.** 120p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- Visser, A.; Gao, Y.; Lettinga, G. (1993a) **Effects of pH on methanogenesis and sulphate reduction in thermophilic (55°C) UASB reactors.** *Bioresource Technology*, n.44, p.113-121.
- Visser, A.; Alphenaar, P.A.; Gao, Y.; van Rossum, G.; Lettinga, G. (1993b) **Granulation and immobilisation of methanogenic and sulfate-reducing bacteria in high-rate anaerobic reactors.** *Applied Microbiology Biotechnology*, n.40, p.575-581.
- Visser, A.; Beeksmā, I.; van der Zee, A.; Stams, A.J.M.; Lettinga, G. (1993c) **Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentrations.** *Applied Microbiology Biotechnology*, n.40, p.549-556.
- Vossoughi, M.; Shakeri, M.; Alemzadeh, I. (2003). **Performance of anaerobic baffled reactor treating synthetic wastewater influenced by decreasing COD/SO₄ ratios.** *Chemical Engineering and Processing*, n.42, p.811- 816.
- Wilkie, A.; Riedesel K.; Owens, J. (2000) **Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks.** *Biomass and Bioenergy*, n.19, p.63–102.
- Winfrey, M. R., and J. G. Zeikus. 1977. **Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments.** *Applied and Environmental Microbiology*, n.33, p.275-281.
- Yoda, M.; Kitagawa, M.; Miyaji, Y. (1987) **Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm.** *Water Research*, v.21, n.12, p.1547-1556.

Zaiat, M.; Cabral, A.K.A.; Foresti, E. (1994) **Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: Concepção e avaliação preliminar de desempenho.** *Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Química, São Carlos*, v.11, n.2, p.33-42.

ANEXO A – CONSTRUÇÃO DOS DIAGRAMAS BOXPLOT

Tabela A1 – *Boxplot* da eficiência de remoção de matéria orgânica no reator metanogênico.

Análise Estatística	Fases Operacionais						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Menor valor não outlier	61	63	92	93	93	95	96
Quartil 1	70	74	94	94	95	96	97
Mediana	74	79	95	94	96	96	97
Quartil 3	76	86	95	95	97	97	98
Maior valor não outlier	77	93	96	95	97	98	98
Limite inferior	60	57	91	92	93	93	95
Intervalo interquartílico - DQ	6	11	2	1	2	1	1
Limite superior	85	103	97	97	99	99	99
Mínimo	9	11	2	1	2	1	0
Quartil 1	70	74	94	94	95	96	97
Mediana	4	5	1	1	1	0	0
Quartil 3	2	7	0	1	0	1	0
Máximo	1	7	1	0	1	1	0

Tabela A2 – *Boxplot* da eficiência de remoção de matéria orgânica no reator sulfetogênico.

Análise Estatística	Fases Operacionais						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Menor valor não outlier	80	62	84	78	87	93	94
Quartil 1	77	67	85	79	87	94	96
Mediana	80	72	85	83	89	94	97
Quartil 3	80	80	86	87	91	94	97
Maior valor não outlier	80	80	88	88	92	94	97
Limite inferior	72	49	82	68	82	93	94
Intervalo interquartílico - DQ	3	12	1	8	4	0	1
Limite superior	85	98	88	99	96	95	98
Mínimo	-3	5	0	1	0	0	1
Quartil 1	77	67	85	79	87	94	96
Mediana	3	5	1	4	2	0	1
Quartil 3	0	8	1	4	2	0	0
Máximo	0	1	2	1	2	0	1

Tabela A3 – *Boxplot* da eficiência de remoção de sulfato no reator sulfetogênico.

Análise Estatística	Fases Operacionais						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Menor valor não outlier	81	86	57	78	83	94	95
Quartil 1	82	87	64	83	90	96	96
Mediana	83	88	86	86	95	98	97
Quartil 3	84	89	87	89	96	98	99
Maior valor não outlier	84	90	94	90	96	99	99
Limite inferior	80	83	31	74	83	92	93
Intervalo interquartilico - DQ	2	2	22	6	5	3	2
Limite superior	86	93	120	97	103	102	102
Mínimo	1	1	8	5	8	1	1
Quartil 1	82	87	64	83	90	96	96
Mediana	1	1	22	3	4	2	1
Quartil 3	0	1	1	2	1	0	1
Máximo	0	1	7	2	1	1	0

Tabela B2 – ANOVA dos valores de rendimento de metano.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM
Tratamentos	13	40.1 e+04	30.9 e+03
Erro	126	11.5 e+04	91.6 e+01

F = 337.025

(p) = < 0,0001

Média (Coluna 1) =	2.346.000	Fase I	<i>Reator Sulfetogênico</i>
Média (Coluna 2) =	2.300.000	Fase II	
Média (Coluna 3) =	1.897.000	Fase III	
Média (Coluna 4) =	2.111.000	Fase IV	
Média (Coluna 5) =	3.302.000	Fase V	
Média (Coluna 6) =	2.958.000	Fase VI	
Média (Coluna 7) =	3.249.000	Fase VII	
<hr/>			
Média (Coluna 8) =	2.516.000	Fase I	<i>Reator Metanogênico</i>
Média (Coluna 9) =	2.461.000	Fase II	
Média (Coluna 10) =	1.552.000	Fase III	
Média (Coluna 11) =	2.457.000	Fase IV	
Média (Coluna 12) =	3.160.000	Fase V	
Média (Coluna 13) =	3.183.000	Fase VI	
Média (Coluna 14) =	3.135.000	Fase VII	

Tukey	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 8) =	170.000	17.767	ns
Médias (2 a 9) =	161.000	16.826	ns
Médias (3 a 10) =	345.000	36.057	ns
Médias (4 a 11) =	346.000	36.161	ns
Médias (5 a 12) =	142.000	14.841	ns
Médias (6 a 13) =	225.000	23.515	ns
Médias (7 a 14) =	114.000	11.914	ns