

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

INAÊ ALVES

**Efeito das taxas de recirculação e das cargas orgânicas nos grânulos da
manta de lodo de reatores UASB utilizados no processamento da vinhaça de
cana-de-açúcar visando à produção de metano**

São Carlos – SP

2019

INAÊ ALVES

Efeito das taxas de recirculação e das cargas orgânicas nos grânulos da manta de lodo de reatores UASB utilizados no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar visando à produção de metano

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

Orientador: Prof. Tit. Eduardo Cleto Pires

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – SP

2019

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

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

A474e Alves, Inaê
 Efeito das taxas de recirculação e das cargas orgânicas nos grânulos da manta de lodo de reatores UASB utilizados no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar visando à produção de metano / Inaê Alves; orientador Eduardo Cleto Pires. São Carlos, 2019.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.

 1. grânulos. 2. dimensão granular. 3. resistência granular. 4. estrutura granular. 5. manta de lodo. 6. UASB. 7. vinhaça. 8. metano. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **INAÊ ALVES**.

Título da tese: "Efeito das taxas de recirculação e das cargas orgânicas nos grânulos da manta de lodo de reatores UASB utilizados no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar visando à produção de metano".

Data da defesa: 01/04/2019.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Eduardo Cleto Pires**
(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Dra. **Valéria Del Nery**

(BIOPROJ Tecnologia Ambiental)

Aprovada

Profa. Dra. **Nélla Henriques Callado Sarmiento**

(Universidade Federal de Alagoas/UFAL)

Aprovada

Prof. Dr. **Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim**

(Universidade Federal de Alagoas/UFAL)

Aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

A minha mãe, Rosangela Alves,
por todas as orações e amor incondicional.

A ela devo cada dia da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois foi por meio da fé que caminhei até aqui.

A minha mãe, Rosângela Alves, que se interessou, participou, leu meus textos, opinou, fez-se presente em todos os momentos.

Ao meu padrasto, Carlos Galindo, pelo incentivo, por acreditar e por tanto carinho.

A minha irmã e melhor amiga, Náíade, por muitas vezes ser minha “psicóloga”, me ouvindo, aconselhando, ajudando.

Aos meus avós, Cícero Laurindo e Maria Lucimar, exemplos de honestidade e perseverança, alicerce da nossa família.

A toda minha família, tia Rô, tio Jairo, Gabriel, Carol, Gabi e Larissa.

Ao Roberto Alves que me apoiou desde o início a fazer o doutorado.

Ao Blim Lopes, meu cunhado, por sempre estar disponível a ajudar. Uma das pessoas mais generosas que conheci.

Ao meu eterno orientador, Eduardo Lucena, por me apresentar a pesquisa e por ser sempre um dos meus maiores incentivadores.

Aos meus queridos professores, orientadores e, também, amigos, Eduardo Cleto Pires e Valéria Del Nery. Obrigada pela confiança e pelos ensinamentos. Vocês possibilitaram esse trabalho e o meu crescimento pessoal. Serei sempre grata.

Aos professores do SHS, pelas aulas dadas com responsabilidade e competência.

À Moara, amiga querida, que partilhou comigo a vida no laboratório e fora dele. Não tenho palavras para dizer o quanto foi importante nessa jornada.

Ao Rodrigo Vernini, que presenciou as dificuldades, a ansiedade dos últimos momentos do doutorado. Obrigada por estar ao meu lado.

Ao Danillinho, por esses anos dividindo apartamento, vivências, lutas e vitórias.

Aos amigos de São Carlos, membros do “sancabadalada”, por fazerem essa caminhada mais leve e mais alegre.

À Eloisa Pozzi e Isabel Sakamoto por todo suporte e amizade.

Ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB), onde o estudo foi desenvolvido.

À Usina Rio Pardo, Cerqueira César-SP, por fornecer a vinhaça e, portanto, possibilitar o desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto e ao Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

ALVES, I. **Efeito das taxas de recirculação e das cargas orgânicas nos grânulos da manta de lodo de reatores UASB utilizados no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar visando à produção de metano.** 2019. 194 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Quatro reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), em escala piloto, foram utilizados neste estudo para processamento anaeróbio da vinhaça, proveniente da produção de álcool de cana-de-açúcar. Os reatores, R1, R2, R3 e R4, foram inoculados com lodo anaeróbio granulado; submetidos a diferentes taxas de recirculação - 50, 100, 200 e 400%, respectivamente - e ao aumento gradativo da carga orgânica volumétrica (COV) de 0,3 a 20 gDQOL⁻¹d⁻¹. O objetivo do estudo foi o acompanhamento do efeito que essas mudanças operacionais provocam na manta de lodo granular e associar as características dos grânulos à eficiência global do sistema. Para tanto, realizaram-se análises físicas, químicas e biológicas na manta de lodo, durante o incremento da COV. Estudaram-se a distribuição de dimensão, a resistência, a composição de metais e a estrutura microbiana dos grânulos em diferentes condições operacionais. O tamanho dos grânulos analisados variou de 0,4 a 5,0 mm em todas as amostras, no inóculo e nos quatro reatores. Os reatores submetidos às maiores porcentagens de recirculação, R3 e R4, apresentaram na COV mais baixa analisada (5 gDQOL⁻¹d⁻¹) maior frequência de grânulos na faixa entre 1,6 e 2,0 mm de diâmetro, com 39,4 e 37% de frequência, respectivamente. O contínuo aumento de carga orgânica e velocidade ascensional provocou redução do diâmetro granular para a menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm). Na maior COV analisada (20 gDQOL⁻¹d⁻¹), R3 e R4 apresentaram 63,6 e 79,1% de grânulos com diâmetro médio na faixa 0,4 a 1,0 mm, respectivamente. Os reatores submetidos a menores porcentagens de recirculação, R1 e R2, em todas as COV analisadas, apresentaram diâmetro médio de grânulos na menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm). O incremento gradativo de carga orgânica e velocidade ascensional provocou aumento da frequência de grânulos na menor faixa de diâmetro: R1 passou de 47,8 para 87,9% e R2 de 39,4 para 52,1%. A agitação de 770 s⁻¹ aplicada aos grânulos reforçou que a agitação hidráulica dentro do reator causou redução no diâmetro granular. Em todos os reatores foram visualizados organismos metanogênicos do gênero *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Na quantidade fornecida e devido à lenta exposição dos microrganismos à água residuária, os metais presentes na vinhaça não foram prejudiciais a atividade microbiana. Zinco, ferro, magnésio, cálcio, sódio e potássio apareceram de forma expressiva dentre as substâncias encontradas na água residuária. As análises de PCR e DGGE mostraram que a população metanogênica foi mais estável que a de bactérias para os reatores. Foi possível concluir que a recirculação do efluente auxiliou a operação dos reatores e que o reator R2 mostrou ser mais estável, em relação aos demais reatores, quando avaliado todos os parâmetros conjuntamente.

Palavras-chaves: grânulos, dimensão granular, resistência granular, estrutura granular, manta de lodo, UASB, vinhaça, metano.

ABSTRACT

ALVES, I. **Effect of recirculation rates and organic loads on the granules of the UASB reactor sludge blanket used in the processing of sugarcane vinasse for the methane production.** 2019. 194 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Four pilot-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) were used in this study for anaerobic processing of vinasse from the production of sugarcane alcohol. The reactors, R1, R2, R3 and R4, were inoculated with granulated anaerobic sludge; submitted to different recirculation rates of 50, 100, 200 and 400%, respectively, and to the gradual increase of the volumetric organic loading rate (OLR) from 0.3 to 20 gCODL⁻¹d⁻¹. The objective of the study was to monitor the effect of these operational changes on the granular sludge blanket and to associate the characteristics of the granules with the overall efficiency of the system. For this purpose, physical, chemical and biological analyzes were performed on the sludge blanket during OLR increment. The size distribution, resistance, metal composition and microbial structure of the granules in different samples were studied. The size of the granules ranged from 0.4 to 5.0 mm in all samples, in the inoculum and in the four reactors. In the lowest OLR (5 gCODL⁻¹d⁻¹), the reactors submitted to the highest percentages of recirculation, R3 and R4, had a higher frequency of granules in the range of 1.6 to 2.0 mm in diameter, with 39.4 and 37 % of frequency, respectively. The continuous increase in organic load and ascending velocity caused a reduction of the granular diameter to the lowest established range (0.4 to 1.0 mm). At the highest OLR analyzed (20 gDQOL⁻¹d⁻¹), R3 and R4 presented 63.6 and 79.1% of granules with a mean diameter in the range of 0.4 to 1.0 mm, respectively. While the reactors submitted to lower percentages of recirculation, R1 and R2, in all OLR analyzed, presented mean diameter of granules in the lowest range (0.4 to 1.0 mm). The gradual increment of organic load and ascending velocity caused an increase in the frequency of granules in the smallest diameter range: R1 increased from 47.8 to 87.9% and R2 from 39.4 to 52.1%. The 770 s⁻¹ agitation applied to the granules reinforced that hydraulic agitation within the reactor caused reduction in the granular diameter. In all reactors methanogenic organisms of the genus *Methanosarcina* and *Methanosaeta* were visualized. In the quantity supplied and due to the slow exposure of the microorganisms to the wastewater, the nutrients aided the microbial activity. Zinc, iron, magnesium, calcium, sodium and potassium appeared expressively among the substances found in wastewater. PCR and DGGE analyzes showed that the methanogenic population was more stable than the bacteria population. It was possible to conclude that the effluent recirculation aided the operation of the reactors and that R2 reactor seemed to be more stable, in relation to the other reactors, when all parameters were evaluated together.

Keywords: granule, granular dimension, granular resistance, granular structure, sludge blanket, UASB, vinasse, methane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Processo de produção de açúcar e etanol | 38 |
| Figura 2. Etapas da digestão anaeróbia | 41 |
| Figura 3. Estrutura granulométrica..... | 58 |
| Figura 4. Célula do tipo <i>Methanosaeta</i> | 74 |
| Figura 5. Fluxograma das etapas de trabalho | 78 |
| Figura 6. Dimensão do reator do tipo UASB | 82 |
| Figura 7. Fluxograma das etapas de trabalho | 93 |
| Figura 8. Esferas de aço calibradas utilizadas para verificar a precisão do software Image Pro-Plus (versão 6.0) | 98 |
| Figura 9. Relação entre o diâmetro real e o medido e seu R ² | 99 |
| Figura 10. Grânulos expostos em placas de Petri para análise de imagem | 100 |
| Figura 11. Resultado dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria..... | 101 |
| Figura 12. Resultado dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria..... | 101 |
| Figura 13. Comparação da distribuição granulométrica do inóculo com a dos reatores – R1, R2, R3 e R4 - nas COV de 5 a 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | 112 |
| Figura 14. Diâmetro médio dos grânulos (mm) x Aumento da COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | 113 |
| Figura 15. Mediana dos diâmetros dos grânulos (mm) x Aumento da COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) .. | 113 |
| Figura 16. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R1 antes e após agitação de 770 s ⁻¹ | 119 |
| Figura 17. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R2 antes e após agitação de 770 s ⁻¹ | 120 |
| Figura 18. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R3 antes e após agitação de 770 s ⁻¹ | 121 |
| Figura 19. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R4 antes e após agitação de 770 s ⁻¹ | 122 |
| Figura 20. Diâmetro médio dos grânulos dos reatores R1, R2, R3 e R4 em diferentes condições operacionais | 123 |
| Figura 21. Diâmetro mediano dos grânulos dos reatores R1, R2, R3 e R4 em diferentes condições operacionais | 124 |
| Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos do inóculo: a) imagem panorâmica superficial do grânulo; b), c), d) superfície do grânulo - bacilos de dimensões variadas, cocos, | |

| | |
|---|-----|
| e filamentos alongados semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; e), f), g) e h) corte do grânulo – agrupamento de cocos semelhantes a <i>Methanosarcina</i> e a abundância do gênero <i>Methanosaeta</i> | 138 |
| Figura 23. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do inóculo: a), b) arranjo de cocos (prováveis <i>Methanosarcina</i>) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para caracterização de <i>Methanosarcina</i> ; c) cocos destacados em círculo vermelho, bacilos de tamanhos variados e <i>Methanosaeta</i> ; d) bacilos de tamanhos variados; e), f), g, h) arranjo de cocos (prováveis células do tipo <i>Methanosarcina</i>) e as respectivas imagens sob incidência de luz fluorescente para caracterização de <i>Methanosarcina</i> | 139 |
| Figura 24. MEV de grânulos do reator R1 com 50% de recirculação e COV de 10 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a), b) imagem da superfície – células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> e cocos; c) micro rachadura na superfície; d) microrganismos presentes na rachadura: células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; e), f) interior do grânulo – predominância de células do tipo <i>Methanosaeta</i> | 141 |
| Figura 25. MEV de grânulos do reator R1 com 50% de recirculação e COV de 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a) panorâmica do grânulo; b) cocos e poucas células de <i>Methanosaeta</i> ; c) poucos bacilos, presença de cocos e filamento de cocos (provável bactéria); e d) bacilos e cocos... | 142 |
| Figura 26. Microscopia de contraste de fase e fluorescência do reator R1 com COV 10 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a), b) abundância de células do tipo <i>Methanosaeta</i> | 143 |
| Figura 27. Microscopia de contraste de fase e fluorescência do reator R1 com COV 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a) prováveis células de <i>Methanosarcina</i> e arqueias hidrogenotróficas protegidas por emaranhado de material polimérico; b) incidência de luz fluorescente sobre as prováveis células de <i>Methanosarcina</i> e arqueias hidrogenotróficas; c), d) cocos e bacilos de dimensão variada e poucas células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> | 143 |
| Figura 28. MEV de grânulos do reator R2 com 100% de recirculação e COV de 10 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a) superfície – células do tipo <i>Methanosaeta</i> e preponderância de cocos e bacilos; b) leveduras; c), d) interior do grânulo – predominância de bacilos..... | 145 |
| Figura 29. MEV de grânulos do reator R2, com 100% de recirculação e COV de 20 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a) cocos e bacilos; b), c) cocos; d) possíveis células de <i>Methanosaeta</i> e bacilos envolvidos em material polimérico..... | 146 |
| Figura 30. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R2, submetido à COV 10 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a) cocos e bacilos predominantemente; b), c) fragmento de <i>Methanosaeta</i> destacado pela seta vermelha, abundância de células e material polimérico; d) cocos e bacilos, predominantemente; e), f) possíveis arqueias metanogênicas hidrogenotróficas | |

| | |
|--|-----|
| e arranjo de cocos fluorescentes envolvidos em material polimérico e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para caracterização; g), h) arranjo de cocos fluorescentes (prováveis células de <i>Methanosarcina</i>) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para a caracterização..... | 147 |
| Figura 31. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R2, submetidos à COV 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a), b) cocos e bacilos, predominantemente, e algumas células de <i>Methanosaeta</i> possivelmente desestruturadas; c), d) possíveis arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e cocos fluorescentes envolvidos em material polimérico e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação | 148 |
| Figura 32. MEV de grânulos do reator R3, submetidos à COV de 10 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a) células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> identificadas na superfície do grânulo; b) variedade morfologia recoberta por material polimérico; c) interior do grânulo – bacilos com dimensões variadas e cocos; d) interior do grânulo - predominância de <i>Methanosaeta</i> , aparentemente danificadas devido a técnica de corte para visualização do perfil do grânulo | 149 |
| Figura 33. MEV da superfície dos grânulos do reator R3 submetidos à COV de 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a) imagem panorâmica da superfície do grânulo; b), c), d) quantidade significativa de células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; d) Além de <i>Methanosaeta</i> , foram observadas leveduras (cocos com dimensões maiores que às bactérias)..... | 150 |
| Figura 34. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R3 submetidos à COV 10 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a), b) possíveis células de <i>Methanosaeta</i> e bacilos; c), d) agrupamento de cocos (prováveis células de <i>Methanosarcina</i>) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação | 151 |
| Figura 35. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R3 submetidos à COV 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ : a), b), c) células do tipo <i>Methanosaeta</i> predominantemente; d) agrupamento de cocos; e), f) agrupamento de cocos (prováveis células de <i>Methanosarcina</i>) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação..... | 152 |
| Figura 36. MEV de grânulos do reator R4 submetidos à COV de 10 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a) predominância de células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> na superfície do grânulo; b), c) e d) predominância de células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> também no interior do grânulo..... | 153 |
| Figura 37. MEV de grânulos do reator R4 submetidos à COV de 20 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a), b) superfície com predominância de células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> e presença de poucos cocos (destacado em vermelho); c) Além de <i>Methanosaeta</i> , leveduras e cocos (em vermelho); d) predominância de <i>Methanosaeta</i> ; f), g) e h) interior do grânulo – cocos (destacado em vermelho) e células de <i>Methanosaeta</i> | 154 |

| | |
|---|-----|
| Figura 38. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R4 submetidos à COV 10 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a, b) agrupamento de cocos provavelmente do domínio <i>Bacteria</i> (destacada em vermelho), células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; c), d) agrupamento de cocos (prováveis <i>Methanosarcina</i>) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação de <i>Methanosarcina</i> | 155 |
| Figura 39. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R4 submetidos à COV 20 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹ : a), b) predominância de células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; c) cocos envolvido em emaranhado biológico e <i>Methanosaeta</i> ; d) predominância de células semelhantes a <i>Methanosaeta</i> ; e), f) agrupamento de cocos (prováveis células de <i>Methanosarcina</i>) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação | 156 |
| Figura 40. Dendograma relativo aos perfis de banda do domínio <i>Archaea</i> | 160 |
| Figura 41. Índices de similaridade, em porcentagem, obtidas por DGGE considerando a correlação de Pearson para o domínio <i>Archaea</i> | 161 |
| Figura 42. Dendograma relativo aos perfis de banda do domínio <i>Bacteria</i> e os respectivos índices de similaridade em porcentagem (correlação de Pearson)..... | 163 |
| Figura 43. Índices de similaridade, em porcentagem, obtidas por DGGE considerando a correlação de Pearson para o domínio <i>Bacteria</i> | 163 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Reunião de estudos realizados em reator UASB..... | 50 |
| Quadro 2. Estudos sobre estrutura e disposição microbiana em grânulos..... | 62 |
| Quadro 3. Frequência de amostragem e análises realizadas nas amostras dos quatro reatores estudados..... | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e álcool no Brasil, safra 2017/2018 | 35 |
| Tabela 2. Safra 2017/2018 e 2018/2019: posição acumulada entre 1° de abril até 1° de novembro de 2018 | 36 |
| Tabela 3. Características da vinhaça resultante de mostos de melaço, de caldo de cana e misto | 40 |
| Tabela 4. Caracterização da vinhaça diluída utilizada no período operacional..... | 84 |
| Tabela 5. Variação dos parâmetros operacionais | 85 |
| Tabela 6. Testes para avaliar a calibração do <i>software</i> Image Pro-Plus (versão 6.0): número de esferas e placas de Petri utilizadas para análise do <i>software</i> | 97 |
| Tabela 7. Teste para avaliar a calibração do <i>software</i> Image Pro-Plus (versão 6.0): resultados de medição..... | 98 |
| Tabela 8. Resultado dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria..... | 102 |
| Tabela 9. Estatística descritiva dos resultados dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria | 102 |
| Tabela 10. Estatística descritiva dos resultados dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria | 103 |
| Tabela 11. Variação da DQO bruta e filtrada da vinhaça e dos reatores e da eficiência de remoção de DQO em relação à DQO bruta e filtrada..... | 105 |
| Tabela 12. Porcentagem de metano nos gases dos reatores R1, R2, R3 e R4..... | 105 |
| Tabela 13. Rendimento de metano em R1, R2, R3 e R4 comparado com o rendimento teórico | 105 |
| Tabela 14. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores R1, R2, R3 e R4, nas COV de 10 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | 107 |
| Tabela 15. Frequência dos diâmetros de grânulos no lodo utilizado para inocular R1 e do lodo utilizado para inocular R2, R3 e R4 | 108 |
| Tabela 16. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R1 (50% de recirculação) submetido a diferentes COV | 108 |
| Tabela 17. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R2 (100% de recirculação) submetido a diferentes COV..... | 109 |
| Tabela 18. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R3 (200% de recirculação) submetido a diferentes COV..... | 109 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 19. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R4 (400% de recirculação) submetido a diferentes COV | 110 |
| Tabela 20. Média e Mediana dos diâmetros dos grânulos dos reatores com o aumento da COV | 112 |
| Tabela 21. Velocidade ascensional nos reatores R1, R2, R3 e R4 nas diferentes COV aplicadas | 115 |
| Tabela 22. Diâmetro granular e COV dos reatores R1, R2, R3 e R4 quando submetidos a velocidade ascensional de $0,125 \text{ m h}^{-1}$ | 115 |
| Tabela 23. Frequência do diâmetro dos grânulos do inóculo antes e após agitação mecânica. | 116 |
| Tabela 24. Distribuição do diâmetro dos grânulos dos reatores – R1, R2, R3 e R4 - antes e após agitação de 770 s^{-1} | 118 |
| Tabela 25. Diâmetro médio e mediano do inóculo e dos reatores R1, R2, R3 e R4 antes e após agitação de 770 s^{-1} , com os respectivos números de grânulos analisados | 125 |
| Tabela 26. Série de sólidos da manta de lodo dos reatores UASB em diferentes COV | 127 |
| Tabela 27. Relação de STF/ST (mineralização) e de STV/ST da manta de lodo dos reatores UASB em diferentes COV | 128 |
| Tabela 28. Características químicas do lodo no perfil do reator R1 | 133 |
| Tabela 29. Características químicas do lodo no perfil do reator R2 | 134 |
| Tabela 30. Características químicas do lodo no perfil do reator R3 | 135 |
| Tabela 31. Características químicas do lodo no perfil do reator R4 | 136 |
| Tabela 32. Índice de diversidade-Shannon (H)..... | 164 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI – Alcalinidade Intermediária

AME – Atividade Metanogênica Específica

AP – Alcalinidade Parcial

ATR - Açúcar Total Recuperável

BRS – Bactérias Redutoras de Sulfato

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COV – Carga Orgânica Volumétrica

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)

EIA – Estudo de Impacto Ambiental

IB – Índice de Biodegradabilidade

IC – Índice de Competitividade

MINTER – Ministério do Interior

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH – *Potencial Hidrogeniônico*

RIMA – Relatório de Impacto Ambiental

ST – Sólidos Totais

SDT – Sólidos Dissolvidos Totais

SST – Sólidos Suspensos Totais

SFT – Sólidos Fixos Totais

SVT – Sólidos Voláteis Totais

SDF – Sólidos Dissolvidos Fixos

SDV – Sólidos Dissolvidos Voláteis

SSF – Sólidos Suspensos Fixos

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

TDH - Tempo de Detenção Hidráulica

UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{Al}(\text{OH})_3$ – Hidróxido de alumínio

Al^{3+} , Al – íon Alumínio, Alumínio

$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ – Fenol

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ – Hidróxido de Cálcio

Ca^{2+} , Ca – íon Cálcio, Cálcio

CaCO_3 – Carbonato de Cálcio

CaO – Óxido de cálcio (cal virgem)

Cd – Cádmi

Cu – Cobre

Fe – Ferro

H – Índice de diversidade Shannon

H_2S – Sulfeto de Hidrogênio

K – Potássio

Mg^{2+} , Mg – íon Magnésio, Magnésio

Mn – Manganês

Na^+ , Na – íon Sódio, Sódio

NaHCO_3 – Bicarbonato de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NH_3 – Amônia

NH_4 – Metano

NH_4HCO_3 – Bicarbonato de Amônio

Ni – Níquel

N- NO_2 – Nitrogênio Nitrito

N- NO_3 – Nitrogênio Nitrato

Pb – Chumbo

PO_4^{3-} – Fosfato

S^{2-} – Sulfeto

SO_4^{2-} – Sulfato

Zn – Zinco

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 31 |
| 2. | OBJETIVO | 34 |
| 3. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| 4. | REVISÃO DA LITERATURA | 35 |
| 4.1 | Produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar | 35 |
| 4.2 | Legislação referente à vinhaça | 38 |
| 4.3 | Características de vinhaça proveniente da cana-de-açúcar | 39 |
| 4.4 | Aspectos gerais da digestão anaeróbia | 40 |
| 4.5 | Tecnologia anaeróbia e reator UASB | 45 |
| 4.6 | Retenção de biomassa nos sistemas anaeróbios | 52 |
| 4.7 | Teoria sobre o processo de formação de grânulos anaeróbios | 54 |
| 4.8 | Características gerais que influenciam na formação de grânulos | 65 |
| 4.9 | Características físicas, químicas e biológicas do grânulo | 68 |
| | Características físicas dos grânulos | 68 |
| | Características químicas dos grânulos | 70 |
| | Características biológicas dos grânulos | 73 |
| 4.10 | Considerações gerais | 75 |
| 5. | MATERIAL E MÉTODO | 77 |
| 5.1 | ETAPA 1 – Determinação da metodologia para análise de distribuição de diâmetro de grânulos provenientes de lodo anaeróbio | 79 |
| | Detalhes do método | 79 |
| | Equipamentos utilizados no procedimento experimental | 79 |
| 5.2 | ETAPA 2 – Monitoramento da eficiência de remoção de matéria orgânica e de produção de metano dos reatores UASB | 81 |
| | Reatores UASB | 81 |
| | Inoculação | 82 |
| | Água residuária | 82 |
| | Variação dos parâmetros operacionais | 84 |
| | Análise da eficiência global dos reatores | 86 |
| 5.3 | ETAPA 3 - Caracterização física da manta de lodo granular | 87 |

| | |
|---|-----|
| Dimensão dos grânulos _____ | 87 |
| Resistência mecânica dos grânulos _____ | 87 |
| Análise estatística da variação de tamanho de grânulos devido às mudanças operacionais e à agitação mecânica aplicada _____ | 87 |
| Série de Sólidos _____ | 88 |
| 5.4. ETAPA 4 - Caracterização química da manta de lodo granular _____ | 89 |
| Determinação do conteúdo mineral _____ | 89 |
| 5.5 ETAPA 5 - Caracterização biológica manta de lodo granular _____ | 90 |
| Determinação da disposição espacial microbiana _____ | 90 |
| Morfologia dos grânulos _____ | 90 |
| Diversidade da comunidade microbiana _____ | 91 |
| 5.6 Frequência de amostragem _____ | 91 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ | 93 |
| 6.1 ETAPA 1 - Determinação de metodologia para análise da distribuição de diâmetro de grânulos provenientes de lodo biológico _____ | 94 |
| Coleta das amostras do lodo granular para determinação granulométrica _____ | 94 |
| Preparação das amostras de grânulos para determinação granulométrica _____ | 94 |
| Ensaio de determinação granulométrica _____ | 95 |
| Calibração do software analisador de imagem _____ | 95 |
| Procedimento para medição do tamanho dos grânulos _____ | 95 |
| Teste de validação do software analisador de imagem _____ | 96 |
| Determinação e validação do volume de amostra para medição das dimensões dos grânulos _____ | 99 |
| Considerações sobre a metodologia de análise de distribuição granulométrica _____ | 103 |
| 6.2 ETAPA 2 - Monitoramento da eficiência de remoção de matéria orgânica e de produção de metano dos reatores UASB _____ | 104 |
| Monitoramento da eficiência de remoção de COV e de produção de metano _____ | 104 |
| Caracterização da concentração de ácidos orgânicos dos reatores UASB _____ | 105 |
| 6.3 ETAPA 3 - Análise física da manta de lodo _____ | 108 |

| | |
|---|-----|
| Distribuição do tamanho dos grânulos do inóculo e da manta de lodo dos reatores UASB submetidos a diferentes cargas orgânicas e hidráulicas _____ | 108 |
| Resistência mecânica dos grânulos _____ | 116 |
| Série de Sólidos _____ | 126 |
| Considerações sobre a análise física da manta de lodo _____ | 129 |
| 6.4 ETAPA 4 - Análise química da manta de lodo _____ | 130 |
| Caracterização de metais na manta de lodo dos reatores UASB _____ | 130 |
| 6.5 ETAPA 5 - Análise biológica da manta de lodo _____ | 137 |
| 6.5.1 Caracterização microbiana por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de contraste de fase e fluorescência _____ | 137 |
| 6.5.2 Caracterização microbiana por meio de PCR e DGGE _____ | 158 |
| 7. CONCLUSÃO _____ | 165 |
| 7.1 Conclusão referente a metodologia de medição da dimensão dos grânulos _____ | 165 |
| 7.2 Conclusão referente ao estudo das características físicas - distribuição da dimensão dos grânulos e resistência mecânica dos grânulos _____ | 165 |
| 7.3 Conclusão referente ao estudo das características químicas - determinação dos metais presentes na manta de lodo _____ | 166 |
| 7.4 Conclusão referente ao estudo das características biológicas _____ | 167 |
| 8. CONCLUSÃO FINAL _____ | 168 |
| 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____ | 169 |
| 10. REFERÊNCIA _____ | 170 |
| APÊNDICE A _____ | 179 |
| APÊNDICE B _____ | 186 |
| APÊNDICE C _____ | 190 |

1. INTRODUÇÃO

Urbanização, industrialização, práticas agrícolas, entre outras atividades da atualidade, aumentam a demanda de água e, portanto, a quantidade de efluentes gerados. O tratamento de águas residuárias tem como foco a redução da poluição e, conseqüentemente, a proteção ao ambiente e à saúde pública, através da remoção do material biodegradável, nutrientes e patógenos. O destaque da atualidade é a possibilidade de sistemas de tratamento de águas residuárias serem fornecedores de energia limpa.

As agroindústrias são contribuintes significativos para a poluição. Com o crescente desenvolvimento de biotecnologia sustentável, pesquisas substanciais foram dedicadas recentemente a lidar com os resíduos gerados pelas agroindústrias. Para este fim, a digestão anaeróbia é uma ferramenta potencial para o tratamento destes resíduos e para produção de energia sob a forma de metano (Rajagopal et al. 2013).

A obtenção de energia a partir de resíduos agroindustriais é uma das estratégias que pode auxiliar a expansão das energias renováveis no Brasil. Entre os vários tipos de resíduos, a vinhaça, originária da indústria da cana-de-açúcar, muito importante para a economia brasileira, tem potencial energético e é gerada em abundância devido à produção de grandes quantidades de etanol (Bernal et al. 2017). A vinhaça apresenta as seguintes características principais: baixo pH e elevados níveis de demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO), potássio, sulfato e cor. Essas características podem apresentar variações, dependendo do seu processo de geração (Wilkie, Riedesel e Owens 2000).

Reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) estão sendo utilizados com êxito no tratamento de água residuária de elevada carga orgânica. A principal característica do reator UASB é seu mecanismo interno, responsável pela separação de sólido, líquido e biogás. O desempenho eficiente desse sistema está vinculado à formação de lodo granular. Os parâmetros que afetam o fenômeno de granulação são, principalmente, as características da água residuária a ser tratada, a seleção do material de inoculação (Show et al. 2004) e a fluidodinâmica do reator.

Os grânulos anaeróbios são agrupamentos microbianos que interagem entre si com o propósito de degradar a matéria orgânica. Essas estruturas, complexas e heterogêneas, são formadas por comunidades microbianas, que coexistem e exercem funções diferentes e complementares, e seus produtos metabólicos (Miqueleto 2006). A granulação da biomassa é um processo natural devido à tendência dos microrganismos de se agrupar, eliminando assim a necessidade de material suporte.

O arranjo espacial dos microrganismos no grânulo anaeróbio oferece vantagens, como, por exemplo, proliferação microbiana mais eficiente; acesso a recursos e nichos que não podem ser utilizados por células isoladas; defesa coletiva; e geração de efluente de reator com baixa concentração de sólidos suspensos (McHugh et al. 2003a). O sintrofismo microbiano nos grânulos favorece o tratamento de águas residuárias, sobretudo as de difícil tratamento devido aos compostos potencialmente deletérios, como o caso da vinhaça.

Os estudos realizados no intuito de analisar a granulação da manta de lodo dos reatores são antigos e, em sua maioria, utilizaram água residuária mais simples, como ácidos orgânicos, glicose ou sacarose (Zeeuw, 1984; MacLeod, Guiot e Costerton, 1990; Chen e Lun, 1993). As pesquisas mais atuais que trataram de avaliar reatores UASB submetidos a águas residuárias complexas, como a vinhaça, tiveram objetivo no funcionamento geral dos reatores, não especificamente na manta de lodo. Além disso, os ensaios foram realizados, majoritariamente, em tempos curtos de operação (um a seis meses) (Hashemian et al., 2005; Mirsepasi et al., 2006; Leenawat et al., 2016; Petta et al., 2017; Cruz-Salomón et al., 2017).

No Brasil, o processamento anaeróbio da vinhaça em reatores UASB tem sido alvo de pesquisa desde a década de 80. Atualmente, a crescente produção de etanol no país, o conseqüente aumento da geração da vinhaça e o interesse mundial pelo aproveitamento energético do metano vêm estimulando o interesse de pesquisadores em estudos de aprimoramento da degradação anaeróbia desta água residuária.

Apesar de existirem estudos que utilizaram reatores UASB no processamento da vinhaça, essa tecnologia ainda apresenta pontos que necessitam ser elucidados. Entre eles estão a capacidade de aplicação de taxas hidráulicas e orgânicas altas, o comportamento da manta de lodo granular submetida a efluentes industriais de elevada carga orgânica e com compostos potencialmente deletérios e a manutenção da biomassa e da eficiência do sistema em tempos prolongados de operação.

Embora o sucesso da digestão anaeróbia e da produção de energia em reatores UASB esteja condicionado à sustentabilidade da manta de lodo, estudos que abordem o comportamento da biomassa, tratando efluentes concentrados, ainda são escassos na literatura científica. Em geral, o desempenho de sistemas UASB é avaliado por caracterizações físico-químicas do afluente e efluente dos reatores. No entanto, os problemas que podem influenciar a operação e o desempenho desses reatores podem estar associados à manta de lodo.

Como as análises de monitoramento usuais não são suficientes para informar sobre as variações das características e da estabilidade do lodo granular, torna-se evidente a importância de analisar a biomassa, sua estrutura, suas características físicas, químicas e biológicas.

As análises físico-químicas convencionais associadas às caracterizações física, química e biológica do lodo granular podem ser ferramentas eficientes no monitoramento, na otimização de parâmetros de projeto, na operação, e no desempenho de reatores UASB. Neste trabalho, pretende-se estudar o efeito da elevação de taxas hidráulicas e cargas orgânicas na manta de lodo granular de reatores UASB, visando relacionar as alterações das características físico-químicas e biológicas da manta de lodo com os parâmetros operacionais.

2. OBJETIVO

Investigar as características físicas, químicas e biológicas da manta de lodo granular de reatores UASB, tratando vinhaça da cana-de-açúcar, em escala piloto, submetido a crescentes cargas hidráulicas e orgânicas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de metodologia de medição da dimensão dos grânulos.
- Estudo da influência das taxas de recirculação do efluente associadas ao aumento de carga orgânica volumétrica nas características físicas, químicas e biológicas da manta de lodo:
- Estudo das características físicas - distribuição da dimensão e análise da resistência mecânica dos grânulos.
- Estudo das características químicas - determinação dos metais presentes na manta de lodo.
- Estudo das características biológicas - análise da estrutura microbiana dos grânulos, identificação da morfologia das células e determinação da diversidade microbiana nas diferentes fases de operação.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, açúcar e etanol, e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o bicomcombustível como alternativa energética. Na safra de 2017/2018 foram produzidos mais de 641 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com produção de mais de 38 milhões toneladas de açúcar e mais de 27 bilhões de litros de etanol (Tabela 1).

A cana-de-açúcar é cultivada em todas as regiões do país, sendo o estado de São Paulo o responsável pela maior produção brasileira. De acordo com dados referentes à safra de 2017/2018, foram processados só em São Paulo mais de 357 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com produção superior a 24 milhões de toneladas de açúcar e mais de 13 bilhões de litros de etanol (UNICA 2018b) (Tabela 1).

Tabela 1. Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e álcool no Brasil, safra 2017/2018

| Estados | Cana-de-açúcar <i>mil toneladas</i> | Açúcar <i>mil toneladas</i> | Etanol (mil m ³) | | |
|------------------------------|--|--------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|
| | | | Anidro | Hidratado | Total |
| Acre | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Alagoas | 13.734 | 1.072 | 219 | 112 | 331 |
| Amazonas | 222 | 12 | 0 | 5 | 5 |
| Bahia | 3.540 | 160 | 75 | 106 | 181 |
| Ceará | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Espírito Santo | 2.381 | 127 | 80 | 11 | 90 |
| Goiás | 70.622 | 2.235 | 1.323 | 3.295 | 4.618 |
| Maranhão | 2.220 | 23 | 143 | 20 | 163 |
| Mato Grosso | 16.134 | 411 | 539 | 960 | 1.499 |
| Mato Grosso do Sul | 46.940 | 1.492 | 878 | 1.754 | 2.632 |
| Minas Gerais | 64.886 | 4.237 | 1.067 | 1.642 | 2.708 |
| Pará | 977 | 46 | 43 | 8 | 52 |
| Paralíba | 5.900 | 159 | 184 | 187 | 370 |
| Paraná | 37.047 | 2.921 | 570 | 699 | 1.269 |
| Pernambuco | 10.863 | 757 | 92 | 229 | 321 |
| Piauí | 850 | 63 | 20 | 1 | 20 |
| Rio de Janeiro | 1.062 | 35 | 0 | 46 | 46 |
| Rio Grande do Norte | 2.516 | 161 | 32 | 45 | 77 |
| Rio Grande do Sul | 45 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Rondônia | 78 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| Santa Catarina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| São Paulo | 357.142 | 24.591 | 5.963 | 7.260 | 13.223 |
| Sergipe | 1.719 | 96 | 24 | 46 | 70 |
| Tocantins | 2.188 | 0 | 116 | 61 | 176 |
| Região Centro-Sul | 596.260 | 36.048 | 10.419 | 15.669 | 26.088 |
| Região Norte-Nordeste | 44.806 | 2.548 | 947 | 823 | 1.771 |
| Brasil | 641.066 | 38.596 | 11.366 | 16.492 | 27.859 |

Fonte: ÚNICA (2018b)

Nota: ¹ - toneladas; ² - milhares de litros.

No acumulado, desde o início da safra 2018/2019 até 1º de novembro de 2018, na região Centro-Sul, a moagem de cana-de-açúcar somou 508,3 milhões de toneladas - queda de 4,3% em relação as 531,4 milhões de toneladas registradas no ciclo 2017/2018 e a produção de açúcar atingiu 24,35 milhões de toneladas, frente as 33,22 milhões de toneladas, no mesmo período de 2017. No caso do etanol, a produção acumulada alcançou 27,26 bilhões de litros, dos quais 8,40 bilhões de anidro e 18,86 bilhões de hidratado. Este último apresenta crescimento de 45,96% em relação ao acumulado da safra 2017/2018 (Tabela 2). Apesar da redução da moagem, o aumento na qualidade da cana e o menor direcionamento da matéria-prima para açúcar visam permitir uma produção elevada de etanol, garantindo o abastecimento em todo período de entressafra (UNICA 2018a).

Tabela 2. Safra 2017/2018 e 2018/2019: posição acumulada entre 1º de abril até 1º de novembro de 2018

| Produtos | Centro-Sul | | | São Paulo | | | Demais Estados | | |
|------------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|
| | 2017/2018 | 2018/2019 | Var. (%) | 2017/2018 | 2018/2019 | Var. (%) | 2017/2018 | 2018/2019 | Var. (%) |
| Cana-de-açúcar ¹ | 531.447 | 508.339 | ↓ -4,35% | 318.627 | 299.720 | ↓ -5,93% | 212.820 | 208.619 | ↓ -1,97% |
| Açúcar ¹ | 33.219 | 24.350 | ↓ -26,70% | 22.697 | 16.793 | ↓ -26,01% | 10.522 | 7.557 | ↓ -28,19% |
| Etanol anidro ² | 9.741 | 8.402 | ↓ -13,75% | 5.536 | 4.896 | ↓ -11,56% | 4.205 | 3.506 | ↓ -16,63% |
| Etanol hidratado ² | 12.920 | 18.858 | ↑ 45,96% | 5.997 | 9.488 | ↑ 58,22% | 6.923 | 9.370 | ↑ 35,34% |
| Etanol total ² | 22.661 | 27.260 | ↑ 20,29% | 11.533 | 14.384 | ↑ 24,72% | 11.129 | 12.876 | ↑ 15,70% |
| ATR ¹ | 73.209 | 71.235 | ↓ -2,70% | 43.555 | 42.091 | ↓ -3,36% | 29.654 | 29.144 | ↓ -1,72% |
| ATR/ tonelada de cana ³ | 137,75 | 140,13 | ↑ 1,73% | 136,70 | 140,44 | ↑ 2,73% | 139,34 | 139,70 | ↑ 0,26% |
| Mix (%) | | | | | | | | | |
| açúcar | 47,62% | 35,87% | ↓ | 54,69% | 41,87% | ↓ | 37,24% | 27,21% | ↓ |
| etanol | 52,38% | 64,13% | ↑ | 45,31% | 58,13% | ↑ | 62,76% | 72,79% | ↑ |
| Litros etanol/ tonelada de cana | 42,25 | 52,90 | ↑ 25,20% | 36,20 | 47,99 | ↑ 32,59% | 51,32 | 59,96 | ↑ 16,83% |
| Kg açúcar/ tonelada de cana | 62,51 | 47,90 | ↓ -23,37% | 71,23 | 56,03 | ↓ -21,34% | 49,44 | 36,22 | ↓ -26,74% |

Fonte: ÚNICA (2018^a).

Nota: ¹ - mil toneladas; ² - milhões de litros; ³ - kg de ATR/ tonelada de cana; ATR - Açúcar Total Recuperável.

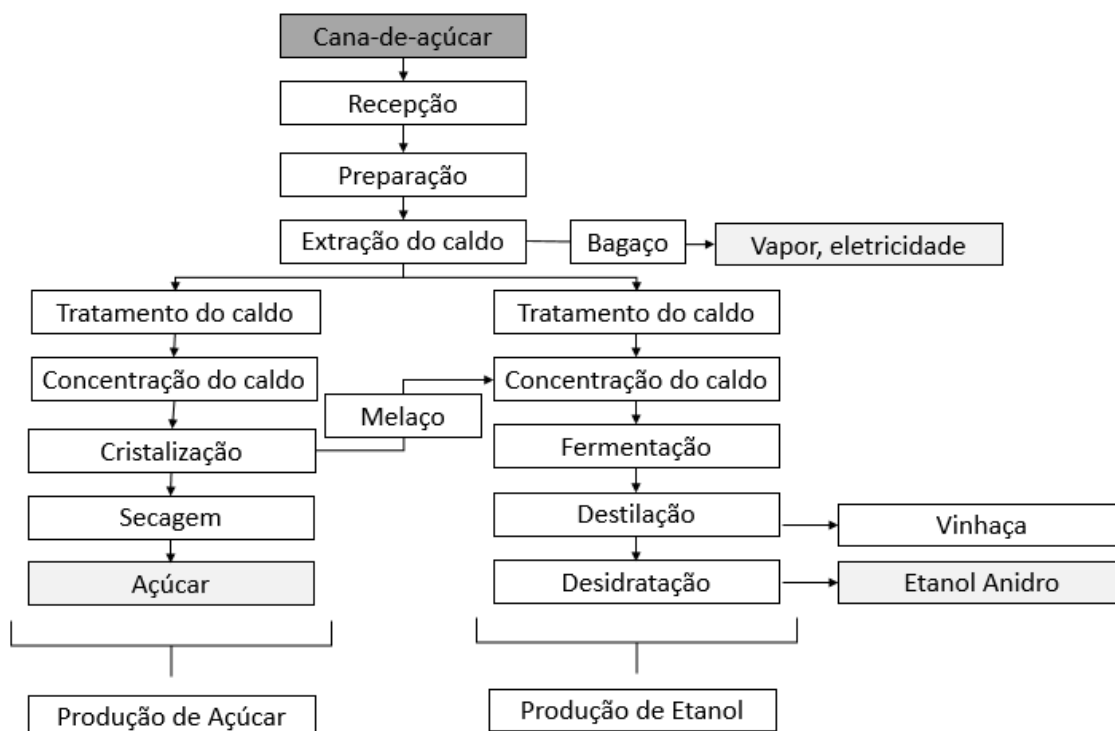
A produção de açúcar e álcool de cana-de-açúcar começa com a lavagem e moagem da matéria-prima, na etapa de preparação. O suco extraído nesse processo, por apresentar impurezas, deve ser submetido a tratamento para adequação aos padrões de qualidade. A primeira etapa é destinada à remoção, por meio de filtros, dos sólidos como areia, argila e bagacilho; a segunda, ao tratamento químico. Nesse, realiza-se a remoção das impurezas que ainda restaram por meio de coagulação, floculação e sedimentação. É necessário, ainda, fazer a correção do pH para evitar inversão e decomposição da sacarose. O caldo tratado pode ser enviado para fabricação de açúcar ou etanol. O açúcar é produzido da evaporação, cozimento (necessário para cristalização da sacarose), centrifugação (geração de melaço) e secagem. O etanol pode ser produzido por meio da fermentação do suco e/ou do melaço gerado na produção do açúcar (Figura 1).

O processo de produção de açúcar e álcool gera subprodutos: bagaço, tortas de filtro (geradas na etapa de tratamento do suco) e vinhaça. Essa última é gerada em grande quantidade na destilação de etanol depois da fermentação do caldo extraído - cerca de 15 litros de vinhaça por litro de etanol produzido (van Haandel 2005). Considerando a estimativa de geração de vinhaça para cada litro produzido de etanol e a produção de álcool na safra de 2017/2018 (Tabela 1), o volume de vinhaça gerado, só no estado de São Paulo, foi cerca de 198 bilhões de litros.

Uma das alternativas encontradas, e que já vem sendo utilizada durante a geração do resíduo, é a utilização da vinhaça para fertilizar os canaviais onde a cana-de-açúcar é cultivada. Por conter nutrientes, a vinhaça ajuda a incrementar a produção e também reduz a utilização de outros fertilizantes, porém essa técnica pode salinizar o solo e prejudicar os aquíferos se realizada de forma indiscriminada (Moraes et al. 2014; UNICA 2016).

Em prol da conservação dos recursos naturais, a legislação brasileira tem se tornado cada vez mais rígida quanto ao descarte desse resíduo, por meio de normas que estabelecem a aplicação controlada da vinhaça no solo e normas com parâmetros de qualidade relativamente altos para descarte do efluente industrial nos corpos de água. Estudos de novas alternativas para tratamento e possível utilização desse resíduo para outros fins tornam-se cada vez mais necessários.

Figura 1. Processo de produção de açúcar e etanol



Fonte: elaborada pela autora

4.2 Legislação referente à vinhaça

A princípio, o lançamento da vinhaça era efetuado em corpos hídricos e/ou no solo de forma indiscriminada. Devido aos impactos ambientais decorrentes desta prática e à preocupação crescente com o meio ambiente e com as consequências de sua degradação para a sociedade e para saúde humana, novas leis foram formuladas, tanto em âmbito federal quanto estadual, com objetivo de proteger o solo e os corpos hídricos.

O Ministério do Interior (MINTER) instituiu a Portaria nº 323, de 29/11/1978, que visa à prevenção de poluição hídrica e, portanto, proíbe o lançamento direto ou indireto da vinhaça em coleções de água; a Portaria nº 124, de 20/08/1980, estabelecida pelo MINTER, mantém a proibição do lançamento direto ou indireto de vinhaça em qualquer coleção hídrica; a Resolução CONAMA nº 0002, de 05/06/1984, determina a realização de estudos contendo normas que possibilite o controle da poluição causada pelos efluentes das destilarias de álcool; a Resolução CONAMA nº 0001, de 23/01/1986, obriga novas indústrias instaladas a fazer estudo de avaliação de impacto ambiental (AIA) e o relatório de impacto ambiental (RIMA); a lei nº 6134 de 02/06/1988 proíbe lançamento de resíduos líquidos, sólidos ou gasosos, provenientes de atividades agropecuárias, industriais, comerciais ou de qualquer outra natureza que possam

poluir águas subterrâneas; e a Norma técnica P4. 231 de 12/2006, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), estabelece critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça no solo.

4.3 Características de vinhaça proveniente da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem sido usada como matéria-prima para a produção de etanol no Brasil, em grande escala, desde a década de 80. Atualmente, a maioria das usinas de cana-de-açúcar tem produção integrada de açúcar e etanol (Dias et al. 2015). A água residuária proveniente dessas usinas, denominada vinhaça, é utilizada para irrigação de culturas de cana-de-açúcar e, parte dela é, por muitas vezes, descartada sem o devido tratamento diretamente nas águas superficiais.

A vinhaça apresenta pH ácido (3-4), altos teores de matéria orgânica (Robles-González et al. 2012; Cruz-Salomón et al. 2017), concentrações significativas de nitrogênio e outros nutrientes, que são características interessantes para produção de biogás por digestão anaeróbia. Por apresentar alto índice de biodegradabilidade (IB), em torno de 0,8, o que significa que 80% da vinhaça é matéria orgânica biodegradável, esse resíduo da agroindústria é considerado passível de ser tratado biologicamente (Cruz-salomón et al. 2017).

Outro fator a se considerar é o índice de competitividade (IC), que é calculado de acordo com a relação de DQO e SO_4^{2-} . Se o IC é maior que 10, considera-se ausente a competição entre os microrganismos redutores de sulfato e os metanogênicos. Os índices de biodegradabilidade e competitividade da vinhaça, além do conteúdo de nutrientes considerados importantes, como nitrogênio, potássio e cálcio, tornam atraente a aplicação da digestão anaeróbia para o tratamento dessa água residuária (Cruz-Salomón et al. 2017).

No trabalho de Alves (2015), dentre os macronutrientes avaliados, o potássio foi predominante (1140 mgL^{-1}), com teores razoáveis de cálcio (773 mgL^{-1}), sulfato (625 mgL^{-1}) e nitrogênio total Kjeldahl (614 mgL^{-1}), e pobre em magnésio (134 mgL^{-1}). O ferro foi o micronutriente de maior concentração ($59,8 \text{ mgL}^{-1}$); manganês, cobre, zinco, chumbo, cádmio, níquel e cromo total apareceram em baixas concentrações (valores entre 0,03 e $5,61 \text{ mgL}^{-1}$).

As características físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar estão intrinsecamente relacionadas com o tipo e origem da matéria-prima utilizada; preparo do mosto, dependente do tipo de indústria; método de fermentação; eficiência do processamento; insumos adicionados como produtos químicos, ácidos, antibióticos e nutrientes à base de nitrogênio e fósforo; qualidade da água; sistema de trabalho; e influência dos operadores (Neto 2008).

Vinhaça mais concentrada é gerada na produção de álcool a partir do melaço ou da mistura de melaço e caldo (mosto misto) em usinas de açúcar e álcool. A vinhaça gerada em destilarias apresenta concentrações mais reduzidas de matéria orgânica, potássio, cálcio e magnésio. A caracterização da vinhaça depende, portanto, do tipo de mosto de cana-de-açúcar (Tabela 3).

A dimensão do potencial poluidor da vinhaça pode ser percebida pela concentração de matéria orgânica presente, que pode vir a exceder 100 gL^{-1} , em termos de DQO (Wilkie et al. 2000). A digestão anaeróbia desse resíduo é alternativa interessante, visto que é possível converter parte significativa do material orgânico da vinhaça em biogás rico em metano (Christofoletti et al. 2013), reduzindo, ao mesmo tempo, o seu impacto negativo no ambiente.

O biogás produzido a partir da digestão anaeróbia pode ser usado para compensar a energia consumida no pré-tratamento e no processo de produção de etanol (Tian et al. 2013). Além disso, após a biodigestão, esse resíduo ainda pode ser utilizado para fertirrigação, pois não perde sua característica fertilizante (Agler et al. 2008).

Tabela 3. Características da vinhaça resultante de mostos de melaço, de caldo de cana e misto

| Referência | Tipo De Mosto | pH | DBO (gL^{-1}) | DQO (gL^{-1}) | N (total) (gL^{-1}) | SO ₄ (gL^{-1}) | P (total) (gL^{-1}) | K (gL^{-1}) |
|---|---------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| (van Haandel e Catunda 1994) | Caldo | 3,5 | 12 | 25 | 0,4 | 0,2 | 0,8 | / |
| (Driessen, Tielbaard, e Vereijken 1994) | Caldo | 3,5 | 12 | 25 | 0,4 | 0,2 | 0,8 | / |
| (Driessen et al. 1994) | Melaço | 3,9 | 39 | 100 | 1,03 | 0,03 | 7 | 9,5 |
| (Costa et al. 1986) | Caldo | 4,2 | 16,5 | 33 | 0,7 | 0,09 | 1,74 | 0,76 |
| (Costa et al. 1986) | Misto | 4,5 | 19,8 | 45 | 0,71 | 0,09 | 3,82 | 3,73 |
| (Costa et al. 1986) | Melaço | 4,6 | 25 | 65 | 1,61 | 0,13 | 6,5 | 6,4 |
| (Souza, Fuzaro e Polegato 1992) | Misto | 3,9 | / | 31,5 | 0,37 | 0,03 | 1,3 | 0,42 |

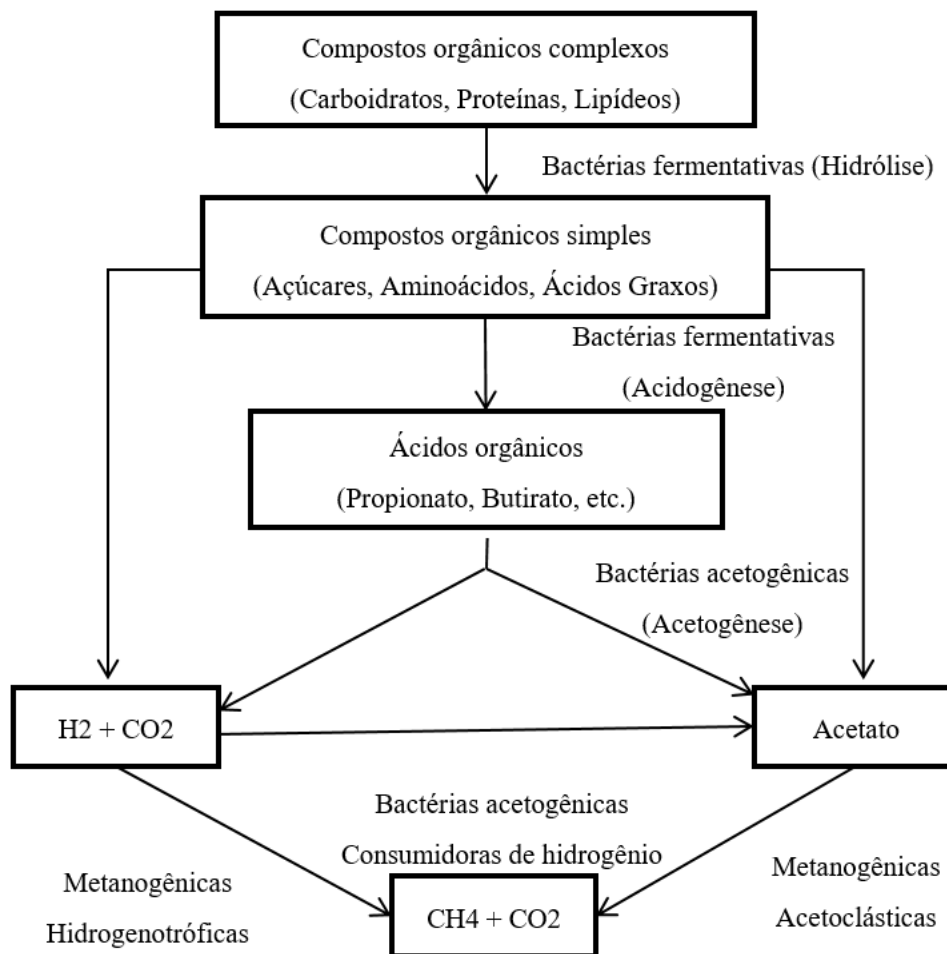
Fonte: Longo (2015)

4.4 Aspectos gerais da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo ecológico balanceado, envolvendo complexos processos metabólicos, que ocorrem em etapas e que dependem da atividade de, pelo menos, três grupos de microrganismos: bactérias fermentativas, bactérias acetogênicas e

microrganismos metanogênicos. Cada grupo microbiano tem comportamento fisiológico diferente e, portanto, função específica, mas trabalham interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em biogás, composto principalmente de metano, gás carbônico e gás sulfídrico. A Figura 2 apresenta as principais etapas do processo anaeróbio e os subprodutos gerados em cada uma delas.

Figura 2. Etapas da digestão anaeróbia



Fonte: adaptado de Gujer e Zehnder (1983)

Hidrólise e acidogênese

Na primeira fase da digestão anaeróbia, em que atuam as bactérias fermentativas, ocorre a conversão dos compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídeos) em outros compostos simples. A conversão de material particulado em material dissolvido (açúcares, aminoácidos e ácidos graxos) é conseguida através da ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas.

O material dissolvido, oriundo da fase de hidrólise, pode ser metabolizado no interior das células, pois esse consegue atravessar a membrana celular. A maioria dos microrganismos fermentativos acidogênicos utiliza o material produzido na etapa de hidrólise e produz diversos compostos mais simples como os ácidos orgânicos (acético, propiônico e butírico, entre outros), dióxido de carbono e hidrogênio.

Acetogênese

Na segunda etapa da digestão anaeróbia, as bactérias acetogênicas oxidam os compostos intermediários gerados pelas bactérias fermentativas e produzem hidrogênio, dióxido de carbono e acetato. Os microrganismos acetogênicos são chamados de sintróficos por dependerem da ação de outros grupos microbianos.

As reações acetogênicas só ocorrem se a concentração de hidrogênio e acetato no meio for mantida baixa. Os microrganismos metanogênicos, atuantes na última etapa da digestão anaeróbia, são os principais responsáveis pelo consumo do excesso de hidrogênio e acetato e, portanto, são responsáveis, também, pelo equilíbrio do sistema.

Metanogênese

As arqueias metanogênicas são essenciais no processo de digestão anaeróbia. Fisiologicamente, os microrganismos metanogênicos são divididos em acetoclásticos e hidrogenotróficos. Os acetoclásticos usam acetato como fonte de carbono e produzem metano e gás carbônico. Os hidrogenotróficos utilizam hidrogênio como fonte de energia, e o gás carbônico como fonte de carbono e aceptor de elétrons (respiração anaeróbia), obtendo como produto final o metano, são também os responsáveis por remover o excesso de hidrogênio e de outros produtos da fermentação, mantendo a pressão de hidrogênio baixa, de forma a possibilitar que as reações das bactérias acetogênicas ocorram.

A grande maioria das espécies de microrganismos metanogênicos é capaz de utilizar hidrogênio e gás carbônico para produzir metano, pertencendo, portanto, ao grupo de microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos. Enquanto que poucos microrganismos conseguem formar metano a partir do acetato. Apesar disso, a rota acetoclástica é responsável por 60 a 70% da produção de metano. Os dois gêneros principais são *Methanosaeta*, que utiliza acetato exclusivamente, e *Methanosarcina*, mais versátil, que pode utilizar, além do acetato, hidrogênio e compostos metilados (Soube 1994).

Sulfetogênese

O processo de digestão anaeróbia pode incluir, ainda, a rota sulfetogênica: fase onde ocorre a redução de sulfato (e outros compostos à base de enxofre) para sulfeto pela ação de bactérias anaeróbias estritas, denominadas bactérias redutoras de sulfato (BRS) ou bactérias sulforedutoras. O produto final gerado pelas redutoras de sulfato são sulfeto de hidrogênio e dióxido de carbono. As BRS são capazes de utilizar uma variedade alta de substrato, competindo, assim, com os demais microrganismos do processo de digestão anaeróbia. A concentração de sulfato no meio delibera qual dos processos será predominante, se metanogênese ou sulfetogênese, pois os dois grupos microbianos envolvidos nesses processos competem por acetato e hidrogênio (Chen et al. 2008). Em condições de escassez de sulfato, as BRS podem atuar como bactérias acetogênicas (Danianovic e Foresti 2009).

Equilíbrio do processo de digestão anaeróbia

Na digestão anaeróbia, os microrganismos produtores de ácido e metano diferem amplamente em termos de fisiologia, necessidades nutricionais, cinética de crescimento e sensibilidade às condições ambientais. Falhas na manutenção do equilíbrio entre esses dois grupos de microrganismos é a principal causa da instabilidade do reator (Chen et al. 2008). Para manter a eficiência do processo de digestão anaeróbia, é necessário que a formação e consumo dos produtos metabólicos intermediários estejam em equilíbrio. Caso contrário, pode ocorrer queda do pH e inibição das atividades das arqueias metanogênicas (Ribas 2006).

A faixa de pH ideal estabelecida na literatura para bom desempenho de microrganismos metanogênicos se aproxima do pH neutro. A alcalinidade do sistema é, basicamente, a capacidade de neutralizar os ácidos, formados na digestão anaeróbia, e de tamponar o pH, caso haja acumulação de ácidos voláteis. A alcalinidade total do sistema é dividida em parcelas de alcalinidade a bicarbonato, ou alcalinidade parcial (AP), e de alcalinidade a ácidos voláteis, ou alcalinidade intermediária (AI). O desbalanceamento da relação AI/AP indica distúrbio no processo anaeróbio, devido à sobrecarga orgânica. Nesses casos, a taxa de geração de metano não acompanha a taxa de produção de ácidos, ocasionando desequilíbrio da digestão anaeróbia e falha do sistema (Ripley, Boyle e Converse 1986).

O processo anaeróbio ocorre pelo sintrofismo dos grupos microbianos atuantes nas diferentes fases da digestão anaeróbia (fermentativa, acetogênica e metanogênica). Se as arqueias metanogênicas, grupo mais sensível às mudanças operacionais, não estiverem adaptadas às condições do meio, o consumo dos produtos intermediários, gerados nas primeiras fases da digestão anaeróbia, será reduzido. Consequentemente, ocorrerá aumento da pressão de

hidrogênio e de ácidos - afetando diretamente a atividade acetogênica -, queda do pH, redução da eficiência de remoção da matéria orgânica e da produção de metano. As principais condições ambientais que interferem no metabolismo metanogênico são pH, alcalinidade, temperatura e presença de substâncias tóxicas no substrato.

Chatterjee e Ghangrekar (2017) analisaram o perfil do reator quanto ao pH e observaram que o pH na parte inferior do reator foi menor em relação ao pH na porção superior. O baixo pH na zona do lodo provavelmente ocorreu devido à ligeira acidificação da matéria orgânica nesta zona. À medida que a água residuária se movia para cima, os ácidos intermediários produzidos foram utilizados pelos microrganismos acetogênicos e metanogênicos, resultando em aumento de pH devido à alcalinidade gerada a partir dessas reações. A variação na inclinação do perfil de pH indica presença de reações bioquímicas dentro do reator. As principais reações bioquímicas ocorreram na base do reator, isto é, na zona de reação ou manta de lodo. Lu et al. (2015) fizeram análises verticais no perfil de reator UASB (escala de bancada), tratando água residuária com amido como fonte de carbono, concluindo que as principais reações - abrangendo hidrólise, acidificação e metanogênese - ocorreram na parte inferior do reator, zona de reação principal.

Os produtos químicos geralmente utilizados para regular o pH, com objetivo de proteger as células e fornecer alcalinidade a bicarbonato, podem ser hidróxido de sódio (NaOH), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃); os que reagem com gás carbônico para produzir alcalinidade a bicarbonato são óxido de cálcio (também chamado de cal virgem - CaO), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) e amônia (NH₃). A recirculação do efluente do reator também pode ser adotado com objetivo de recircular a alcalinidade do sistema, estratégia interessante para redução de custos com alcalinizante químico (Van Haandel 2005).

A temperatura influencia no processo de digestão anaeróbia, pois é diretamente vinculada ao metabolismo microbiano. Faixas diferentes de temperatura são apontadas como adequadas para a digestão anaeróbia. Essa divergência ocorre devido à combinação da temperatura com outros fatores interferentes no processo, principalmente o tipo microbiano predominante. Embora variem, faixas de temperaturas mesofílica e termofílica são geralmente consideradas adequadas para produção de metano a partir da degradação anaeróbia da vinhaça (Ribas 2006).

Estudo realizado aponta temperatura abaixo de 25°C como um dos principais problemas no processo de digestão anaeróbia de água residuária proveniente da indústria de açúcar. Ainda, segundo o mesmo estudo, temperaturas acima de 40°C também podem causar redução da eficiência do sistema de tratamento e da produção de metano (Leenawat et al. 2016). Ao

relacionar temperatura e concentração de amônia, pesquisa concluiu que a fermentação anaeróbia de resíduos com alta concentração de amônia é mais facilmente inibida e menos estável em temperaturas termofílicas que em temperaturas mesofílicas (Chen et al. 2008).

Além de temperatura, pH e alcalinidade, determinadas substâncias podem influenciar no desempenho do sistema. Substâncias consideradas inibidoras são encontradas em concentrações significativas nos resíduos industriais, a exemplo de alguns metais pesados observados na vinhaça. A concentração inadequada de metais pesados no substrato pode ser inibidora da atividade dos microrganismos metanogênicos e acetogênicos, que são fundamentais no processo de tratamento biológico (McHugh et al. 2003b).

4.5 Tecnologia anaeróbia e reator UASB

Os sistemas anaeróbios oferecem vantagens específicas para o tratamento de diversas águas residuárias, principalmente as oriundas de processos agroindustriais. Essas vantagens estão relacionadas à relativa simplicidade da tecnologia, baixa demanda de área e de energia para implantação e operação, reduzida produção de lodo e geração de metano como produto final útil e economicamente valioso (Cruz-salomón et al. 2017).

Um dos avanços mais significativos na área da tecnologia de tratamento anaeróbio de alta taxa ocorreu na década de 70. Neste período, esforços consideráveis foram aplicados no desenvolvimento de um processo que fosse mais sofisticado e que promovesse o tratamento anaeróbio com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 3-4 horas para resíduos de baixa carga orgânica. O empenho resultou em um novo tipo de sistema, atualmente utilizado em escala real, chamado reator anaeróbio de manta de lodo, do inglês *upflow anaerobic sludge blanket*, ou simplesmente UASB (Lettinga et al. 1976). Na primeira planta, escala completa, de reator UASB (200 m³), cargas orgânicas de até 16 gDQOL⁻¹d⁻¹ puderam ser tratadas de forma satisfatória, em tempos de detenção hidráulica de 4 horas, utilizando como fonte de carbono o resíduo do processamento da beterraba para produção de açúcar (Lettinga et al. 1980).

A configuração do UASB apresenta dispositivo de separação do gás-sólido-líquido com as seguintes funções: separar e recolher o biogás produzido (a área de superfície gás-líquido dentro do dispositivo deve ser suficientemente grande, de modo que o gás possa evadir facilmente); separar as partículas de lodo através do mecanismo de sedimentação; evitar a expansão da manta de lodo em direção ao compartimento de gás; evitar perda da biomassa junto ao efluente por arraste (van Lier et al. 2015).

Nesta tecnologia, a maior parte da matéria orgânica é biodigerida pelo lodo sedimentado no fundo do reator (Christofolletti et al. 2013). À medida que a água residuária passa pela manta de lodo, entrando em contato com os microrganismos, ocorre a degradação anaeróbia dos resíduos orgânicos. O biogás gerado provoca turbulência hidráulica devido ao seu fluxo ascendente, proporcionando mistura adequada (McHugh et al. 2003b).

O sistema UASB foi um dos primeiros a contar com o estabelecimento de biomassa granular e é atualmente a tecnologia mais amplamente aplicada para o tratamento anaeróbio de alta taxa de efluentes industriais (McHugh et al. 2003b). A retenção da biomassa permite aplicação de taxa de carga orgânica volumétrica (COV) elevada, maior contato entre o grânulo e o substrato (Lettinga et al. 1980; McHugh et al. 2003b) e, também, curto TDH, comparado a outras tecnologias. Essas vantagens fazem do UASB um sistema relativamente compacto e econômico.

A formação de lodo granular depende das características da água residuária a ser tratada e da seleção do material de inoculação (Show et al. 2004). Atualmente, a grande maioria das instalações de tratamento de resíduos anaeróbios é baseada na formação e manutenção de grânulos/flocos no reator (McHugh et al. 2003b).

A retenção de lodo, nessa configuração de reator, ocorre por meio da formação de agregados bem sedimentáveis (flocos ou grânulos) e na aplicação de um dispositivo interno de separação gás-líquido-sólido em forma de funil reverso. Alguns conceitos de reatores com manta de lodo foram reunidos (van Lier et al. 2015):

- Lodo anaeróbio tem ou adquire boas propriedades de sedimentação, desde que o processo seja operado corretamente. As partículas pequenas ou instáveis serão lavadas do sistema.
- O contato necessário entre os grânulos e as águas residuárias nos reatores UASB geralmente é conseguido alimentando o sistema com águas residuárias, tão uniformemente quanto possível, evitando caminhos preferenciais.
- Com águas residuárias contendo compostos inibitórios biodegradáveis, uma estratégia seria aplicar a mistura hidrodinâmica através de fluxo de recirculação de líquido. Como resultado, pode-se obter redução do potencial de inibição.

Importantes estudos foram realizados utilizando reatores UASB desde a década de 70. Os resultados mostram o potencial tecnológico que o sistema UASB oferece no tratamento biológico para vasta gama de águas residuárias. Aplicações bem-sucedidas desta tecnologia, desde o tratamento de água residuária relativamente diluída (esgoto doméstico, por exemplo) a reatores submetidos a carga orgânica elevada, resultou no estabelecimento de milhares de reatores em escala real em todo o mundo (Lim e Kim 2014; Nnaji 2014). No entanto, desafios

foram encontrados no decorrer da aplicação desta técnica, evidenciando que apesar de promissora, a tecnologia anaeróbia apresenta diversas variáveis que contribuem para o equilíbrio/desequilíbrio desse sistema. Algumas destas aplicações estão apresentadas no Quadro 1 e são brevemente comentadas a seguir.

Pesquisas demonstram a viabilidade técnica da aplicação de reator UASB no tratamento de diferentes tipos de vinhaça. Hashemian et al (2005) avaliaram a capacidade de tratamento anaeróbio de vinhaça, proveniente do processamento da beterraba para produção de álcool, em reator UASB e concluiu que, mesmo com o aumento gradual de COV até $16 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, o sistema de tratamento alcançou 95% de eficiência de remoção de DQO.

Cruz-Salomón et al. (2017) compararam dois reatores UASB, um tradicional e outro modificado. A inovação do UASB modificado consistiu em um segundo leito de manta de lodo, suportado por uma placa metálica multiperfurada, que não bloqueou o fluxo hidrodinâmico. O biorreator UASB modificado e o convencional operaram eficientemente no tratamento de vinhaça, oriunda de destilaria de agave (DQO de 120 gL^{-1}), e apresentaram remoção de matéria orgânica de 93% e 91%, respectivamente. O desenho do biorreator modificado aumentou a proporção de metano na mistura de biogás produzido e aumentou o valor calorífico do biogás em comparação com o bioreator convencional (Cruz-Salomón et al. 2017).

Em uma análise comparativa de dois reatores UASB, escala completa, com parâmetros operacionais diferentes: um dos reatores (UASB-1) teve a água residuária inserida diretamente no sistema; no segundo caso (UASB-2), antes de submetida ao reator, a água residuária passou por tanque de condicionamento onde foram regulados parâmetros como pH, carga orgânica e temperatura. A falta de controle nos parâmetros do UASB-1 prejudicou a eficiência do sistema; no reator UASB-2, a qualidade do funcionamento foi melhor do que no reator UASB-1, mas não foi suficiente, sugerindo necessidade de maior controle de alcalinidade e ácidos voláteis (Mirsepasi et al. 2006).

Petta et al. (2017) analisaram a possibilidade de utilizar, estrategicamente, um sistema UASB como pré-tratamento de vinhaça, oriunda do processamento de uva, no intuito de reduzir a fração orgânica facilmente biodegradável e produzir metano. A água residuária de entrada, caracterizada por pH ácido, necessitou de correção preliminar para obter um valor de 6,2. Os resultados mais estáveis ocorreram em COV de $4,5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, com uma eficiência de remoção de matéria orgânica e eficiência total de remoção de fenóis de 97,2 e 75,0%, respectivamente. No entanto, os valores mais elevados de COV (no intervalo de 6,2 e $11,5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$) resultaram em formação biológica de espuma com conseqüente redução da produção de biogás e relativa instabilidade do processo.

Leenawat et al. (2016) analisaram faixas de temperatura entre 29 e 42°C em reator UASB tratando água residuária da indústria de açúcar. O sistema apresentou melhor eficiência de remoção de carga orgânica, aproximadamente 92%, com temperatura entre 30 e 40 °C e a produção máxima de metano ocorreu a 39°C (0,38 LCH₄ gDQO⁻¹). A concentração de metano diminuiu com temperaturas entre 40 e 42 °C, com pior produção de metano a 42 °C (0,22 LCH₄ gDQO⁻¹).

Muitas são as aplicações possíveis para o reator UASB. O desafio está relacionado ao controle das diversas variáveis que interferem no resultado como, por exemplo, temperatura, pH, carga orgânica, TDH, presença de nutrientes e/ou metais no substrato, lavagem de biomassa, curto-circuito, sobrecarga, inibições do processo e qualidade do biogás. Ainda é desafiador controlar tantas variáveis e, por isso, dependendo da água residuária e das condições ambientais, mais pesquisas serão necessárias para otimização do processo.

Aspectos importantes que devem ser melhorados no sistema: (i) redução do tempo de partida e da granulação em reatores UASB; (ii) acoplamento com unidade de pós-tratamento; (iii) melhoria da eficiência de remoção da matéria orgânica, nutrientes e patógenos no efluente final; (iv) compreensão da dinâmica de formação e funcionamento da biomassa; (v) estudo de estratégias para evitar zonas mortas, geralmente causadas por baixos fluxos; (vi) análise de formas de evitar a lavagem de biomassa ativa (vii) estudo da adaptação de diversos compostos possivelmente tóxicos para, assim, diminuir a sensibilidade do lodo granular a essas substâncias (Rajagopal et al. 2013; Robles-gonzález et al. 2012).

Alguns fatores podem atenuar as desvantagens, entre os quais a inoculação do reator com um lodo já adaptado, reduzindo assim o tempo de partida desses sistemas. A carga hidráulica deve ser estudada e aplicada de forma que evite caminhos preferenciais e também a lavagem da biomassa por arraste. Quanto ao fator de toxicidade, a gradual exposição da biomassa ao substrato é capaz de proporcionar a adaptação do lodo às condições adversas e, dessa forma, manter a estabilidade do processo.

Apesar de existirem limitações, o tratamento anaeróbio é uma tecnologia madura, com potencial para ser utilizado em estações de tratamento mais sustentáveis, visando, além do tratamento da água residuária em si, a produção de energia. Embora o uso de energia de biogás ainda seja incipiente no Brasil, existem vantagens inerentes a essa prática, tais como a produção de energia descentralizada; cogeração para produzir eletricidade e calor; redução das emissões de metano; e, possivelmente, lucro extra da comercialização da energia produzida. Além disso, o lodo gerado em reatores anaeróbios, mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas,

apresenta valioso potencial de uso agrícola ou, ainda, de recuperação, também, na forma de energia (Rosa et al. 2018).

Quadro 1. Reunião de estudos realizados em reator UASB

| Escala/ Volume | Resíduo | Inóculo | Carga orgânica | TDH | Vazão | pH | Temp média (°C) | Produção de metano | metano no biogás% | Atividade Metanogênica Específica (AME) | DQO de entrada | Eficiência de remoção (%) - DQO | Tempo de operação | Referência |
|---|--|--|--|-------|-----------------------|---------------------------|-----------------|---|-------------------------------------|--|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Piloto (1300 L) | Vinhaça (beterraba) gerada na produção de álcool | 600 L de lodo mesofílico do fundo de uma lagoa anaeróbia tratando resíduos de laticínios | Gradualmente de 1 até 16 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | 6h | - | 4,5 Ajustado para: 7-7,5 | 30 | - | - | - | 1000 a 11000 mgL ⁻¹ | 95 | 180 dias | (Hashemian et al. 2005) |
| Bancada modificado e convencional (4 L) | Vinhaça (destilado do agave) | Complexo microbiano anaeróbio adaptado 2,5 gSTmL ⁻¹ | - | - | 100 mLh ⁻¹ | 3,89 ±0,01 Valor ajustado | 30 | 2130 (modificado) e 1840 (convencional) mLd ⁻¹ | 80 (modificado) e 67 (convencional) | 0,51 (modificado) e 0,49 (convencional) gDQOgSSV ⁻¹ d ⁻¹ | 120±18 gL ⁻¹ | 93 (modificado) 91 (convencional) | 60 dias | (Cruz-Salomón et al. 2017) |
| UASB-1 Real/ 430 m ³ | Vinhaça | - | - | >200h | 50 | 4-5 | 20-25 | - | - | - | 50 gL ⁻¹ | < 55 | 3 meses | (Mirsepasi et al. 2006) |

Continua

Conclusão

| Escala/ Volume | Resíduo | Inóculo | Carga orgânica | TDH | Vazão | pH | Temp média (°C) | Produção de metano | metano no biogás % | Atividade Metanogênica Específica (AME) | DQO de entrada | Eficiência de remoção (%) - DQO | Tempo de operação | Referência |
|---------------------------------------|--|---|---|--------------|-------|---|-----------------------|--|-----------------------|---|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| UASB-2 Real/ 430 m ³ | Vinhaça | - | 10 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | 20h | 480 | 7±0,5 | 30 ±2 | - | - | - | 8-12 gL ⁻¹ | 55 | 3 meses | (Mirsepasi et al. 2006) |
| Bancada 24 L | Vinhaça (uva) | Lodo anaeróbio submetido à resíduo de frutas (15 g L) | 3-11,5 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | 16-4 dias | - | 3,8 ± 0,05 (real) 7,3-8,0 (ajuste) | 37 | 340 LCH ₄ KgDQO ⁻¹ | 60 | - | 44,6 ± 94,5 gL ⁻¹ | 97 | 4 meses | (Petta et al. 2017) |
| Bancada 14,5 L | Água residuária de indústria de açúcar e água de estação de bioenergia elétrica | - | 140 kgDQOd ⁻¹ | - | - | 6,5 – 8,5 | 29-42 | - | - | 0,38 m ³ CH ₄ kg ⁻¹ DQO | - | 92% (entre 30 e 40°C) | 35 dias | (Leenawat et al. 2016) |

Fonte: elaborado pela autora.

4.6 Retenção de biomassa nos sistemas anaeróbios

A retenção da biomassa é fundamental para o sucesso da operação nos reatores anaeróbios. O início da operação dos reatores demanda cuidado e deve ser realizado com cautela para promover a adaptação da comunidade microbiana às condições impostas. Como não é possível avaliar todas as variáveis do processo, principalmente no tratamento de águas residuárias concentradas, com elevada carga orgânica e substâncias potencialmente deletérias, a estratégia seria buscar a adaptação do lodo anaeróbio às condições ambientais.

Adaptação é um termo que, de forma geral, descreve o processo de resposta de um organismo submetido às mudanças em seu ambiente. Ou seja, é a capacidade do organismo em se ajustar às alterações impostas pelo meio, tornando-se menos suscetível a essas variações.

A zona ativa do reator, onde se concentra o lodo anaeróbio, é a área que necessita de maior atenção, pois é o coração do sistema. Além de promover a adaptação da biomassa, também é importante avaliar os parâmetros operacionais que podem influenciar na sua manutenção. Segundo Lu et al. (2015) fatores como carga orgânica elevada (maior que $8 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$) e TDH baixo (em torno de 3 h ou menor) podem ser prejudiciais para as partículas de lodo por reduzir a taxa de transferência de massa e prejudicar a atividade específica da metanogênese.

As células microbianas se distinguem de várias maneiras: em tamanho, morfologia, fases de crescimento, metabolismo, resistência, tempo de multiplicação/reprodução, características de agregação, entre outras particularidades. A diferença entre os grupos celulares tem caráter prático na digestão anaeróbia, pois tais características têm efeito importante na sobrevivência dos organismos e na transferência de nutrientes interespecíficos.

O processo de agrupamento celular, que se inicia quando microrganismos se tornam sensíveis aos parâmetros ambientais ou às condições de estresse, constitui em importante estratégia de sobrevivência, pois, assim, as células se protegem contra agressões externas.

O fenômeno de agregação multicelular depende de diversos fatores quanto à organização microbiana dentro da estrutura e envolve a faixa de tamanho das células, a localização da célula no agregado e o meio de crescimento. A disposição de cada célula na estrutura granular está relacionada à troca de nutrientes e ao mecanismo de proteção.

O sintrofismo microbiano, que a imobilização da biomassa proporciona, é requisito fundamental para o desenvolvimento do processo de digestão anaeróbia, mantendo a conversão dos compostos orgânicos balanceada. A imobilização da biomassa pode ocorrer aderida a algum tipo de material suporte inerte, fixo ou flutuante, ou pode ocorrer sem material suporte. De

forma geral, a imobilização é entendida como a aderência de microrganismos sobre partículas muito finas inertes ou orgânicas presentes nas águas residuárias.

A retenção de microrganismos em reatores biológicos pode ocorrer por meio da formação de biofilmes, flocos ou grânulos densos. Os biofilmes são camadas de microrganismos que se desenvolvem aderidos à superfície de algum material suporte, fixo ou móvel (Campos 1999). Diversos materiais podem ser utilizados como suporte, como, por exemplo, espuma, areia, argila expandida e poliestireno. Os microrganismos se aderem formando um biofilme no entorno do material.

Os microrganismos aderidos uns aos outros, sem necessidade de material suporte, podem formar lodo floculento, quando o agrupamento microbiano é disperso; ou lodo granulado, no qual o aglomerado microbiano tem característica densa. O agrupamento de microrganismos em flocos ajuda na sedimentação do lodo no sistema, importante para manutenção da biomassa no reator e, conseqüentemente, para manter a concentração de sólidos baixa no efluente do sistema.

O crescimento ocorrerá principalmente como biomassa dispersa (lodo floculento) em condição de baixa pressão de seleção, resultando na formação de um tipo de lodo volumoso. Em reatores anaeróbios, o organismo do tipo *Methanosaeta* pode formar filamentos muito longos (200–300 μm). Quando esses organismos crescem, na ausência de partícula de suporte sólida (orgânica ou inorgânica), características pobres de sedimentação são obtidas. Além disso, devido às bolhas de gás produzidas, esses lodos constituídos de filamentos vagamente entrelaçados tendem a flotar (Hulshoff Pol et al. 1983).

O crescimento microbiano em grânulos, formação mais comumente observada em reatores UASB, parece ocorrer principalmente no tratamento de águas residuárias ricas em carboidratos e ácidos voláteis. A formação dos grânulos está sujeita a fatores físicos, químicos e biológicos como características do substrato, condições que beneficiem o crescimento de arqueias metanogênicas, hidrodinâmica, temperatura, pH, entre outros fatores (Hulshoff Pol et al. 2004; Alves 2015). Lodo granulado possui, em geral, melhor capacidade de estabilização, maior densidade, estrutura microbiana mais forte, maior retenção de biomassa e melhor capacidade de remoção de nutrientes em comparação com lodos floculentos (Liu et al. 2014).

Todas as formas de retenção microbiana são positivas para melhoria da eficiência do tratamento, pois a manutenção da biomassa traz benefícios, tais como maior concentração de biomassa no sistema; capacidade de tratamento de maior volume de água residuária e efluente do reator clarificado devido a menor concentração de sólidos (Xing et al. 2015). No entanto, o mecanismo de granulação é mais eficiente. Sua estrutura permite troca simbiótica entre a massa microbiana de maneira a potencializar a capacidade de tratamento. Alguns estudos têm

investigado e não medido esforços para compreender esse mecanismo (Hulshoff Pol et al. 2004; Alves 2015; van Lier et al. 2015), que é chave do tratamento em reatores UASB de alta taxa.

4.7 Teoria sobre o processo de formação de grânulos anaeróbios

O reconhecimento do processo de granulação foi um marco significativo no tratamento anaeróbio de águas residuárias, visto que esse fenômeno aumenta a eficiência e aplicabilidade da tecnologia, podendo ser considerado o principal motivo do êxito da introdução do reator de manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente para tratamento anaeróbio de efluentes industriais (McHugh et al. 2003b; Hulshoff Pol et al. 2004).

A granulação é um processo dinâmico sem um ponto de partida claro. No entanto, descobriu-se que o início do processo de granulação é identificável em condições de laboratório pelo aparecimento, dentro de um período de alguns dias, de aglomerados de lodo macroscópicos (Hulshoff Pol et al. 1983). De forma geral, os grânulos anaeróbios são formados por agrupamentos de microrganismos que interagem entre si, num complexo consórcio microbiano altamente estruturado, a fim de degradar a matéria orgânica. Tal agregado é um arranjo metabólico estável que cria condições ambientais ótimas para todos os seus membros (Guiot, Paus e Costerton 1992).

Díaz et al. (2006) associaram a idade e característica do grânulo anaeróbio à sua aparência e cor. Essa associação ocorreu diante da avaliação das características de reator UASB tratando efluentes de cervejaria. Tipos diferentes de grânulos coexistiram nesse sistema e a distinção visual principal estava nas cores: pretos, cinzas ou marrons. Além da cor, os agregados microbianos diferiam na taxa de sedimentação e tamanho. Os grânulos pretos eram pequenos e compactos. Os grânulos marrons eram menos compactos e porosos. Os grânulos cinzentos, mais abundante no lodo, eram compostos por camadas concêntricas definidas de microrganismos.

Embora a formação de grânulos venha sendo estudada, e já se saiba da importância que esse ecossistema microbiano com arquitetura interna característica apresenta em sistemas de tratamento biológico, a literatura é, muitas vezes, contraditória sobre os mecanismos responsáveis por sua formação e atuação. Isto porque não há apenas um caminho para formação de grânulos e os diversos fatores ambientais podem contribuir para sua dinâmica, impondo, aos mesmos, características diferentes que resultarão em respostas diferentes às alterações no meio.

O fenômeno de granulação e os principais fatores para formação de grânulos são tratados por diversos enfoques na literatura. Hulshoff Pol et al. (2004) reuniram informações sobre as teorias existentes e as dividiram em físicas, microbianas e termodinâmicas. Parâmetros

como velocidades ascensionais do líquido e dos gases, forças de cisalhamento e a remoção do excesso de lodo são considerados como principais responsáveis pelo fenômeno da granulação na teoria física. A teoria microbiológica é baseada nas características de microrganismos específicos e a teoria termodinâmica parte do princípio da energia e interações físico-químicas entre as paredes celulares ou entre paredes celulares e outras superfícies.

Teoria de granulação - Física

Na abordagem física, o fenômeno de granulação é explicado em termos das condições físicas prevalentes no reator. Velocidades de fluxo ascendente do líquido e gás, sólidos suspensos no afluente ou lodo, atrito e remoção do excesso de lodo dos reatores são considerados os fatores responsáveis pela granulação (Hulshoff Pol et al. 2004). Nesta perspectiva, duas teorias foram apontadas por Hulshoff Pol (2004): a teoria de seleção de Hulshoff Pol (1983) e a de crescimento de sólidos colonizados de Pereboom (1994). Os autores não descartam a importância da disponibilidade de concentração adequada de nutrientes, o pH e a temperatura.

Na teoria da pressão de seleção, acredita-se que a base do processo de granulação seja a seleção contínua de partículas de lodo que ocorre no reator, em que o lodo leve e disperso é expulso do sistema, enquanto componentes mais densos permanecem. Essa seleção seria governada tanto pela taxa de produção de gás, que dependente da taxa de carga orgânica aplicada ao lodo, quanto pela taxa de carga hidráulica.

Em cargas orgânicas mais altas, a crescente produção e liberação de gás desempenha papel importante no processo, proporcionando mistura no sistema devido à agitação provocada pelo desprendimento de gás. A maior produção de biogás também pode provocar o encapsulamento de grânulos pelo gás produzido. O grânulo encapsulado pode ser levado por flotação, sendo os grânulos maiores os mais susceptíveis, pois os agregados microbianos volumosos, com uma superfície específica elevada, têm maior propensão em aderir às bolhas de biogás e à espuma gerada no sistema, o que pode vir a reduzir a propriedade de sedimentação e causar flotação.

Taxa de carga hidráulica apropriada é necessária para a retenção seletiva da fração de lodo mais densa. Como se trata de um processo dinâmico, fortemente dependente do tipo de resíduo, números não podem ser estabelecidos em relação ao regime recomendado para a taxa hidráulica e de carga orgânica aplicada ao lodo. No entanto, os autores indicam a aplicação de pelo menos $0,6 \text{ kgDQO kgSSV}^{-1}\text{d}^{-1}$ e alertam que a taxa de granulação será baixa em concentrações de DQO abaixo de 1gL^{-1} , resultando em lavagem drástica do lodo.

Com o carregamento do lodo menos denso, o crescimento do lodo finamente disperso é minimizado e o desenvolvimento microbiano é delegado a um número limitado de núcleos de crescimento, que pode consistir em materiais inertes orgânicos e inorgânicos. Esses núcleos de crescimento aumentam em tamanho até um determinado limite máximo, geralmente 5 mm. Após esse limite, partes dos grânulos se destacam, produzindo uma nova geração de núcleos de crescimento e assim por diante.

A primeira geração consiste em agregados relativamente volumosos, mas naturalmente eles se tornam gradualmente mais densos devido ao crescimento microbiano no exterior e no interior dos agregados, pois o crescimento microbiano é estimulado nos agregados menos volumosos, já que o substrato pode penetrar mais profundamente nesses devido à menor limitação de difusão e menor atividade bacteriana.

Na proposição de crescimento de sólidos suspensos colonizados, Pereboom (1994) sugere que a formação dos grânulos ocorre devido ao atrito e colisão de sólidos finos suspensos presentes no afluente e que o aumento do tamanho dos grânulos é explicado apenas pelo crescimento microbiano. Nessa hipótese, a força de cisalhamento não contribui significativamente para quebra ou desintegração dos aglomerados. O desenvolvimento dos grânulos ocorre, portanto, apenas pelo crescimento de pequenas partículas formadas pelo atrito.

Nas teorias físicas, o tempo de retenção celular está diretamente relacionado com o tamanho das partículas: grânulos maiores estão há mais tempo no sistema e por isso tiveram oportunidade para multiplicação celular, o que explica seu crescimento. A limitação do tamanho máximo do grânulo em operação, por sua vez, é dada pela descarga regular de biomassa excedente.

Teoria de granulação – Microbiana

As teorias agrupadas nesta seção explicam a granulação fundamentada, principalmente, nas características de determinados microrganismos. Nessa abordagem, os fatores físicos, tal como velocidades de fluxo ascendente do líquido e gás, sólidos suspensos, atrito e remoção do excesso de lodo dos reatores são frequentemente integrados. A observação de características granulares, estrutura de grânulos e microbiologia correspondente, acoplada às condições prevalentes no reator, constituem a base dessas teorias.

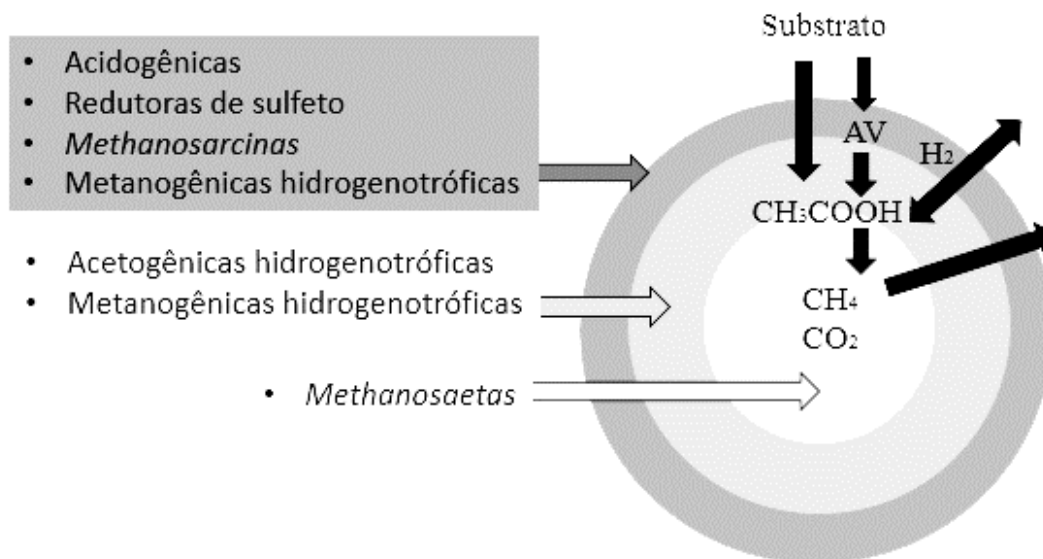
Alguns estudos observaram a organização estrutural dos grânulos e constataram estratificação microbiana em camadas sobrepostas, enquanto que em outros não foram identificadas camadas bem definidas (MacLeod, Guiot e Costerton 1990; Guiot, Pauss e Costerton 1992; Chen e Lun 1993; Del Nery et al. 2008; Alves 2015).

Nas pesquisas desenvolvidas por MacLeod, Guiot e Costerton (1990), os grânulos obtidos de um reator mesofílico, alimentado durante um mês com sacarose, exibiu uma estrutura de três camadas em que cada camada predominava uma morfologia distinta. A camada exterior continha uma variedade de organismos, incluindo aglomerados de grandes organismos cocóides que se assemelhavam a cocos metanogênicos da ordem *Methanococcales*, filamentos finos similares ao *Methanospirillum* sp. também estavam presentes; a segunda camada consistia de grande número de microrganismos em forma de bastões. Entre esses estavam organismos muito densos em elétrons à semelhança de *Methanobrevibacter* sp. e outros a *Syntrophobacter* sp. A terceira camada continha um grande número de hastes com extremidades planas, que ocuparam grandes áreas do centro dos grânulos.

A teoria estabelecida por meio destas observações é que a camada mais externa é formada por possíveis bactérias acidogênicas, bactérias redutoras de sulfato (ocorrem na presença de sulfato no substrato), além de *Merhanosarcina*; prováveis bactérias acetogênicas, e, também, arqueias metanogênicas, consumidoras de hidrogênio, são encontradas na camada intermediária; o núcleo acetoclástico, composto quase exclusivamente de organismos semelhantes a *Methanosaeta* (Guiot et al. 1992).

Segundo essa abordagem, o substrato em contato com a superfície do grânulo é utilizado pelas bactérias acidogênicas presentes na primeira camada; em seguida, difunde-se no grânulo, onde é transformado em ácidos orgânicos e hidrogênio. Em resposta aos gradientes, os ácidos orgânicos e o hidrogênio adentram cada vez mais para o centro dos grânulos. A produção de metano e dióxido de carbono, efetivada por microrganismos metanogênicos consumidores de acetato, ocorre mais fortemente no centro desses grânulos e depois escapa para o meio líquido do sistema (Figura 3). A complexidade e beleza do sistema granular estão na capacidade de um único grânulo incluir todo o processo de digestão anaeróbia.

Figura 3. Estrutura granulométrica



Fonte: adaptado de Guiot, Paus e Costerton (1992).

No estudo de Alves (2015), foi verificado que em grânulos de UASB utilizado no tratamento de vinhaça da cana-de-açúcar, análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou que, de maneira geral, as amostras de grânulos se comportaram de duas formas: nas menores cargas orgânicas analisadas (2,5 e 5 gDQOL⁻¹d⁻¹), as *Methanosaeta* parecem se concentrar no interior do grânulo, enquanto as outras morfologias se apresentam na superfície granular (bacilos de dimensões variadas e poucos arranjos de cocos semelhante a methanosarcina.). E nas COV mais altas (7,5 e 10 gDQOL⁻¹d⁻¹), as *Methanosaeta* afloraram na superfície. O diâmetro dos grânulos reduziu com o aumento da carga orgânica, o que pode ter influenciado o surgimento desses microrganismos na superfície.

Em grânulos oriundos de UASB, tratando resíduo de abatedouro de aves, não foi observado distribuição microbiana em camadas. Diferentes tipos morfológicos de células se entrelaçaram aparentemente de forma aleatória ao longo da seção transversal. Células semelhantes a *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, bastonetes e colônias de cocos foram observadas na superfície, camada interna e centro dos grânulos. Provavelmente, a complexidade do substrato, devido principalmente às proteínas e gorduras, levou à distribuição microbiológica uniforme nos grânulos analisados (Del Nery et al. 2008).

Chen e Lun (1993) verificaram que três tipos de grânulos de lodo foram cultivados com diversos substratos e em diferentes condições, todos com boa capacidade de estabilização em condições normais de operação. Na condição 1 foi utilizado ácido acético como substrato; na condição 2, glicose e na 3, vinhaça. Os grânulos cultivados como ácido acético como única

fonte de carbono mostraram predominância de *Methanosaeta* na superfície e nas partes internas aglomerados de *Methanosarcina*. Os grânulos alimentados com glicose apresentaram macrozonas com distribuição de variados morfotipos microbianos na superfície e predominância de *Methanosaeta* no centro. Nos grânulos submetidos à vinhaça as *Methanosarcina* e *Methanosaeta* foram responsáveis pela formação dos núcleos. Comparado com o grânulo submetido ao ácido acético, o grânulo alimentado com glicose é mais complexo, isto ocorre devido à digestão anaeróbia da glicose envolver mais processos que a digestão do ácido acético. Os autores verificaram que o grânulo cultivado em vinhaça possui a maior complexidade microbiológica devido aos constituintes do substrato.

Hulshoff Poll et al. (2004) reuniram diversos estudos sobre granulação no que diz respeito à abordagem microbiana e dividiram as teorias embasadas na fisiologia e ecologia. As teorias agrupadas, referente a fisiologia, foram as de Sam-Soon et al. (1987); Wiegant (1987) e de Chen e Lun (1993); e as de ecologia foram de Zeeuw (1984) e de Morgan, Evison e Forster (1991).

Segundo Sam-Soon et al. (1987), a granulação depende de um grupo de microrganismos do gênero *Methanobacterium*, um organismo que utiliza H_2 como sua única fonte de energia e pode produzir todos os seus aminoácidos, com exceção de cisteína. Quando esse microrganismo está em ambiente de alta pressão parcial de H_2 , isto é, excesso de substrato, o crescimento celular e a produção de aminoácidos são estimulados. Em condições de alta carga, a taxa de absorção de H_2 pelos organismos consumidores de H_2 é menor que a taxa de produção de H_2 resultando numa região de alta pressão parcial de H_2 .

Wiegant (1987) propôs uma "teoria do espaguete" sobre a granulação de lodo no UASB tratando águas residuárias acidificadas, soluções de acetato ou misturas de ácidos orgânicos com microrganismos predominantemente de *Methanosaeta*. Essa teoria divide a formação dos grânulos em duas fases: formação de precursores e crescimento dos grânulos a partir dos precursores. Inicialmente, os microrganismos do gênero *Methanosaeta* formam agregados muito pequenos. A seleção de agregados é feita impondo uma velocidade ascensional crescente, os precursores são formados e a granulação é inevitável. O crescimento individual dos microrganismos e o aprisionamento dos microrganismos dispersos levam ao crescimento das partículas precursoras formando grânulos, que devido às forças de cisalhamento causadas pela carga hidráulica e pelo biogás produzido adquirem uma forma esférica. Grânulos jovens apresentam aparência filamentosa. Com o tempo, os grânulos vão ficando mais robustos devido ao aumento da densidade pelo crescimento microbiano. Segundo essa teoria, a concentração de

sólidos em suspensão não deve ser muito alta, caso contrário, o aumento no tamanho dos agregados ocorrerá muito lentamente.

Chen e Lun (1993) formularam uma hipótese semelhante à “teoria do espaguete” para a granulação de lodo anaeróbio em um UASB alimentado com vinhaça. Nessa teoria, microrganismos do gênero *Methanosaeta* e *Methanosarcina* são considerados os organismos responsáveis pela formação do núcleo. O primeiro, devido à qualidade de aderência e o último por sua capacidade de crescer em pacotes envolvidos por polímeros extracelulares (PEC), sobre os quais os organismos de *Methanosaeta* podem se anexar. A pressão de seleção e a concentração de ácido acético são as forças motrizes para a formação do núcleo. Após formação do núcleo, o grânulo se desenvolve com vários outros microrganismos. Nessa teoria, os microrganismos metanogênicos não predominam na superfície de grânulos maduros, mas, em vez disso, são misturados com uma variedade de bactérias.

Segundo Morgan, Evison e Forster (1991), os grânulos se desenvolvem a partir de um precursor que consiste em um pequeno agregado predominantemente constituído de *Methanosaeta* e bactérias. Nos filamentos de *Methanosaeta* se aderem outros microrganismos metanogênicos e não metanogênicos.

Zeeuw (1984) explica a formação dos diferentes tipos de grânulos de UASB alimentados com ácidos orgânicos voláteis. Os três tipos de grânulos observados foram: grânulos esféricos compactos compostos, principalmente, de microrganismos que se assemelham a *Methanosaeta*; grânulos relativamente esféricos constituídos, majoritariamente, por microrganismos filamentosos, semelhantes a *Methanosaeta*, frouxamente entrelaçados ligados a uma partícula inerte; e grânulos compactos esféricos compostos, predominantemente, por *Methanosarcinas*. O desenvolvimento de cada tipo de lodo granular foi explicado com base na seleção do inóculo, erosão e expansão da manta de lodo, diferença na pressão de seleção e tempo médio de retenção celular. A adição de pequenas quantidades de lodo granular foi considerada vantajosa por pelo menos dois motivos: iniciar o novo sistema com lodo granular constituído de biomassa metanogênica e ter as partículas de lodo granular como possíveis precursores para novos grânulos (Chen e Lun 1993; Hulshoff Pol et al. 1983).

Pesquisa realizada em 2002 mostrou uma abordagem díspar. Nesse estudo, a caracterização de grânulos submetidos a água residuária de cervejaria foi realizada pela investigação periódica do lodo de reatores em grande escala. A hipótese formada é que grânulos que apresentam microrganismos metanogênicos centralizados na camada mais profunda e bactérias concentradas na superfície têm tendência à flotação, pois os gases formados não são liberados prontamente. Segundo os autores, para evitar o acúmulo de biogás dentro do grânulo,

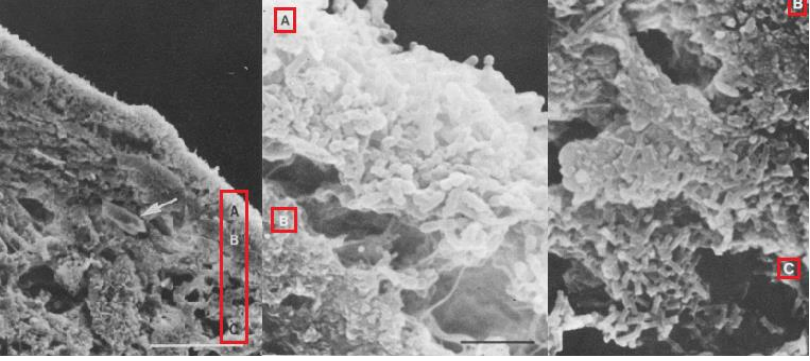
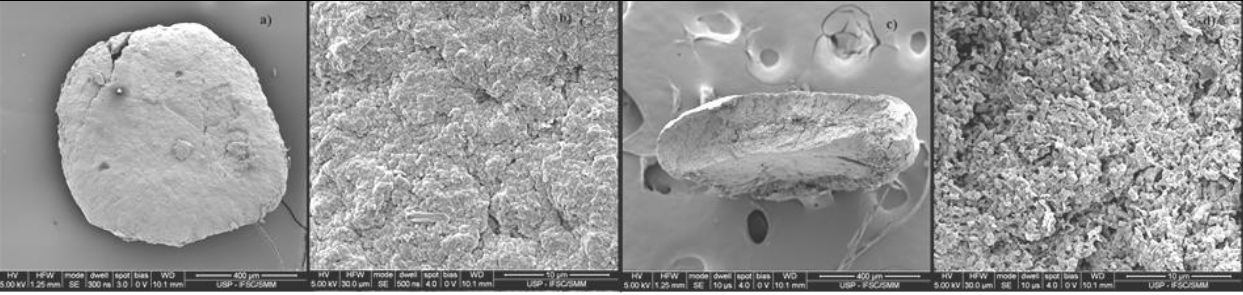
o núcleo deve ser rígido e funcionar como suporte metanogênico. Portanto, grânulos estáveis foram considerados os que apresentaram microrganismos metanogênicos na superfície granular (Saiki et al. 2002).

São diversas as teorias de formação granular baseada na microbiologia. Algumas se amparam e outras se contradizem. A estrutura granular não segue, necessariamente, um padrão de organização microbiana, pois a estrutura, microrganismos predominantes e outras características dos grânulos estão intrinsicamente ligados a parâmetros ambientais e operacionais, que são específicos para cada tratamento.

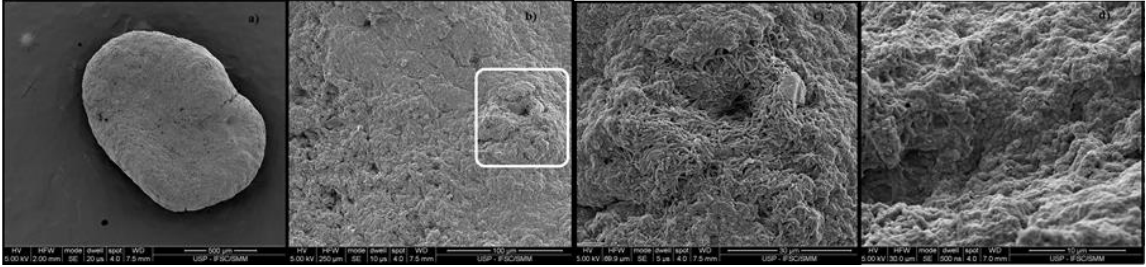
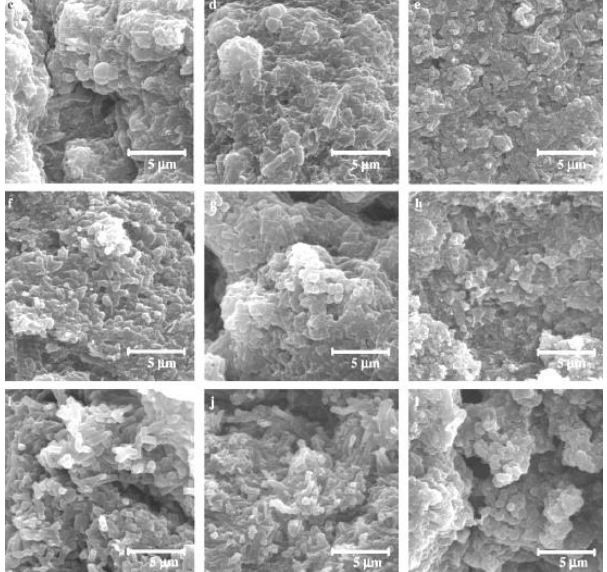
Nos estudos analisados, e expostos no Quadro 2, foi possível identificar quatro formas diferentes de organização da biomassa nos agregados microbianos. Nas pesquisas desenvolvidas foram aplicadas diferentes condições operacionais como, por exemplo, substratos e tempo de operação, que influenciam na dinâmica granular de maneira ainda não entendida.

A maioria das teorias sobre granulação confirma que *Methanosaeta*, microrganismos metanogênicos acetotróficos, desempenham papel fundamental na granulação. Alguns acreditam que aglomerados de *Methanosarcina* melhoram a formação de grânulos. A única teoria, dentre as estudadas, que afirma que outros organismos causam granulação é o de Sam-Soon et al. (1987), que defende que a granulação depende de um grupo de microrganismos do gênero *Methanobacterium*, excessiva produção de polímero extracelular e altas pressões parciais de H₂ (Hulshoff Pol et al. 2004).

Quadro 2. Estudos sobre estrutura e disposição microbiana em grânulos

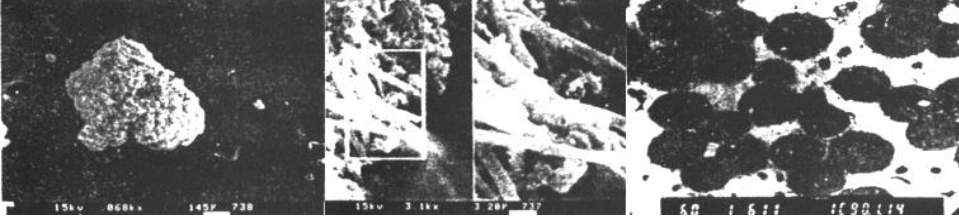
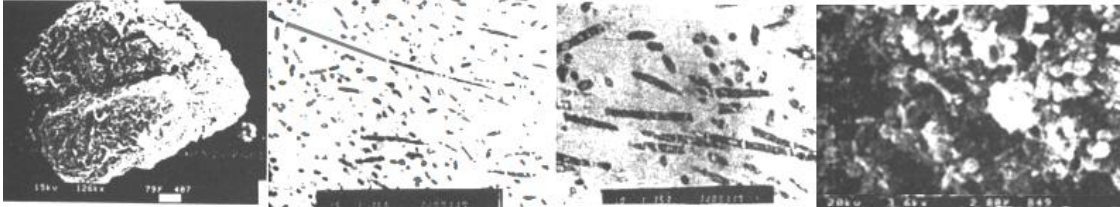
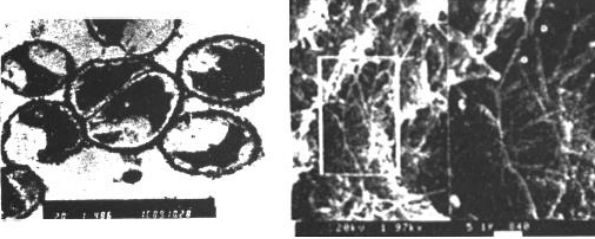
| Estrutura granular | Ilustrações | Características | Referência |
|---|--|---|------------------------------|
| <p>Grânulos com camadas bem definidas (A, B e C).</p> |  <p>Camadas distintas (A, B, C) na seção transversal granular. (A) revela uma população heterogênea de hastes, filamentos e cocos. Camada (B) exibe um empacotamento denso de biomassa, constituída predominantemente por bastonetes que parecem estar embebidos em polímero extracelular. Camada (C) contém principalmente um morfotipo, que forma as paredes das cavidades internas.</p> | <p>UASB alimentado com sacarose por 1 mês.</p> | <p>(MacLeod et al. 1990)</p> |
| <p>Grânulos sem camadas definidas, mas com tendência de maiores concentrações de <i>Methanosaeta</i> no centro.</p> |  <p>Grânulo na COV de 2,5 gDQOL⁻¹d⁻¹: a) Imagem panorâmica do grânulo; b) Imagem da superfície do grânulo; c) Imagem panorâmica do corte do grânulo e d) Imagem do interior do grânulo.</p> | <p>UASB alimentado com vinhaça da cana-de-açúcar com COV de 2,5 e 5 gDQOL⁻¹d⁻¹.</p> | <p>(Alves 2015)</p> |

Continua

| Estrutura granular | Ilustrações | Características | Referência |
|--|---|--|-------------------------------|
| <p>Grânulos sem camadas definidas, mas com afloramento de <i>Methanosaeta</i> na superfície.</p> |  <p>Grânulo na COV de 7,5 gDQO L⁻¹ d⁻¹: a) Imagem panorâmica do grânulo; b) Imagem da superfície do grânulo com destaque para afloramento de <i>Methanosaeta</i>; c) Afloramento de <i>Methanosaeta</i> ampliado e d) Imagem do interior do grânulo apresentando variedade de morfotipos.</p> | <p>UASB alimentado com vinhaça da cana de açúcar com COV de 7,5 e 10 gDQOL⁻¹d⁻¹.</p> | <p>(Alves 2015)</p> |
| <p>Grânulos com distribuição microbiana aparentemente aleatória.</p> |  <p>Imagens: (c), (d) e (e) cocos, células em forma de bastonetes, células do tipo <i>Methanosarcina</i> e <i>Methanosaeta</i> (superfície); (f), (g) e (h) cocos, células em forma de bastonete e células do tipo <i>Methanosaeta</i> (camada interna); (i), (j) e (k) cocos, células em forma de bastonete e células do tipo <i>Methanosaeta</i> (centro).</p> | <p>UASB operando por 1228 dias, tratando água residuária de abatedouro de aves.</p> | <p>(Del Nery et al. 2008)</p> |

Continua

Conclusão

| Estrutura granular | Ilustrações | Características | Referência |
|---|---|---|--------------------------|
| <p>Grânulos com predominância de <i>Methanosaeta</i> na superfície e nas partes internas aglomerado de <i>Methanosarcina</i>.</p> |  <p>Imagens de MEV: superfície do grânulo, <i>Methanosaeta</i> predomina na superfície externa e aglomerados de <i>Methanosarcina</i> (perfil do grânulo), respectivamente.</p> | <p>Grânulos submetidos à ácido acético como única fonte de carbono.</p> | <p>(Chen e Lun 1993)</p> |
| <p>Grânulos com distribuição de diferentes morfotipos microbianos na superfície e predominância de <i>Methanosaeta</i> no centro.</p> |  <p>Imagens de MEV: superfície do grânulo; parte interna do grânulo; características morfológicas típicas de <i>Methanosaeta</i>; e <i>Methanosaeta</i> desenvolvida em cavidade no grânulo, respectivamente.</p> | <p>Grânulos submetidos à glicose como única fonte de carbono.</p> | <p>(Chen e Lun 1993)</p> |
| <p>Grânulos com <i>Methanosarcina</i> e <i>Methanosaeta</i> responsáveis pela formação dos núcleos e predominância absoluta de <i>Methanosaeta</i> na superfície.</p> |  <p>Imagens de MEV: <i>Methanosarcina</i> cresce em aglomerados através de polímero extracelular no centro do grânulo e <i>Methanosaeta</i> predomina absolutamente na superfície do núcleo.</p> | <p>UASB alimentado com vinhaça.</p> | <p>(Chen e Lun 1993)</p> |

Fonte: elaborada pelo autor

Teoria de granulação - Termodinâmica

Nessa teoria de granulação, hidrofobicidade e mobilidade eletroforética são características relevantes, além da influência da atividade de translocação de prótons através das superfícies das membranas microbianas, causando a sua energização (Hulshoff Pol et al. 2004). Segundo os critérios termodinâmicos, o processo de granulação em reatores UASB pode seguir quatro etapas de formação do biofilme: transporte de células para a superfície de um material inerte ou outras células contidas no substrato; adsorção reversível inicial por forças físico-químicas; adesão irreversível das células ao substrato por apêndices microbianos e/ou polímeros e multiplicação das células (Schmidt e Ahring 1995).

As células são transportadas por uma combinação dos seguintes mecanismos: difusão (Movimento browniano), transporte pelo fluxo de fluídos, flotação de gás ou sedimentação. A adsorção pode ocorrer após uma colisão entre células com outras células ou com agregados microbianos presentes no inóculo ou com materiais inorgânicos que podem funcionar como núcleos de crescimento (Schmidt e Ahring 1995).

4.8 Características gerais que influenciam na formação de grânulos

As teorias de granulação, expostas na seção 4.7, foram formuladas logo após a descoberta da importância da granulação para o desempenho do sistema anaeróbio e são, a maioria, da década de 1980 e 1990. Atualmente, poucas pesquisas têm se concentrado na manta de lodo, mas sim nos resultados gerais do tratamento biológico e na possibilidade de produção de energia. No entanto, a estabilidade da manta de lodo é o que torna o sistema anaeróbio eficiente. Embora o enfoque não seja o estudo da manta de lodo, trabalhos relativamente recentes apontam algumas características fundamentais para o estabelecimento da formação granular. Essas características estão relacionadas, principalmente, ao tempo necessário de reprodução microbiana, ao núcleo de formação, ao mecanismo de defesa e às forças externas exercidas sobre as partículas de lodo.

O lodo granular desempenha papel importante no tratamento de águas residuárias devido às vantagens de sua estrutura agregada, densa e forte, que possibilita melhor retenção celular, melhor separação de efluentes e sólidos, maior taxa de conversão de substrato, maior concentração de biomassa e maior resistência às cargas de choque (Xing et al. 2015).

Os núcleos adequados para o crescimento e formação dos grânulos são materiais inertes orgânicos (como, por exemplo, uma única célula microbiana) ou inorgânicos. Os núcleos de crescimento aumentam não apenas em tamanho, mas também em densidade microbiana;

portanto, ocorre crescimento tanto aos arredores quanto na parte interna do grânulo (Van Lier et al. 2015). Mudanças operacionais ou a própria idade do lodo, que pode vir a torna-lo menos resistente, fazem com que os grânulos se quebrem. Esses fragmentos podem servir como bases para outras unidades de grânulos ou, ainda, acabar sendo arrastados para fora do reator (Alves 2015).

A formação dos agregados microbianos pode ocorrer automaticamente em resposta ao aumento da velocidade superficial do líquido e da produção de biogás, como possível forma de defesa, melhorando, assim, o consórcio microbiano. O tamanho dos grânulos e a espessura do biofilme dependem de vários fatores, que ainda não são claros. No entanto, sabe-se que forças de ligação química, forças externas exercidas sobre as partículas, como tensão de cisalhamento, e cargas orgânicas elevadas podem influenciar no crescimento granular (Alves 2015).

Fatores operacionais e ambientais são responsáveis pela estabilidade do lodo e, conseqüentemente, pelo desempenho do sistema de tratamento. A análise do tempo de retenção celular, carga orgânica aplicada ao lodo, TDH e velocidade ascensional, presença de substâncias tóxicas e metais pesados, salinidade e disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura devem ser observados para garantir a estabilidade do sistema (Abbasi e Abbasi 2012).

A granulação, apesar de ser um processo natural em alguns sistemas biológicos, ocorre apenas se o TDH não prejudicar a manutenção microbiana. O TDH e o tempo de retenção celular devem ser suficientes para permitir a duplicação dos microrganismos metanogênicos, por serem mais sensíveis e de crescimento mais lento comparado aos das células bacterianas.

A velocidade ascensional é responsável pela mistura interna e por promover contato mais eficiente entre água residuária e microrganismos. A velocidade ascensional necessita ser tão grande quanto possível, resultando no menor TDH admissível, para um tratamento rápido e um sistema compacto. Caso esses parâmetros não estejam adequados para o tipo de tecnologia utilizada, é presumível a ocorrência de alguns problemas, tais como: perda excessiva de biomassa, provocada pelo arraste do lodo com o efluente; redução do tempo de retenção celular e conseqüente diminuição da estabilização da biomassa ativa; possível falha do sistema, uma vez que o tempo de permanência da biomassa não é suficiente para seu desenvolvimento e estabilização.

As limitações de transferência de massa externa não são importantes em condições de velocidade ascensional maior 1 mh^{-1} , mas podem desempenhar papel relevante nas velocidades de fluxo ascendente inferiores a 1 mh^{-1} . Alguns dos processos cinéticos que ocorrem dentro do grânulo são crescimento e decaimento de biomassa, conversão de substrato solúvel e

desintegração e hidrólise de partículas orgânicas. Supõe-se que a biomassa morta se comporta como material suporte para partículas (Odriozola, López e Borzacconi 2016).

A intensidade aplicável ao lodo de carga orgânica varia de substrato para substrato utilizado. Isso ocorre porque alguns podem conter mais substâncias tóxicas e inibidoras do processo anaeróbio que outros, fazendo necessária a avaliação específica para cada condição. É nesse ponto que se encontra a complexidade de sistemas de tratamento biológico, pois uma verdade para uma determinada condição de tratamento fornece indícios, mas não certezas. O que, de fato, é possível afirmar é que o inóculo e a composição química das águas residuárias utilizadas no tratamento têm impacto significativo na composição química e na estrutura dos grânulos (Batstone, Keller e Blackall 2004; Alves 2015)

Em COV superiores a $5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, a mistura de lodo e água residuária ocorre, também, devido à turbulência provocada pela produção do biogás (van Lier et al. 2015). O biogás produzido, juntamente com a velocidade do fluxo ascendente do líquido e o movimento descendente do lodo, são os responsáveis por fornecer a mistura dentro do reator, o que é essencial para distribuição adequada do substrato e para evitar ou minimizar caminhos preferenciais (Rajagopal et al. 2013; Chatterjee e Ghangrekar 2017).

A presença de substâncias tóxicas e metais pesados, em determinada concentração, é conhecida por limitar o processo de digestão anaeróbia. No entanto, em quantidades específicas, algumas substâncias com potencial inibidor podem ser favoráveis para o desenvolvimento microbiano e desempenho adequado do sistema. Macronutrientes e micronutrientes, como cálcio, magnésio, ferro, cobre, cobalto, além do alumínio, são de vital importância para a agregação das células (Subramanyam e Mishra 2013). Inclusive, vários tipos de inibição podem ser neutralizadas aumentando a retenção da biomassa no reator (Chen, Cheng e Creamer, 2008).

Muitos metais pesados conduzem numerosas reações anaeróbias e, portanto, são essenciais no processo. O motivo que os tornam estimulantes ou inibidores aos microrganismos está relacionado com a concentração, formas químicas e fatores relacionados com pH e potencial redox (Chen, Cheng e Creamer, 2008). Ademais, concentração da biomassa, tempo de exposição à substância tóxica, idade celular (culturas mais novas provaram ser mais robustas e resistentes aos tóxicos em relação às culturas mais antigas), adaptação dos microrganismos e temperatura também delimitam o nível de toxicidade da substância (Yang e Speece, 1986).

Temperatura e pH estão diretamente ligados ao desenvolvimento das células nos grânulos e, conseqüentemente, ao seu tipo de formação, pois os microrganismos apresentam sensibilidade diferente a esses parâmetros, os quais, portanto, atuam como selecionadores de microrganismos presentes no meio. Além disso, o pH também é indicativo dos processos que

estão ocorrendo. A respeito das faixas de temperaturas mesofílica e termofílica, estas são reconhecidas como adequadas na degradação anaeróbia. O aumento da temperatura do processo em geral tem efeito sobre a taxa metabólica dos microrganismos. A influência do pH e temperatura na digestão anaeróbia está ampliada na sessão 0, que se ateve em aprofundar a discussão sobre Equilíbrio do processo de digestão anaeróbia.

Ademais, substâncias poliméricas extracelulares, liberadas por microrganismos durante o crescimento e lise celular, também desempenham papel importante na formação e manutenção de grânulos devido a sua capacidade de ligação, que está intimamente relacionada ao desempenho de agregados microbianos (Liu et al. 2014).

Os polímeros extracelulares são compostos principalmente de carboidratos, proteínas e substâncias húmicas, além de pequenas quantidades de DNA liberado das células mortas após lise (Li et al. 2012). A cobertura de uma célula por polímero poderia alterar as características físico-químicas da superfície celular, tais como carga superficial, hidrofobicidade e outras propriedades. O PEC também influencia o aumento de tamanho dos grânulos, pois essa secreção pode formar camada de gel na superfície granular contribuindo, assim, para a adesão e ligação microbiana por meio de ligação química ou emaranhamento físico, facilitando o acúmulo de biomassa e fortalecendo a granulação do lodo (Wang et al. 2006).

4.9 Características físicas, químicas e biológicas do grânulo

Os grânulos resistentes e saudáveis, com alta velocidade de sedimentação, são benéficos para operação bem-sucedida de reatores (Lu et al. 2013). As características físicas, químicas e biológicas do lodo granular, sob diversas condições, podem esclarecer possíveis causas de instabilidade do processo UASB (Lettinga et al. 1997; Puñal et al. 2003). Ademais, a caracterização do lodo é uma oportunidade de encontrar novos parâmetros que possam ser utilizados para monitorar a sua qualidade em estações de tratamento de águas residuárias e, assim, otimizar o tratamento e a produção de energia.

Características físicas dos grânulos

Propriedades como tamanho, resistência e velocidade de sedimentação de grânulos são apontadas como fundamentais para o processo de tratamento. O crescimento do grânulo até determinado tamanho estacionário é delimitado por processos de abrasão e lavagem de grânulos (Odriozola et al. 2016). A manta de lodo dos reatores é capaz de formar naturalmente grânulos, com tamanho variando entre 0,5-5 mm de diâmetro (Show et al. 2004; Alves 2015). No entanto

alguns pesquisadores apontam faixa de diâmetro menor como, por exemplo, de 0,5 a 3 mm (Del Nery et al. 2008) e de 0,4 a 2 mm (Lu et al. 2013).

O tamanho do grânulo não é simplesmente um parâmetro para ilustrar o processo de crescimento e envelhecimento nas organizações microbianas; mas também influencia na capacidade de transporte e difusão de massa, devido à porosidade dessas estruturas (Bishop, Zhang e Fu 1995; Liu et al. 2014). A taxa de utilização do substrato pode ser limitada pela resistência à transferência de massa (Odriozola et al. 2016).

Pesquisadores buscaram definir o tamanho mínimo das biopartículas que poderiam ser classificadas como grânulos, ou seja, o tamanho mínimo em que as vantagens do lodo granular fossem mantidas. Para tal, analisaram grânulos de UASB, escala de bancada, utilizando a teoria da sedimentação, na qual as biopartículas de diâmetro mínimo, que devem ser consideradas como grânulos, foram definidas por gravidade específica de lodos variando entre 1,01 e 1,05. Por exemplo, para a gravidade específica de 1,035, o diâmetro mínimo de grânulos necessários para uma melhor retenção de lodo foi de 0,34 mm. Observou-se que a atividade metanogênica específica (AME) aumentou com o tamanho das biopartículas testadas (0,27-3,03 mm). Esses resultados evidenciam que o arranjo granular interfere diretamente no potencial metanogênico do lodo (Bhunia e Ghangrekar 2007).

Alguns trabalhos científicos relacionaram a dimensão do grânulo à propriedade de resistência às forças de cisalhamento devido à turbulência no reator, assim como ao descarte do excesso de biomassa, ao processo biológico de crescimento e decaimento celular, e à concentração e tipo de substrato (Kosaric et al. 1990; Grotenhuis et al. 1991; Grotenhuis et al. 1991). Outros autores associaram a dimensão e as propriedades de resistência dos grânulos à velocidade ascensional do líquido, ao tempo de operação, ao TDH e aos microrganismos formadores (Guiot et al. 1992; Ghangrekar et al. 1996; Puñal e Lema 1999).

Além disso, a desintegração do lodo granular pode estar associada ao aparecimento de cavidade central proveniente de problemas de difusão do substrato. Esses grânulos, por apresentarem paredes muito finas, são mais suscetíveis ao rompimento por forças de cisalhamento (Kosaric et al. 1990; Yan e Tay 1997; Saiki et al. 2002; Del Nery et al. 2008).

As técnicas apresentadas na literatura para análise da dimensão granular, como microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teoria da sedimentação, embora sejam interessantes e contribuam para análise da estrutura granular, apresentam limitações importantes. No primeiro caso, poucos grânulos são utilizados na determinação do diâmetro de grânulo e o intervalo de determinados tamanhos de grânulos não pode ser mensurado usando

essa técnica. No segundo caso, as análises realizadas não são quantitativa e qualitativamente exatas.

Características químicas dos grânulos

Os minerais que constituem a manta de lodo granular são oriundos, principalmente, da água residuária processada no sistema de tratamento. A concentração dos minerais é fator importante já que, dependendo dela, esses podem se comportar como nutrientes que auxiliam o processo anaeróbio ou podem apresentar toxicidade aos microrganismos envolvidos no processo.

As substâncias inibitórias são, muitas vezes, as principais causas da instabilidade e falha do reator anaeróbio, uma vez que estão presentes em concentrações substanciais nas águas residuária e no lodo. Um material pode ser julgado inibitório quando causa uma mudança adversa na população microbiana ou inibição do crescimento (Kroeker et al. 1979). A inibição é geralmente indicada pela diminuição da taxa de estado estacionário de produção de gás metano e acumulação de ácidos orgânicos.

Os inibidores comumente presentes em digestores anaeróbios incluem amônia, íons de metais leves e metais pesados. Devido à diferença de inóculo anaeróbio, composição de resíduos, métodos e condições experimentais, como pH e outros fatores e os resultados apontados na literatura sobre a inibição causada por tóxicos específicos variam amplamente. A codigestão com outros resíduos, a adaptação de microrganismos às substâncias inibitórias e a incorporação de métodos para remover ou neutralizar substâncias tóxicas, antes da digestão anaeróbia, podem melhorar significativamente a eficiência do tratamento (Chen et al. 2008).

Fenômenos como antagonismo ou sinergismo podem interferir na digestão anaeróbia e, assim, dificultar o entendimento do processo biológico, visto que são muitas variáveis a serem consideradas e nem sempre é possível identificar todas. Antagonismo químico é o fenômeno em que a exposição à determinada substância química reduz, ou até inibe totalmente, o efeito da exposição à outra substância química. O sinergismo, por sua vez, tem significado oposto ao antagonismo: refere-se ao efeito resultante da ação de vários agentes que atuam de forma conjunta. Ou seja, trata-se da ação combinada de duas ou mais substâncias que produzem efeito biológico superior à soma dos efeitos de cada substância analisada separadamente. A presença de um segundo químico potencializa, portanto, o efeito do primeiro.

Diversas pesquisas vêm mostrando a influência de diferentes concentrações de substâncias químicas no sistema de tratamento, tais como amônia, sulfeto, íons de metais leves

e metais pesados. A amônia, substância produzida pela degradação biológica da matéria nitrogenada, em concentração abaixo de 200 mgL^{-1} pode ser benéfica para o processo, uma vez que o nitrogênio é um nutriente essencial para microrganismos anaeróbios (Chen et al. 2008). No entanto, concentração superior pode ser um problema. Outros fatores também influenciam, como o controle de pH. Dentro do intervalo considerado ótimo para os microrganismos, o pH possibilita a redução da toxicidade da amônia (Chen, Cheng, e Creamer 2008).

Vários mecanismos para controlar o efeito da amônia foram propostos, como alteração no pH intracelular, aumento da necessidade de energia de manutenção e redução da reação enzimática. A amônia em solução aquosa pode ser encontrada na forma de íon amônio ou amônia livre, sendo a amônia livre a principal causadora de inibição por ser facilmente permeável à membrana celular (Kroeker et al. 1979; Chen et al. 2008). Íons como Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} podem ser uma espécie de antídoto para inibição da amônia (antagonismo). Em concentrações elevadas, íons de metais leves (Na, K, Mg, Ca e Al) podem interromper a função celular (Chen et al. 2008).

A respeito dos sulfetos e seus efeitos nos microrganismos, existe uma variação considerável em relação aos níveis de concentração que podem causar inibição, que ficam na faixa de $100\text{-}800 \text{ mgL}^{-1}$ dissolvido ou entre 50 e 400 mgL^{-1} de H_2S não dissociado. Essa variação pode estar relacionada ao pH do sistema de tratamento (Chen et al. 2008; Parkin et al. 1990).

Os íons de metais leves, tal como alumínio, cálcio, magnésio, sódio e potássio, estão muitas vezes presentes nos digestores anaeróbios. Eles podem ser liberados pela degradação da matéria orgânica ou acrescentados por meio de produtos químicos de ajuste de pH (Grady et al. 1999). A adição de algumas destas, com propriedade de coagulação, pode influenciar no processo de agregação microbiana, tendo em vista que esses elementos atuam no desenvolvimento microbiano e, conseqüentemente, afetam a taxa de crescimento específico, como qualquer outro nutriente. Concentrações moderadas estimulam, enquanto quantidades excessivas diminuem o crescimento microbiano ou, inclusive, causam inibição.

A capacidade de microrganismos metanogênicos para se adaptar a altas concentrações de alumínio foi investigado em reator UASB alimentado com resíduo sintético, contendo glicose como fonte de carbono. Verificou-se que a concentração de até 2500 mgL^{-1} de Al^{3+} pode ser tolerada pelos microrganismos metanogênicos. No entanto, em maiores concentrações, ocorreu inibição dos metanogênicos e, conseqüente, diminuição no desempenho do digestor. O alumínio precipitou como $\text{Al}(\text{OH})_3$ e acumulou na manta de lodo (Jackson-Moss e Duncan, 1991).

O cálcio, por sua vez, é conhecido por ser essencial para o crescimento de certos grupos metanogênicos, por sua importância na formação e resistência dos grânulos e na retenção da biomassa no sistema (Huang e Pinder 1994; Graaff et al. 2011). Contudo, excessiva quantidade de cálcio conduz à precipitação de carbonato e fosfato, e propicia toxicidade no sistema anaeróbio. Chen, Cheng e Creamer (2008) reuniram pesquisas que mostraram concentrações de cálcio que podem dificultar a biodigestão (Kugelman e McCarty, 1965; Jackson-Moss e Duncan, 1991).

Kugelman e McCarty (1965) constataram que concentrações de cálcio de até 7000 mgL⁻¹ não são inibitórias. Jackson-Moss e Duncan (1991), por sua vez, apontaram concentrações de 2500 a 4000 mgL⁻¹ como causadoras de inibição moderada, concentração de 8000 mgL⁻¹ como fortemente inibitória e concentração abaixo 120 mgL⁻¹ de Ca²⁺ como estimulante para formação de biofilme. Outras pesquisas também reforçaram a importância do cálcio, em concentrações de 100 a 200 mgL⁻¹, para a granulação de lodo em reatores UASB (Yu, Tay e Fang, 2001).

A concentração adequada de Magnésio e Potássio também não está bem delimitada na literatura. Alguns dados mostram que concentrações a partir de 400 mgL⁻¹ podem ser tóxicas para sistemas anaeróbios, principalmente em sistemas termofílicos. O sódio, substância abundante em águas residuárias oriundas de processos alimentícios, é essencial para os microrganismos metanogênicos em concentrações na faixa de 100 a 200 mgL⁻¹, estimulando o crescimento anaeróbio de microrganismos mesófilos (McCarty 1964).

Gagliano et al. (2017) analisaram a estrutura do biofilme e grânulos formados durante o tratamento anaeróbio de águas residuárias sintéticas de alta salinidade (10 e 20 gL⁻¹ de sódio). O estudo mostrou que o inóculo adaptado foi capaz de realizar altas taxas de remoção de carga orgânica nos níveis de salinidade testados. Os autores concluíram que há possibilidade de se obter granulação em ambientes com alta salinidade, desde que isso não afete a seleção de células de *Methanosaeta*, importantes para formação de grânulos fortes devido ao seu arranjo filamentosos.

Os metais pesados, como cromo, ferro, cobalto, cobre, zinco, cádmio e níquel, podem estar presentes em concentrações significativas e prejudiciais ao processo anaeróbio. Uma característica distintiva dos metais pesados é que, ao contrário de muitas outras substâncias tóxicas, eles não são biodegradáveis; acumulam-se e provocam a falha do sistema (Sterritt e Lester 1980). Todavia, a falta de alguns deles pode provocar deficiência no tratamento (Fermoso et al. 2010).

Há duas questões principais quando se aborda a disponibilidade de nutrientes. A primeira, aparentemente mais lógica, é se há ou não nutrientes em concentrações suficientes para o desenvolvimento e multiplicação celular. A segunda questão é como esses nutrientes estão disponíveis, ou seja, se o substrato a ser tratado é de fácil biodegradação ou não.

Se o substrato utilizado for de difícil biodegradação, provavelmente por apresentar substâncias com potencial inibidor (como metais pesados em concentrações desfavoráveis), a atividade microbiana pode ser prejudicada.

A adaptação da biomassa é necessária para as duas situações e ocorre através da gradativa exposição ao substrato. Os grânulos respondem bem a situações adversas desde que estejam adaptados às condições ambientais.

Os problemas causados em sistemas de tratamento biológico por substâncias tóxicas são passíveis de ser contornados, já que os microrganismos metanogênicos têm grande capacidade de adaptação. Em sistemas adaptados, os consórcios metanogênicos podem operar, sem perda de eficiência, submetidos à concentração de substâncias tóxicas até 12 vezes maior que aquelas que causam inibição em sistemas não adaptados (Parkin et al. 1983).

Características biológicas dos grânulos

Diversas teorias sobre o fenômeno de granulação foram descritas na literatura, como apresentado na seção 0. A maioria dessas teorias aponta as células de *Methanosaeta* como principal responsável pela formação inicial de grânulos. No entanto, o papel dos demais microrganismos é fundamental para o processo de digestão anaeróbia.

A identificação dos microrganismos envolvidos na formação granular é complexa, mas existem técnicas, já aplicadas, que auxiliam nesse processo. A admissão de técnicas de avaliação fenotípica, como por exemplo a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de contraste de fase e fluorescência, permitiu observar a estrutura morfológica das células e a arquitetura interna dos grânulos. As fotografias da seção transversal de grânulos, cada vez com melhor qualidade de imagem, permitem a análise da estrutura, indicando a associação entre microrganismos acidogênicos e metanogênicos.

Os microrganismos podem ser visualizados, por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de contraste de fase e fluorescência (outras técnicas também podem ser utilizadas), devido as suas morfologias características: cocos, bacilos, vibriões e espirilos. Os cocos podem se agrupar e formarem colônias, nas quais dois cocos formam um diplococo. Quando enfileirados, formam estreptococos e, em cachos, estafilococos. De forma semelhante, os bacilos formam diplobacilo e estreptobacilos.

Os dois gêneros principais de microrganismos metanogênicos são *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. A morfologia dos organismos do grupo *Methanosaeta* se apresenta como filamentos, constituídos por um conjunto de células enfileiradas, onde cada uma é circuncidada por uma bainha nas extremidades, semelhante a um “bambu” (as imagens por MEV permitem visualizar bem essa característica) (Figura 4).

Figura 4. Célula do tipo *Methanosaeta*



Fonte: Alves (2015)

Classificações fenotípicas são usualmente aplicadas na avaliação microbiana. Mas essa análise celular não resulta em informações evolutivas sobre o grupo microbiano analisado. Obtém-se a relação evolutiva entre os microrganismos por meio da comparação de sequências de nucleotídeos dos respectivos genomas. Quanto maior a diferença entre os genes, maior é a distância entre os microrganismos analisados no quadro evolutivo.

As técnicas de biologia molecular vêm sendo aprimoradas para auxiliar na compreensão do comportamento microbiano. Procedimentos baseados em análises de DNA e RNA ribossomal (RNAr), em conjunto com análises microbianas convencionais, podem ser ferramentas complementares na determinação da presença e distribuição de espécies individuais em comunidades complexas, facilitando o entendimento entre estrutura microbiana e sua função fisiológica.

Técnicas importantes de biologia molecular são reação de polimerase em cadeia (PCR), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), clonagem e sequenciamento. A PCR é método de amplificação de uma sequência específica de DNA, através da enzima *taq DNA polimerase* como catalisadora da reação de amplificação, na fase de extensão de novas fitas do DNA. As etapas dessa técnica consistem em desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão das novas fitas de DNA. Os *primers* são oligonucleotídeos iniciadores sintéticos de 20-30 bases nitrogenadas de extensão, relativamente específico para seus sítios de ligação nas extremidades

do DNA alvo. Sua configuração é baseada nas sequências de DNA presentes em bancos de dados (Varesche, Sakamoto e Oliveira 2013).

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos de DNA r 16s, amplificados pela reação da PCR, é uma técnica utilizada para caracterização de comunidades complexas; para inferir afiliação filogenética dos grupos microbianos; testar pureza de linhagem microbiológica; monitorar o isolamento de bactérias e arqueias; analisar o comportamento das populações específicas em função das variações das condições operacionais de sistemas biológicos, como o de tratamento de águas residuárias. Com essa técnica é possível fazer a caracterização da comunidade microbiana de várias amostras seguindo as etapas de extração de DNA, amplificação do DNA (por PCR) e separação dos fragmentos de DNA amplificado utilizando DGGE (Varesche et al. 2013).

A separação no DGGE ocorre através da mobilidade eletroforética da dupla hélice do fragmento de DNA parcialmente dissociado em gel de poliacrilamida. O movimento das partículas dissociadas ocorre formando discretas bandas no gel, em que cada uma delas representa uma população microbiana específica. A resposta dessa análise possibilita a comparação da comunidade, o cálculo do grau de similaridade e, também, da diversidade microbiana existente nas amostras. As técnicas de PCR e DGGE, no entanto, não possibilitam a identificação dos microrganismos. É preciso escolher o fragmento de maior interesse obtido por esses procedimentos e, posteriormente, sequenciá-lo (Varesche et al. 2013).

A clonagem e sequenciamento do gene rRNA 16S é método importante. A clonagem consiste na transferência do produto da PCR para um vetor (geralmente um plasmídeo) resultando em cópia fiel dos fragmentos de DNA *in vivo*. Os clones contêm fragmentos definidos que podem ser rapidamente sequenciados.

Considera-se de grande importância prática entender os fundamentos relativos ao comportamento dos aglomerados microbianos, não apenas do ponto de vista biológico, mas também do ponto de vista da engenharia de processo. Ainda é de difícil compreensão como ocorre a formação e a manutenção da estrutura dos grânulos de reatores UASB (Lu et al. 2015), ressaltando a necessidade de estudos adicionais.

4.10 Considerações gerais

A produção crescente de álcool e do resíduo gerado (vinhaça) em grande volume no Brasil e no mundo, associada à preocupação com a disposição inadequada desse resíduo no meio ambiente, são incentivos para mais estudos e investimentos em tecnologias de tratamento.

O potencial de aplicação dos reatores UASB no tratamento de vinhaça vem sendo explorado. No entanto, o que se observa nas análises realizadas são reatores funcionando sob tempo de operação curto e sem análise da biomassa (Quadro 1), que é a principal responsável pela biodigestão da carga orgânica e pela produção de biogás. Estudos prolongados dos reatores com análises da manta de lodo e da eficiência dos reatores são imprescindíveis, pois o tempo de exposição prolongado da biomassa à vinhaça pode proporcionar modificações de suas características e acúmulo de elementos, causando mineralização do lodo e inibição da biomassa devido a determinadas substâncias presentes na vinhaça.

As análises da manta de lodo dos reatores UASB são fundamentais para compreender o funcionamento desses sistemas de tratamento e, assim, possibilitar a manutenção da biomassa ativa nos reatores. O monitoramento com análises na manta de lodo, principalmente análises físicas, como tamanho de grânulos e série de sólidos, para a determinação da concentração de biomassa e avaliação da mineralização do lodo, são análises simples e de baixo custo que podem antecipar futuros problemas nos digestores anaeróbios. As análises químicas são importantes para a avaliação dos elementos que podem estar acumulando na manta de lodo e seus efeitos na biomassa.

O monitoramento da biomassa em associação com as análises de eficiência de remoção de carga orgânica e de produção de biogás é ferramenta eficaz e necessária para avaliação momentânea dos reatores e para a previsão de possíveis problemas nos digestores anaeróbios.

Diante disso, faz-se necessário estudos para aplicação do tratamento da vinhaça em reatores UASB com tempo prolongado de operação; determinação de metodologia simples de monitoramento da granulometria da manta de lodo; monitoramento do tamanho, resistência e concentração de biomassa ativa nos sistemas; monitoramento dos elementos químicos e possíveis interações e efeitos sobre a biomassa. Ademais, as análises microbiológicas, embora não sejam de baixo custo e de resposta rápida, auxiliam no entendimento da causa dos possíveis efeitos observados nos sistemas de tratamento.

5. MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi dividida em cinco etapas principais, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5:

Etapa 1 - Obtenção de protocolo de medição das dimensões dos grânulos provenientes dos reatores UASB, a partir da avaliação da metodologia de Del Nery et al. (2008). No protocolo foram estabelecidos a metodologia de obtenção de grânulos e o volume adequado de amostra para análise.

Etapa 2 – Análises gerais da eficiência de remoção de matéria orgânica e de produção de metano dos quatro reatores, alimentados com vinhaça e operados sob diferentes taxas hidráulicas e orgânicas, para associação dessas características com as respectivas particularidades das mantas de lodo.

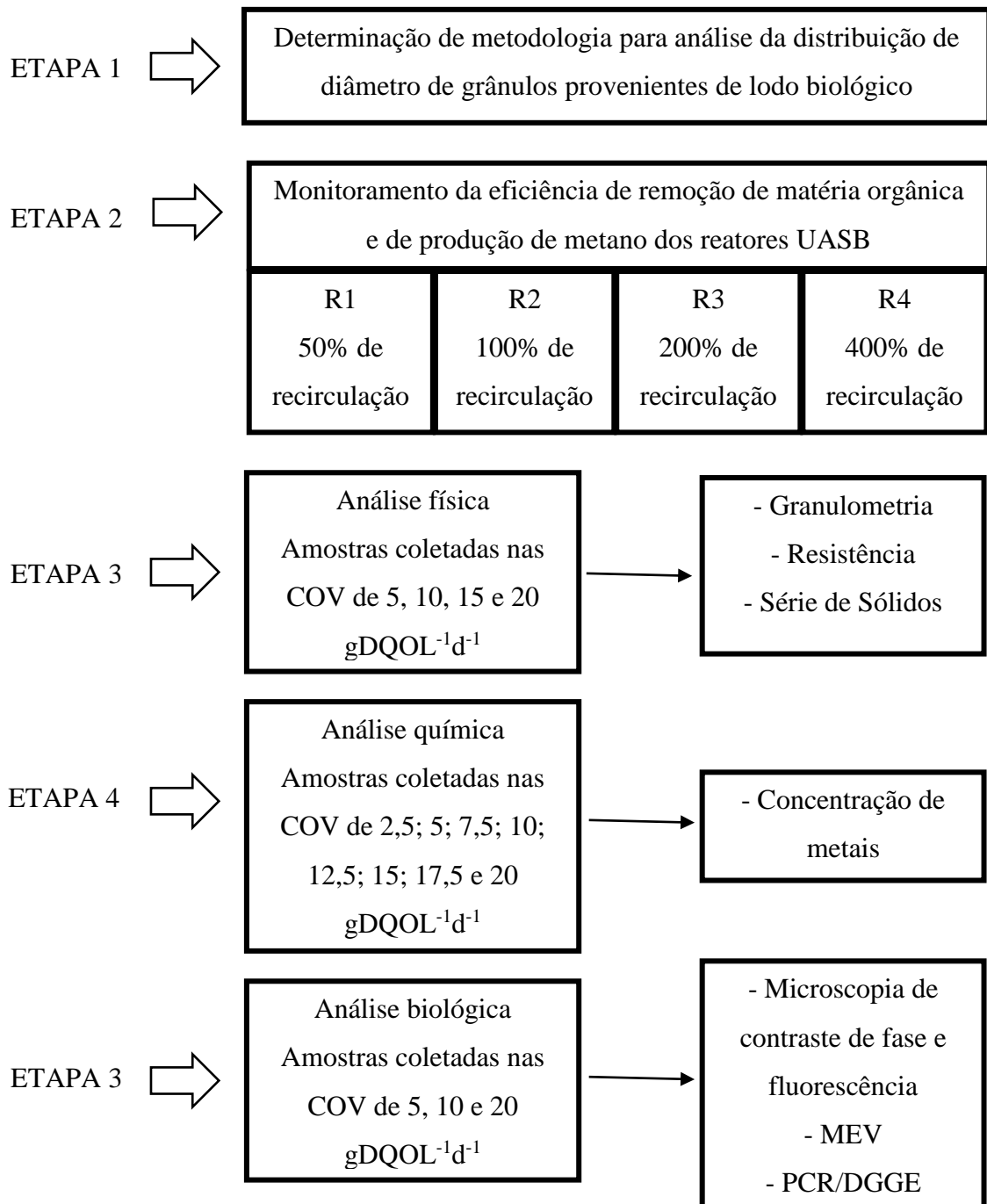
Etapa 3 - Análises físicas da manta de lodo granular dos quatro reatores estudados. O lodo foi coletado e analisado especificamente nas COV de 5; 10; 15 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Etapa 4 – Análise química da manta de lodo granular dos quatro reatores estudados. O lodo foi coletado e analisado especificamente nas COV de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Etapa 5 – Análise Biológica da manta de lodo granular. O lodo foi coletado e analisado especificamente nas COV de 5; 10 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$.

A coleta das amostras da manta de lodo para as análises realizadas nas etapas 3, 4 e 5 era feita uma semana depois dos reatores atingirem as cargas estabelecidas para coleta. O lodo era retirado de cinco pontos do perfil vertical da área reacional (área inoculada com lodo anaeróbio) (Figura 6). Coletava-se um litro de amostra composta, sendo 200 mL de cada um dos cinco pontos de amostragem. A retirada era feita de cima (ponto 5) para baixo (ponto 1) devido à acomodação das partículas de lodo. Da amostra composta homogeneizada, retirava-se a alíquota para as análises.

Figura 5. Fluxograma das etapas de trabalho



Fonte: elaborada pela autora

5.1 ETAPA 1 – DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DE GRÂNULOS PROVENIENTES DE LODO ANAERÓBIO

A dimensão de grânulos anaeróbios, provenientes de tratamento biológico anaeróbio de diversos tipos de águas residuárias, vem sendo investigada no intuito de compreender a influência dessa característica no desempenho do sistema de tratamento. No entanto, não há na literatura atual metodologia padronizada, que aponte detalhes do processo para obtenção dos dados, tais como volume adequado de amostra, descrição da precisão e limitação das técnicas utilizadas. O objetivo desse protocolo, portanto, é padronizar o ensaio de granulometria capaz de medir a dimensão de grânulos de forma precisa e rápida. Além disso, a metodologia proposta compreende cerca de 1500 a 3000 grânulos em uma única amostra, número representativo em relação às técnicas apontadas na literatura.

Detalhes do método

O protocolo de determinação de grânulos proposto se baseou na metodologia utilizada por Del Nery et al.(2008). O software indicado para analisar a dimensão de grânulos provenientes de lodo granulado é o Image Pro-Plus (versão 6.0). Essa ferramenta é capaz de verificar diâmetro, entre outras funções de análise de imagem. Na metodologia, esmiuçou-se a forma estabelecida para coleta, preparo das amostras, assim como o ensaio de determinação granulométrica, calibração do *software* e procedimento para medição do tamanho dos grânulos.

Para avaliar a adequação da técnica de granulometria, procedeu-se a dois testes: de aferição do software; e de avaliação do volume de amostra estatisticamente representativo. Estes testes foram realizados a fim de legitimar a metodologia desenvolvida.

Os detalhes da metodologia de granulometria estão expostos na seção de resultados por se tratar de dados obtidos a partir de vários testes, através dos quais foi estabelecido o protocolo de análise granulométrica, já publicado (Alves et al. 2018).

Equipamentos utilizados no procedimento experimental

- Software Image Pro-Plus (versão 6.0);
- scanner HP Scanjet 3770;
- régua;
- esferas calibradas de diferentes diâmetros: 1, 2, 3, 4 e 5 mm;
- cola;
- proveta volumétrica;

- 6 placas de petri;
- pipeta pasteur;
- água;
- Excel ou programa similar (para aquisição e análise dos dados).

Nota: quaisquer *scanner* e *software* analisador de imagem com característica similar podem ser utilizados.

5.2 ETAPA 2 – MONITORAMENTO DA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E DE PRODUÇÃO DE METANO DOS REATORES UASB

Reatores UASB

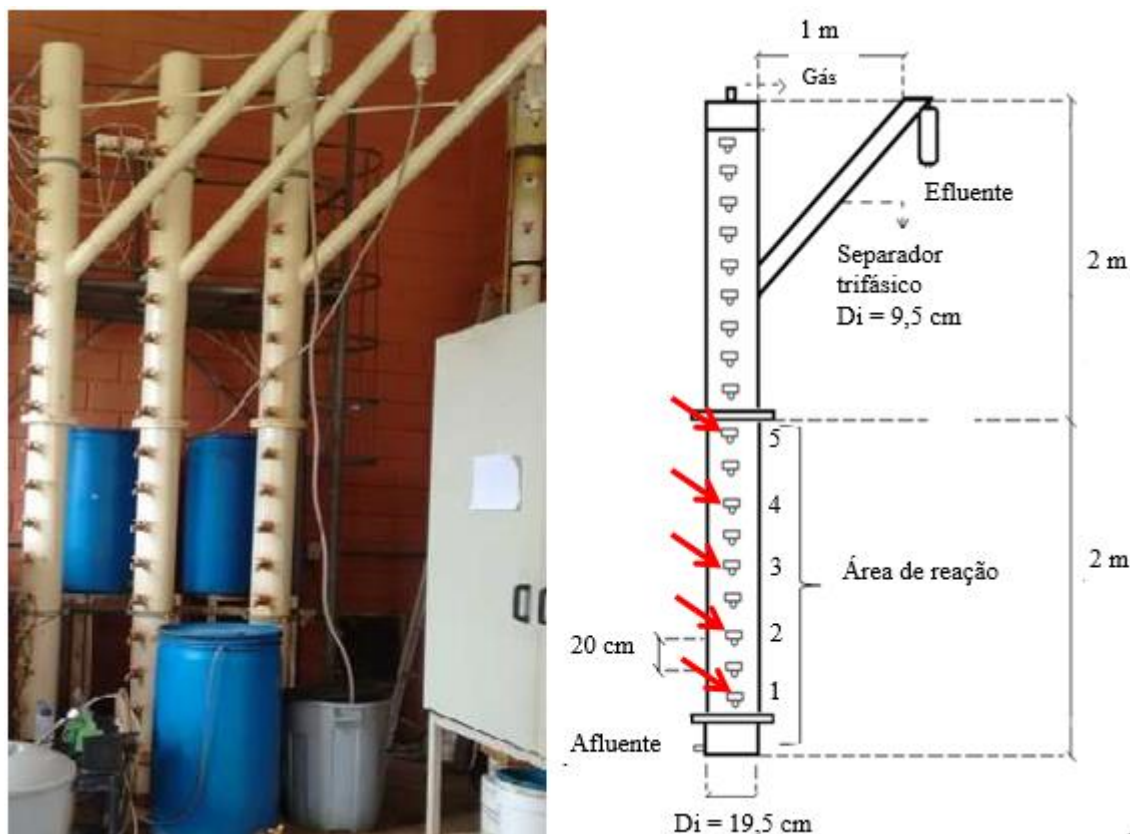
Foram utilizados no estudo quatro reatores do tipo UASB, reatores R1, R2, R3 e R4, em escala piloto, para processamento da vinhaça de destilaria de álcool da cana-de-açúcar. Os reatores (Figura 6) foram construídos em coluna de PVC com altura total de 4 m, diâmetro interno de 19,5 cm e capacidade de aproximadamente 120 L, equipado com separador trifásico modificado e provido de dispositivo de recirculação.

A unidade operacional foi composta pelos reatores e uma bomba dosadora para cada reator. As bombas utilizadas para a alimentação dos reatores foram os modelos Grundfos DDC e DDA, com controle digital e motor sequencial com velocidade variável. Os modelos DDC e DDA possuem vazões de 10 e 30 Lh⁻¹, respectivamente. A utilização do modelo DDA ocorreu conforme a demanda de vazão se tornou maior.

O sistema de medição do biogás produzido foi composto por captação, selo hídrico, distribuição e medição do volume do biogás. A captação do biogás pelo topo dos reatores foi realizada por mangueiras de silicone.

Os reatores em questão foram implantados no projeto de pós-doutorado da Dra. Valéria Del Nery, sob supervisão do Professor Tit. Eduardo Cleto Pires, intitulado “Produção de biogás por degradação anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar: investigação de taxas hidráulicas e de cargas orgânicas aplicadas em reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo para otimização do processo”.

Figura 6. Dimensão do reator do tipo UASB



Fonte: elaborada pela autora

Inoculação

Os reatores foram inoculados uma única vez com lodo granulado até 2 m a partir de sua base (aproximadamente 60 L). O lodo utilizado para inoculá-los foi proveniente de reator UASB, tratando resíduo do abatedouro de aves Rosaves, localizado em Pereira, São Paulo. Não foi realizado nenhum tipo de tratamento no lodo.

Os reatores R2, R3 e R4 foram inoculados com lodo coletado em período diferente do coletado para o reator R1.

Água residuária

A vinhaça utilizada foi coletada na Usina Rio Pardo, Cerqueira César-SP. Esta vinhaça era concentrada por evaporação na indústria. Sua carga orgânica, portanto, era elevada e variava entre 180 a 200 gDQOL⁻¹, necessitando de diluição antes de sua utilização. A concentração de alimentação estabelecida foi de aproximadamente 20 gDQOL⁻¹. As características da vinhaça, após diluição, estão apresentadas na Tabela 4.

A concentração fixa de 20 gL^{-1} foi estabelecida baseada nos menores valores produzidos em destilarias, de forma a manter valor condizente com as condições reais. Para o tamponamento da água residuária, adotou-se $1 \text{ gNaHCO}_3\text{g}^{-1}\text{DQO}$ para manutenção do pH afluente próximo ao neutro no início da operação do sistema. Essa concentração foi reduzida gradativamente até $0,3 \text{ gNaHCO}_3\text{g}^{-1}\text{DQO}$ no decorrer dos 100 primeiros dias de operação.

Tabela 4. Caracterização da vinhaça diluída utilizada no período operacional

| PARÂMETROS | |
|--|---------------|
| Ácidos voláteis (mgCaCO ₃ L ⁻¹) | 1352±480 |
| Alcalinidade total (mgCaCO ₃ L ⁻¹) | <1 |
| DBO bruta (mgO ₂ L ⁻¹) | 9096±3117 |
| DQO bruta (mgO ₂ L ⁻¹) | 18400±5675 |
| Fenol (mgC ₆ H ₅ OHL ⁻¹) | 1,97±2,03 |
| Fosfato (mgPO ₄ ³ L ⁻¹) | 113±169 |
| Nitrogênio amoniacal (mgNL ⁻¹) | 48±26 |
| Nitrogênio nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ L ⁻¹) | 516±433 |
| Nitrogênio nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ L ⁻¹) | <0,001 |
| Nitrogênio total Kjeldahl (mgNTK L ⁻¹) | 372±137 |
| pH | 4,18±0,2 |
| Sólidos totais (mgSTL ⁻¹) | 16185±2627 |
| Sólidos fixos totais (mgSFTL ⁻¹) | 4789±1860 |
| Sólidos voláteis totais (mgSVTL ⁻¹) | 11396±2805 |
| Sólidos suspensos totais (mgSSTL ⁻¹) | 2368±922 |
| Sólidos suspensos fixos (mgSSFL ⁻¹) | 314±115 |
| Sólidos suspensos voláteis (mgSSVL ⁻¹) | 2054±873 |
| Sólidos dissolvidos totais (mgSDTL ⁻¹) | 13817±2474 |
| Sólidos dissolvidos fixos (mgSDFL ⁻¹) | 4476±1897 |
| Sólidos dissolvidos voláteis (mgSDVL ⁻¹) | 9114±2586 |
| Sulfato (mgSO ₄ ²⁻ L ⁻¹) | 1005±945 |
| Sulfeto (mgS ²⁻ L ⁻¹) | 5,57±19,47 |
| Zinco (mgZnL ⁻¹) | 1,41±0,58 |
| Chumbo (mgPbL ⁻¹) | 0,392±0,173 |
| Cádmio (mgCdL ⁻¹) | 0,042±0,019 |
| Níquel (mgNiL ⁻¹) | 0,376±0,337 |
| Ferro (mgFeL ⁻¹) | 43,498±24,312 |
| Manganês (mgMnL ⁻¹) | 4,702±1,754 |
| Cobre (mgCuL ⁻¹) | 0,250±0,083 |
| Cromo total (mgCrL ⁻¹) | 0,075±0,061 |
| Cálcio (mgCaL ⁻¹) | 527±222 |
| Magnésio (mgMgL ⁻¹) | 254±76 |
| Sódio (mgNaL ⁻¹) | 23±6 |
| Potássio (mgKL ⁻¹) | 1625±600 |

Fonte: elaborada pela autora

Varição dos parâmetros operacionais

As taxas hidráulicas e cargas orgânicas aplicadas aos reatores UASB foram escalonadas e crescentes, visando, principalmente, à adaptação do lodo anaeróbio à vinhaça e à verificação do potencial de redução da matéria orgânica e de geração de metano. Os reatores diferiram entre si da seguinte maneira: R1 teve recirculação de 50%; R2, recirculação de 100%; R3, recirculação de 200%; e R4, recirculação de 400%. A carga orgânica variou de 0,3 a 20

$\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$. O aumento da carga orgânica ocorreu com o aumento da vazão de vinhaça, que apresentou concentração de matéria orgânica, em termos de DQO, constante (20 gL^{-1}).

Os reatores R4 e R3 foram os primeiros a serem colocados em funcionamento; em seguida R2 e, por fim, R1. Os reatores R2 e R1 demandaram menor tempo de operação devido à experiência adquirida com o início de operação dos primeiros reatores, R4 e R3. Na Tabela 5 estão apresentadas as vazões, taxas de recirculação e cargas orgânicas aplicadas ao lodo.

Os reatores foram alimentados com vazões iguais de vinhaça, o que resulta em COV e cargas aplicadas ao lodo similares. No entanto, as taxas de recirculação foram diferentes em cada reator. Esses procedimentos visaram avaliar o efeito da diluição do substrato, da velocidade ascensional e da taxa de recirculação do efluente final dos reatores na adaptação da biomassa em valores crescentes de vazão de alimentação e de carga orgânica.

Resumidamente, as taxas de recirculação aplicadas objetivaram aumentar a velocidade ascensional, com o fim de favorecer o contato entre substrato e microrganismos, o transporte de massa e a granulação do lodo; minimizar o impacto da elevada concentração de matéria orgânica e dos constituintes deletérios da vinhaça, possibilitando a otimização da remoção da fração orgânica com geração de biogás; e reciclar a alcalinidade para o reator, intencionando à redução da adição de álcali na alimentação.

A temperatura média de operação dos reatores foi $22 \pm 3^\circ\text{C}$. No inverno foi colocado aquecedor ambiente próximo aos reatores para evitar oscilações bruscas de temperatura. O tempo de operação dos reatores foram relativamente longos, chegando a 727 dias para o reator R4 (Tabela 5). Os reatores R1 e R2 foram mais rápidos, pois já havia a experiência obtida com o início da partida dos reatores R3 e R4, que foram colocados em funcionamento primeiro.

Tabela 5. Variação dos parâmetros operacionais

| Reator | Vazão da vinhaça (Ld^{-1}) | Vazão de recirculação (Ld^{-1}) | Recirculação (%) | Vazão total (Ld^{-1}) | COV ($\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$) | Velocidade ascensional (mh^{-1}) | Tempo de operação (dias) |
|--------|---------------------------------------|--|------------------|----------------------------------|--|---|--------------------------|
| R1 | 1-60 | 0,5 – 30 | 50 | 1,5 – 90 | 0,3-20 | 0,002 - 0,125 | 285 |
| R2 | 1-60 | 1 – 60 | 100 | 2 – 120 | 0,3-20 | 0,003 - 0,167 | 372 |
| R3 | 1-60 | 2 – 120 | 200 | 3 – 180 | 0,3-20 | 0,004 - 0,250 | 617 |
| R4 | 1-60 | 4 – 240 | 400 | 5 – 300 | 0,3 – 20 | 0,007 - 0,417 | 727 |

Fonte: elaborada pela autora

Análise da eficiência global dos reatores

As mudanças operacionais de aumento de COV e de vazão somente eram efetivadas quando os reatores se encontravam estáveis e com boa eficiência, isto é: em uma constância de remoção de carga orgânica superior a 80% e conteúdo de metano no biogás acima de 60% por período mínimo de sete dias.

As análises de DQO foram realizadas de acordo com *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF 2005). O volume de gás produzido foi mensurado com medidor Ritter Drum-type Gas Meter TG05/5. A faixa de vazão de medição é de 1 a 60 Lh⁻¹. A avaliação da composição do biogás foi feita por cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo Shimadzu (modelo GC 2014), com detector térmico de condutividade e coluna HP-PLOT (30m x 0,53mm) e análise de ácidos voláteis por cromatografia, por meio de cromatógrafo HP 6890 com a coluna HP-INNOVAX (30 mx0.25 mmx0.25 mm).

5.3 ETAPA 3 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA MANTA DE LODO GRANULAR

Para analisar a manta de lodo granular do ponto de vista físico, coletaram-se amostras compostas ao longo do perfil vertical da manta de lodo dos reatores UASB nas COV 5; 10; 15 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Dimensão dos grânulos

O tamanho dos grânulos foi determinado de acordo com a metodologia desenvolvida e apresentada na Etapa 1.

Resistência mecânica dos grânulos

Os grânulos foram agitados para o teste de resistência mecânica com gradiente de velocidade de 770 s^{-1} , durante 60 minutos em *Jar Test*. A análise qualitativa da resistência foi realizada através da comparação das dimensões dos grânulos antes e depois de serem submetidos a agitação, segundo metodologia proposta por Alves (2015). Nesta metodologia, os grânulos são considerados resistentes quando, apesar da agitação, mantêm a estrutura granular, podendo apresentar ou não redução do diâmetro dos grânulos.

Análise estatística da variação de tamanho de grânulos devido às mudanças operacionais e à agitação mecânica aplicada

Nove faixas de diâmetro foram determinadas (em mm): [0,4 - 1,0], [1,1 - 1,5], [1,6 - 2,0], [2,1 - 2,5], [2,6 - 3,0], [3,1 - 3,5], [3,6 - 4,0], [4,1 - 4,5] e [4,6 - 5,0]. Os limites inferior (0,4 mm) e superior (5,0 mm) foram definidos de acordo com os dados granulométricos das próprias amostras de grânulos analisadas.

A frequência de diâmetro granular foi estimada por estatística descritiva básica. Para avaliar se as alterações no tamanho dos grânulos, com as mudanças operacionais, foram significativas, do ponto de vista estatístico, fez-se uso do programa PAST, devido ao fato do mesmo ser gratuito, relativamente simples de usar e apresentar interface muito similar ao *Microsoft Excel*.

O teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico, foi utilizado para identificar se as alterações causadas nos grânulos, devido às mudanças operacionais e à agitação aplicada no teste de resistência, foram significativas. As hipóteses nula e alternativa foram:

- Hipótese nula (H_0) - As medianas das 5 amostras analisadas (inóculo, COV 5, 10, 15 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$) são iguais - $H_0: m_1 = m_2 = m_3 = m_4 = m_5$

- Hipótese alternativa - Pelo menos uma mediana difere das demais.

No caso da hipótese nula ser rejeitada, a segunda etapa consistiu em aplicar o teste Tukey para comparação das médias par a par e, assim, identificar quais amostras diferem das demais.

Série de Sólidos

Série de sólidos foi realizada de acordo com *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF 2005).

5.4. ETAPA 4 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MANTA DE LODO GRANULAR

Determinação do conteúdo mineral

A amostras para análise do conteúdo mineral da manta de lodo foram coletadas ao longo do perfil vertical da manta de lodo dos reatores UASB nas COV 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15, 17,5 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹.

Os metais determinados foram zinco, chumbo, cádmio, níquel, ferro, manganês, cobre, cromo total, cálcio, magnésio, sódio, potássio. A análise foi realizada por absorção atômica, através das cinzas do lodo anaeróbio (obtidas por ignição em mufla de 450° C) dissolvidas em ácidos.

5.5 ETAPA 5 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA MANTA DE LODO GRANULAR

Coletaram-se amostras compostas ao longo do perfil vertical da manta de lodo dos reatores UASB nas COV 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ para realização das análises de microscópica de contraste de fase e fluorescência e de microscopia eletrônica de varredura. Para PCR e DGGE, foram analisadas, além das amostras do lodo dos reatores UASB nas COV 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, amostra dos quatro reatores submetidos a COV 5 gDQOL⁻¹d⁻¹.

Determinação da disposição espacial microbiana

A disposição espacial microbiana foi investigada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, foi utilizado o Microscópio FEG (*Field Emission Gun*), modelo SIGMA, fabricante ZEISS. A análise foi realizada no Laboratório de Física da Universidade de São Paulo (São Carlos - campus 1).

As amostras foram tratadas (limpas, desidratadas e recobertas com ouro e paládio) antes de serem observadas por microscópio. A limpeza ocorreu da seguinte maneira: os grânulos foram colocados em frascos Falcon e mergulhadas em solução de glutaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por 12 horas a 4°C; em seguida, foram submersos com tampão fosfato (0,1 M em pH 7,8) por 10 minutos (repetiu-se esse procedimento três vezes). Após a limpeza, os grânulos foram desidratados gradativamente através do contato por submersão com soluções de etanol em concentrações crescentes (50, 70, 89, 90, 95 e 100%) por 10 minutos cada. Após a exposição ao etanol, os grânulos foram colocados em estufa (60 °C) para secagem completa do material. Por fim, os grânulos tratados foram fixados em um suporte e recobertos com camada de 10 nanômetros de ouro e paládio.

Morfologia dos grânulos

A morfologia microbiana foi analisada por observação sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência. O microscópio utilizado foi o Olympus BX60, com câmera acoplada para aquisição da imagem.

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de contraste de fase e fluorescência são largamente utilizadas devido sua simplicidade, rápido resultado e custo relativamente baixo. A avaliação das imagens obtidas é realizada por análise visual e, portanto, apresentam limitações.

Diversidade da comunidade microbiana

A diversidade microbiana foi analisada para os domínios *Bacteria* e *Archaea* por meio de duas técnicas de biologia molecular, PCR e DGGE. Os padrões de bandas de DGGE foram analisados utilizando *software* BioNumerics V.2.5, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, e método de aglomeração UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) para a construção do dendrograma. A diversidade microbiana foi analisada pelo índice de diversidade de Shannon (H).

5.6 Frequência de amostragem

No Quadro 3 estão apresentadas as frequências de amostragem para caracterização do desempenho dos reatores e da manta de lodo.

Quadro 3. Frequência de amostragem e análises realizadas nas amostras dos quatro reatores estudados

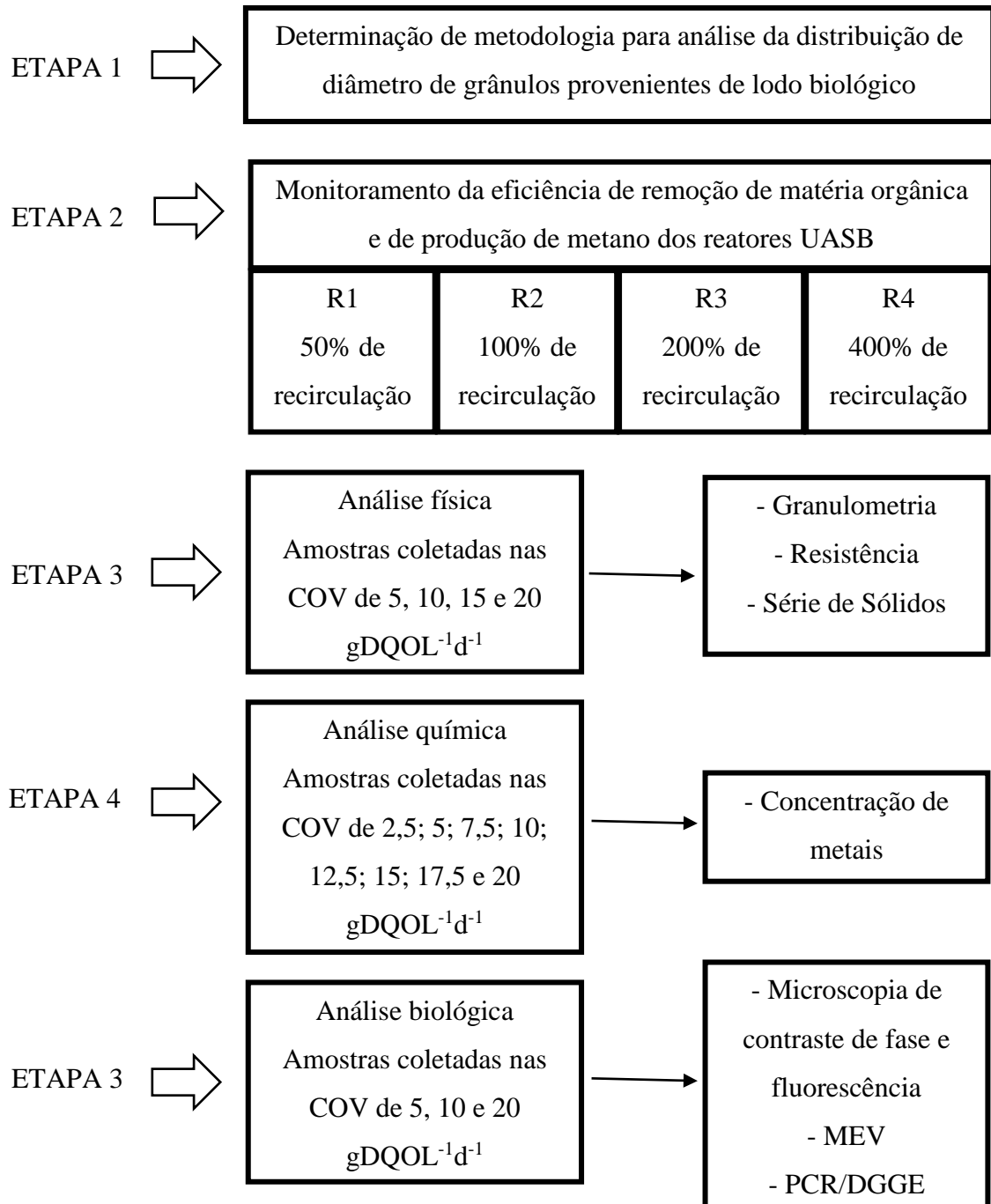
| Ponto de coleta | Análises | Frequência | Métodos/equipamentos |
|----------------------------------|--|--|---|
| Afluente e efluente dos reatores | DQO | 2x na semana | APHA (2005) |
| | Ácidos orgânicos voláteis por cromatografia | 2x ao longo de todo período operacional, nas COV de 10 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | Penteado et al (2013) |
| Biogás | Metano | 2x na semana | Perna et al. (2013) |
| Inóculo e Manta de lodo | Sólidos Fixos Totais e Sólidos Voláteis Totais | 1 x no inóculo e na manta de lodo submetida às cargas 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | APHA (2005) |
| | Granulometria e resistência | 1 x no inóculo e na manta de lodo submetida às cargas 5, 10, 15 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | Alves (2018) e Alves (2015) |
| | Análise das concentrações de metais | 1 x no inóculo e na manta de lodo submetida às cargas 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | Alves (2015) |
| Inóculo e Manta de lodo | Microscopia de contraste de fase e fluorescência e MEV | 1 x no inóculo e na manta de lodo submetida às cargas 10 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | Microscópio Olympus BX60 e Microscópio FEG, modelo SIGMA, fabricante ZEISS |
| Manta de lodo | PCR e DGGE | Nas cargas 5, 10, 15 e 20 gDQOL ⁻¹ d ⁻¹ | Software BioNumerics V.2.5, coeficiente de correlação de Pearson, e método de aglomeração UPGMA |

Fonte: elaborada pela autora

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados e discutidos estão na ordem estabelecida no fluxograma de etapas do trabalho (Figura 7).

Figura 7. Fluxograma das etapas de trabalho



Fonte: elaborada pela autora

6.1 ETAPA 1 - Determinação de metodologia para análise da distribuição de diâmetro de grânulos provenientes de lodo biológico

Os detalhes da metodologia de granulometria estão expostos na seção de resultados por se tratar de dados obtidos a partir de vários testes, através dos quais foi estabelecido o presente protocolo, já publicado (Alves et al. 2018). Imagens pormenorizadas do procedimento podem ser verificadas no apêndice A.

Coleta das amostras do lodo granular para determinação granulométrica

É importante que a amostra de lodo granular seja representativa. Para avaliar a manta de lodo de um reator UASB, as amostras devem ser retiradas ao longo do perfil reacional do reator para que, de fato, represente os grânulos de toda extensão da manta de lodo. A coleta tem que ser realizada do ponto mais alto para o mais baixo devido à acomodação dos grânulos no sistema (fator importante em reatores menores, escala de bancada e piloto).

Em reatores de escala piloto ou plena, que contam com maior volume de lodo granular, pode-se coletar uma amostra composta de 1 L no total, retirando aproximadamente 100 a 200 mL de cada ponto ao longo do perfil reacional (as amostras retiradas de cada ponto de coleta devem ser de volumes iguais), a depender de quantos pontos de coleta estejam disponíveis. O volume de amostra para a análise de granulometria é retirado dessa amostra composta.

Se o propósito for analisar os grânulos da manta de lodo em diferentes pontos do reator, então a coleta deve ser pontual (Exemplo: ponto alto, meio e base da manta de lodo do reator).

Preparação das amostras de grânulos para determinação granulométrica

Após a coleta, mistura-se 10 mL da amostra composta de lodo granular em aproximadamente 1 L de água, em béquer. Posterior à mistura, é necessário esperar a sedimentação dos grânulos, por 1 a 2 minutos, para descarte do sobrenadante, entre 700 e 800 mL. Essa fase, denominada etapa de lavagem, precisa ser repetida três vezes, a fim de que os grânulos muito finos (< 0,4 mm) e sem propriedade de sedimentação sejam descartados.

Ensaio de determinação granulométrica

O ensaio de determinação granulométrica ocorre em dois momentos: a captura e a análise de imagem. No primeiro, os grânulos que sedimentaram na etapa de lavagem são colocados em placas de Petri. É de suma importância que a separação dos grânulos seja feita de forma cuidadosa, pois o programa analisador de imagem interpreta os objetos escuros. Portanto, se dois grânulos estiverem juntos, o programa reconhece como apenas um objeto.

Além disso, o manuseio dos grânulos exige cautela para evitar danos que modifiquem sua estrutura, de forma que, para sua separação, é necessária utilização de ferramenta adequada que não os danifique, tal como pipeta pasteur de plástico.

As placas de Petri são posicionadas em *scanner* convencional e, então, a imagem é obtida e salva. Cada imagem pode conter até 6 placas de Petri (quantidade máxima que o *scanner* comporta), reduzindo, assim, o tempo de análise (Figura 10).

A segunda etapa, de análise de imagem, exige a calibração do *software* (descrita a seguir, na seção “Calibração do *software* analisador de imagem”). Logo após a calibração, inicia-se a análise propriamente dita das imagens capturadas, descrita na seção “Procedimento para medição do tamanho dos grânulos”.

Calibração do *software* analisador de imagem

A calibração do *software* é procedida conforme os seguintes passos:

1. Captura-se a imagem de uma régua utilizando um scanner.
2. Abre-se, por meio do *software* Image Pro-Plus (versão 6.0), a imagem capturada da régua.
3. Selecionam-se as opções “Measure” > “Calibration” > “Spatial”.
4. Selecionam-se as opções “New” > altera-se a unidade para milímetro > “Image”.
5. Delimita-se o comprimento e informa ao *software* o valor em milímetro do comprimento delimitado.
6. Dá-se o nome desejado para a calibração realizada ou mantém a opção do *software* (Spatial Cal 0) > “Apply”.

Procedimento para medição do tamanho dos grânulos

1. Abre-se, por meio do *software* Image Pro-Plus (versão 6.0), a primeira imagem capturada que se quer analisar;

2. Seleccionam-se as opções “Measure” > “Calibration” > “Select Spatial” > Selecciona-se a opção de calibração feita antecipadamente “Spacial Cal 0” (essa seleção deve ser realizada sempre que uma nova imagem for aberta para análise) > “apply”;
3. Selecciona-se a opção de delimitação “Ellipse” > delimita-se a placa de Petri contida na imagem (cuidadosamente para não selecionar a borda da placa);
4. Seleccionam-se as opções “Measure” > “Count/Size”;
5. Seleccionam-se as opções “Measurements” > “Select Measurements”;
6. Seleccionam-se a função “Diameter Mean” > “ok”;
7. Selecciona-se “Count” (verifica-se se os objetos escuros de interesse, os grânulos, foram delimitados em vermelho pelo *software*);
8. Seleccionam-se as opções “File” > “Clipboard”;
9. Transferem-se os valores copiados para uma página do Excel (ou programa equivalente) para posterior análise estatística dos dados;
10. Repete-se o procedimento para cada placa de Petri da imagem (a circunferência obtida pela função de delimitação “Ellipse” pode ser arrastada com o *mouse*);
11. Repete-se o procedimento para as demais imagens (como já dito, é necessário selecionar a calibração inicial “Spacial Cal 0”, realizada antecipadamente, sempre que abrir uma nova imagem).

Nos próximos itens estão expostos e discutidos os artifícios utilizados para demonstrar que o *software* e o volume de amostra propostos são estatisticamente adequados para o ensaio granulométrico. Esses ensaios, portanto, não são etapas do teste granulométrico. Seus resultados objetivaram puramente a validação do procedimento metodológico desenvolvido.

Teste de validação do *software* analisador de imagem

A confiabilidade do *software* Image Pro-Plus (versão 6.0) foi comprovada recorrendo-se a esferas de aço calibradas, ou seja, com dimensão conhecida, para simular os grânulos. Para validação do *software* seguiu-se o protocolo de determinação de diâmetro aqui descrito:

- 1 – Colocaram-se as esferas calibradas em placas de Petri (como se trata de esferas perfeitas, foi necessário o uso de cola para mantê-las fixas);
- 2 – Capturou-se pelo *scanner* a imagem das esferas e determinaram-se os diâmetros usando o *software* Image Pro-Plus (versão 6.0);
- 3 – Comparou-se o diâmetro fornecido às esferas calibradas, estabelecendo-se a acurácia e precisão do *software* em fornecer as dimensões das imagens analisadas. O mais importante foi a precisão, visto que a acurácia pode ser ajustada por calibração.

O primeiro ensaio consistiu em analisar esferas com o mesmo diâmetro separadamente e o segundo, em esferas de diâmetros diferentes na mesma imagem (Tabela 6, Tabela 7 e Figura 8). A média dos diâmetros e o desvio padrão obtidos indicaram pequenas diferenças entre os valores reais e os observados (Tabela 7). No entanto, a acurácia, o desvio padrão e o coeficiente de variação evidenciaram a precisão dos resultados.

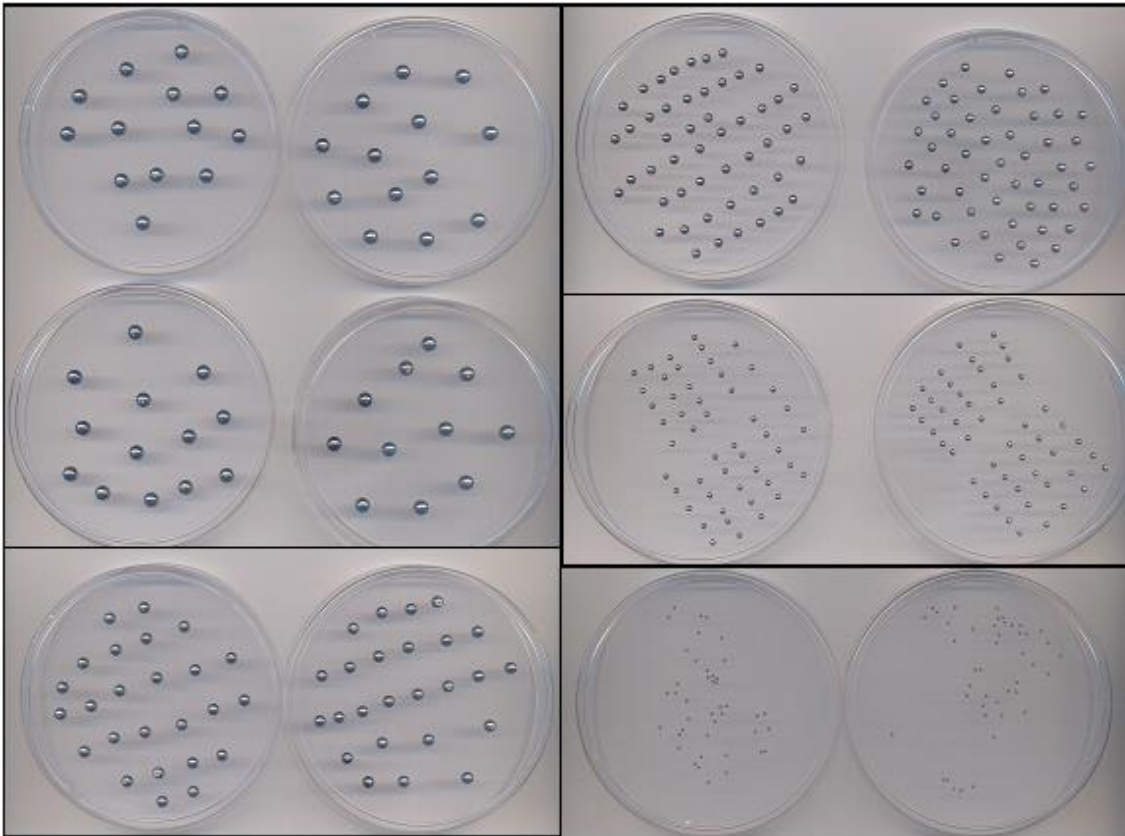
Pôde-se verificar que, nesse caso, o erro foi sempre negativo, próximo a 0,1 mm, podendo ser considerado sistemático (Tabela 7); assim, uma curva de calibração simples poderia ser usada para obter o tamanho correto das esferas de diâmetros desconhecidos. O desvio de linearidade do modelo de ajuste (R^2), que varia entre 0 e 1, foi de 0,999 (Figura 9), reforçando a validade do procedimento de medida do diâmetro através da captura de imagem em *scanner* e seu processamento no *software* escolhido (Image Pro-Plus).

Tabela 6. Testes para avaliar a calibração do *software* Image Pro-Plus (versão 6.0): número de esferas e placas de Petri utilizadas para análise do *software*

| 1º Ensaio | Diâmetro das esferas | Nº de esferas | Nº de placas de Petri utilizadas |
|-----------|----------------------|---------------|----------------------------------|
| Teste 1 | 5 mm | 50 | 4 |
| Teste 2 | 4 mm | 50 | 2 |
| Teste 3 | 3 mm | 100 | 2 |
| Teste 4 | 2 mm | 100 | 2 |
| Teste 5 | 1 mm | 100 | 2 |
| 2º Ensaio | Diâmetros variados | Nº de esferas | Nº de placas de Petri utilizadas |
| Teste 6 | 5 mm | 80 | 2 |
| | 4 mm | | |
| | 3 mm | | |
| | 2 mm | | |
| | 1 mm | | |

Fonte: elaborada pela autora

Figura 8. Esferas de aço calibradas utilizadas para verificar a precisão do software Image Pro-Plus (versão 6.0)

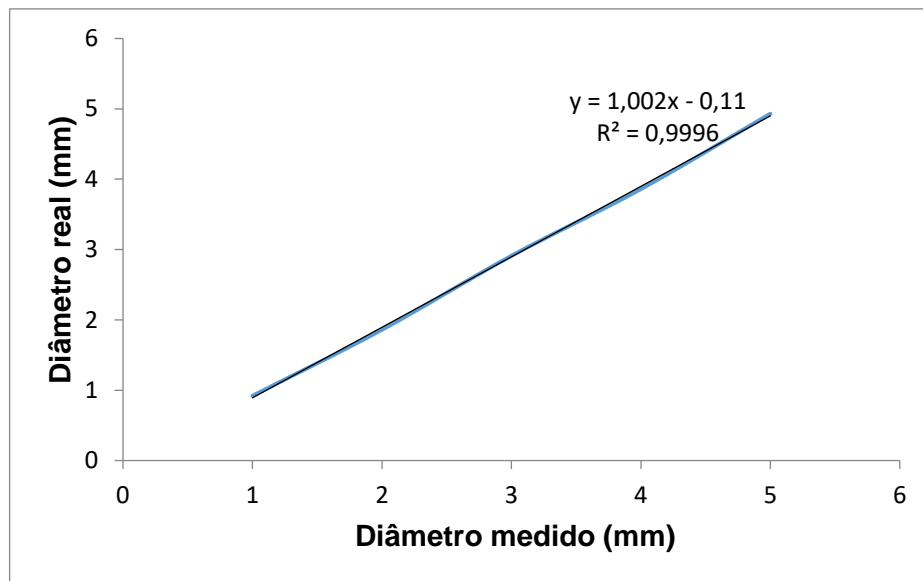


Fonte: elaborada pela autora

Tabela 7. Teste para avaliar a calibração do *software* Image Pro-Plus (versão 6.0): resultados de medição.

| Diâmetro real das esferas (mm) | Diâmetro médio obtido (mm) | Erro (mm) | Desvio padrão (mm) | Coefficiente de variação (%) |
|--------------------------------|----------------------------|-----------|--------------------|------------------------------|
| 1,00 | 0,92 | 0,08 | 0,04 | 4,4 |
| 2,00 | 1,86 | 0,14 | 0,05 | 2,7 |
| 3,00 | 2,91 | 0,09 | 0,08 | 2,7 |
| 4,00 | 3,86 | 0,14 | 0,08 | 2,1 |
| 5,00 | 4,93 | 0,07 | 0,07 | 1,4 |

Fonte: elaborada pela autora

Figura 9. Relação entre o diâmetro real e o medido e seu R²

Fonte: elaborada pela autora

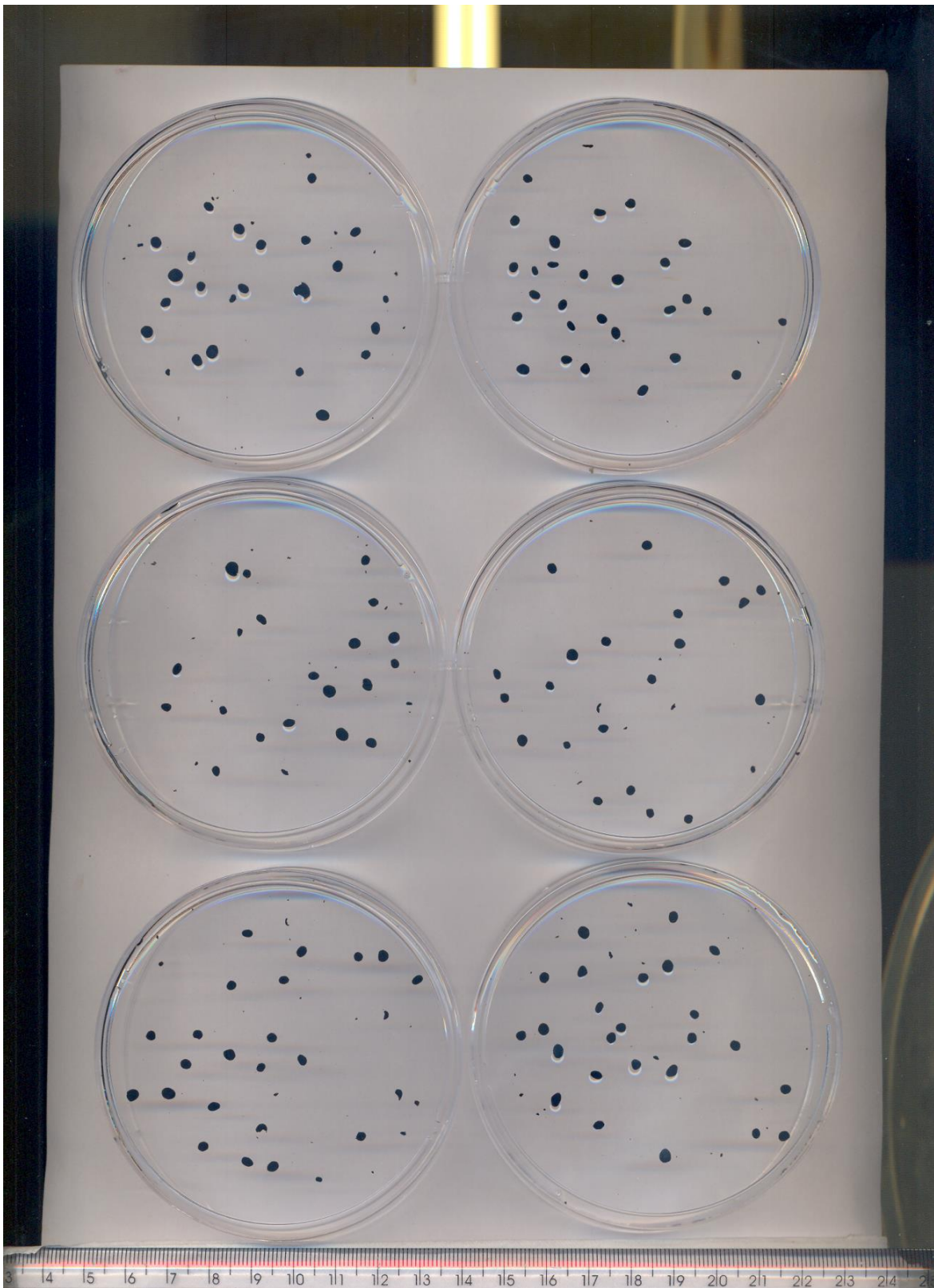
Determinação e validação do volume de amostra para medição das dimensões dos grânulos

A proposta dessa etapa consistiu em empregar a metodologia desenvolvida de granulometria, utilizando diferentes volumes, a fim de legitimar o montante de 10 mL determinado no protocolo em questão, com base em Del Nery et al. (2008).

Os ensaios foram feitos em triplicata. Além dos 10 mL, foram testados 5 e 15 mL de grânulos biológico. A amostra utilizada foi proveniente de reator UASB, empregado no tratamento de resíduo de abatedouro de aves (especificações do lodo em Del Nery et al. 2016).

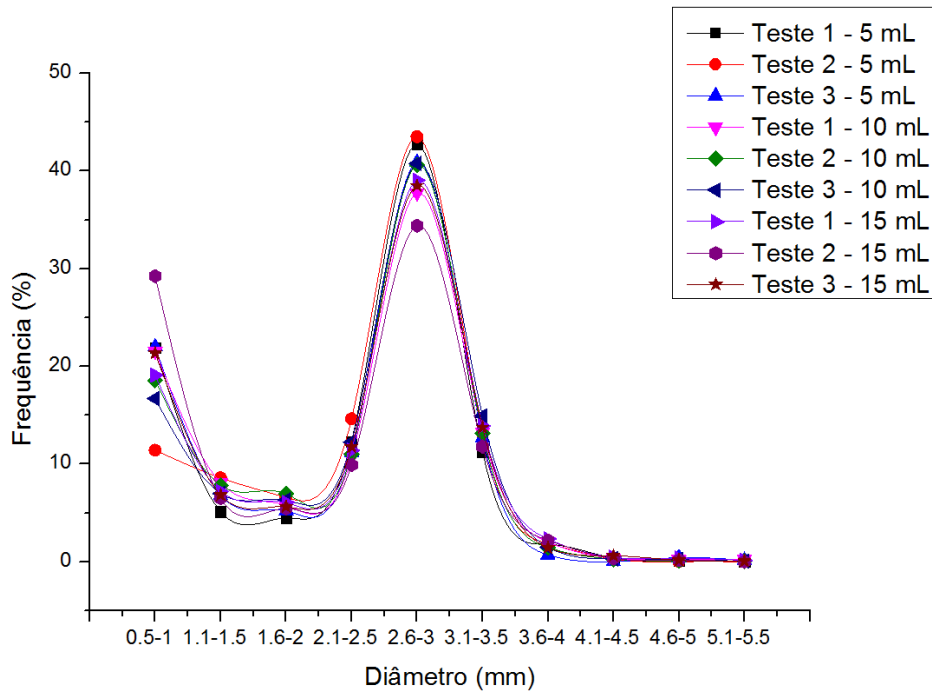
Os três volumes avaliados se mostraram adequados. No entanto, o ensaio realizado com volume de 10 mL de amostra apresentou menor média de desvio padrão, variância e coeficiente de variação (0,7, 1 e 3,5, respectivamente), considerando todas as faixas de diâmetro estabelecidas (Figura 11, Figura 12, Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10). O volume de 5 mL também poderia ser considerado se o montante de lodo disponível for pequeno, como no caso de reatores em escala de bancada. Desconsiderou-se a indicação de 15 mL por demandar maior tempo de trabalho sem ganho superior.

Figura 10. Grânulos expostos em placas de Petri para análise de imagem



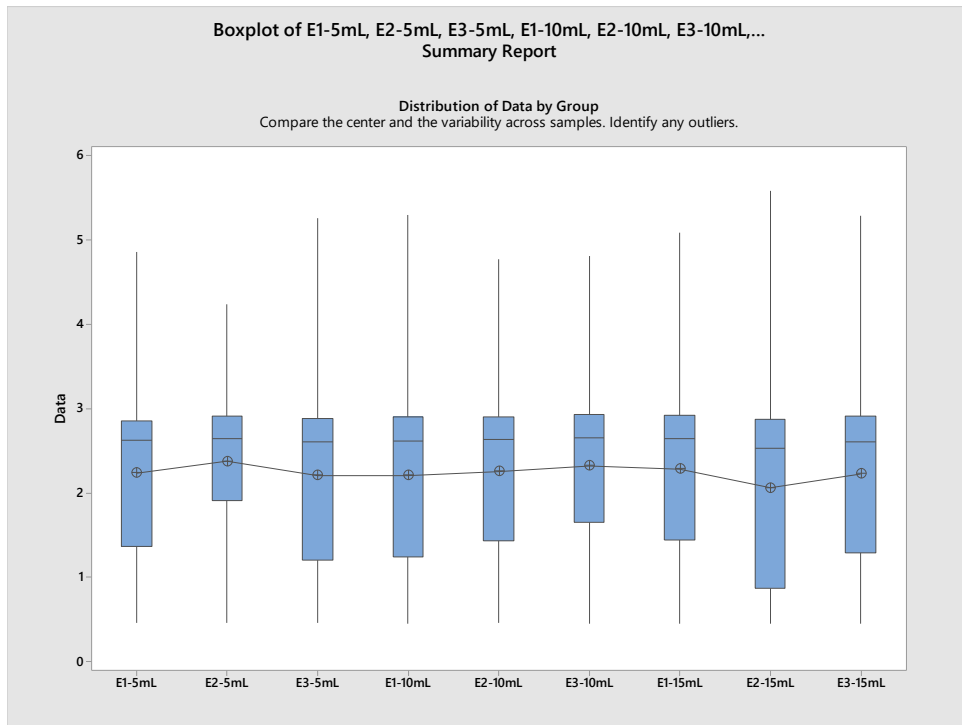
Fonte: elaborada pela autora

Figura 11. Resultado dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 12. Resultado dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 8. Resultado dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria

| Diâmetro | Frequência (%) | | | | | | | | |
|----------|-----------------|---------|---------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|
| | 5 mL de amostra | | | 10 mL de amostra | | | 15 mL de amostra | | |
| | Teste 1 | Teste 2 | Teste 3 | Teste 1 | Teste 2 | Teste 3 | Teste 1 | Teste 2 | Teste 3 |
| 0,5-1,0 | 21,9 | 11,4 | 22,0 | 21,5 | 18,6 | 16,7 | 19,1 | 29,2 | 21,3 |
| 1,1-1,5 | 5,1 | 8,6 | 6,8 | 8,1 | 7,8 | 7,0 | 7,2 | 6,5 | 6,8 |
| 1,6-2,0 | 4,5 | 6,6 | 5,2 | 5,8 | 7,0 | 6,3 | 6,1 | 5,5 | 5,6 |
| 2,1-2,5 | 12,3 | 14,6 | 11,1 | 10,7 | 11,0 | 12,2 | 11,4 | 9,9 | 11,8 |
| 2,6-3,0 | 42,7 | 43,5 | 40,9 | 37,8 | 40,6 | 40,8 | 39,0 | 34,4 | 38,5 |
| 3,1-3,5 | 11,3 | 13,2 | 12,7 | 13,3 | 13,1 | 14,9 | 13,9 | 11,8 | 13,7 |
| 3,6-4,0 | 1,8 | 1,9 | 0,7 | 2,0 | 1,4 | 1,5 | 2,3 | 2,2 | 1,4 |
| 4,1-4,5 | 0,4 | 0,3 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,6 |
| 4,6-5,0 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,1 |
| 5,1-5,5 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 |
| 5,6-6,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 9. Estatística descritiva dos resultados dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria

| | Média | | | Desvio Padrão | | |
|------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | 5 mL de amostra | 10 mL de amostra | 15 mL de amostra | 5 mL de amostra | 10 mL de amostra | 15 mL de amostra |
| | 21,9 | 18,6 | 21,3 | 6,1 | 2,4 | 5,3 |
| | 6,8 | 7,8 | 6,8 | 1,7 | 0,6 | 0,3 |
| | 5,2 | 6,3 | 5,6 | 1,1 | 0,6 | 0,3 |
| | 12,3 | 11,0 | 11,4 | 1,8 | 0,8 | 1,0 |
| | 42,7 | 40,6 | 38,5 | 1,3 | 1,7 | 2,5 |
| | 12,7 | 13,3 | 13,7 | 1,0 | 1,0 | 1,2 |
| | 1,8 | 1,5 | 2,2 | 0,7 | 0,3 | 0,5 |
| | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 0,0 | 0,1 |
| | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 |
| Soma | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 1,3 | 0,7 | 1,0 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 10. Estatística descritiva dos resultados dos testes para determinação do volume de amostra para ensaio de granulometria

| | Variância | | | Coeficiente De Variação | | |
|------|-----------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------|------------------|
| | 5 mL de amostra | 10 mL de amostra | 15 mL de amostra | 5 mL de amostra | 10 mL de amostra | 15 mL de amostra |
| | 36,9 | 6,0 | 28,4 | 0,3 | 0,1 | 0,2 |
| | 3,0 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 |
| | 1,1 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| | 3,2 | 0,7 | 1,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| | 1,8 | 2,9 | 6,4 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| | 1,0 | 1,0 | 1,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 |
| | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,2 | 0,3 |
| | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,4 | 0,7 |
| | 0,0 | 0,0 | 0,0 | * | 1,1 | 1,5 |
| | 0,0 | 0,0 | 0,0 | * | 1,1 | 0,6 |
| Soma | 4,3 | 1,0 | 3,4 | 3,8 | 3,5 | 3,9 |

Fonte: elaborada pela autora

* não foi possível calcular, pois a média da amostra é zero.

Considerações sobre a metodologia de análise de distribuição granulométrica

Os valores de desvio padrão e de coeficiente de variação (Tabela 9 e Tabela 10) indicam que a precisão experimental é suficiente para a determinação do tamanho dos grânulos biológicos. Esses grânulos variam em forma e possuem irregularidades em sua superfície, características comuns de grânulos biológicos, de modo que qualquer tipo de mensura é aproximada e o diâmetro atribuído é sempre equivalente.

Os testes realizados evidenciaram que a metodologia proposta para granulometria é adequada, precisa e estatisticamente representativa, pois o volume de amostra avalia um número expressivo de grânulos e o *software* analisador de imagem é suficientemente preciso para o objetivo.

6.2 ETAPA 2 - Monitoramento da eficiência de remoção de matéria orgânica e de produção de metano dos reatores UASB

O objetivo principal do estudo foi avaliar a dinâmica da manta de lodo granular nos reatores sob diferentes condições operacionais. Para alcançar esta finalidade, fez-se necessário ter ciência das condições gerais dos reatores, do seu funcionamento, eficiência de tratamento e de produção de biogás. Nesta etapa, abordaram-se questões gerais de operação e eficiência dos quatro sistemas analisados para que, nas próximas etapas, fosse possível adentrar nas questões efetivamente referentes à manta de lodo granular.

Monitoramento da eficiência de remoção de COV e de produção de metano

A adaptação da biomassa às mudanças operacionais foi fundamental para manter o sistema equilibrado, com eficiente remoção de carga orgânica e produção satisfatória de metano.

A COV removida representou mais de 80% da COV aplicada, sugerindo, portanto, que a recirculação do efluente, independente da taxa, foi positiva para o desempenho dos reatores. A recirculação incrementou a velocidade ascensional, o que provavelmente melhorou o transporte de massa no interior dos grânulos, facilitando a eficiência da degradação anaeróbia, além de contribuir com o desprendimento do biogás dos grânulos e com a diluição da vinhaça, reduzindo os efeitos negativos da elevada concentração de matéria orgânica e da presença de substâncias inibidoras do processo anaeróbio.

A eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 11) e os resultados do conteúdo de metano no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 (Tabela 12) e do rendimento de metano (Tabela 13) corroboraram a discussão de que as alterações da composição de sólidos e metais na manta de lodo dos reatores, causados pelo incremento de vinhaça, não foram prejudiciais às populações metanogênicas no período de estudo. A porcentagem de metano no biogás foi sempre superior a 60%. As taxas de rendimento de metano nos reatores, comparadas com os valores teóricos, variaram de 74 a 87%. Os resultados indicaram que a população microbiana presente no reator estava em equilíbrio e ativa e que não houve toxicidade a metais para a população metanogênica.

Tabela 11. Variação da DQO bruta e filtrada da vinhaça e dos reatores e da eficiência de remoção de DQO em relação à DQO bruta e filtrada

| Parâmetros | Vinhaça | R1 | R2 | *R3 | R4 |
|---------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| DQO bruta (g L^{-1}) | 19,4±2,5 | 3,0±1,3 | 2,8±1,7 | 2,5±1,2 | 2,1±1,2 |
| DQO solúvel (g L^{-1}) | 15,2±2,0 | 1,6±0,5 | 1,4±0,6 | 1,5±0,7 | 1,2±0,7 |
| Efic. de rem. bruta (%) | | 85±5 | 85±8 | 87±5 | 89 ±7 |
| Efic. de rem. solúvel (%) | | 90±4 | 91±4 | 90±3 | 92±5 |

Fonte: elaborada pela autora

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

Tabela 12. Porcentagem de metano nos gases dos reatores R1, R2, R3 e R4

| Reator | Metano (%) |
|-----------------------------|------------|
| R1 (50% de recirculação) | 66,7±0,05 |
| R2 (100% de recirculação) | 64,7±4,27 |
| * R3 (200% de recirculação) | 68,8±7,14 |
| R4 (400% de recirculação) | 69,7±8,36 |

Fonte: elaborada pela autora

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

Tabela 13. Rendimento de metano em R1, R2, R3 e R4 comparado com o rendimento teórico

| Reator | Rendimento real (LCH ₄ gDQO ⁻¹ _{removida}) | Rendimento teórico (LCH ₄ gDQO ⁻¹ _{removida}) | Taxa (%) |
|--------|---|--|-------------|
| R1 | 0,344±0,064 | 0,395±0,001 | 87 |
| R2 | 0,302±0,070 | 0,393±0,003 | 77 |
| * R3 | 0,299±0,066 | 0,391±0,004 | 76 |
| R4 | 0,289±0,060 | 0,391±0,004 | 74 |

Fonte: elaborada pela autora

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

Caracterização da concentração de ácidos orgânicos dos reatores UASB

A análise da concentração de ácidos orgânicos foi realizada no afluente, efluente e em pontos ao longo do perfil da manta de lodo dos reatores – P1, P2, P3, P4 e P5 – em que P1 foi o ponto mais próximo da base dos reatores e P5, o mais alto. Os ácidos voláteis gerados predominantemente nos reatores no tratamento de vinhaça foram acético e propiônico. Os ácidos butírico e valérico apareceram discretamente em algumas fases (Tabela 14).

Na COV 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ do reator R1, observou-se maior concentração de propiônico nos pontos P1, P2 e P3 devido a quantidade significativa desse ácido na vinhaça de alimentação, maior que 300 mgL⁻¹, além do gerado pela degradação anaeróbia dentro do reator. Nos demais pontos, a concentração de propiônico diminuiu para valores próximos a 200 mgL⁻¹, semelhante ao observado para o ácido acético. Na COV 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, apesar da fermentação da vinhaça de alimentação (ácido acético superior a 1000 mgL⁻¹), os microrganismos envolvidos no

processo absorveram a água residuária relativamente acidificada sem prejuízos ao reator (Tabela 14).

Para o reator R2, a maior concentração de ácidos ocorreu nos pontos P1 e P2, mais expressivamente no P1, mostrando que a base do reator foi significativamente mais ativa e atuou como barreira que protege o sistema de sobrecarga orgânica. Os valores de ácidos acético e propiônico variaram de 300 a 1200 mgL⁻¹ na base do reator, mas mantiveram-se baixos nos demais pontos de amostragem (Tabela 14).

O reator R3 apresentou concentração de ácidos orgânicos voláteis baixa em todas as fases analisadas. No reator R4, quantias baixas de ácido acético e propiônico foram observadas na COV 10 gDQOL⁻¹d⁻¹, com valores inferiores a 40 mgL⁻¹. Na maior COV analisada, 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, notou-se maior concentração de ácidos acético e propiônico nos pontos mais altos, P3, P4, P5 e no efluente. Os valores variaram entre 10 e 412 mgL⁻¹ de ácido acético e de 9 a 160 mgL⁻¹ de propiônico (Tabela 14). As maiores vazões e velocidades ascensionais aplicadas nessa fase do reator R4 podem ter sido responsáveis por esse resultado.

Verificou-se que a vinhaça de alimentação apresentou características diferentes quanto ao conteúdo de ácidos no decorrer do período operacional dos reatores, mesmo a vinhaça sendo proveniente da mesma indústria. Essas alterações ocorreram devido a diversos fatores como fermentação, mudança na concentração e forma de armazenamento.

A produção de ácidos esteve sujeita principalmente à característica da água residuária e à COV aplicada. Como as cargas orgânicas referente à vinhaça foram semelhantes, a particularidade da água residuária de alimentação, diferenciada em R1, R2, R3 e R4 pela taxa de recirculação do próprio efluente tratado, influenciou os resultados de ácidos.

Como princípio, o ácido acético, em quantidades equilibradas, é visto como importante por ser principal precursor da digestão anaeróbia. O propiônico, por sua vez, é avaliado com cautela, pois sua utilização por microrganismos metanogênicos é termodinamicamente desfavorável, já que sua biodegradação ocorre por complexas reações enzimáticas (Şentürk, İnce e Onkal Engin 2010). No entanto, alguns estudos apontaram presença expressiva desses ácidos sem, necessariamente, causar malefícios ao processo (Barros et al. 2017; Şentürk, İnce e Onkal Engin 2010; Fuess et al. 2017). No caso do presente estudo, o conteúdo de ácidos acético e propiônico não prejudicou a eficiência dos sistemas de tratamento.

Tabela 14. Concentração de ácidos orgânicos nos reatores R1, R2, R3 e R4, nas COV de 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹

| R1-10 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | | | R1-20 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | |
|---|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|---|--------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Efluente | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Efluente |
| Ac. Acético | 76,6 | 105,2 | 384,3 | 174,9 | 448,2 | 214,7 | 177,8 | 1128,0 | 77,4 | 26,6 | 7,2 | 47,8 | 33,3 | 14,3 |
| Ac. Propiônico | 334,8 | 563,2 | 563,2 | 493,0 | 357,6 | 201,0 | 204,0 | 216,0 | 36,3 | 6,8 | 5,0 | < 0,2 | 5,7 | < 0,2 |
| Ac. Butírico | 8,6 | 18,6 | 26,8 | 12,1 | 11,2 | 9,5 | 9,8 | < 0,2 | 33,9 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |
| Ac. Valérico | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | 72,6 | 21,1 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |
| R2-10 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | | | R2-20 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | |
| | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Efluente | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Efluente |
| Ac. Acético | 223,9 | 364,6 | 330,4 | 112,3 | 115,2 | 130,6 | 95,3 | 636,3 | 1140,9 | 74,5 | 20,0 | 71,1 | 74,2 | 64,0 |
| Ac. Propiônico | 28,2 | 352,2 | 208,5 | 41,0 | 48,0 | 34,5 | 19,0 | 53,9 | 984,8 | 156,9 | - | 69,4 | 65,1 | 62,2 |
| Ac. Butírico | 66,9 | 36,9 | 16,0 | 7,6 | 7,6 | 6,4 | 2,9 | 7,0 | 48,6 | 7,8 | 6,8 | 6,5 | 6,4 | 6,3 |
| Ac. Valérico | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | 6,5 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |
| R3-10 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | | | R3-20 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | |
| | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | *Efluente | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | *Efluente |
| Ac. Acético | 556,0 | 102,7 | 34,6 | 28,2 | 50,8 | 35,5 | 56,5 | 305,5 | 37,5 | 11,5 | 27,6 | 30,7 | 51,3 | 27,8 |
| Ac. Propiônico | 52,7 | 24,1 | 3,7 | < 0,2 | 1,7 | 0,2 | 7,2 | 116,9 | 57,6 | 0,8 | 1,8 | 1,0 | 45,1 | 27,8 |
| Ac. Butírico | 6,4 | 6,8 | 7,4 | 3,6 | 3,5 | 6,4 | 12,0 | 44,8 | 12,0 | 7,9 | 4,5 | 7,5 | 7,8 | 15,3 |
| Ac. Valérico | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | 6,5 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |
| R4-10 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | | | R4-20 gDQOL⁻¹d⁻¹ | | | | | | |
| | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Efluente | Vinhaça | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | Efluente |
| Ac. Acético | 243,8 | 41,0 | 18,4 | < 0,2 | 38,5 | 32,7 | 28,3 | 125,6 | 34,1 | 10,2 | 412,7 | 241,5 | 311,2 | 376,3 |
| Ac. Propiônico | 16,7 | 7,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | 9,2 | 11,6 | < 0,2 | 162,4 | 83,4 | 118,0 | 96,9 |
| Ac. Butírico | 8,3 | 6,4 | 6,1 | 0,0 | 2,9 | < 0,2 | < 0,2 | 10,8 | 3,2 | 6,4 | 12,3 | 9,3 | 10,6 | 12,3 |
| Ac. Valérico | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 | < 0,2 |

Fonte: elaborada pela autora

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

6.3 ETAPA 3 - Análise física da manta de lodo

Distribuição do tamanho dos grânulos do inóculo e da manta de lodo dos reatores UASB submetidos a diferentes cargas orgânicas e hidráulicas

As análises do lodo do inóculo e da manta de lodo dos reatores nas COV estudadas mostraram que diferentes tamanhos de grânulos coexistiram no reator. O tamanho dos grânulos analisados variou de 0,4 a 5,0 mm em todas as amostras. No entanto, mais de 98% deles apresentaram diâmetros entre 0,4 e 3,5 mm (Tabela 15, Tabela 16, Tabela 17, Tabela 18 e Tabela 19).

Tabela 15. Frequência dos diâmetros de grânulos no lodo utilizado para inocular R1 e do lodo utilizado para inocular R2, R3 e R4

| Diâmetro médio (mm) | Frequência de grânulos no inóculo (%) | |
|------------------------|---------------------------------------|-------------|
| | R1 | R2, R3 e R4 |
| 0,4-1,0 | 18,6 | 17,5 |
| 1,1-1,5 | 7,8 | 5,5 |
| 1,6-2,0 | 7,0 | 19,7 |
| 2,1-2,5 | 11,0 | 46,4 |
| 2,6-3,0 | 40,6 | 9,6 |
| 3,1-3,5 | 13,1 | 1,0 |
| 3,6-4,0 | 1,4 | 0,2 |
| 4,1-4,5 | 0,3 | 0,1 |
| 4,6-5,0 | 0,1 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 16. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R1 (50% de recirculação) submetido a diferentes COV

| Faixa granulométrica (mm) | Frequência de grânulos no reator R1 (%) | | | | |
|---------------------------------|---|---------|----------|----------|----------|
| | Inóculo | COV 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
| 0,4-1,0 | 18,6 | 47,8 | 66,5 | 73,6 | 87,9 |
| 1,1-1,5 | 7,8 | 11,5 | 7,4 | 6,4 | 6,9 |
| 1,6-2,0 | 7,0 | 6,6 | 4,7 | 3,9 | 2,1 |
| 2,1-2,5 | 11,0 | 9,5 | 4,4 | 3,9 | 1,2 |
| 2,6-3,0 | 40,6 | 18,9 | 12,6 | 8,6 | 1,1 |
| 3,1-3,5 | 13,1 | 4,6 | 3,8 | 3,2 | 0,8 |
| 3,6-4,0 | 1,4 | 0,8 | 0,5 | 0,3 | 0,0 |
| 4,1-4,5 | 0,3 | 0,4 | 0,0 | 0,1 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

* COV em $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$

Tabela 17. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R2 (100% de recirculação) submetido a diferentes COV

| Faixa granulométrica (mm) | Frequência de grânulos no reator R2 (%) | | | | |
|---------------------------|---|---------|----------|----------|----------|
| | Inóculo | COV 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
| 0,4-1,0 | 17,5 | 39,4 | 42,2 | 47,9 | 52,1 |
| 1,1-1,5 | 5,5 | 9,9 | 8,3 | 10,0 | 7,1 |
| 1,6-2,0 | 19,7 | 9,1 | 9,2 | 7,5 | 5,5 |
| 2,1-2,5 | 46,4 | 29,9 | 26,0 | 21,2 | 16,5 |
| 2,6-3,0 | 9,6 | 10,4 | 12,3 | 11,7 | 15,3 |
| 3,1-3,5 | 1,0 | 1,0 | 1,6 | 1,5 | 3,2 |
| 3,6-4,0 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,2 |
| 4,1-4,5 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

* COV em $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$

Tabela 18. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R3 (200% de recirculação) submetido a diferentes COV

| Faixas granulométricas (mm) | Frequência de grânulos no Reator R3 (%) | | | | |
|-----------------------------|---|---------|--------|-------|----------|
| | Inóculo | COV 5,0 | COV 10 | COV15 | COV 20,0 |
| 0,4-1,0 | 17,5 | 29,3 | 51,0 | 51,1 | 63,6 |
| 1,1-1,5 | 5,5 | 19,0 | 14,5 | 12,5 | 9,8 |
| 1,6-2,0 | 19,7 | 39,4 | 27,0 | 22,3 | 12,8 |
| 2,1-2,5 | 46,4 | 10,2 | 6,8 | 12,5 | 11,6 |
| 2,6-3,0 | 9,6 | 1,6 | 0,6 | 1,3 | 1,8 |
| 3,1-3,5 | 1,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| 3,6-4,0 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| 4,1-4,5 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

* COV em $\text{gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$

Tabela 19. Frequência dos diâmetros de grânulos no reator R4 (400% de recirculação) submetido a diferentes COV

| Faixas granulométricas (mm) | Frequência de grânulos no reator R4 (%) | | | | |
|-----------------------------|---|---------|----------|----------|----------|
| | Inóculo | COV 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
| 0,4-1,0 | 17,5 | 33,0 | 51,0 | 73,1 | 79,1 |
| 1,1-1,5 | 5,5 | 16,5 | 11,9 | 7,2 | 5,1 |
| 1,6-2,0 | 19,7 | 37,0 | 24,3 | 9,7 | 7,0 |
| 2,1-2,5 | 46,4 | 11,5 | 11,1 | 8,7 | 7,2 |
| 2,6-3,0 | 9,6 | 1,7 | 1,5 | 1,2 | 1,5 |
| 3,1-3,5 | 1,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,1 |
| 3,6-4,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,1-4,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

* COV em gDQO L⁻¹d⁻¹

O inóculo, utilizado para início da partida do reator R1, apresentou 40,6% dos grânulos com diâmetros entre 2,6 e 3,0 mm. Apesar de ter mesma origem, a característica do lodo aplicado nos reatores R2, R3 e R4, coletado em período distinto, diferiu em relação à distribuição granulométrica, apresentando 46,4% dos grânulos com diâmetros em uma faixa menor: 2,1 a 2,5 mm (Tabela 15).

A maior parte dos diâmetros dos grânulos, nos reatores submetidos a menores porcentagens de recirculação, R1 com 50% e R2 com 100%, mantiveram-se na menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm). O incremento contínuo da carga orgânica e da velocidade ascensional provocou aumento da frequência dos grânulos com diâmetros entre 0,4 e 1,0 mm: R1 passou de 47,8 para 87,9% e R2, de 39,4 para 52,1% (Tabela 16 e Tabela 17).

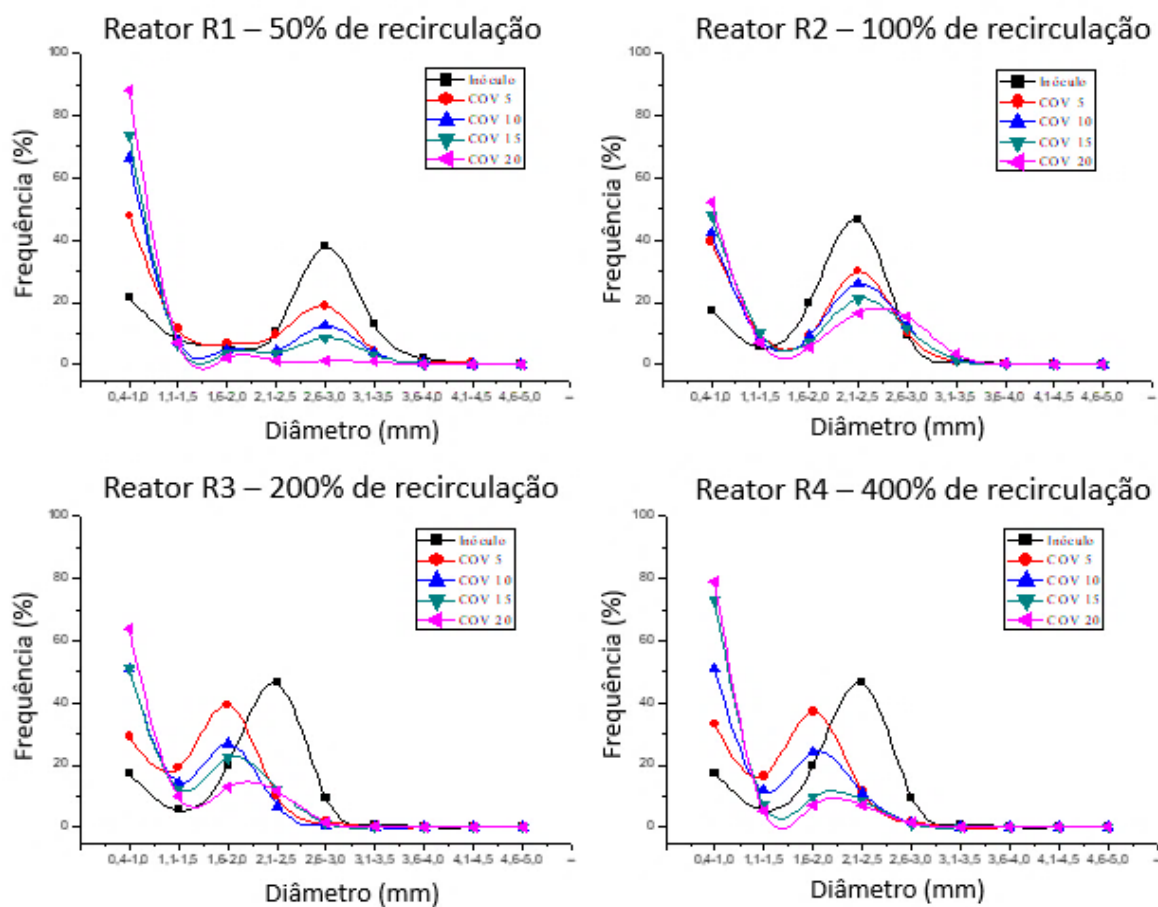
Nos reatores submetidos a maiores porcentagens de recirculação, R3 com 200% e R4 com 400%, na COV mais baixa (5 gDQOL⁻¹d⁻¹), a maior frequência de diâmetro de grânulos ocorreu na faixa de 1,6 a 2,0 mm, com 39,4 e 37%, respectivamente. Com o contínuo aumento da carga orgânica e da velocidade ascensional, observou-se redução do diâmetro granular para a menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm). Na maior COV analisada (20 gDQOL⁻¹d⁻¹), R3 e R4 apresentaram 63,6 e 79,1% dos seus grânulos na faixa de 0,4 a 1,0 mm, respectivamente (Tabela 18 e Tabela 19).

A comparação das curvas de distribuição granulométrica do inóculo, em relação aos grânulos após o início da partida dos reatores, demonstrou que a alimentação com vinhaça, o aumento da COV e da velocidade ascensional provocaram alteração no diâmetro granular (Figura 13), acarretando na redução da média e da mediana dos diâmetros dos grânulos (Tabela 20).

A média reduziu, em relação ao inóculo, de 2,2 a 0,8 mm em R1; de 1,9 a 1,5 mm em R2; de 1,9 a 1,1 em R3; e de 1,9 a 0,9 mm em R4, com incremento gradativo de carga hidráulica e orgânica. Seguindo a mesma dinâmica, a mediana foi de 2,6 a 0,7 mm em R1; de 2,1 a 0,95 mm em R2; de 2,1 a 0,8 mm em R3 e de 2,1 a 0,6 mm em R4 (Tabela 20, Figura 14 e Figura 15). A quantidade de grânulos por amostra variou de 1530 a 4951, número considerado representativo para análise estatística (Tabela 25).

A redução do diâmetro granular nos reatores R1 e R4 foi mais drástica que no reator R2 e R3 (Figura 14 e Figura 15). Na última fase analisada, os reatores R1 e R4 apresentaram 87,9 e 79,1% dos grânulos com diâmetros entre 0,4 e 1 mm, respectivamente; enquanto que em R2 e R3, foi de 52,1 e 63,6%, respectivamente. Diante disso, observou-se que a menor recirculação (50%) e a maior (400%) causaram efeito mais brusco na dimensão granular que a recirculação de 100 e 200%. A menor diluição da vinhaça em R1 e a elevada velocidade ascensional em R4 alteraram consideravelmente o tamanho das partículas de lodo. Estatisticamente, a recirculação de 100% foi a que menos causou alterações significativas do diâmetro granular.

Figura 13. Comparação da distribuição granulométrica do inóculo com a dos reatores – R1, R2, R3 e R4 - nas COV de 5 a 20 gDQOL⁻¹d⁻¹



* COV em gDQOL⁻¹d⁻¹

Fonte: elaborada pela autora

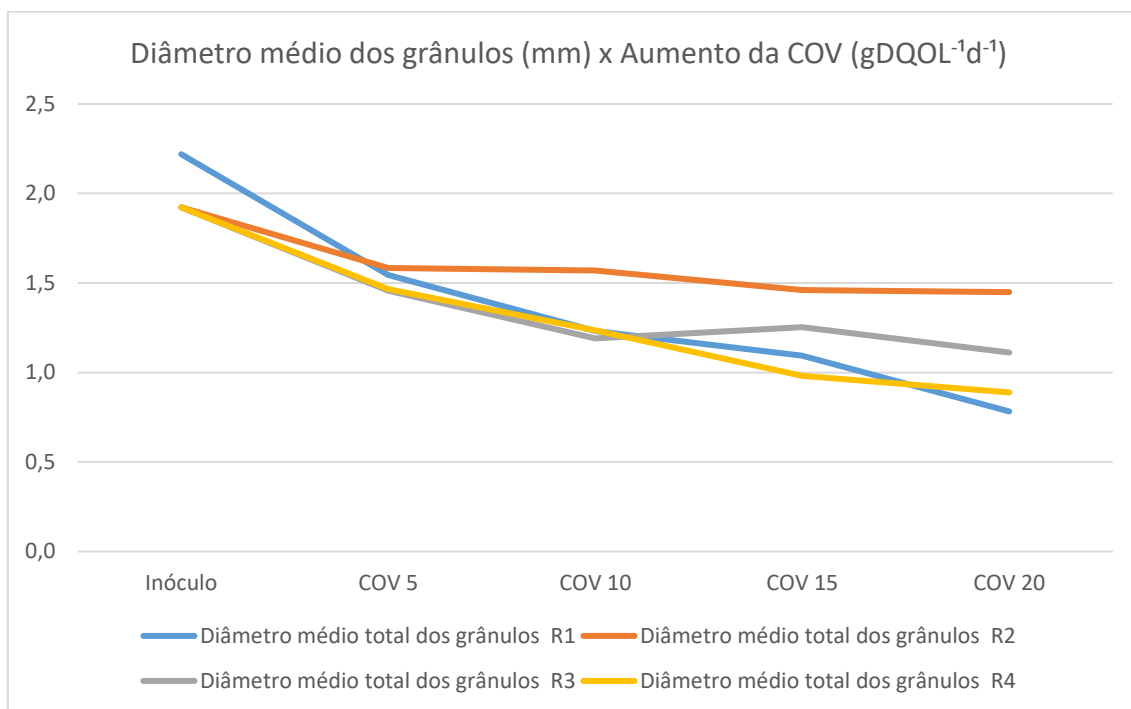
Tabela 20. Média e Mediana dos diâmetros dos grânulos dos reatores com o aumento da COV

| | Diâmetro médio total dos grânulos | | | | Mediana dos diâmetros dos grânulos | | | |
|---------|-----------------------------------|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|-----|-----|
| | R1 | R2 | R3 | R4 | R1 | R2 | R3 | R4 |
| Inóculo | 2,2 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 2,6 | 2,1 | 2,1 | 2,1 |
| COV 5 | 1,5 | 1,6 | 1,5 | 1,5 | 1,1 | 1,6 | 1,6 | 1,6 |
| COV 10 | 1,2 | 1,6 | 1,2 | 1,2 | 0,8 | 1,5 | 1,0 | 1,0 |
| COV 15 | 1,1 | 1,4 | 1,3 | 1,0 | 0,7 | 1,1 | 1,0 | 0,6 |
| COV 20 | 0,8 | 1,4 | 1,1 | 0,9 | 0,7 | 1,0 | 0,8 | 0,5 |

COV em gDQOL⁻¹d⁻¹

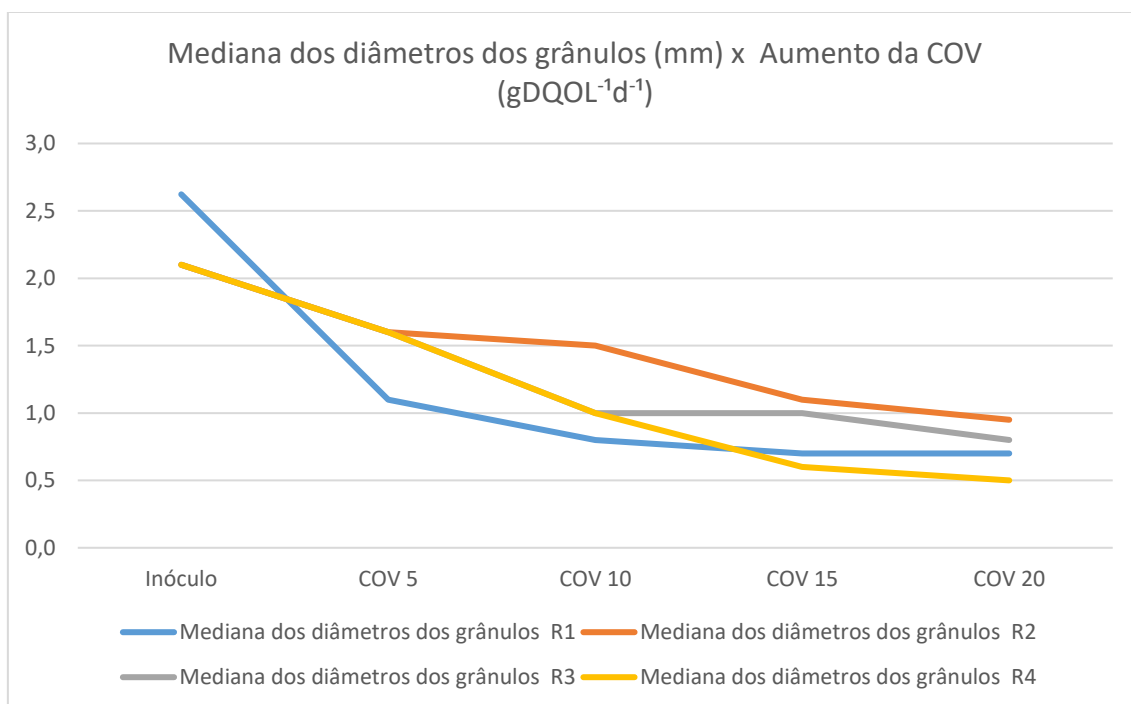
Fonte: elaborada pela autora

Figura 14. Diâmetro médio dos grânulos (mm) x Aumento da COV (gDQOL⁻¹d⁻¹)



Fonte: elaborada pela autora

Figura 15. Mediana dos diâmetros dos grânulos (mm) x Aumento da COV (gDQOL⁻¹d⁻¹)



Fonte: elaborada pela autora

A fim de avaliar o efeito isolado da carga orgânica do afluente no diâmetro granular, foram comparados os dados dos reatores R2, R3 e R4 nas etapas em que eles foram submetidos a velocidades ascensionais semelhantes (Tabela 21). O reator R1 não foi analisado em conjunto por ter sido inoculado com lodo que apresentava disparidade granulométrica em relação ao inóculo dos demais reatores, impossibilitando a comparação. O lodo utilizado no reator R1 é de mesma origem do utilizado nos demais reatores, no entanto, sua coleta foi realizada em período distinto.

Como os reatores foram operados com taxas de recirculação diferentes e, portanto, vazões de entrada diferentes, a avaliação dos reatores com mesma velocidade ascensional teve de ser feita com os reatores submetidos a distintas COV e, conseqüentemente, com distintas taxas de produção de biogás, como apresentado na Tabela 21 e Tabela 22.

No período em que a velocidade ascensional chegou a aproximadamente $0,125 \text{ mh}^{-1}$, as cargas orgânicas nos reatores eram 10, 15 e 5 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ e a frequência de diâmetro granular na menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm) era de 48, 51 e 33% para R2, R3 e R4, respectivamente (Tabela 22). A segunda maior frequência de diâmetro de grânulos se enquadrou na faixa de 2,1 a 2,5 mm, para R2, com 21%; e na de 1,6 a 2,0 mm, para R3 e R4, com 27% e 37%, respectivamente.

Ao analisar o diâmetro granular dos reatores R2, R3 e R4, submetidos à mesma velocidade ascensional do líquido, foi possível verificar isoladamente o efeito da carga orgânica e da força de cisalhamento provocada pelas bolhas de biogás (Tabela 22). A maior alteração observada foi na manta de lodo do reator submetido a menor carga (5 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), em relação aos grânulos submetidos as demais cargas analisadas, 10 e 15 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$. Avaliando o diâmetro granular entre os reatores sob as cargas 10 e 15 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, não foi observada alteração significativa nos grânulos nestas cargas orgânicas.

Dessa forma, pôde-se concluir que, apesar da COV e da produção de biogás influenciarem o diâmetro granular, o aumento da carga hidráulica foi mais significativo para determinação da dinâmica granular nas situações analisadas.

O biogás produzido poderia ter proporcionado maior descarga de biomassa por flotação, caso os grânulos possuíssem núcleos ocos (devido a menor densidade, característica desse tipo de grânulo), no entanto, não foram observados grânulos ocos na manta de lodo dos reatores analisados. Segundo Del Nery et al. (2008), a presença de núcleos ocos pode ser resultado de diminuição na difusão do substrato devido ao tamanho

maior do grânulo (maior que 2 mm de diâmetro) ou a baixa taxa de carregamento orgânico aplicada no reator. Provavelmente, a ausência de núcleos ociosos, observada no presente estudo, mesmo em grânulos com diâmetro superior a 2 mm, ocorreu devido à alta carga orgânica aplicada.

Além dos efeitos operacionais, vale ressaltar que reatores são organismos dinâmicos, portanto, os grânulos estiveram em formação e em fase de decomposição concomitantemente (Alves 2015).

Tabela 21. Velocidade ascensional nos reatores R1, R2, R3 e R4 nas diferentes COV aplicadas

| COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | Velocidade Ascensional (m h ⁻¹) | | | |
|---|---|--------------|--------------|--------------|
| | R1 | R2 | R3 | R4 |
| 5 | 0,031 | 0,042 | 0,063 | 0,104 |
| 10 | 0,063 | 0,083 | 0,125 | 0,208 |
| 15 | 0,094 | 0,125 | 0,188 | 0,313 |
| 20 | 0,125 | 0,167 | 0,250 | 0,417 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 22. Diâmetro granular e COV dos reatores R1, R2, R3 e R4 quando submetidos a velocidade ascensional de 0,125 m h⁻¹

| Reator | Velocidade Ascensional (mh ⁻¹) | COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | Frequência de diâmetro de grânulos na faixa de 0,4 a 1 mm (%) | Média dos diâmetros (mm) | Mediana dos diâmetros (mm) | Produção de biogás (Lh ⁻¹) |
|--------|--|--|---|--------------------------|----------------------------|--|
| R2 | 0,125 | 15 | 48 | 1,4 | 1,1 | 19 |
| R3 | 0,125 | 10 | 51 | 1,2 | 1 | 12,7 |
| R4 | ~ 0,125 | ~ 5 | 33 | 1,5 | 1,6 | 7,7 |

Fonte: elaborada pela autora

Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e de Tukey, aplicado nos dados de granulometria (Apêndice B) confirmaram que as mudanças operacionais alteraram significativamente todas as amostras em R1, R3 e R4. Os grânulos de R2 foram menos impactados, sendo consideradas iguais as amostras expostas às COV 5 e 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ e as expostas às COV 15 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹.

Resistência mecânica dos grânulos

A agitação aplicada (770 s^{-1}) aos grânulos do inóculo, utilizado em R2, R3 e R4, causou redução de dez pontos percentuais na frequência de grânulos de diâmetro entre 2,1 e 2,5 mm (de 46,4 para 36,4%) e o aumento da frequência de grânulos na menor faixa de diâmetro (de 17,5 para 23,1%) (Tabela 23). A análise de agitação não foi realizada para o inóculo do reator R1.

Tabela 23. Frequência do diâmetro dos grânulos do inóculo antes e após agitação mecânica.

| Diâmetro médio (mm) | Frequência de grânulos no inóculo (%) | |
|------------------------|---------------------------------------|---------------|
| | Antes da Agitação | Após Agitação |
| 0,4-1,0 | 17,5 | 23,1 |
| 1,1-1,5 | 5,5 | 9,9 |
| 1,6-2,0 | 19,7 | 23,6 |
| 2,1-2,5 | 46,4 | 36,4 |
| 2,6-3,0 | 9,6 | 6,3 |
| 3,1-3,5 | 1,0 | 0,7 |
| 3,6-4,0 | 0,2 | 0,0 |
| 4,1-4,5 | 0,1 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 |

Fonte: elaborada pela autora

Nas amostras dos reatores R3 e R4, que operaram com maior recirculação (200 e 400%, respectivamente), a agitação aplicada aos grânulos de menor carga ($5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), fez com que a maior frequência de grânulos passasse a apresentar diâmetro médio entre 0,4 e 1,0 mm, com 44,8 e 46,2% para R3 e R4, respectivamente. Nas demais cargas (10, 15 e $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), pôde-se observar tendência de diminuição da frequência de grânulos na faixa de 0,4 a 1,0 mm, pois a agitação nas amostras fez com que parte dos grânulos, que já apresentavam diâmetro pequeno, se desfizesse ou reduzisse (menor que 0,4 mm) de tal maneira que não fosse possível contabilizá-lo (Tabela 24, Figura 18 e Figura 19).

Nas amostras dos reatores R1 e R2, que tinham menor recirculação (50 e 100%,

respectivamente), a agitação aplicada aos grânulos pareceu não causar grandes variações na distribuição de diâmetro, quando se observou a porcentagem de grânulos em cada faixa analisada, principalmente nas maiores COV analisadas (10, 15 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹) (Tabela 24 e Figura 16 e Figura 17).

No entanto, em todas as amostras, houve alteração do número de grânulos após agitação, para mais ou para menos, quando comparado ao número de grânulos nas amostras antes da agitação, como apresentado na Tabela 25, evidenciando que a agitação causou modificação nos grânulos avaliados.

O aumento da quantidade de grânulos após agitação esteve relacionado com a quebra dos grânulos, crescendo o número de partículas das amostras. A diminuição da quantidade de grânulos, por sua vez, ocorreu devido aos tamanhos terem diminuído a ponto de não serem contabilizados pela metodologia adotada (< 0,4 mm). Portanto, o aumento da média e/ou da mediana dos grânulos apresentados na Tabela 25, Figura 20 e Figura 21, não equivaleu ao crescimento do diâmetro granular, mas sim à diminuição da montante de grânulos nas amostras, devido à quebra ou à dissolução das partículas, impedindo a contabilização.

As modificações no número de grânulos das amostras após a agitação evidenciam que essa perturbação hidráulica de fato modificou o tamanho granular, devido à quebra e, até mesmo, à dissolução das partículas. No entanto, os testes estatísticos aplicados, Kruskal-Wallis e Tukey, foram inconclusivos (Apêndice C).

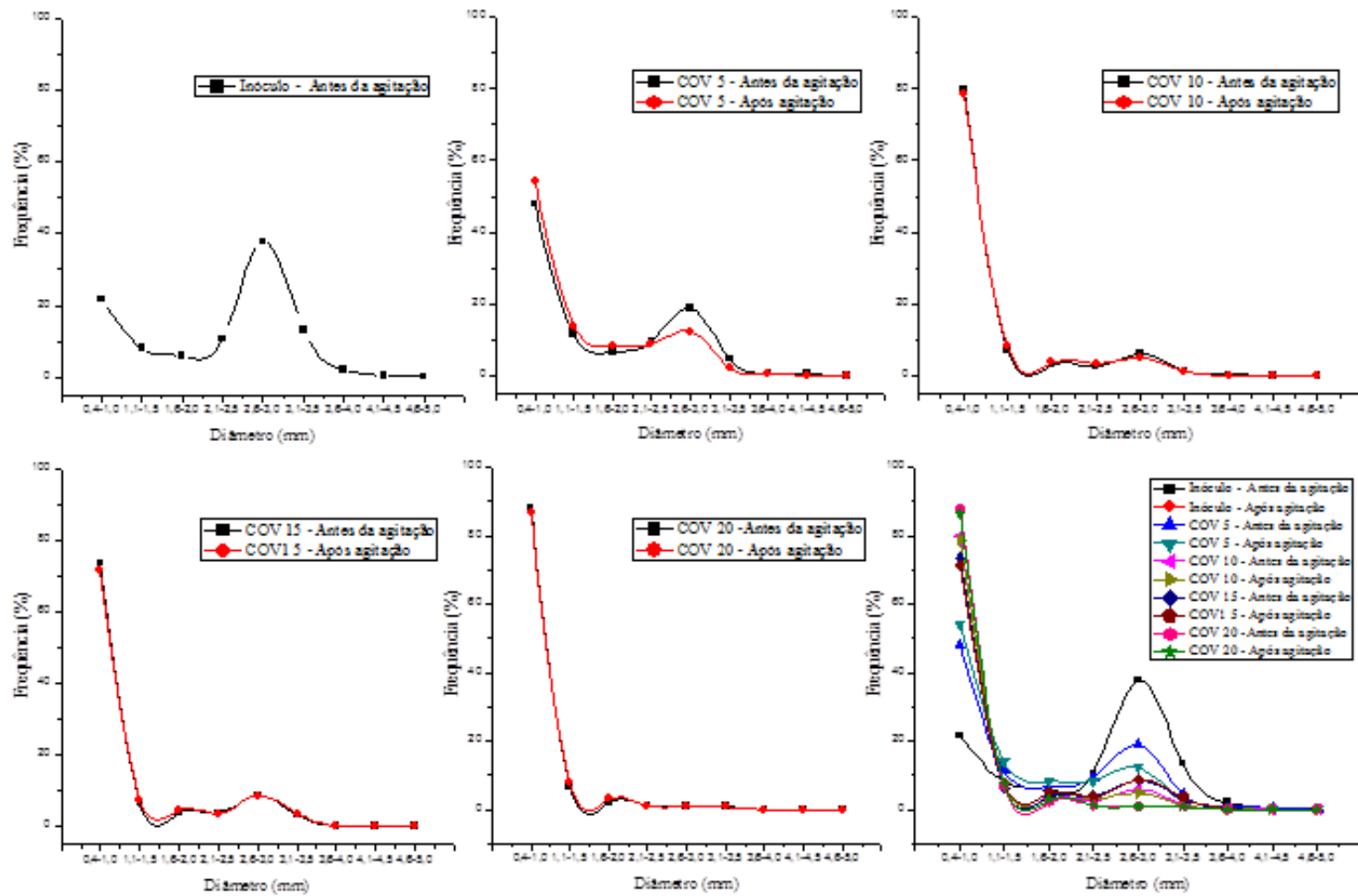
No reator R1, os testes estatísticos mostraram que na menor COV (5 gDQOL⁻¹d⁻¹) houve mudança na distribuição de diâmetro médio após agitação, enquanto, nas demais cargas, não ocorreram alterações significativas. Em R2, não foi identificada diferença estatística na distribuição granulométrica em nenhuma das fases analisadas. Em R3, apenas as amostras nas COV 5 e 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ apresentaram diferença significativa. E em R4, a agitação influenciou na distribuição granulométrica nas COV 5 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹.

Tabela 24. Distribuição do diâmetro dos grânulos dos reatores – R1, R2, R3 e R4 - antes e após agitação de 770 s⁻¹

| Diâmetro médio (mm) | COV 5,0 | | COV 10,0 | | COV 15,0 | | COV 20,0 | |
|--|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| | Antes da Agitação | Após Agitação | Antes da Agitação | Após Agitação | Antes da Agitação | Após Agitação | Antes da Agitação | Após Agitação |
| Distribuição granulométrica de R1 (50% de recirculação) - % | | | | | | | | |
| 0,4-1,0 | 47,8 | 54,0 | 79,7 | 78,7 | 73,6 | 71,4 | 87,9 | 86,5 |
| 1,1-1,5 | 11,5 | 14,0 | 7,0 | 8,0 | 6,4 | 7,5 | 6,9 | 7,6 |
| 1,6-2,0 | 6,6 | 8,3 | 3,0 | 3,6 | 3,9 | 4,8 | 2,1 | 3,0 |
| 2,1-2,5 | 9,5 | 8,6 | 2,6 | 3,3 | 3,9 | 3,6 | 1,2 | 1,2 |
| 2,6-3,0 | 18,9 | 12,3 | 5,9 | 4,8 | 8,6 | 8,7 | 1,1 | 1,0 |
| 3,1-3,5 | 4,6 | 2,3 | 1,4 | 1,3 | 3,2 | 3,6 | 0,8 | 0,7 |
| 3,6-4,0 | 0,8 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,0 |
| 4,1-4,5 | 0,4 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Distribuição granulométrica de R2 (100% de recirculação) - % | | | | | | | | |
| 0,4-1,0 | 39,4 | 35,7 | 42,2 | 40,1 | 47,9 | 46,6 | 52,1 | 53,4 |
| 1,1-1,5 | 9,9 | 10,4 | 8,3 | 9,2 | 10,0 | 10,4 | 7,1 | 8,6 |
| 1,6-2,0 | 9,1 | 10,5 | 9,2 | 10,6 | 7,5 | 8,7 | 5,5 | 7,6 |
| 2,1-2,5 | 29,9 | 31,0 | 26,0 | 27,6 | 21,2 | 21,7 | 16,5 | 14,7 |
| 2,6-3,0 | 10,4 | 11,2 | 12,3 | 11,1 | 11,7 | 11,0 | 15,3 | 13,2 |
| 3,1-3,5 | 1,0 | 1,0 | 1,6 | 1,0 | 1,5 | 1,3 | 3,2 | 2,2 |
| 3,6-4,0 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 |
| 4,1-4,5 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Distribuição granulométrica de R3 (200% de recirculação) - % | | | | | | | | |
| 0,4-1,0 | 29,3 | 44,8 | 51,0 | 56,8 | 51,1 | 51,0 | 63,6 | 59,8 |
| 1,1-1,5 | 19,0 | 20,8 | 14,5 | 17,0 | 12,5 | 13,8 | 9,8 | 11,8 |
| 1,6-2,0 | 39,4 | 27,3 | 27,0 | 22,6 | 22,3 | 22,7 | 12,8 | 13,9 |
| 2,1-2,5 | 10,2 | 6,4 | 6,8 | 3,5 | 12,5 | 11,6 | 11,6 | 12,3 |
| 2,6-3,0 | 1,6 | 0,5 | 0,6 | 0,1 | 1,3 | 0,7 | 1,8 | 2,0 |
| 3,1-3,5 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| 3,6-4,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 |
| 4,1-4,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Distribuição granulométrica de R4 (400% de recirculação) - % | | | | | | | | |
| 0,4-1,0 | 33,0 | 46,2 | 51,0 | 47,9 | 73,1 | 62,5 | 79,1 | 70,9 |
| 1,1-1,5 | 16,5 | 19,7 | 11,9 | 12,0 | 7,2 | 7,7 | 5,1 | 7,1 |
| 1,6-2,0 | 37,0 | 25,8 | 24,3 | 26,2 | 9,7 | 11,6 | 7,0 | 10,4 |
| 2,1-2,5 | 11,5 | 7,4 | 11,1 | 12,3 | 8,7 | 8,5 | 7,2 | 9,6 |
| 2,6-3,0 | 1,7 | 0,7 | 1,5 | 1,6 | 1,2 | 8,5 | 1,5 | 1,8 |
| 3,1-3,5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 1,3 | 0,1 | 0,2 |
| 3,6-4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| 4,1-4,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4,6-5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

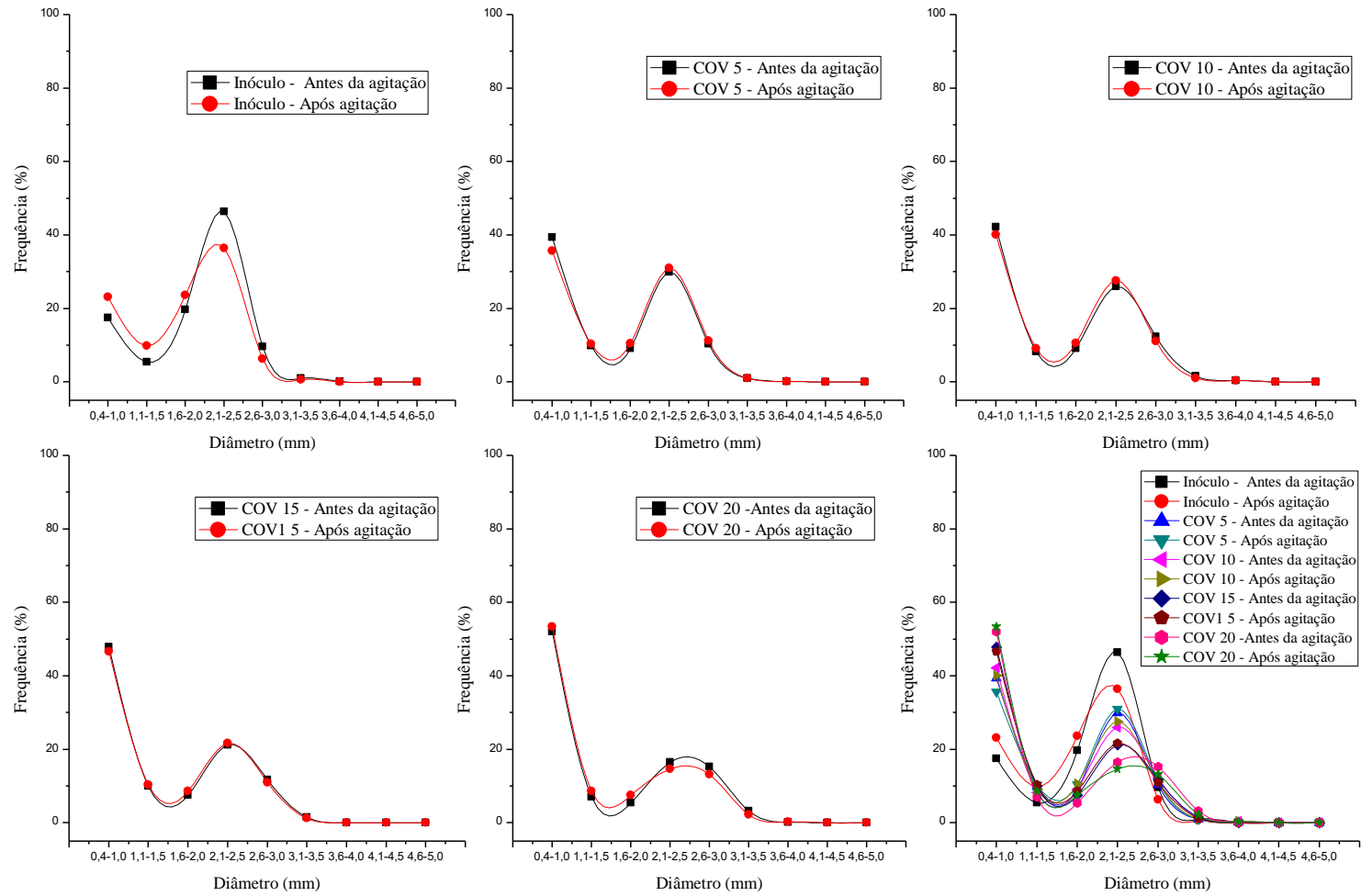
Fonte: elaborada pela autora

Figura 16. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R1 antes e após agitação de 770 s^{-1}



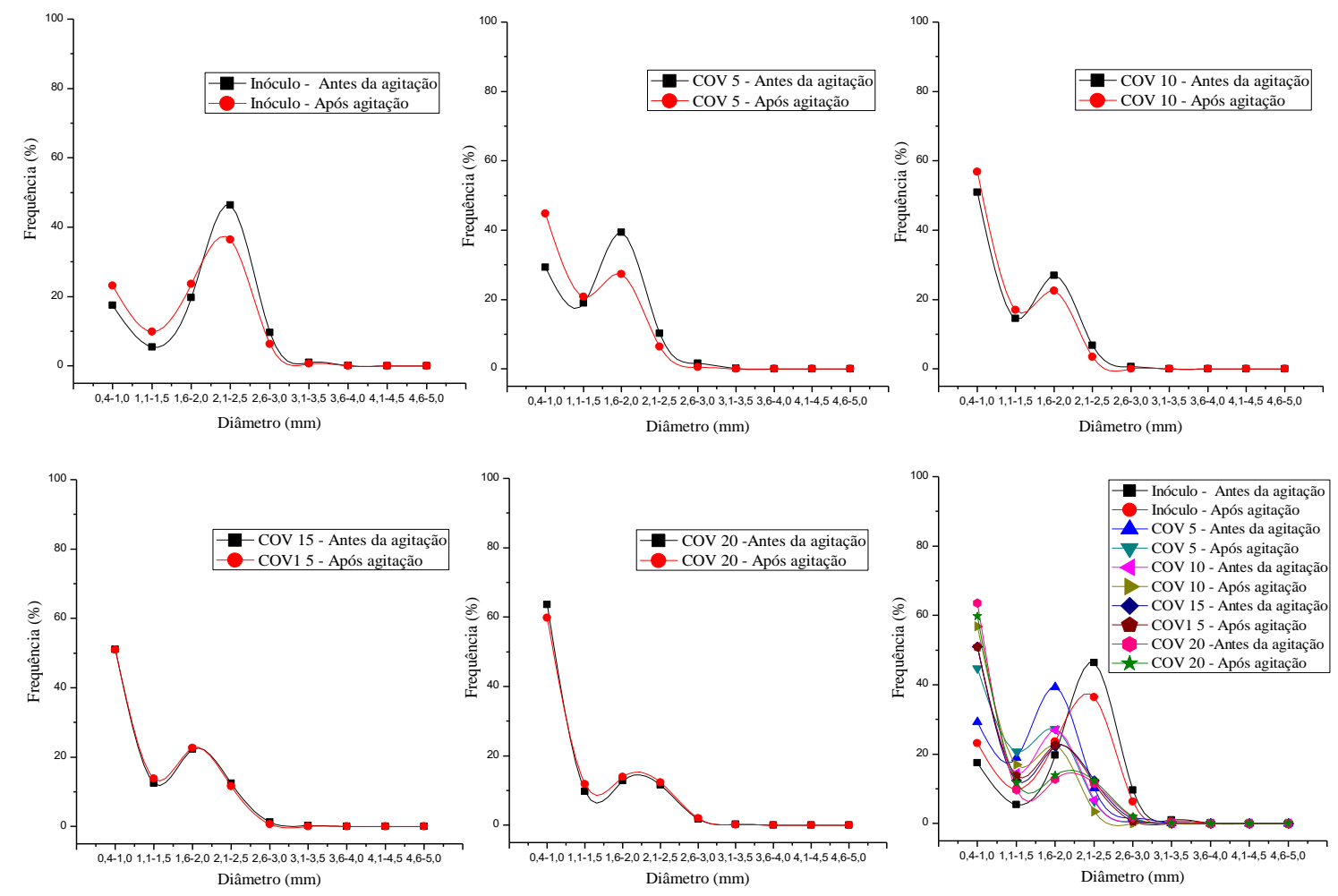
Fonte: elaborada pela autora

Figura 17. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R2 antes e após agitação de 770 s⁻¹



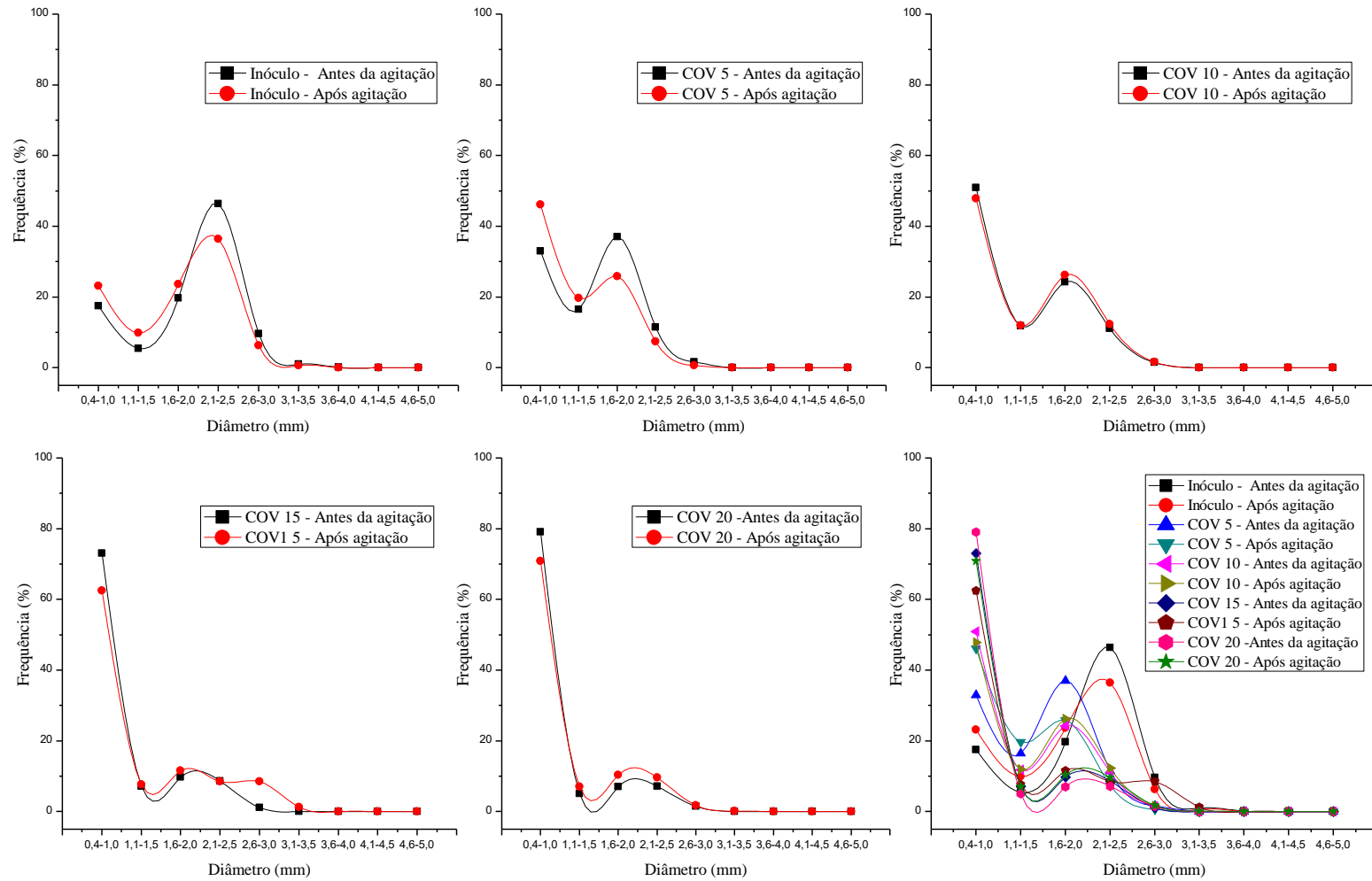
Fonte: elaborada pela autora

Figura 18. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R3 antes e após agitação de 770 s⁻¹



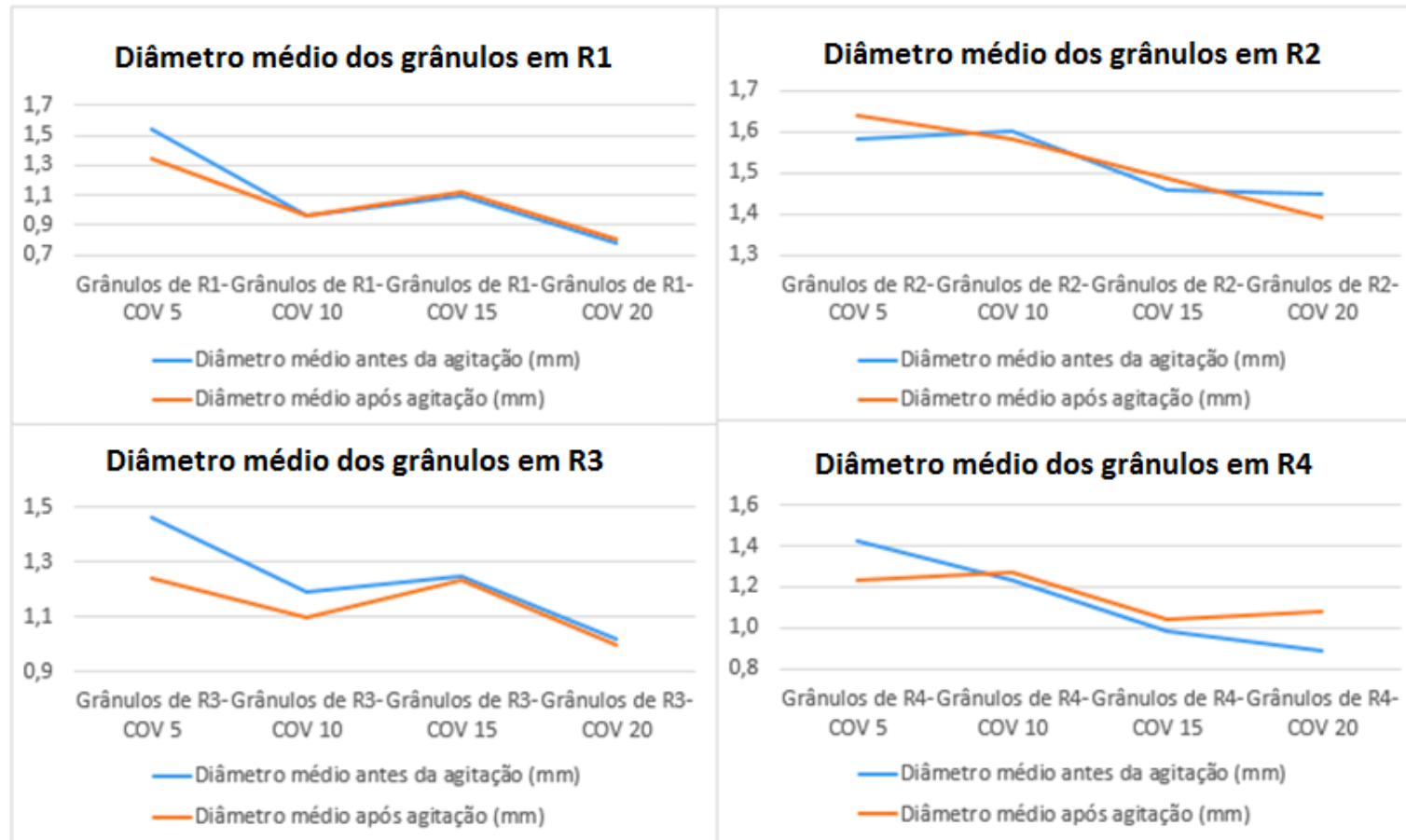
Fonte: elaborada pela autora

Figura 19. Curva de distribuição granulométrica para as amostras do R4 antes e após agitação de 770 s^{-1}



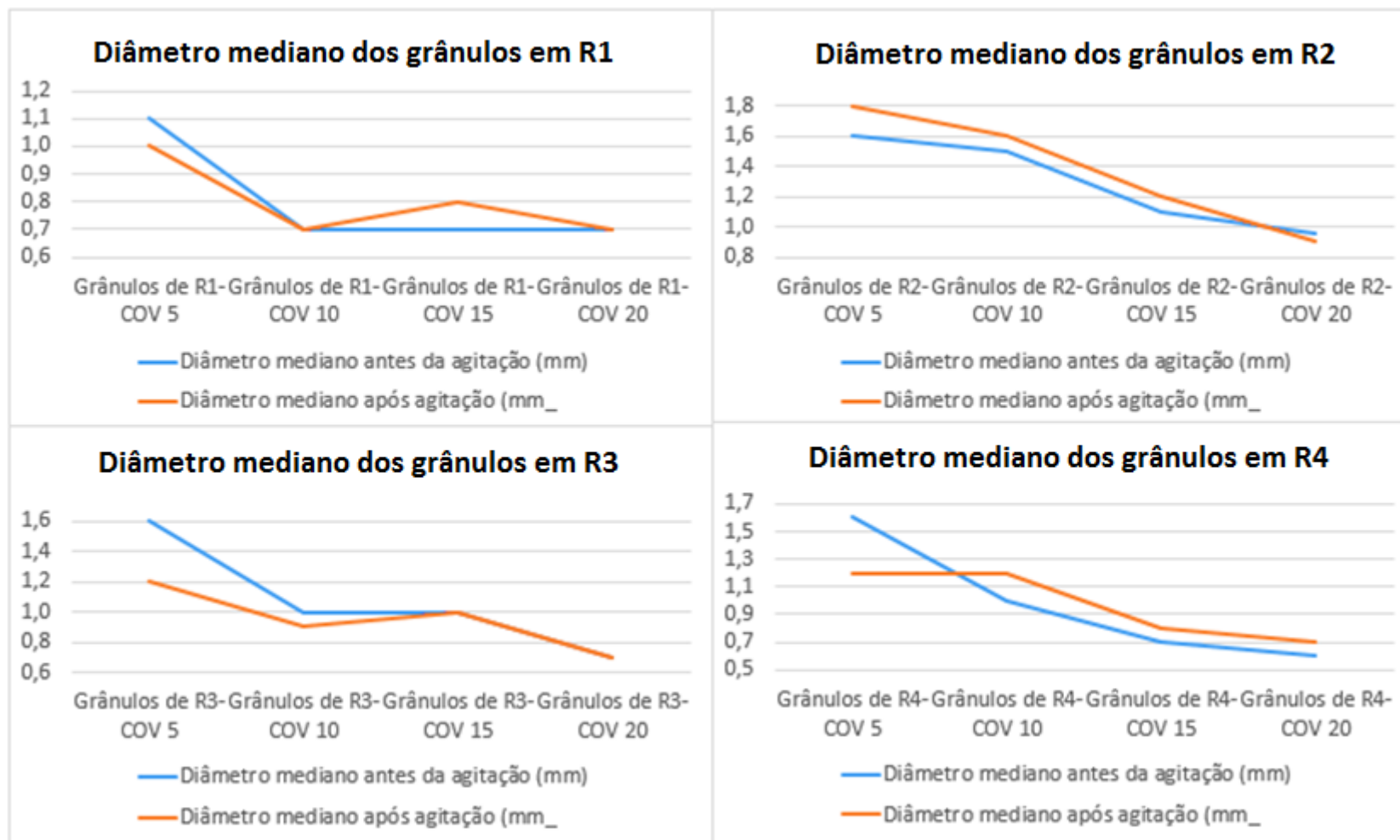
Fonte: elaborada pela autora

Figura 20. Diâmetro médio dos grânulos dos reatores R1, R2, R3 e R4 em diferentes condições operacionais



Fonte: elaborada pela autora

Figura 21. Diâmetro mediano dos grânulos dos reatores R1, R2, R3 e R4 em diferentes condições operacionais



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 25. Diâmetro médio e mediano do inóculo e dos reatores R1, R2, R3 e R4 antes e após agitação de 770 s⁻¹, com os respectivos números de grânulos analisados

| | Média antes da agitação | Média após agitação | Mediana antes da agitação | Mediana após agitação | Nº de grânulos antes da agitação | Nº de grânulos após da agitação | Aumento (+) ou diminuição (-) de nº de grânulos após a agitação |
|------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| Inóculo de R1 | 2,2 | | | | 1348 | | |
| Inóculo de R2, R3 e R4 | 1,9 | 3,4 | 2,1 | 2 | 1530 | 1749 | + |
| Grânulos de R1-COV 5 | 1,5 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 2191 | 2961 | + |
| Grânulos de R1-COV 10 | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,7 | 1865 | 1891 | + |
| Grânulos de R1-COV 15 | 1,1 | 1,1 | 0,7 | 0,8 | 2740 | 2613 | - |
| Grânulos de R1-COV 20 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 2476 | 2152 | - |
| Grânulos de R2-COV 5 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,8 | 2393 | 2332 | - |
| Grânulos de R2-COV 10 | 1,6 | 1,6 | 1,5 | 1,6 | 2322 | 2246 | - |
| Grânulos de R2-COV 15 | 1,5 | 1,5 | 1,1 | 1,2 | 2075 | 2057 | - |
| Grânulos de R2-COV 20 | 1,4 | 1,4 | 1,0 | 0,9 | 2046 | 2225 | + |
| Grânulos de R3-COV 5 | 1,5 | 1,2 | 1,6 | 1,2 | 2900 | 3916 | + |
| Grânulos de R3-COV 10 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 2648 | 3051 | + |
| Grânulos de R3-COV 15 | 1,3 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 2676 | 2716 | + |
| Grânulos de R3-COV 20 | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,7 | 3525 | 3660 | + |
| Grânulos de R4-COV 5 | 1,4 | 1,2 | 1,6 | 1,2 | 2430 | 2745 | + |
| Grânulos de R4-COV 10 | 1,2 | 1,3 | 1,0 | 1,2 | 2008 | 1853 | - |
| Grânulos de R4-COV 15 | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,8 | 2098 | 1740 | - |
| Grânulos de R4-COV 20 | 0,9 | 1,1 | 0,6 | 0,7 | 2465 | 1713 | - |

Fonte: elaborado pela autora

*COV em gDQOL⁻¹d⁻¹

Série de Sólidos

Verificou-se redução considerável dos sólidos totais voláteis e aumento dos sólidos totais fixos praticamente em todas as amostras dos reatores em relação ao inóculo (Tabela 26 e Tabela 27). A redução de sólidos voláteis esteve relacionada com a perda de sólidos com o efluente do reator (lavagem de biomassa), devido ao aumento da velocidade ascensional e, também, pela crescente geração de biogás no decorrer da operação.

Por meio da relação de STF/ST foi possível mensurar a mineralização do lodo no decorrer da operação dos reatores. A relação STF/ST aumentou nos sistemas, quando estes passaram a ser submetidos à vinhaça de cana-de-açúcar. Em R1, a relação variou de 0,32 a 0,49; em R2 de 0,27 a 0,60; em R3, de 0,25 a 0,54; e em R4 de 0,30 a 0,52. Não foi verificada a redução da eficiência dos sistemas em função do aumento de sólidos fixos nos reatores.

Tabela 26. Série de sólidos da manta de lodo dos reatores UASB em diferentes COV

| Parâmetros (mgL ⁻¹) | R1 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | | R3 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| ST | 44313 | - | 24215 | 18140 | 22465 | 40694 | 37875 | 38286 | 26400 | 44313 | 50520 | - | 32979 | 15204 | 30022 | 25606 | 17372 | 9238 |
| SFT | 7593 | - | 10815 | 6408 | 11080 | 13832 | 11978 | 12751 | 11015 | 7593 | 12470 | - | 8346 | 7573 | 14405 | 8376 | 8344 | 4984 |
| SVT | 36720 | - | 13400 | 11732 | 11385 | 26862 | 25897 | 25535 | 15385 | 36720 | 37185 | - | 24633 | 7631 | 15617 | 17230 | 9028 | 4254 |
| Parâmetros (mgL ⁻¹) | R2 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | | R4 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | |
| | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| ST | 44313 | 47080 | 49838 | 21416 | 34964 | 19694 | 28694 | 34962 | 23022 | 44313 | - | - | 20804 | 21305 | 16547 | 18274 | - | 23504 |
| SFT | 7593 | 22308 | 13419 | 8964 | 15644 | 11762 | 10010 | 14174 | 8316 | 7593 | - | - | 6316 | 10953 | 8266 | 8940 | - | 12300 |
| SVT | 36720 | 24772 | 36419 | 12452 | 19320 | 7932 | 18684 | 20788 | 14706 | 36720 | - | - | 14488 | 10352 | 8281 | 9334 | - | 11204 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 27. Relação de STF/ST (mineralização) e de STV/ST da manta de lodo dos reatores UASB em diferentes COV

| Relação | R1 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | | R3 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | |
|---------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|---|------|---|------|------|------|------|------|------|
| | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| SFT/ST | 0,17 | - | 0,45 | 0,35 | 0,49 | 0,34 | 0,32 | 0,33 | 0,42 | 0,17 | 0,25 | - | 0,25 | 0,50 | 0,48 | 0,33 | 0,48 | 0,54 |
| SVT/ST | 0,83 | - | 0,55 | 0,65 | 0,51 | 0,66 | 0,68 | 0,67 | 0,58 | 0,83 | 0,74 | - | 0,75 | 0,50 | 0,52 | 0,67 | 0,52 | 0,46 |
| Relação | R2 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | | R4 - COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | | |
| | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 | Inóculo | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| SFT/ST | 0,17 | 0,47 | 0,27 | 0,42 | 0,45 | 0,60 | 0,35 | 0,41 | 0,36 | 0,17 | - | - | 0,30 | 0,51 | 0,50 | 0,49 | - | 0,52 |
| SVT/ST | 0,83 | 0,53 | 0,73 | 0,58 | 0,55 | 0,40 | 0,65 | 0,59 | 0,64 | 0,83 | - | - | 0,70 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | - | 0,48 |

Fonte: elaborada pela autora

Considerações sobre a análise física da manta de lodo

A COV e a produção de biogás influenciaram o diâmetro dos grânulos. No entanto, o aumento da carga hidráulica foi mais significativo para determinação da dinâmica granular. O teste de agitação indicou que a perturbação hidráulica foi capaz de modificar o tamanho granular devido à quebra das partículas.

As partículas muito finas de biomassa oriundas da quebra devido, principalmente, à agitação hidráulica dentro do reator, foram expulsas do sistema junto ao efluente, resultando na redução considerável dos sólidos totais voláteis em todas as amostras dos reatores em relação ao inóculo.

Rocha (2012) testou a resistência de grânulos anaeróbios à agitação mecânica. Os dados obtidos mostraram que as médias dos diâmetros dos grânulos, depois do teste de resistência ao cisalhamento, diminuíram em todas as amostras analisadas, indicando redução do tamanho. Observou-se que, após o teste de resistência, ocorreu maior quantidade de pequenas partículas, devido ao desprendimento de material dos grânulos, ocasionando a diminuição da área média. Entretanto, não foi observada a completa desintegração dos grânulos, indicando que são estruturas que estão em processo contínuo de desintegração e reconstrução.

Odriozola et al. (2016) apontaram os processos de abrasão e de lavagem da biomassa para fora do reator como responsáveis por limitar o crescimento granular. Grotenhuis et al. (1991) e Kosaric et al. (1990) também afirmaram que a dimensão do grânulo está relacionada à propriedade de resistência às forças de cisalhamento devido à turbulência no sistema. Também associaram o descarte do excesso de biomassa ao processo biológico de crescimento e decaimento celular, e à concentração e tipo de substrato.

Ghangrekar et al. (1996), Guiot et al. (1992) e Puñal e Lema (1999) interligaram a dimensão e as propriedades de resistência dos grânulos à velocidade ascensional do líquido, ao tempo de operação, ao TDH e aos microrganismos formadores.

6.4 ETAPA 4 - Análise química da manta de lodo

Caracterização de metais na manta de lodo dos reatores UASB

A manta de lodo dos reatores foi analisada em diversas fases do sistema. As coletas de amostra ocorreram nas cargas orgânicas de 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ para caracterização química do lodo durante o período operacional. Nas Tabela 28, Tabela 29, Tabela 30 e Tabela 31 foram apresentados os resultados da concentração de diversas substâncias no lodo dos reatores R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

Verificou-se o aumento da concentração de manganês, magnésio, sódio e potássio no lodo de todos os reatores com o tempo de operação devido ao aporte de sólidos fixos e elementos químicos contidos na água residuária. A vinhaça apresentou concentração de manganês, magnésio, potássio e sódio de $4,7 \pm 1,7$ mgL⁻¹, 254 ± 76 mgL⁻¹, 1625 ± 600 mgL⁻¹ e 23 ± 6 mgL⁻¹, respectivamente. A adição de bicarbonato de sódio para tamponamento dos sistemas contribuiu para o aumento do conteúdo de sódio na manta de lodo. A quantidade adicionada foi reduzida gradativamente de 1 a 0,3 g NaHCO₃ gDQO⁻¹.

Observou-se que ocorreu diminuição da concentração de cobre, em relação ao inóculo (1689 mg.kg⁻¹), nas fases analisadas. O cobre foi sendo liberado dos grânulos gradualmente, apresentando redução de percentual entre 54 e 72% ao final do período operacional. O conteúdo de cromo foi significativamente alterado na manta de lodo do reator R1, reduzindo de 34,5 mg.Kg⁻¹ (inóculo) para 2 mg.Kg⁻¹ (Tabela 28). Cobre e cromo apareceram em concentrações baixas na vinhaça de alimentação: $0,25 \pm 0,08$ e $0,07 \pm 0,06$ mg.L⁻¹, respectivamente.

A concentração de cálcio na manta de lodo dos reatores R2 e R3 aumentou substancialmente nas primeiras amostras de lodo, coletadas nas COV 2,5; 5; 7,5 e 10 gDQOL⁻¹d⁻¹, mas voltou a diminuir no decorrer do incremento de COV de 12,5 a 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ (Tabela 29 e Tabela 30). A variação na manta de lodo estava relacionada com a elevada alteração do conteúdo de cálcio na vinhaça de alimentação, 527 ± 222 mgL⁻¹, que pode ser notada pelo desvio padrão.

O ferro, presente em expressiva quantidade na alimentação dos reatores ($43,50 \pm 24,31$ mg.L⁻¹), não acumulou na manta de lodo, mantendo-se com variação relativamente constante do decorrer da operação. A variação ficou entre 9910 e 14740 mg.Kg⁻¹, 8610 e 15410 mg.Kg⁻¹, 10610 e 13820 mg.Kg⁻¹, 12150 e 18610 mg.Kg⁻¹ para R1, R2, R3 e R4, respectivamente (Tabela 28, Tabela 29, Tabela 30 e Tabela 31).

O aporte de elementos nos grânulos não foi sempre cumulativo. Alguns se concentraram na manta de lodo, aumentando no decorrer do período operacional como manganês, magnésio, sódio e potássio, presentes em maior quantidade na vinhaça. A concentração de ferro manteve-se relativamente constante, apesar da presença considerável desse elemento na vinhaça de alimentação. Cobre, no entanto, tendeu a diminuir e o cromo foi reduzido em R1 e R4. A concentração de cálcio foi variável, principalmente na manta dos reatores R2 e R3, devido à variação de cálcio na vinhaça de alimentação ($527 \pm 222 \text{ mgL}^{-1}$).

Magnésio, sódio e potássio foram comumente encontrados em digestores anaeróbios devido a degradação da matéria orgânica ou por meio de produtos químicos de ajuste de pH (Grady et al. 1999). A literatura comprovou que esses elementos estimularam o desenvolvimento microbiano e apontou que, no entanto, quantidades excessivas causaram efeito inverso, inibindo o crescimento (McCarty 1964).

Concentrações de magnésio, sódio e potássio entre 75-150, 100-200, 200-400 mgL^{-1} , respectivamente, foram considerados essenciais para os microrganismos metanogênicos e quantidades correspondentes entre 1000-1500, 3500-5500 e 2500-4500 mgL^{-1} foram consideradas inibitória (McCarty 1964). Estes dados sugeriram que a faixa de valores pode ser variável, dependendo das características do sistema de tratamento.

Pesquisas demonstraram o cálcio como essencial para o crescimento de determinados grupos metanogênicos por auxiliar na formação e resistência dos grânulos e na retenção da biomassa no sistema (Huang e Pinder 1994; Graaff et al. 2011). Verificaram também que, em excesso, esse elemento acarretou em precipitação de carbonato e fosfato, propiciando a toxicidade no sistema anaeróbio. Jackson-Moss e Duncan (1991) estipularam que concentração abaixo 120 mgL^{-1} de Ca^{2+} foi estimulante para formação de biofilme. Em geral, concentrações entre 100 e 200 mgL^{-1} foram apontadas como importantes para a granulação de lodo em reatores UASB (McCarty 1964; Yu, Tay, e Fang 2001). Valores entre 2500 a 4500 mgL^{-1} foram consideradas inibitórias (McCarty 1964).

A presença de metais pesados como cromo, ferro, cobalto, cobre, zinco, cádmio e níquel foi considerada indispensável para atividade microbiana por Feroso et al. (2010). No entanto, segundo considerações de Sterritt e Lester (1980), por se tratar de elementos não biodegradáveis, não foi incomum a acumulação em digestores anaeróbios causando falha no sistema após atingir determinada concentração.

Segundo Barros et al. (2017), em quantidades adequadas, elementos químicos como Fe puderam aumentar a atividade microbiana específica ou a concentração de biomassa de um grupo de bactérias e arqueias metanogênicas, favorecendo a operação estável e mais eficiente

da digestão anaeróbia, com aceleração da degradação de acetato e propionato para produção de metano.

Pesquisa realizada com 30 digestores anaeróbios de tratamento de águas residuárias relatou a possibilidade da limitação do tratamento devido à indisponibilidade de ferro, níquel ou cobalto. Oito dos 30 lodos observados apresentaram melhora na taxa de produção de biogás quando suplementado com um destes elementos (Speece, 1988). Custos modestos foram associados à suplementação mineral em relação ao valor do metano gerado (Takashima e Speece 1989).

Takashima e Speece (1989) exploraram as exigências mínimas de nutrientes minerais para atingir uma alta taxa de utilização de acetato ($30-40 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$). Os minerais essenciais foram: nitrogênio ($100 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), fósforo ($4 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), sulfeto de sódio ($10 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), cálcio ($5 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), magnésio ($1 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), ferro ($1 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$), cobalto ($0,1 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$) e níquel ($0,2 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$).

A maior parte dos minerais citados como essenciais por Takashima e Speece (1989) foi encontrada na vinhaça utilizada para alimentação no presente estudo, mas em concentrações muito elevadas comparativamente às determinadas por aqueles autores. A maior concentração de minerais não implicou em cumulatividade nos grânulos, a exceção de manganês, magnésio, sódio e potássio. Observou-se que o excesso da maioria dos minerais presentes na vinhaça foi eliminado gradativamente por algum mecanismo. Mesmo o ferro, presente em expressiva quantidade na alimentação dos reatores ($43,50 \pm 24,31 \text{ mgL}^{-1}$), não acumulou na manta de lodo, mantendo-se com variação relativamente constante do decorrer da operação: entre 9910 e 14740 mgKg^{-1} , 8610 e 15410 mgKg^{-1} , 10610 e 13820 mgKg^{-1} , 12150 e 18610 mgKg^{-1} para R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

Embora a caracterização da manta de lodo dos reatores tenha apresentado alterações, como redução de sólidos suspensos voláteis em relação ao inóculo e aumento na concentração de alguns minerais (manganês, magnésio, sódio e potássio), com o incremento crescente de COV e de velocidade ascensional, verificou-se que não ocorreu prejuízo ao desempenho dos sistemas. O descarte de sólidos não foi necessário. Todos os reatores apresentaram boa performance quanto à remoção de matéria orgânica e produção de metano. Os resultados mostraram que após adaptação, lenta e gradual, da biomassa aos constituintes da vinhaça, os produtos e elementos químicos presentes não apresentaram efeito deletério na composição granular e no consequente desempenho dos reatores.

Tabela 28. Características químicas do lodo no perfil do reator R1

| Parâmetros (mgKg ⁻¹) | Inóculo | COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|--|-------|-------|-------|---------|---------|-------|
| | | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| Zinco | 1217 | 1908 | 1363 | 2036 | 1669 | 1086 | 700 | 1014 |
| Chumbo | 21 | 38 | 2,0 | 37 | 5,0 | 6,0 | 4,0 | 23,0 |
| Cadmio | 6,2 | 2,9 | 2,0 | 3,3 | 3,8 | 2,1 | 1,5 | 2,7 |
| Níquel | 43,2 | 51,5 | 37 | 43,9 | 34,8 | 33,4 | 29,4 | 38,6 |
| Ferro | 13718 | 14180 | 11210 | 14740 | 13180 | 11460 | 9910 | 11910 |
| Manganês | 130,9 | 237 | 208 | 284 | 244 | 199 | 233 | 295 |
| Cobre | 1689 | 1346 | 954 | 1306 | 976 | 834 | 719 | 704 |
| Cromo total | 34,5 | 21,9 | 11 | 10,4 | 7,2 | < 0,005 | < 0,005 | 2,0 |
| Cálcio | 13400 | 11000 | 11000 | 7960 | 12300 | 7100 | 7500 | 13300 |
| Magnésio | 1913 | 9260 | 9260 | 9260 | 7890 | 7950 | 8400 | 6590 |
| Sódio | 9000 | 37100 | 29200 | 23500 | 29300 | 21500 | 26600 | 23300 |
| Potássio | 3040 | 52000 | 48700 | 45800 | 49500 | 40800 | 46700 | 46000 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 29. Características químicas do lodo no perfil do reator R2

| Parâmetros (mgKg ⁻¹) | Inóculo | COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| Zinco | 1217 | 1959 | 1548 | 1885 | 1728 | 1401 | 2219 | 770,9 | 753 |
| Chumbo | 21 | 33 | 46,0 | 51,0 | 31,0 | 22 | 18,0 | 21,0 | 29 |
| Cadmio | 6,2 | 4,5 | 5,1 | 5,7 | 4,6 | 2,8 | 3,5 | 3,5 | 3,2 |
| Níquel | 43,2 | 57 | 56,0 | 75,4 | 86,7 | 93,4 | 53,2 | 54,2 | 124,8 |
| Ferro | 13718 | 12520 | 9910 | 12460 | 15410 | 13490 | 13570 | 8610 | 15400 |
| Manganês | 130,9 | 291 | 330 | 399 | 475 | 330 | 139,6 | 188,8 | 297 |
| Cobre | 1689 | 1283 | 1044 | 1194 | 1099 | 1106 | 974 | 494 | 544 |
| Cromo total | 34,5 | 28,2 | 30,3 | 21,0 | 29,0 | 23,9 | 14,5 | 17,5 | 36 |
| Cálcio | 13400 | 60700 | 38500 | 29300 | 32700 | 13600 | 9600 | 10800 | 11000 |
| Magnésio | 1913 | 3692 | 10400 | 12400 | 9970 | 6930 | 7000 | 9200 | 9900 |
| Sódio | 9000 | 62500 | 28000 | 28800 | 41200 | 33100 | 23100 | 33000 | 18400 |
| Potássio | 3040 | 17800 | 23000 | 26900 | 25700 | 33700 | 36000 | - | 47600 |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 30. Características químicas do lodo no perfil do reator R3

| Parâmetros (mgKg ⁻¹) | Inóculo | COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 17,5 | 20 |
| Zinco | 1217 | 1322 | 1732 | 1386 | 1440 | 1257 | 1159 | 672 | 1266 |
| Chumbo | 21 | < 1 | 33 | 52,0 | 43 | 26,0 | 50,0 | 25 | 70 |
| Cadmio | 6,2 | 3,4 | 7,4 | 5,0 | 6,6 | 3,30 | 5,5 | 1,3 | 3,7 |
| Níquel | 43,2 | 46 | 77,9 | 107,5 | 133,5 | 115,7 | 120,4 | 117,7 | 82,4 |
| Ferro | 13718 | 10950 | 13130 | 13780 | 13820 | 12580 | 11410 | 11230 | 10610 |
| Manganês | 130,9 | 257 | 326 | 380,0 | 471 | 509 | 422 | 331 | 194 |
| Cobre | 1689 | 1202 | 1387 | 814 | 720 | 769 | 585 | 512 | 765 |
| Cromo total | 34,5 | 23,5 | 37,7 | 24,3 | 28,3 | 30,2 | 23,3 | 23,3 | 46,9 |
| Cálcio | 13400 | 40900 | 28600 | 90300 | 59400 | 39500 | 29600 | 11000 | 10300 |
| Magnésio | 1913 | 4930 | 4760 | 8100 | 6900 | 11610 | 12140 | 6660 | 8720 |
| Sódio | 9000 | 15800 | 11500 | 12000 | 41200 | 36300 | 30700 | 30300 | 22500 |
| Potássio | 3040 | 27600 | 23200 | 32000 | 33700 | 27900 | 27300 | 34600 | - |

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 31. Características químicas do lodo no perfil do reator R4

| Parâmetros (mgKg ⁻¹) | Inóculo | COV (gDQOL ⁻¹ d ⁻¹) | | | | | |
|-------------------------------------|---------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 2,5 | 7,5 | 10 | 12,5 | 15 | 20 |
| Zinco | 1217 | 1740 | 1719 | 1223 | 1423 | 1253 | 684 |
| Chumbo | 21 | 11 | 70 | 36 | 24,0 | 21,0 | 46 |
| Cadmio | 6,2 | 4,6 | 5,9 | 4,1 | 4,9 | 2,7 | 6,5 |
| Níquel | 43,2 | 51 | 134,6 | 139,3 | 125,4 | 140,2 | 110 |
| Ferro | 13718 | 15120 | 18610 | 14000 | 14950 | 15010 | 12150 |
| Manganês | 130,9 | 245 | 503 | 423 | 369 | 418 | 263 |
| Cobre | 1689 | 1475 | 992 | 760 | 757 | 636 | 472 |
| Cromo total | 34,5 | 34,3 | 27,9 | 27,3 | 30,6 | 27,6 | 18,9 |
| Cálcio | 13400 | 44000 | 44400 | 19400 | 39400 | 43700 | 23500 |
| Magnésio | 1913 | 4400 | 8280 | 4080 | 8310 | 10000 | 7050 |
| Sódio | 9000 | 12100 | 9500 | - | 33500 | - | 20200 |
| Potássio | 3040 | 27100 | 27200 | - | 17000 | - | 22500 |

Fonte: elaborada pela autora

6.5 ETAPA 5 - Análise biológica da manta de lodo

6.5.1. Caracterização microbiana por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de contraste de fase e fluorescência

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de contraste de fase possibilitaram a visualização de filamentos semelhantes a de *Methanosaeta*.

A técnica de contraste de fase e fluorescência foi adequada para visualização de arqueias acetoclásticas (*Methanosarcina*) e arqueias hidrogenotróficas, pois a incidência de luz fluorescente fez com que esses microrganismos se destacassem, diferenciando-os dos demais.

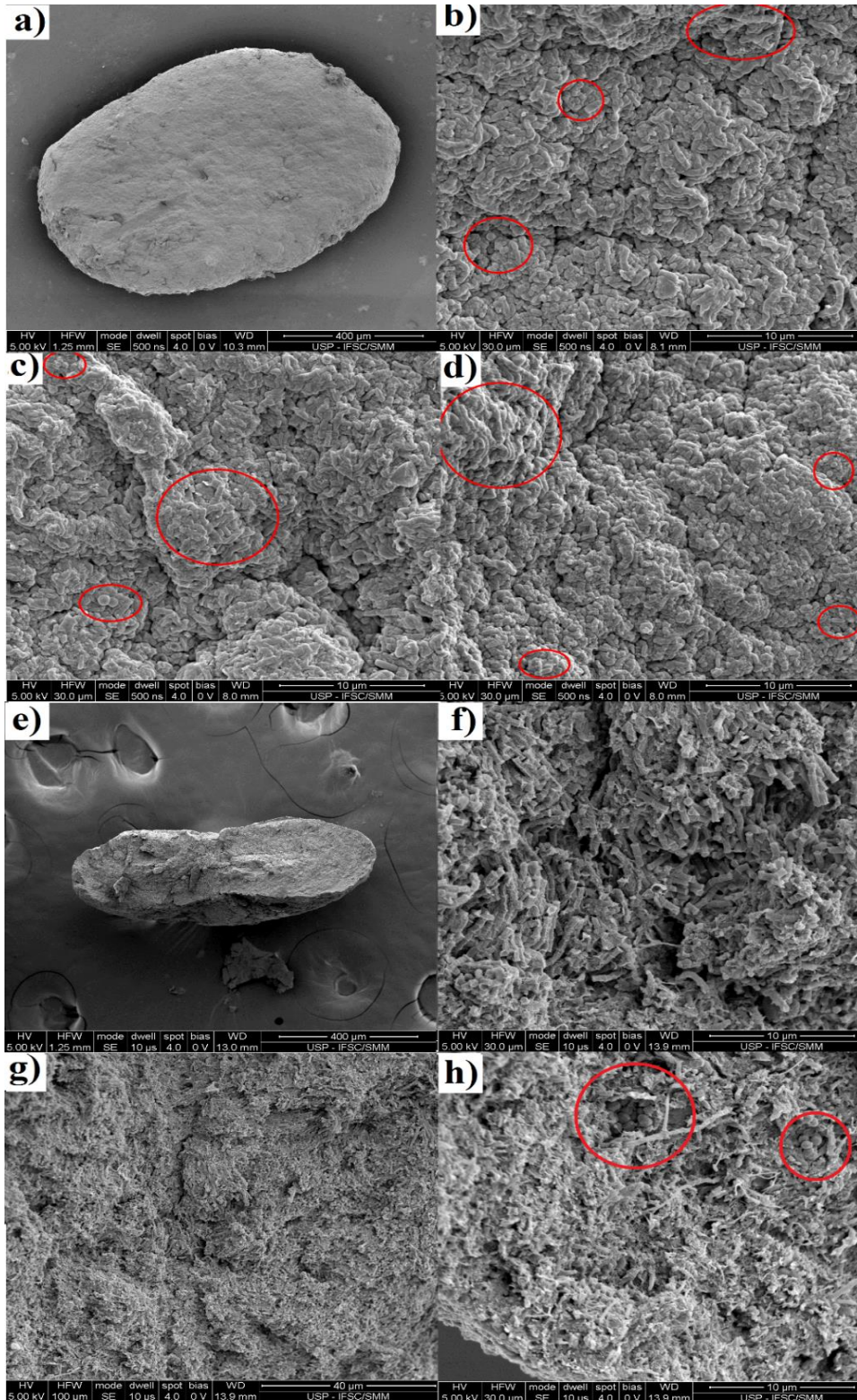
O emprego dessas técnicas distintas de microscopia foram importantes na caracterização da morfologia dos grânulos e dos microrganismos que os compõem. Essas análises são visuais e, portanto, apresentam limitações. Tais exames microscópicos definem apenas aspectos morfológicos da microbiota, permitindo identificação visual de grupos microbianos, como os participantes da metanogênese, com morfologias características. *Methanosaeta*; possíveis *Methanosarcina* (arqueias acetoclásticas) e arqueias hidrogenotróficas puderam ser visualizadas na biomassa, além de bactérias cocóides e bacilares.

Caracterização microbiana do inóculo

Na superfície do grânulo, observou-se, por meio de MEV, variedade de morfologias: bacilos de dimensões variadas, cocos e filamentos alongados semelhantes a *Methanosaeta*. O corte transversal do grânulo permitiu visualizar abundância de células semelhantes a *Methanosaeta* no seu interior e também agrupamento de cocos semelhantes a *Methanosarcina* (Figura 22).

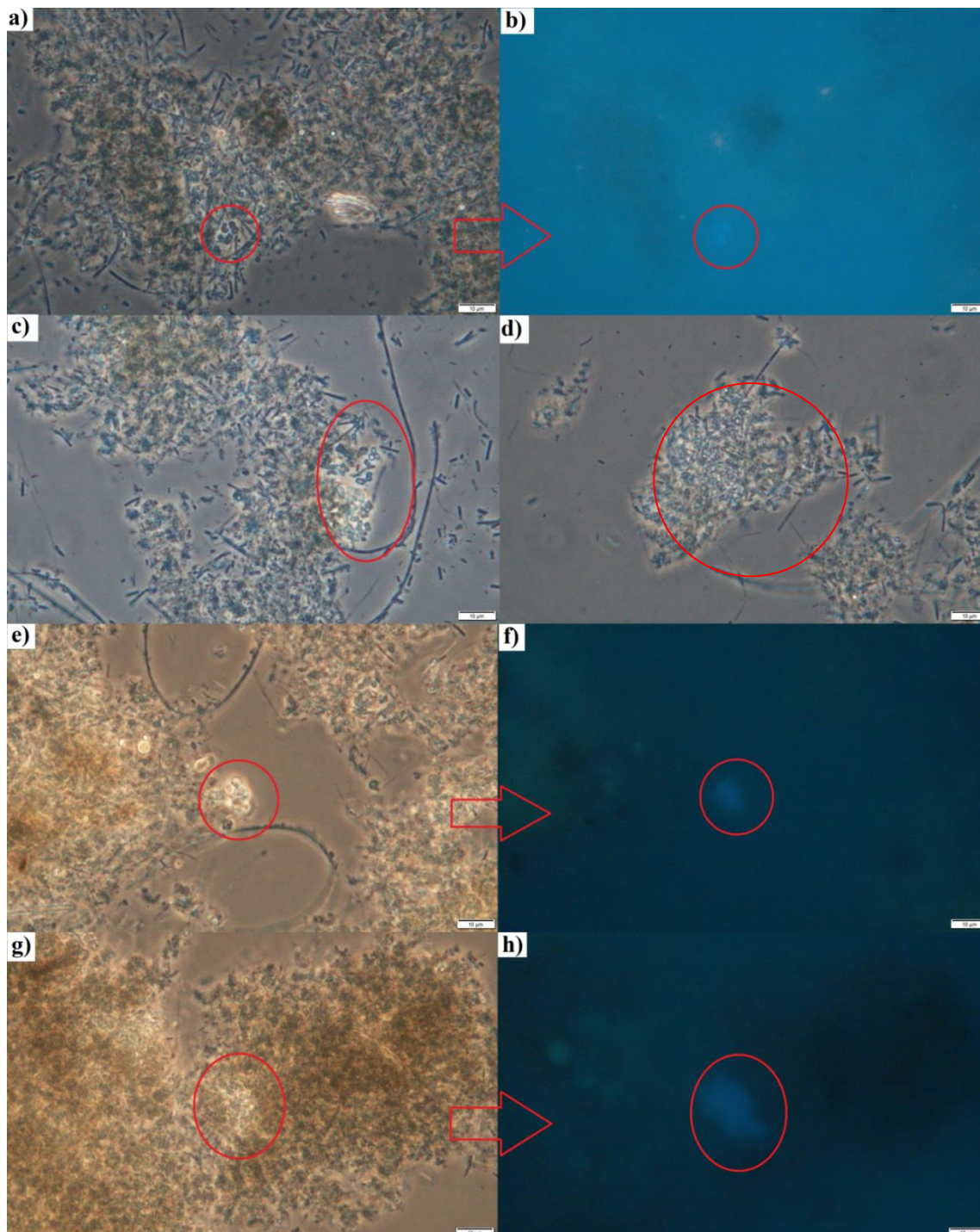
A microscopia de contraste de fase e fluorescência, realizada nas amostras de grânulos do inóculo, permitiu visualizar as mesmas morfologias observadas por MEV, corroborando, assim, com o concluído (Figura 23): *Methanosaeta*, bacilos de tamanhos variados, cocos e arranjo de cocos que fluoresceram, revelando prováveis células de *Methanosarcina*.

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos do inóculo: a) imagem panorâmica superficial do grânulo; b), c), d) superfície do grânulo - bacilos de dimensões variadas, cocos, e filamentos alongados semelhantes a *Methanosaeta*; e), f), g) e h) corte do grânulo – agrupamento de cocos semelhantes a *Methanosarcina* e a abundância do gênero *Methanosaeta*.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 23. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do inóculo: a), b) arranjo de cocos (prováveis *Methanosarcina*) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para caracterização de *Methanosarcina*; c) cocos destacados em círculo vermelho, bacilos de tamanhos variados e *Methanosaeta*; d) bacilos de tamanhos variados; e), f), g), h) arranjo de cocos (prováveis células do tipo *Methanosarcina*) e as respectivas imagens sob incidência de luz fluorescente para caracterização de *Methanosarcina*



Fonte: elaborada pela autora

Reator R1 – 50% de recirculação – COV 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹

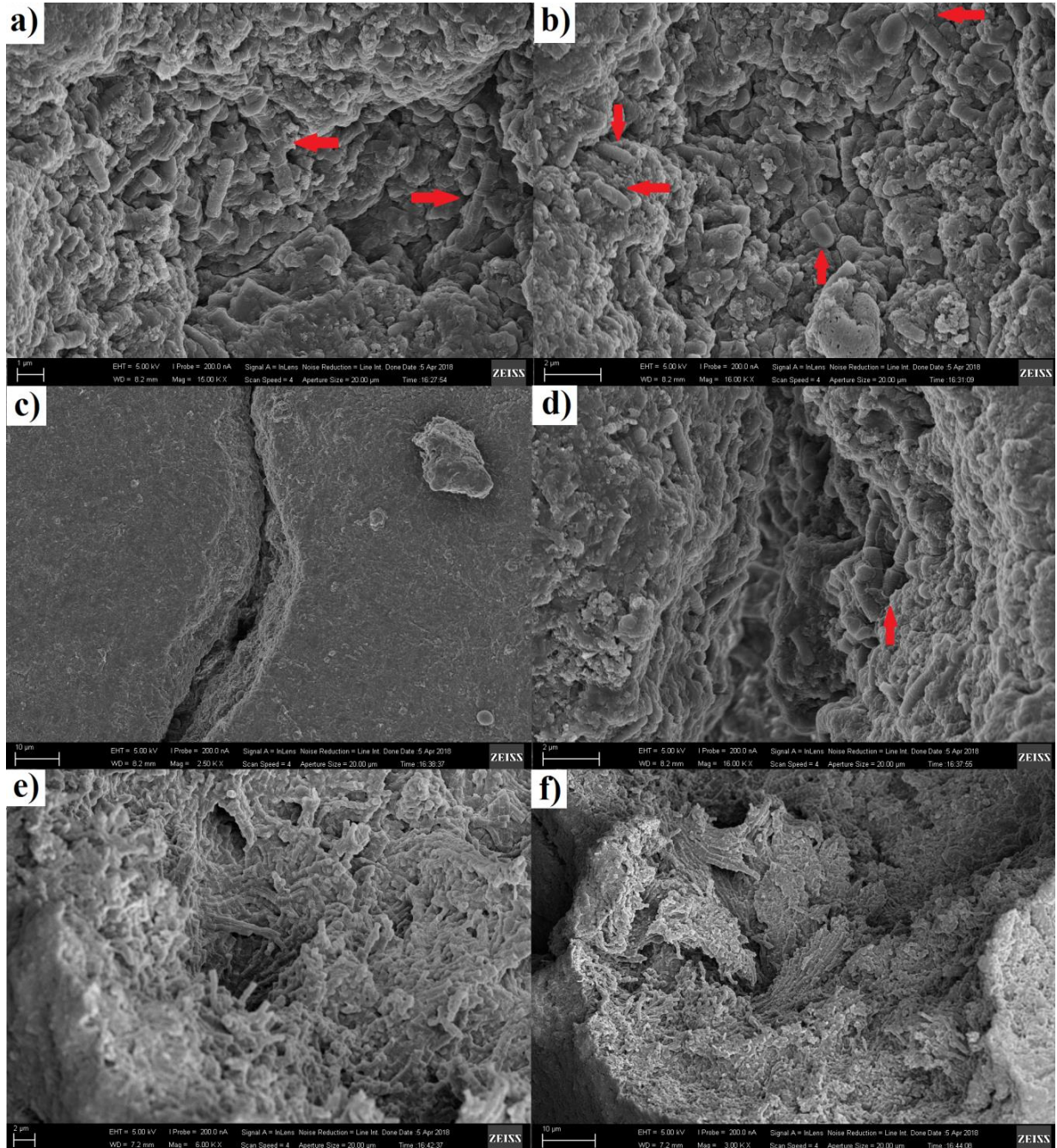
Nos grânulos submetidos à taxa de recirculação menor (50%) e COV de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹, caracterizaram-se por MEV, principalmente, microrganismos com morfologias semelhantes a de *Methanosaeta*, em todas as regiões (superfície, rachaduras e interior dos grânulos). Na superfície dos grânulos também foi visualizado cocos (Figura 24).

Nos grânulos submetidos a COV de 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, caracterizaram-se, na superfície granular, poucas células semelhantes a *Methanosaeta*; poucos bacilos e aparente predomínio de cocos comparado aos grânulos submetidos à COV de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹. Cocos agrupados em cadeia, possivelmente bactérias, foram observados na superfície do grânulo (Figura 25). Não foi possível analisar o interior do grânulo, pois o corte realizado não foi adequado.

Os exames das imagens obtidas por microscopia de contraste de fase e fluorescência do reator R1 confirmam o observado na microscopia eletrônica de varredura. Na COV de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ houve predominância de células do tipo *Methanosaeta* em todas as imagens (Figura 26). Na maior carga (20 gDQOL⁻¹d⁻¹), constatou-se menor densidade de microrganismos semelhantes a *Methanosaeta* e presença de possíveis células de *Methanosarcina* e de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, que fluoresceram em meio ao emaranhado de material polimérico (Figura 27).

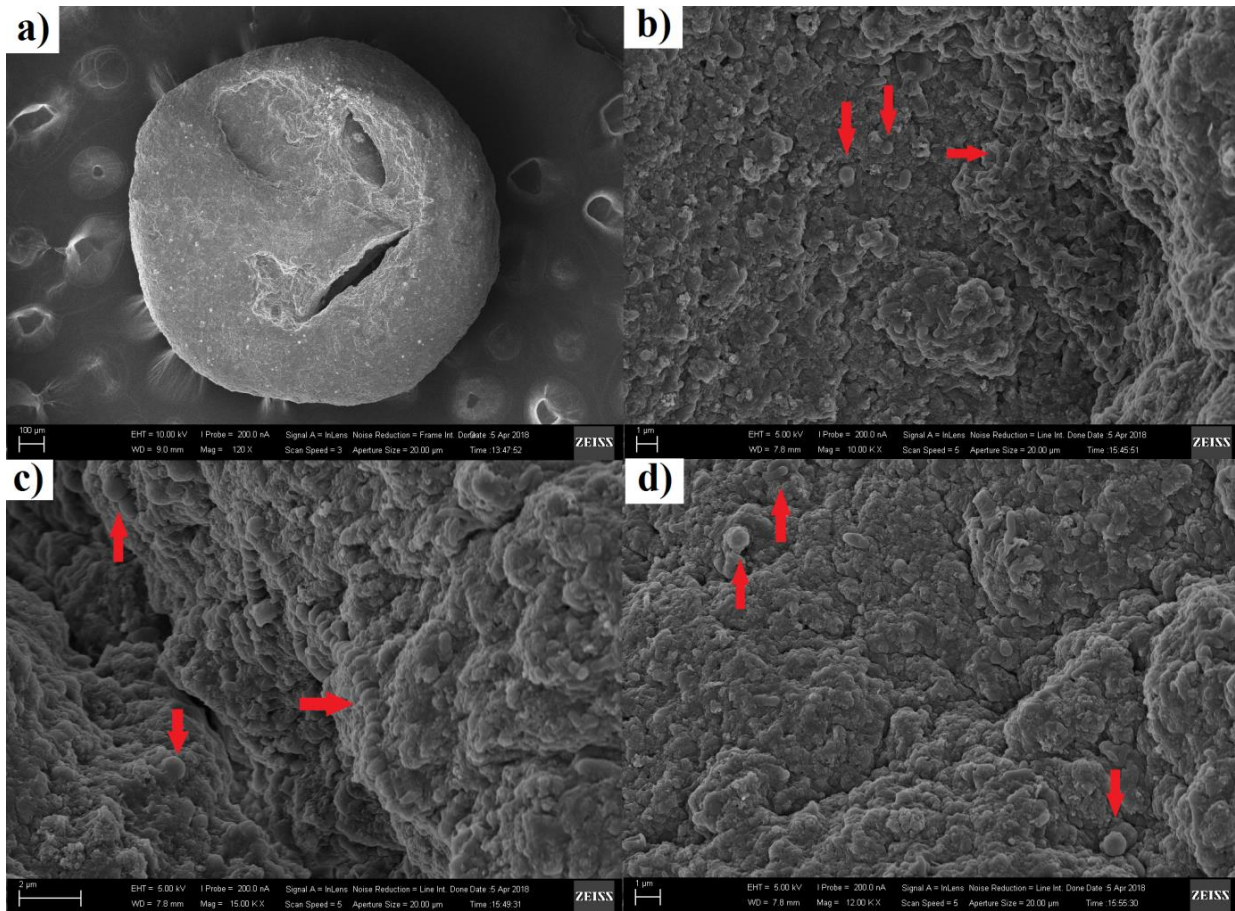
A presença simultânea de *Methanosaeta* e de *Methanosarcina* é exemplo clássico de como dois microrganismos que usam o mesmo substrato (acetato) podem coexistir. No entanto, espera-se presença mais significativa de *Methanosarcina* em cargas mais altas; e dominância de *Methanosaeta* em menores cargas (Conklin, Stensel and Ferguson, 2006). No reator R1 aqui analisado, o aumento de carga de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ proporcionou a redução de *Methanosaeta* concomitantemente com a maior visualização de *Methanosarcina*.

Figura 24. MEV de grânulos do reator R1 com 50% de recirculação e COV de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹: a), b) imagem da superfície – células semelhantes a *Methanosaeta* e cocos; c) micro rachadura na superfície; d) microrganismos presentes na rachadura: células semelhantes a *Methanosaeta*; e), f) interior do grânulo – predominância de células do tipo *Methanosaeta*



Fonte: elaborada pela autora

Figura 25. MEV de grânulos do reator R1 com 50% de recirculação e COV de 20 gDQOL⁻¹d⁻¹: a) panorâmica do grânulo; b) cocos e poucas células de *Methanosaeta*; c) poucos bacilos, presença de cocos e filamento de cocos (provável bactéria); e d) bacilos e cocos



Fonte: elaborada pela autora

Figura 26. Microscopia de contraste de fase e fluorescência do reator R1 com COV 10 gDQOL⁻¹d⁻¹: a), b) abundância de células do tipo *Methanosaeta*

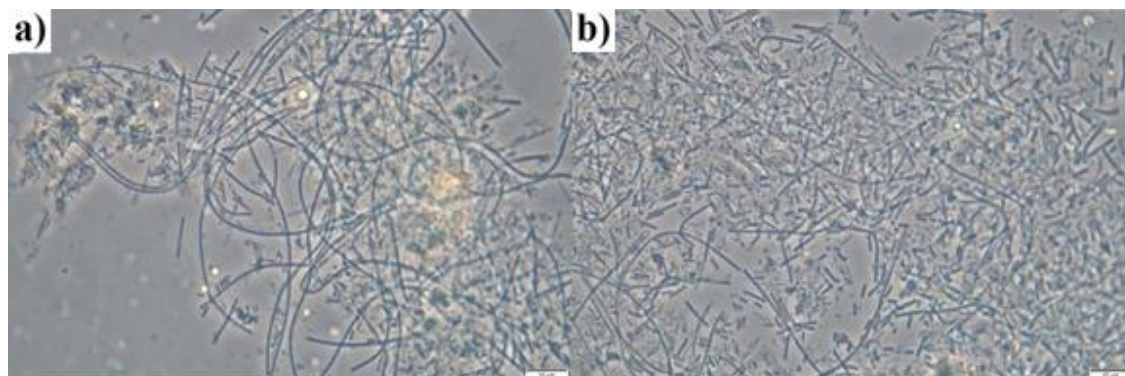
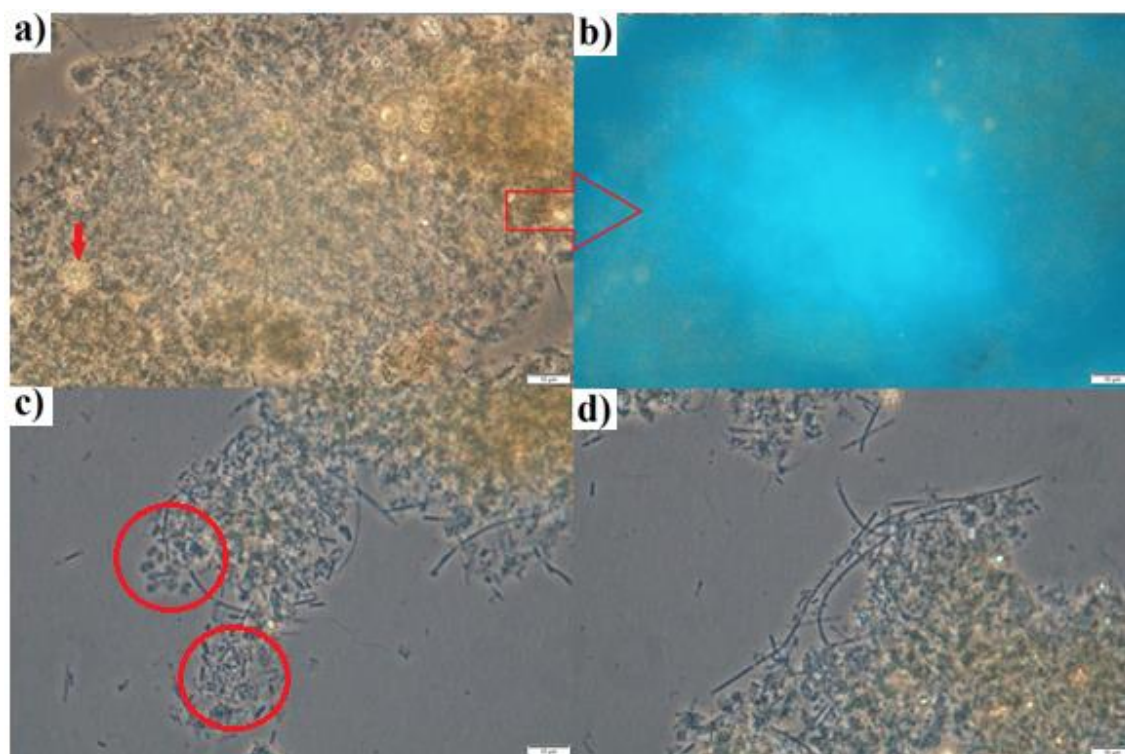


Figura 27. Microscopia de contraste de fase e fluorescência do reator R1 com COV 20 gDQOL⁻¹d⁻¹: a) prováveis células de *Methanosarcina* e arqueias hidrogenotróficas protegidas por emaranhado de material polimérico; b) incidência de luz fluorescente sobre as prováveis células de *Methanosarcina* e arqueias hidrogenotróficas; c), d) cocos e bacilos de dimensão variada e poucas células semelhantes a *Methanosaeta*



Fonte: elaborada pela autora

Reator R2 – 100% de recirculação – COV 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹

Nas superfícies dos grânulos submetido à taxa de recirculação de 100% e COV de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹, observaram-se, por meio de MEV, poucas células semelhantes a *Methanosaeta*; leveduras (cocos com dimensões maiores que as bactérias) provenientes da água residuária; e

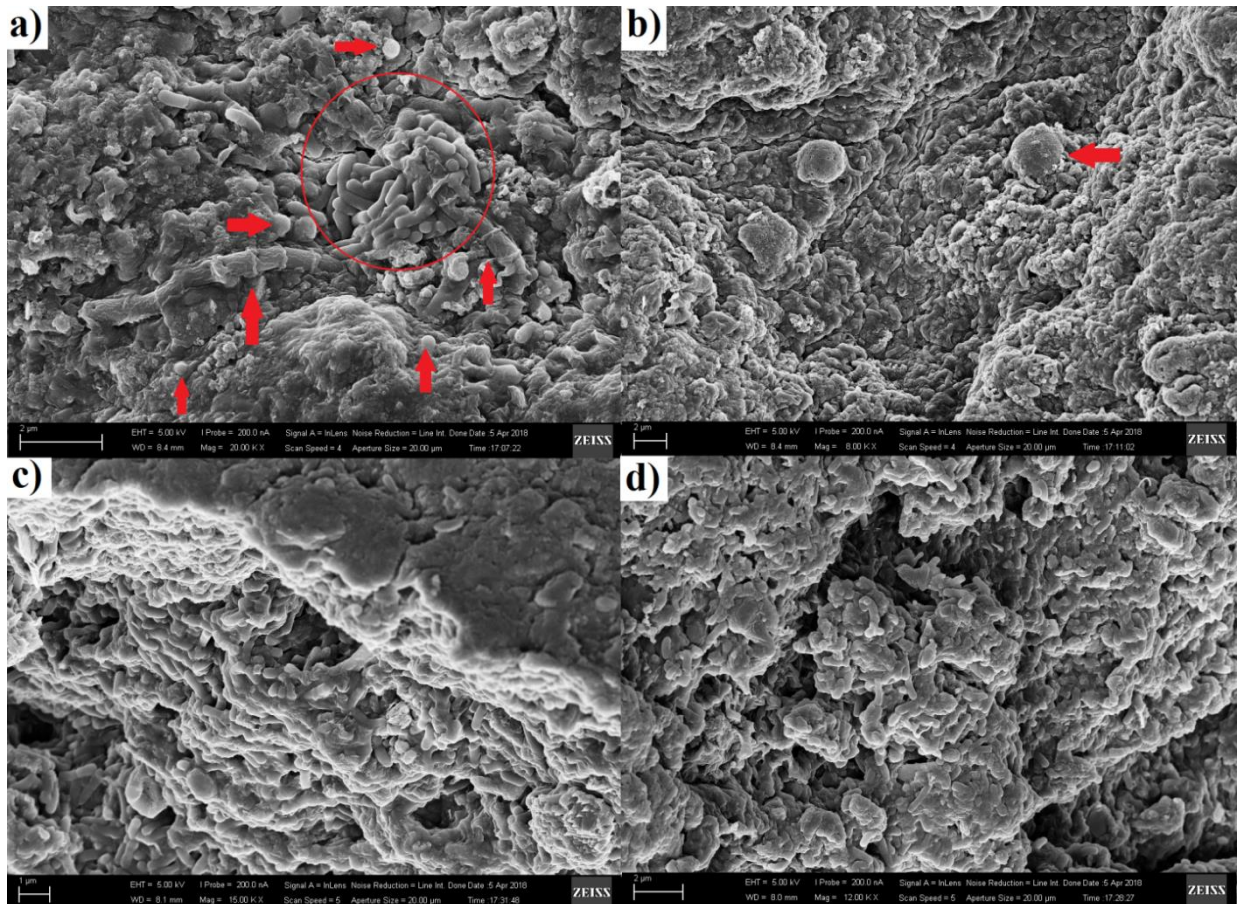
cocos e bacilos, predominantemente. No interior do aglomerado, os bacilos prevaleceram (Figura 28). Nos grânulos submetidos à COV de 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, também foram visualizados possíveis microrganismos do tipo *Methanosaeta* e, preponderantemente, cocos e bacilos (Figura 29).

Nas duas cargas analisadas (10 e 20 gDQO L⁻¹d⁻¹), por microscopia de contraste de fase, predominaram cocos e bacilos, corroborando com o observado por MEV. A microscopia de fluorescência caracterizou os possíveis cocos e bacilos metanogênicos, mas o emaranhado de material polimérico dificultou a identificação. Observaram-se poucas células semelhantes a *Methanosaeta* (Figura 30 e Figura 31).

Segundo Haandel, Vrieze and Vagner (2014), quando um digestor é operado a uma taxa de carga orgânica acima de sua capacidade de tratamento, a concentração residual de acetato tende a aumentar, levando a condições mais favoráveis para a *Methanosarcina* e é possível que estes se tornem os microrganismos metanogênicos acetoclásticos dominantes e, portanto, aumentem a capacidade de tratamento.

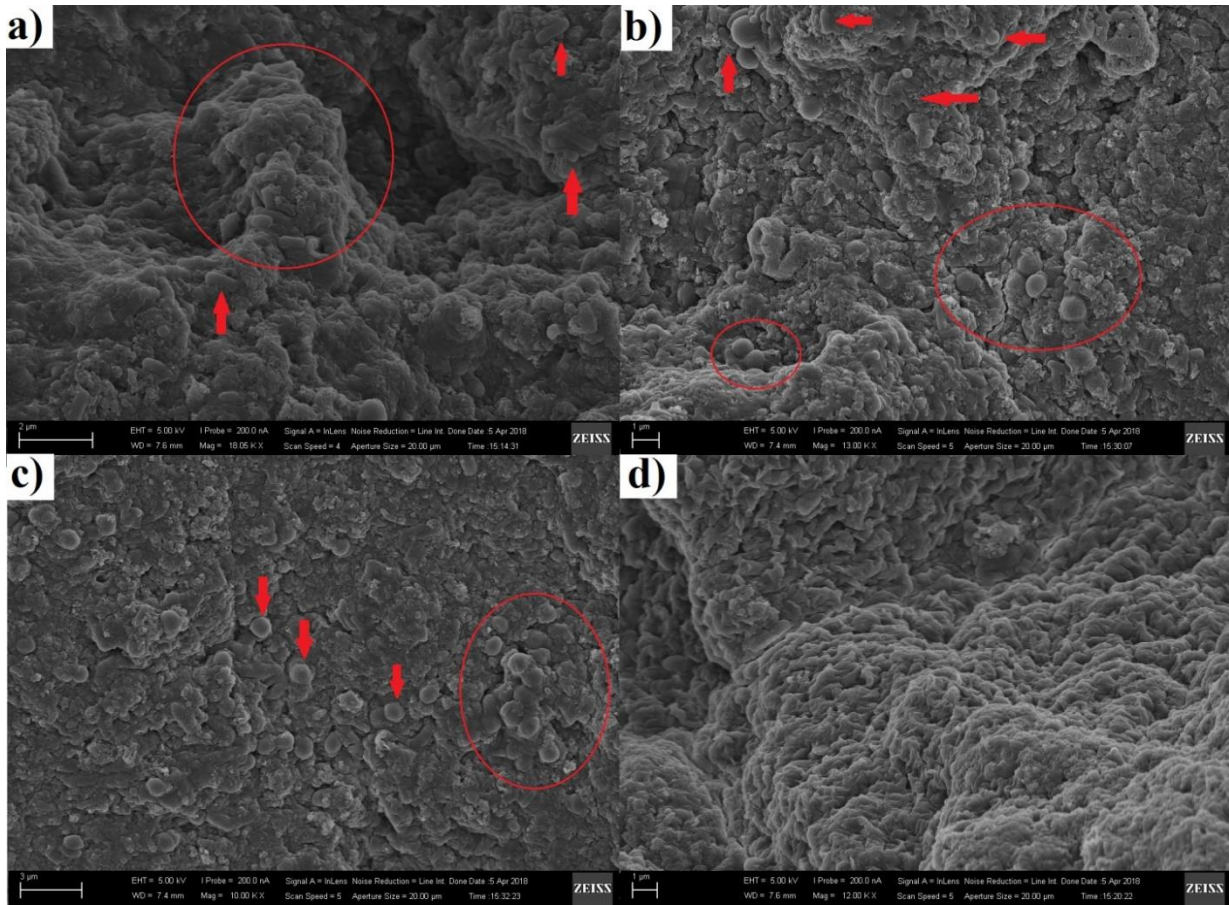
Outro fator que deve ser considerado é que as amostras do reator R2 foram difíceis de serem analisadas, pois parte das células visualizadas estavam desestruturadas, em especial as do tipo *Methanosaeta* (Figura 30 e Figura 31) e, portanto, dificultaram o processo de análise.

Figura 28. MEV de grânulos do reator R2 com 100% de recirculação e COV de 10 gDQO L⁻¹d⁻¹: a) superfície – células do tipo *Methanosaeta* e preponderância de cocos e bacilos; b) leveduras; c), d) interior do grânulo – predominância de bacilos



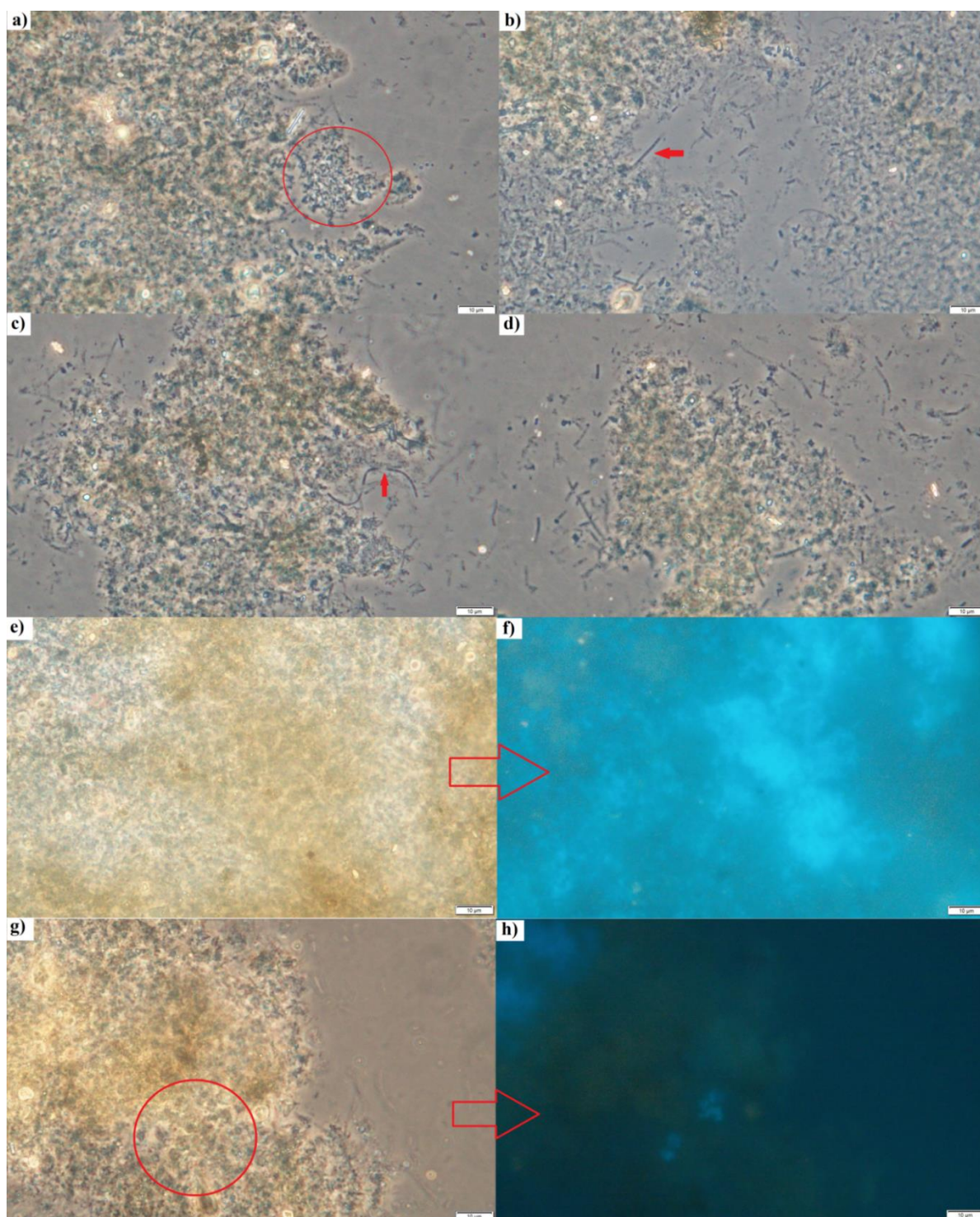
Fonte: elaborada pela autora

Figura 29. MEV de grânulos do reator R2, com 100% de recirculação e COV de 20 gDQO L⁻¹d⁻¹: a) cocos e bacilos; b), c) cocos; d) possíveis células de *Methanosaeta* e bacilos envolvidos em material polimérico



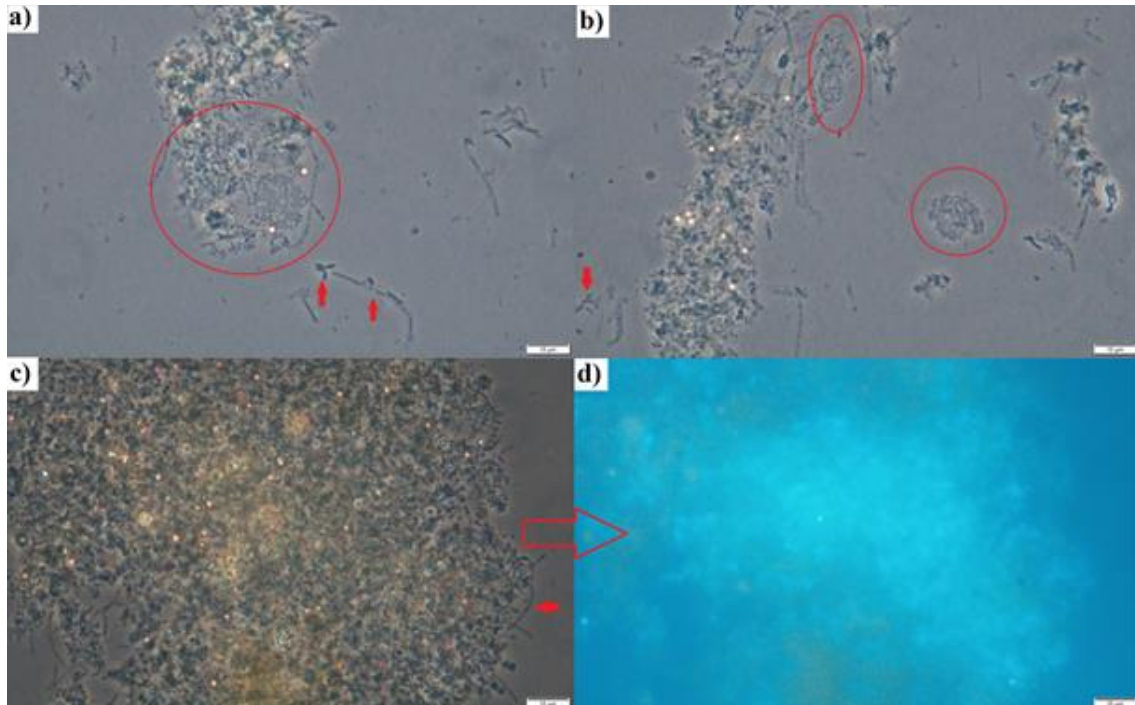
Fonte: elaborada pela autora

Figura 30. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R2, submetido à COV $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$: a) cocos e bacilos predominantemente; b), c) fragmento de *Methanosaeta* destacado pela seta vermelha, abundância de células e material polimérico; d) cocos e bacilos, predominantemente; e), f) possíveis arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e arranjo de cocos fluorescentes envolvidos em material polimérico e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para caracterização; g), h) arranjo de cocos fluorescentes (prováveis células de *Methanosarcina*) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para a caracterização.



Fonte: elaborada pela autora

Figura 31. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R2, submetidos à COV 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$: a), b) cocos e bacilos, predominantemente, e algumas células de *Methanosaeta* possivelmente desestruturadas; c), d) possíveis arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e cocos fluorescentes envolvidos em material polimérico e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação



Fonte: elaborada pela autora

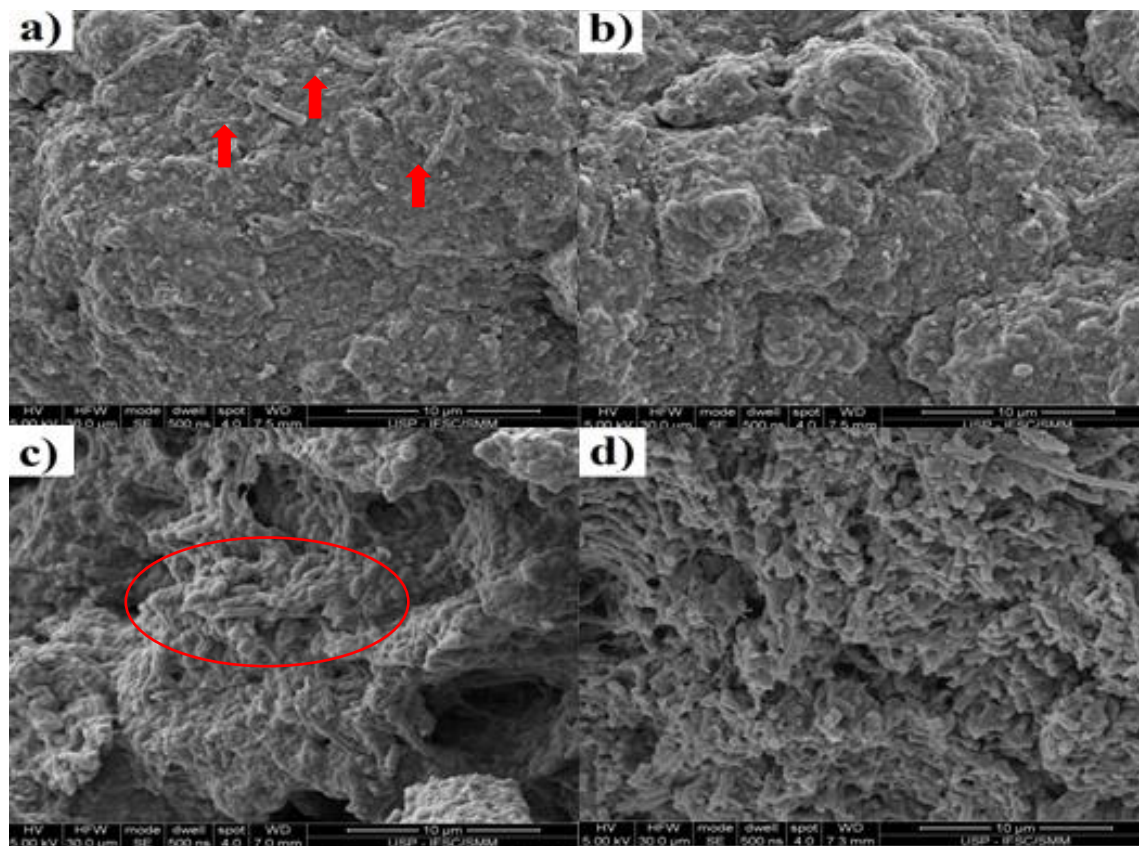
Reator R3 – 200% de recirculação – COV 10 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$

O exame de MEV evidenciou a abundância de células semelhantes a *Methanosaeta* tanto por afloramento na superfície do grânulo e em micro rachaduras da superfície, quanto no interior do grânulo, onde também foram visualizados bacilos com dimensões variadas e cocos (Figura 32 e Figura 33).

Análise de contraste de fase e fluorescência permitiu visualização de células semelhantes a *Methanosaeta* e bacilos, além de *Methanosarcina*, identificadas por agrupamentos de cocos que reagiram à incidência de luz fluorescente, nas amostras de grânulos sob COV 10 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Figura 34).

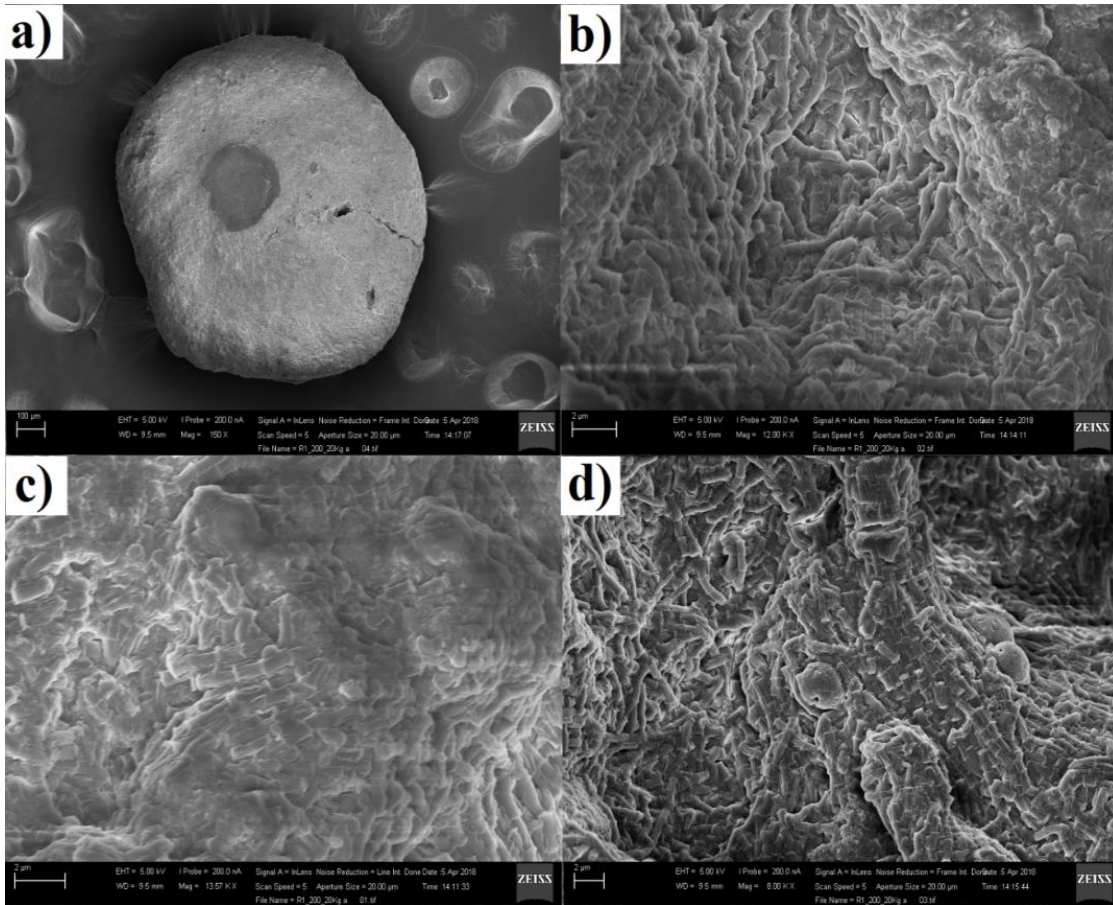
Na COV 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, as células de *Methanosaeta* foram mais facilmente identificadas. Alguns agrupamentos de cocos e bacilos também foram vistos. Parte dos cocos brilharam com a incidência de luz fluorescente, indicando que esses fazem parte do grupo de *Methanosarcina* e outros não reagiram à luz fluorescente, sendo, portanto, possivelmente do domínio *Bacteria* (Figura 35).

Figura 32. MEV de grânulos do reator R3, submetidos à COV de 10 gDQO L⁻¹d⁻¹: a) células semelhantes a *Methanosaeta* identificadas na superfície do grânulo; b) variedade morfologia recoberta por material polimérico; c) interior do grânulo – bacilos com dimensões variadas e cocos; d) interior do grânulo - predominância de *Methanosaeta*, aparentemente danificadas devido a técnica de corte para visualização do perfil do grânulo



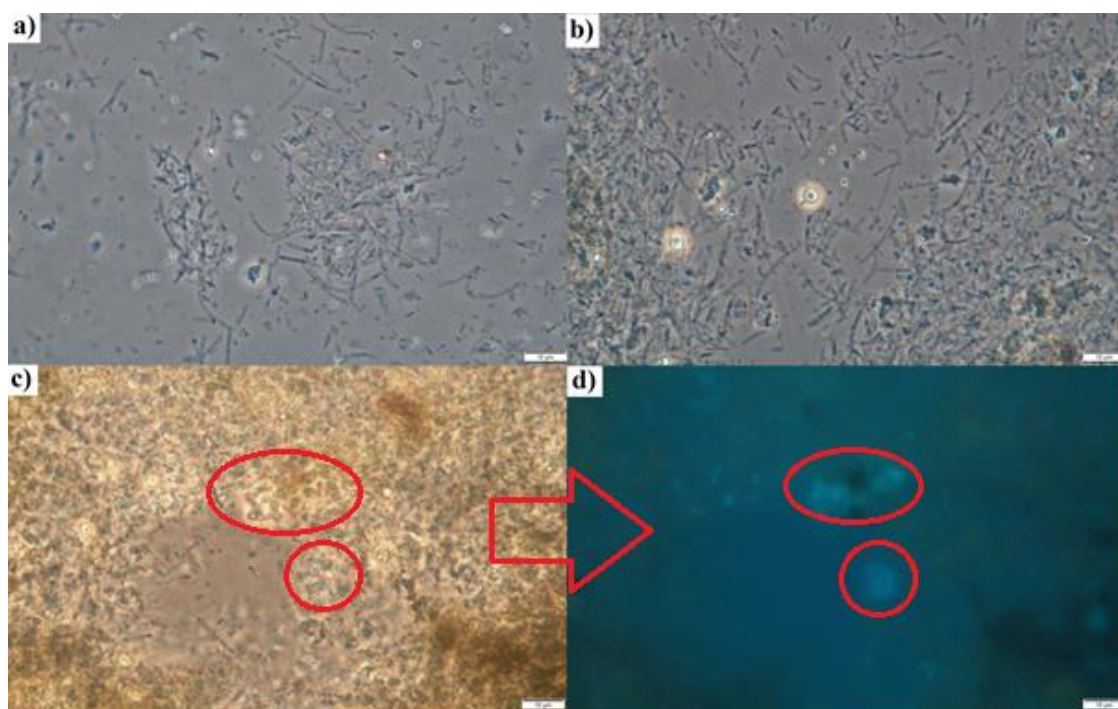
Fonte: elaborada pela autora

Figura 33. MEV da superfície dos grânulos do reator R3 submetidos à COV de $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$: a) imagem panorâmica da superfície do grânulo; b), c), d) quantidade significativa de células semelhantes a *Methanosaeta*; d) Além de *Methanosaeta*, foram observadas leveduras (cocos com dimensões maiores que às bactérias)



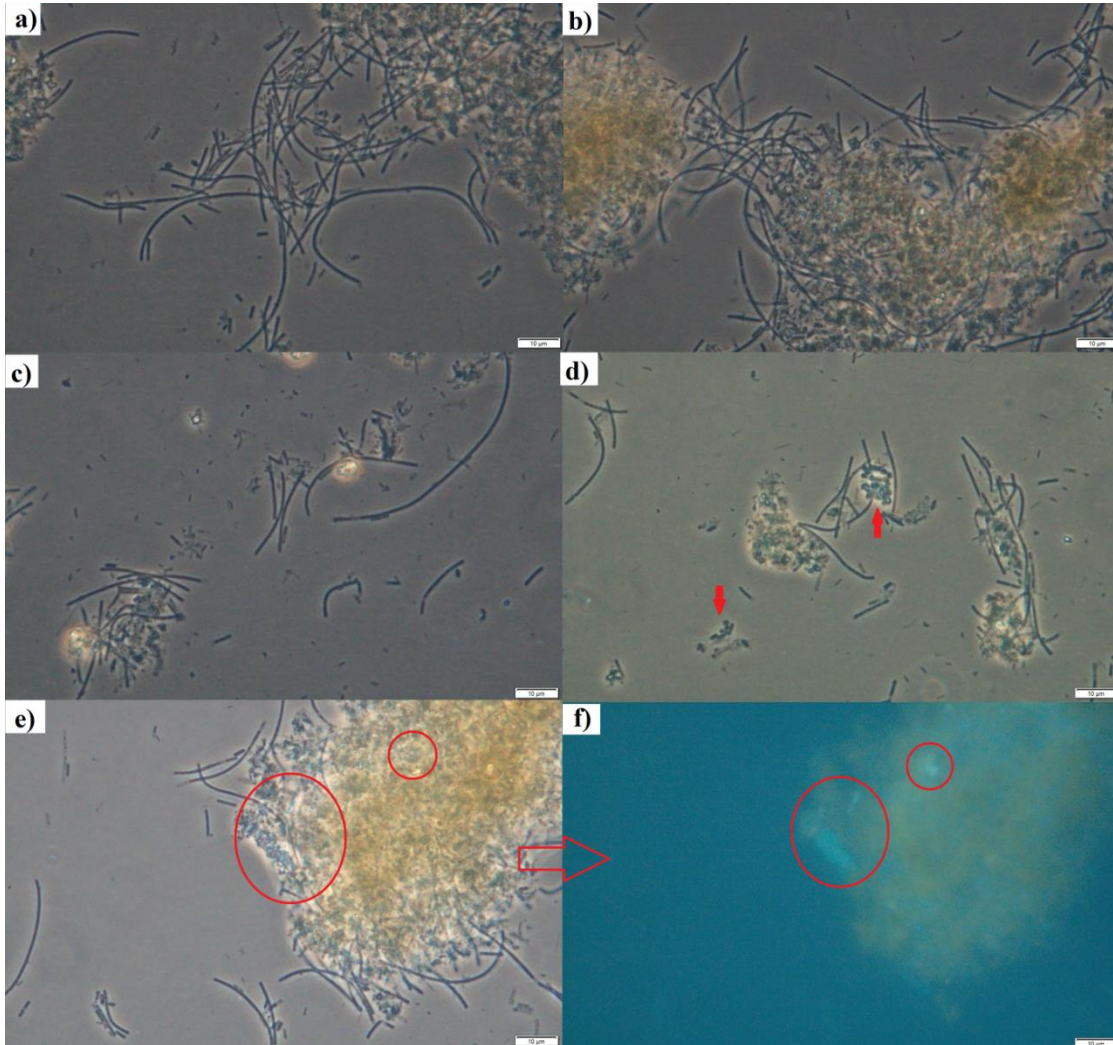
Fonte: elaborada pela autora

Figura 34. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R3 submetidos à COV 10 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$: a), b) possíveis células de *Methanosaeta* e bacilos; c), d) agrupamento de cocos (prováveis células de *Methanosarcina*) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação



Fonte: elaborada pela autora

Figura 35. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R3 submetidos à COV 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$: a), b), c) células do tipo *Methanosaeta* predominantemente; d) agrupamento de cocos; e), f) agrupamento de cocos (prováveis células de *Methanosarcina*) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação



Fonte: elaborada pela autora

Reator R4 – 400% de recirculação – COV 10 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$

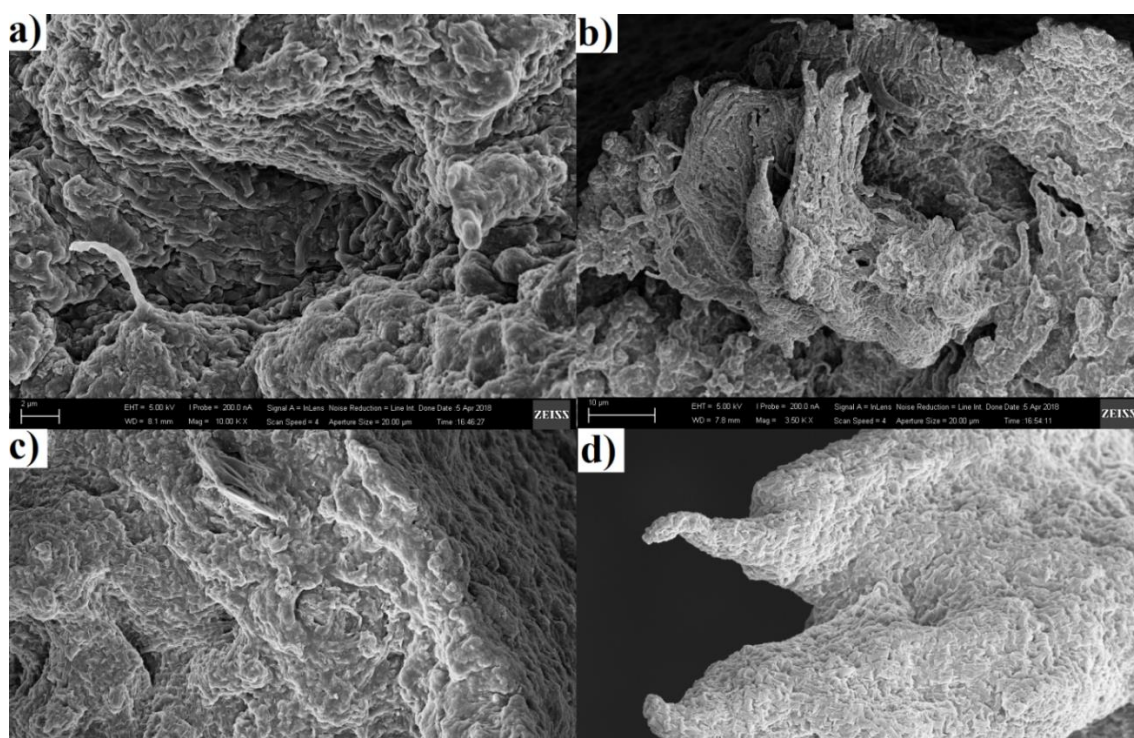
O exame de MEV mostrou que os grânulos do reator R4 apresentaram predominância de *Methanosaeta* nas duas condições analisadas, 10 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Figura 36 e Figura 37). Por meio de microscopia de contraste de fase e fluorescência foi possível a visualização de agrupamento de *Methanosarcina* (cocos), evidenciadas por fluorescência; cocos do domínio *Bacteria* (pois não reagiram à luz fluorescente) e predominância de *Methanosaeta* (Figura 38). A densidade de *Methanosaeta* foi, aparentemente, maior nos grânulos submetidos à COV de 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ em relação aos submetidos à COV de 10 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Figura 39).

Apesar do aumento de carga orgânica volumétrica de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, observou-se que a presença de células de *Methanosaeta* foi similar a observada na COV 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ para os reatores R3 e R4 (submetidos a taxas de recirculação elevadas de 200 e 400%, respectivamente). Aparentemente, as células de *Methanosarcina* não foram efetivamente incorporadas aos grânulos e acabaram sendo arrastadas para fora do sistema.

Segundo Haandel, Vrieze and Vagner (2014), a maior concentração de *Methanosaeta* pode estar relacionada a menor capacidade de células de *Methanosarcina* se manterem dentro do sistema, pois, devido a sua estrutura menos favorável, elas podem acabar sendo varridas do reator.

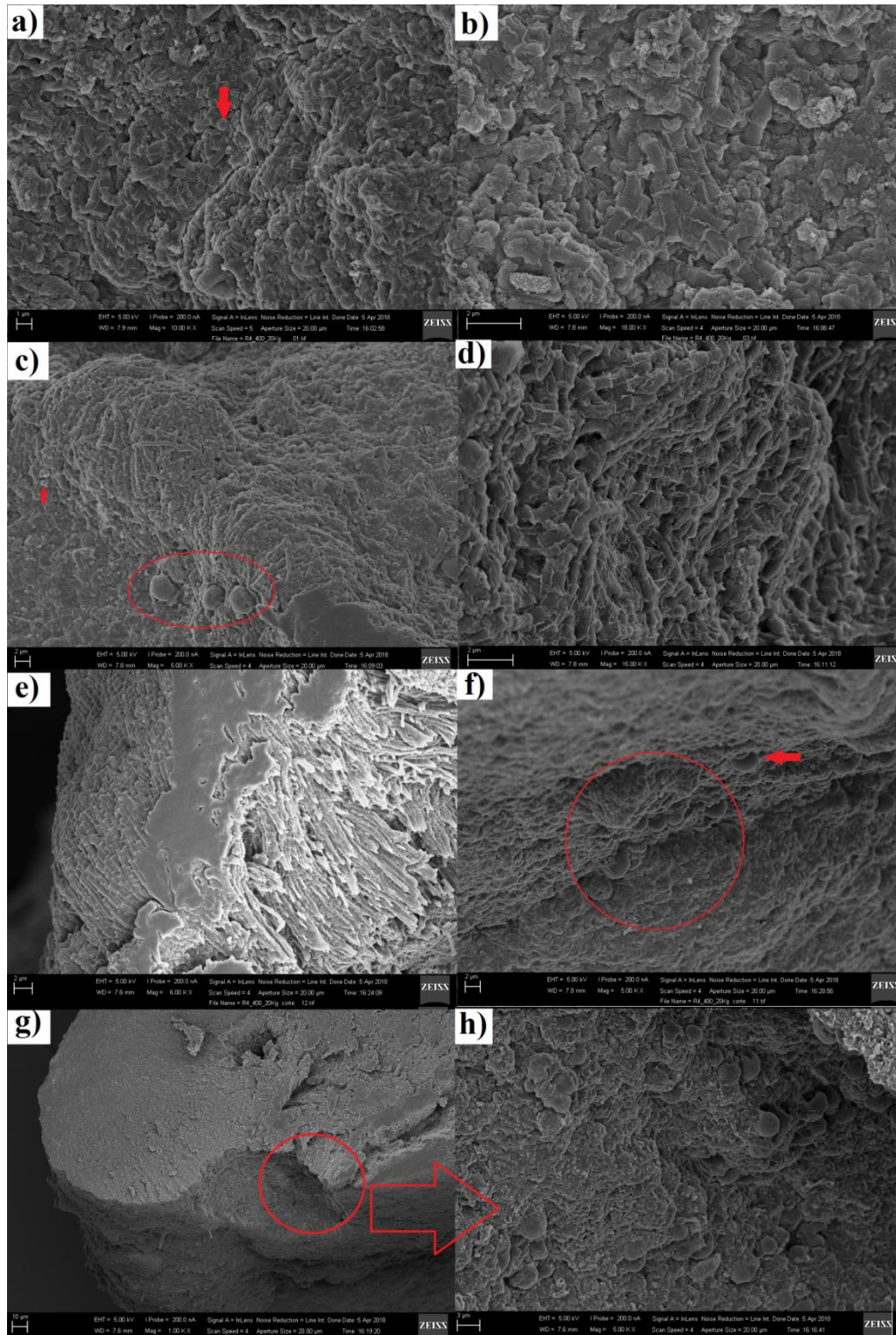
Portanto, o fato de não haver acúmulo de *Methanosarcina* na maior carga orgânica volumétrica (20 gDQOL⁻¹d⁻¹), nos reatores R3 e R4, pode ter ocorrido devido a uma menor afinidade desse tipo de célula (estrutura esférica) para formar ou incorporar grânulos em contraste com as células de *Methanosaeta* (estrutura filamentososa).

Figura 36. MEV de grânulos do reator R4 submetidos à COV de 10 gDQO L⁻¹d⁻¹: a) predominância de células semelhantes a *Methanosaeta* na superfície do grânulo; b), c) e d) predominância de células semelhantes a *Methanosaeta* também no interior do grânulo



Fonte: elaborada pela autora

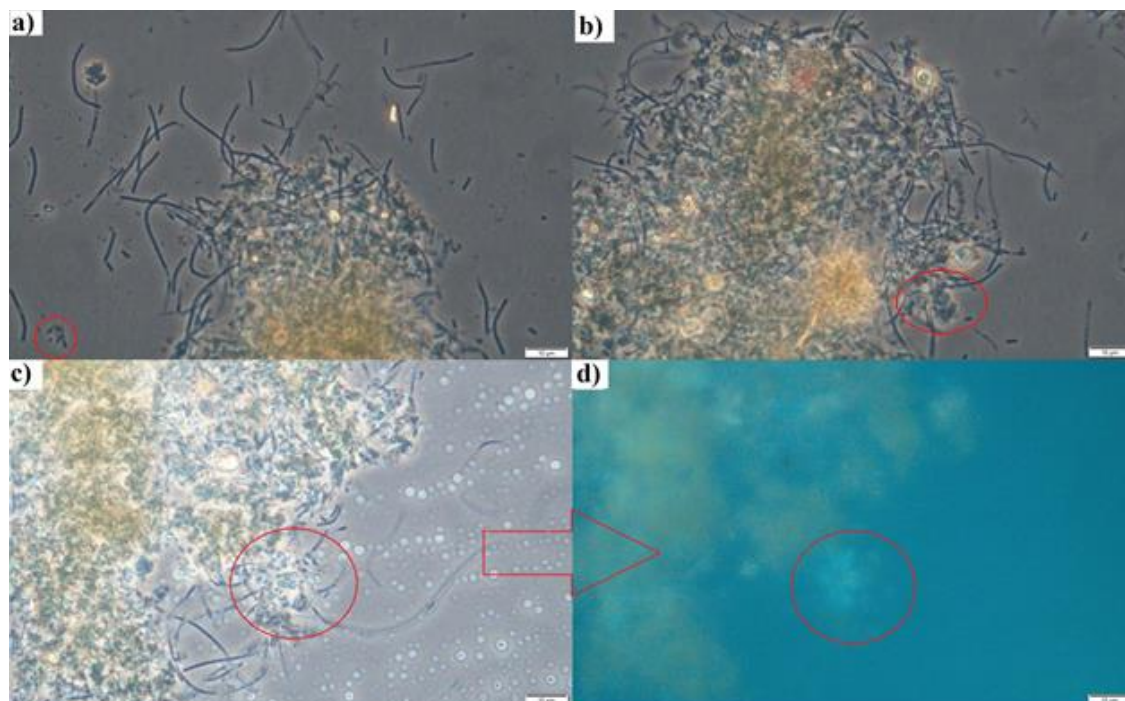
Figura 37. MEV de grânulos do reator R4 submetidos à COV de 20 gDQO L⁻¹d⁻¹: a), b) superfície com predominância de células semelhantes a *Methanosaeta* e presença de poucos cocos (destacado em vermelho); c) Além de *Methanosaeta*, leveduras e cocos (em vermelho); d) predominância de *Methanosaeta*; f), g) e h) interior do grânulo – cocos (destacado em vermelho) e células de *Methanosaeta*



Fonte: elaborada pela autora

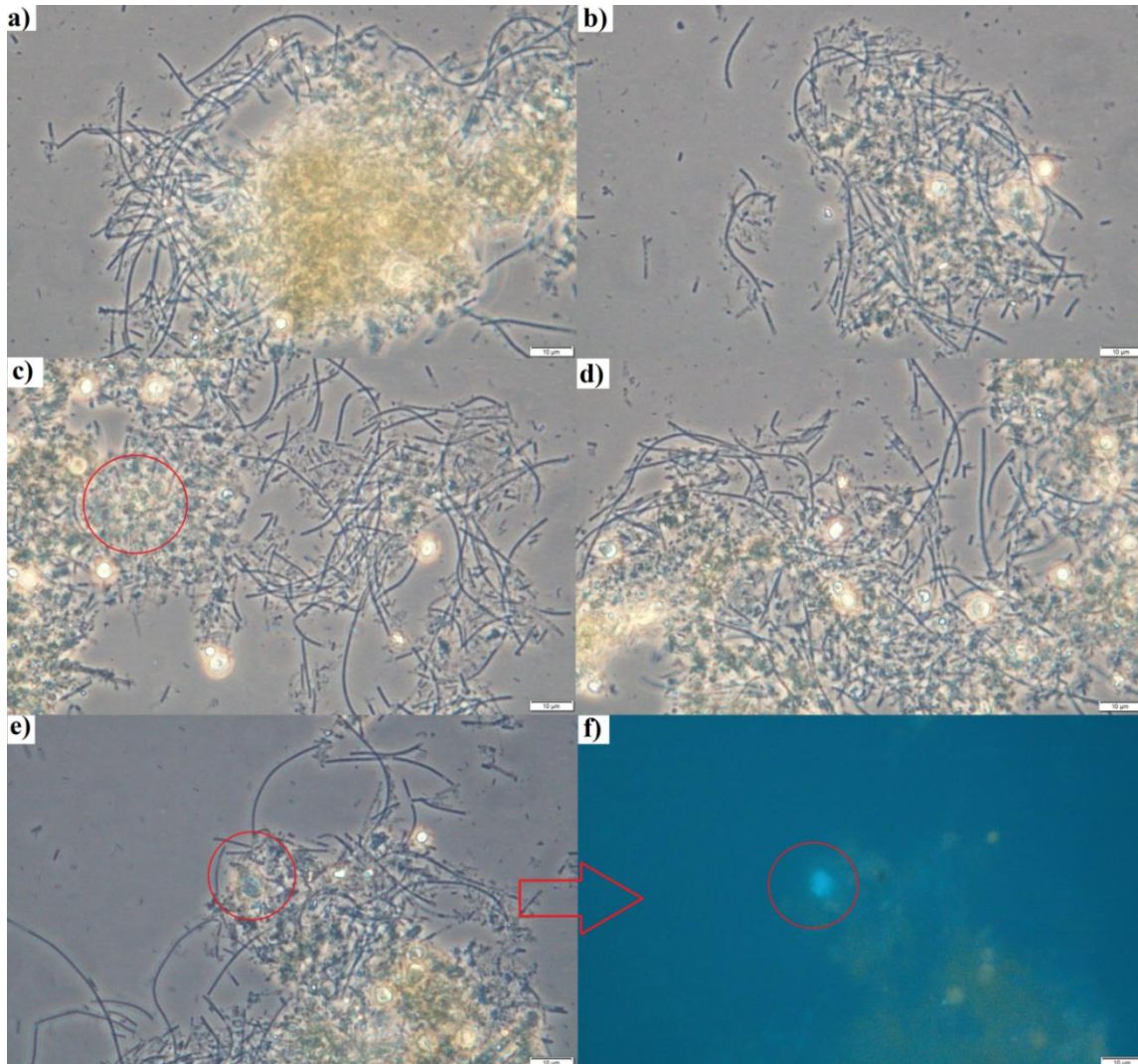
Figura 38. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R4 submetidos à COV 10 gDQO

L⁻¹d⁻¹: a, b) agrupamento de cocos provavelmente do domínio *Bacteria* (destacada em vermelho), células semelhantes a *Methanosaeta*; c, d) agrupamento de cocos (prováveis *Methanosarcina*) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação de *Methanosarcina*



Fonte: elaborada pela autora

Figura 39. Microscopia de contraste de fase e fluorescência dos grânulos do reator R4 submetidos à COV 20 gDQO $L^{-1}d^{-1}$: a), b) predominância de células semelhantes a *Methanosaeta*; c) cocos envolvidos em emaranhado biológico e *Methanosaeta*; d) predominância de células semelhantes a *Methanosaeta*; e), f) agrupamento de cocos (prováveis células de *Methanosarcina*) e a respectiva imagem sob incidência de luz fluorescente para identificação



Fonte: elaborada pela autora

Em todos os reatores, observaram-se organismos metanogênicos dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, grupos importantes na produção de metano por meio do acetato. Arqueias metanogênicas hidrogenotróficas também foram observadas.

Nos reatores R1 e R2, com menor taxa de recirculação, reduziu-se aparentemente a densidade de *Methanosaeta* com o incremento da COV de 10 para 20 gDQO $L^{-1}d^{-1}$. Mais cocos foram visualizados nas amostras de grânulos desses dois reatores submetidos a maior COV.

Percebeu-se que a vinhaça de alimentação, entre as fases com COV 10 e 20 gDQO $L^{-1}d^{-1}$, apresentou aumento de ácido acético de 77 para 1128 mgL^{-1} e 223 para 636 mgL^{-1} para R1 e R2, respectivamente (resultados apresentados e discutidos na seção

“Caracterização da concentração de ácidos orgânicos dos reatores UASB”). O aumento da concentração de acetato na alimentação dos reatores possivelmente beneficiou as células de *Methanosarcina*.

O incremento de COV de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ favoreceu as células de *Methanosaeta*, nos reatores com maior taxa de recirculação, R3 e R4. Percebeu-se que entre essas fases, a vinhaça de alimentação apresentou diminuição de ácido acético de 556 para 305 mgL⁻¹ e de 244 para 126 mgL⁻¹ para R3 e R4 (resultados apresentados e discutidos na seção “Caracterização da concentração de ácidos orgânicos dos reatores UASB”), respectivamente, favorecendo as células de *Methanosaeta*.

A maior recirculação dos reatores R3 e R4 também teve papel fundamental na seleção de *Methanosaeta*, pois proporcionou elevada velocidade ascensional, diluição do substrato e, conseqüentemente, diluição do acetato da vinhaça justificando, assim, a maior concentração de microrganismos do grupo de *Methanosaeta*.

As concentrações de ácido acético e propiônico nas fases analisadas justificaram a presença de *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. Sabe-se que o ácido acético, presente em grande quantidade, funciona como um dos principais precursores da metanogênese (Şentürk, İnce e Onkal Engin 2010; Barros et al. 2017). O propionato, por sua vez, oxida-se primeiro a acetato e hidrogênio e, então, converte-se a metano (Boonyakitsombut *et al.*, 2002).

Entende-se que, no crescimento granular, em concentração alta de acetato, microrganismos do gênero *Methanosarcina* conseguem competir com os de *Methanosaeta*, coexistindo no lodo anaeróbio. Uma vez reduzida a concentração de ácido acético, microrganismos do gênero *Methanosaeta* são favorecidos, devido a maior afinidade ao acetato (Chen e Lun 1993). Por esse motivo, as células de *Methanosaeta* vem sendo amplamente encontradas em estudos com reatores anaeróbios, sendo a sua predominância confirmada por variadas análises moleculares (Hulshoff Pol *et al.*, 1983; Díaz *et al.*, 2006; Abreu, 2007).

A forma de exposição gradual dos microrganismos aos nutrientes presentes na vinhaça, utilizada no presente estudo, justificou a alteração microbiana sem causar falha nos sistemas, mesmo sob concentrações altas de ácido acético e propiônico. Takashima e Speece (1989) e Barros et al. (2006) analisaram e relacionaram o efeito de determinados ácidos orgânicos na presença de nutrientes.

Takashima e Speece (1989) testaram uma cultura que mostrou suportar taxas entre 30 a 40 gL⁻¹d⁻¹ de acetato, quando suplementados com nutrientes minerais. As concentrações dos nutrientes e a presença de acetato em alta concentração foram determinantes para facilitar o crescimento relativamente rápido de *Methanosarcina*.

Barros et al. (2006) constataram que o controle das concentrações de ácido propiônico, que promoveu condições adequadas para manutenção de microrganismos metanogênicos, esteve relacionado à presença de elementos químicos na água residuária, pois os nutrientes estimularam a atividade de cada grupo microbiano no consórcio, aumentando a degradação do propionato.

No presente estudo, o aumento da COV aplicada aos reatores, associado ao incremento de vazão de alimentação, causou diminuição dos grânulos e aumento de células de *Methanosaeta* na superfície. As células de *Methanosarcina*, no entanto, foram encontradas em emaranhados de outras células e material polimérico.

Apesar da consolidada teoria de que organismos metanogênicos tendem a se proteger no centro dos grânulos (MacLeod, Guiot e Costerton 1990; Guiot, Pauss e Costerton 1992), alguns estudos apontam comportamento diferente. Chen e Lin (1993) constataram, em grânulos de lodo cultivados com ácido acético como única fonte de carbono, predominância de *Methanosaeta* na superfície e, na parte interna dos grânulos, aglomerados de *Methanosarcina*. Saiki et al. (2002) consideraram que grânulos bem estabilizados tiveram o desenvolvimento dos microrganismos metanogênicos na superfície do grânulo, de modo que os gases gerados foram prontamente liberados, evitando flotação.

6.5.2. Caracterização microbiana por meio de PCR e DGGE

Os reatores foram analisados para os domínios *Bacteria* e *Archaea* nas fases em que estavam submetidos às COV de 5, 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹. Dois pontos de análise foram considerados: (a) alteração da comunidade microbiana provocada principalmente pelas taxas de recirculação; (b) alteração da comunidade microbiana instigada prioritariamente pelo aumento de COV.

Para discutir o item (a), analisou-se comparativamente a comunidade microbiana entre os reatores R1, R2, R3 e R4, submetidos a 50, 100, 200 e 400% de recirculação, respectivamente, na COV 5; em seguida, comparou-se a microbiota entre os reatores submetidos à COV 10 e, por fim, à COV 20 gDQOL⁻¹d⁻¹. Dessa forma, verificou-se o grau de similaridade e diversidade microbiológica entre os reatores submetidos à mesma carga orgânica, de forma que, as alterações encontradas nessa etapa foram relacionadas às taxas de recirculação aplicadas, já que as COV eram semelhantes.

Na análise do item (b), foi observado cada reator isoladamente. O objetivo foi analisar a mudança microbiana provocada pelas diferentes fases de operação, com crescentes cargas orgânicas e hidráulicas, de um único reator por vez.

Domínio *Archaea*

(a) Análise da alteração da população metanogênica provocada pelas taxas de recirculação

Na menor carga analisada ($5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), os reatores R1, R2 e R3 (50, 100 e 200% de recirculação, respectivamente) mantiveram-se semelhantes em relação às populações de arqueias. Por sua vez, a recirculação de R4 (400%) propiciou uma mudança significativa nessas populações, mantendo-se com menor índice de similaridade que 50% em relação aos demais reatores. R1 apresentou 90% de similaridade em relação ao R2; R2 similaridade de 84% ao R3 e R3, apenas 48% de similaridade ao R4 (Figura 40 e Figura 41).

A similaridade dos microrganismos do domínio *Archaea* entre todos os reatores nas duas últimas fases, 10 e $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, foi maior ou igual a 84% (Figura 41). O aparente aumento de *Methanosaeta* nos reatores R3 e R4 em relação aos reatores R1 e R2, observado nas análises de microscopia eletrônica e de contraste de fase e fluorescência (resultados discutidos na seção 6.5.1), não acarretou em mudança drástica da similaridade entre as populações de arqueias nessas fases. Vale ressaltar aqui que o resultado da biomol refere-se ao DNA genômico dos organismos, ou seja, não é uma análise quantitativa.

(b) Análise da alteração da população metanogênica provocada pelo aumento de carga orgânica volumétrica

A população metanogênica dos reatores submetidos à COV de $5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ foi relativamente modificada com o aumento da carga orgânica para $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, principalmente no reator R4, submetido a maior taxa de recirculação. Os reatores R1, R2 e R3 apresentaram populações de arqueias com similaridade de 74, 72 e 72%, respectivamente, e o reator R4 foi o que apresentou menor paridade entre as duas cargas, com 48%.

A semelhança entre as populações de arqueias presentes nos reatores na COV de $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ comparada com as arqueias dos reatores submetidos a $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ foi de 90, 96, 98 e 94% para os reatores R1, R2, R3 e R4, respectivamente (Figura 40 e Figura 41). Os resultados observados por microscopia eletrônica de varredura e contraste de fase e fluorescência mostraram que, aparentemente, não houve alteração significativa nos morfotipos

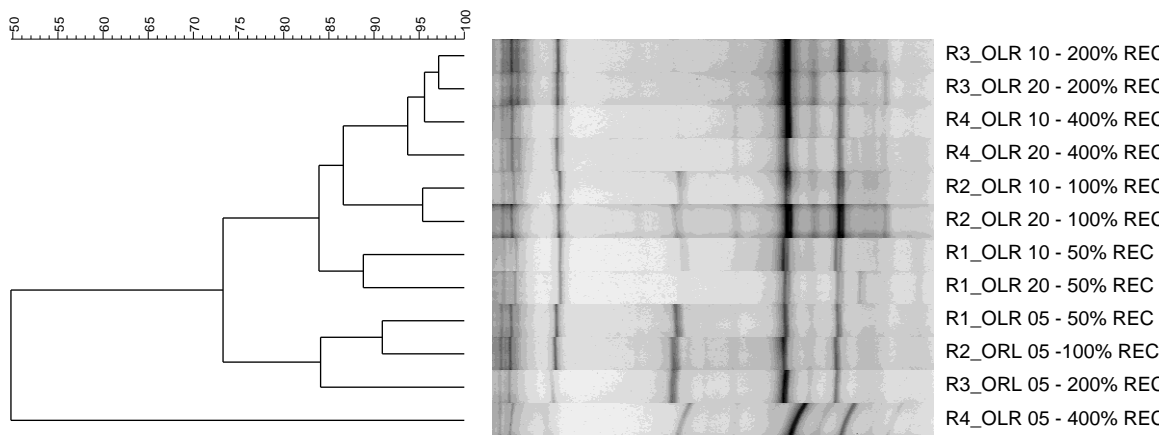
de microrganismos metanogênicos entre os grânulos submetidos à COV de 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, corroborando com o obtido por DGGE.

O aumento de COV de 5 para 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ causou maior alteração nas populações de arqueias em relação ao aumento de COV de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ nos quatro reatores analisados. Provavelmente isso ocorreu pelo fato dos reatores submetidos a menor COV estarem ainda se adaptando às novas condições, já que o lodo utilizado para inoculação foi oriundo de reator tratando resíduo de abatedouro de aves e passou a tratar resíduo do processamento da cana-de-açúcar (vinhaça). Nas maiores COV, de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, a similaridade foi maior ou igual a 90%, indicando que as arqueias provavelmente se adaptaram às condições impostas.

O reator com alta recirculação (400%) exigiu maior período para adaptação da microbiota do domínio *Archaea*, pois entre a primeira e segunda fase de análise (5 e 10 gDQOL⁻¹d⁻¹), o reator R4 apresentou apenas 48% de similaridade (Figura 41). A recirculação elevada possivelmente influenciou a estabilização desse reator nas primeiras fases do sistema. Após adaptação na COV 10 gDQOL⁻¹d⁻¹, o aumento gradativo para COV 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ não provocou alterações significativas (similaridade de 94%).

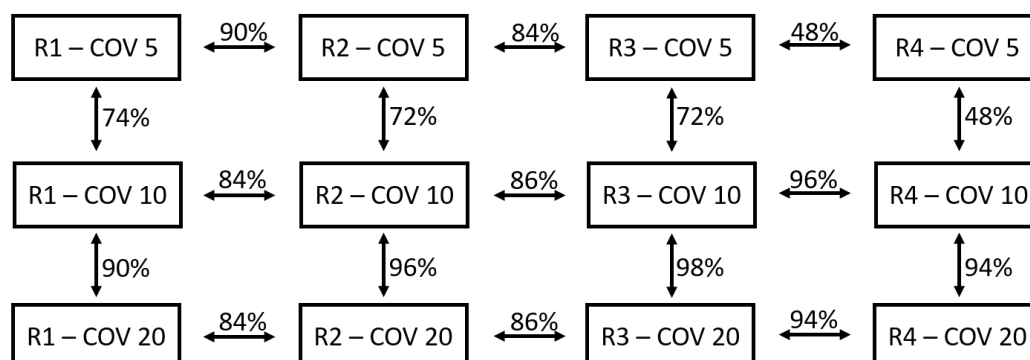
O índice de diversidade de Shannon (H), para o domínio *Archaea*, aumentou com o incremento de vinhaça até COV 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, em relação ao inóculo, em todos os reatores indo de 2 (inóculo) para 2,2 em R1; de 2 para 2,3 em R2; de 2 para 2,2 em R3 e de 2 para 2,3 em R4 (Tabela 32). Portanto, a introdução crescente de vinhaça propiciou aumento na diversidade microbiana para o domínio *Archaea*.

Figura 40. Dendograma relativo aos perfis de banda do domínio *Archaea*



Fonte: resultado obtido pela autora

Figura 41. Índices de similaridade, em porcentagem, obtidas por DGGE considerando a correlação de Pearson para o domínio *Archaea*



Fonte: elaborada pela autora

Domínio *Bacteria*

(a) Análise da alteração da população bacteriana provocada pelas taxas de recirculação

Na menor carga analisada ($5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), os reatores R1, R2 e R3 mantiveram-se semelhantes em relação à microbiota do domínio *Bacteria*. No entanto, nessa carga orgânica baixa, a recirculação alta (400%), condição do reator R4, propiciou uma mudança significativa das populações de bactérias, assim como ocorreu com o domínio *Archaea*. A similaridade entre R1 e R2 foi de 82%; entre R2 e R3, de 88%; e entre R3 e R4, de apenas 48% (Figura 42 e Figura 43).

Nas amostras de lodo sob COV de $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ e, posteriormente, de $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, não foi possível estabelecer uma tendência do comportamento microbiano para o domínio *Bacteria*. No entanto, notou-se a diminuição significativa da similaridade entre as populações de bactérias presentes nos reatores, em relação ao observado para o domínio *Archaea*. O índice de similaridade variou entre 18 e 68% (Figura 43).

(b) Análise da alteração da comunidade microbiana provocada pelo aumento de carga orgânica volumétrica

Sob condições de menores recirculações (50 e 100%), a similaridade entre as populações de bactérias presentes nos reatores submetidos à COV de 5 em relação à de $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ foi de 48%. O aumento da COV de 10 para $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ propiciou maior similaridade entre as populações de bactérias presentes na manta de lodo desses reatores, 82% para R1 e 62% para R2 (Figura 43).

Nos reatores R1 e R2, com o incremento da COV de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, mais morfotipos celulares na forma de cocos foram visualizados, por técnicas de microscopia. Os bacilos evidenciaram-se no reator R2, também na fase com maior COV (20 gDQOL⁻¹d⁻¹). A menor similaridade em R2 (62%), em relação ao observado para o aumento de COV em R1 (82%), pode estar relacionada a maior densidade de bacilos, fisiologicamente diferentes, visualizados nas técnicas de microscopia (resultados discutidos na seção 6.5.1).

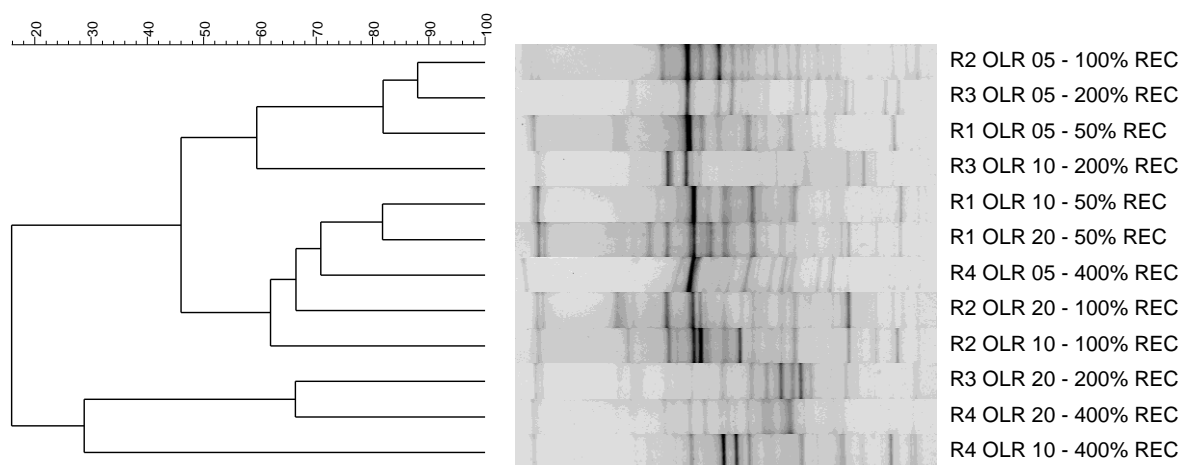
O reator R3 (200% de recirculação) apresentou comportamento contrário. A similaridade entre a microbiota do domínio bactéria na COV de 5 em relação à de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ foi maior, 60%; e o aumento da COV de 10 para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ propiciou mudança significativa da comunidade bacteriana (similaridade de 18%), como apresentado na Figura 42 e Figura 43.

O aumento de COV no reator R4, com 400% de recirculação, apresentou maior modificação, com apenas 18% de similaridade entre as populações de bactérias em todas as condições analisadas, 5, 10 e 20 gDQOL⁻¹d⁻¹ (Figura 42 e Figura 43).

O índice de Shannon (H) para o domínio *Bacteria* aumentou de 2,5 (inóculo) para 2,7, com o incremento da COV para 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, em todos os reatores (Tabela 32), indicando aumento da diversidade microbiana para o domínio *Bacteria*.

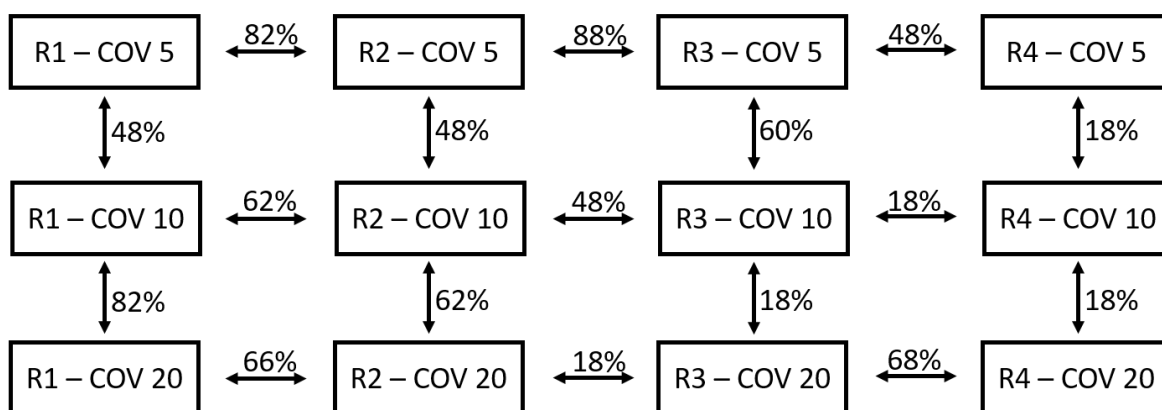
O índice de Shannon (H) foi maior para o domínio *Bacteria* que para o *Archaea*, indicando maior diversidade da população de bactéria em relação à de arqueia, com exceção da amostra de lodo de R3 sob COV de 10 gDQOL⁻¹d⁻¹ (Tabela 32), em que os domínios *Archaea* e *Bacteria* apresentaram H de 2,33 e 2,20, respectivamente. Sabe-se que o domínio *Bacteria* é mais versátil que o domínio *Archaea* e, portanto, esperava-se uma maior diversificação dessa comunidade devido às mudanças operacionais, tal como aumento gradativo de carga orgânica e hidráulica.

Figura 42. Dendograma relativo aos perfis de banda do domínio *Bacteria* e os respectivos índices de similaridade em porcentagem (correlação de Pearson)



Fonte: elaborado pela autora

Figura 43. Índices de similaridade, em porcentagem, obtidas por DGGE considerando a correlação de Pearson para o domínio *Bacteria*



Fonte: elaborada pela autora

Tabela 32. Índice de diversidade-Shannon (H)

| Shannon (H) | Inóculo | R1 | | | R2 | | |
|-------------------------|---------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
| | | COV 5 | COV 10 | COV 20 | COV 5 | COV 10 | COV 20 |
| Domínio <i>Archaea</i> | 2,03 | 2,03 | 2,29 | 2,18 | 2,05 | 2,12 | 2,25 |
| Domínio <i>Bacteria</i> | 2,53 | 2,46 | 2,50 | 2,75 | 2,75 | 2,56 | 2,71 |
| Shannon | Inóculo | R3 | | | R4 | | |
| | | COV 5 | COV 10 | COV 20 | COV 5 | COV 10 | COV 20 |
| Domínio <i>Archaea</i> | 2,03 | 1,95 | 2,33 | 2,35 | 2,15 | 2,15 | 2,16 |
| Domínio <i>Bacteria</i> | 2,53 | 2,47 | 2,20 | 2,66 | 2,38 | 2,57 | 2,71 |

Fonte: elaborada pela autora

Observou-se comportamento diferente entre as populações de arqueias e de bactérias. O índice de similaridade das populações de arqueias, analisando o efeito da recirculação e da COV, foi maior e menos variável, com mínimo de 48%. As populações de bactérias, no entanto, apresentaram índices de similaridade mais variáveis e geralmente menores que os das arqueias, entre 18 e 88%. Observou-se também que a maior recirculação (400%) provocou maior instabilidade para as populações de bactérias e arqueias.

As eficiências de remoção de matéria orgânica e de produção de metano foram satisfatórias para todos os reatores, inclusive o de maior recirculação (resultados discutidos na seção 6.2).

De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que o incremento da carga orgânica e hidráulica proporcionou mudanças nas populações de arqueias e principalmente de bactérias. A maior instabilidade das populações de bactérias esteve relacionada provavelmente com seu papel na digestão anaeróbia. Por serem responsáveis pela primeira etapa de tratamento da água residuária, as bactérias provavelmente são mais impactadas pelo substrato complexo utilizado, a vinhaça (Barbosa, 2017).

Ao analisar amostras de lodo anaeróbio de UASB submetido a troca de substrato de vinhaça para melaço, Barbosa (2017) observou que o coeficiente de similaridade das populações do domínio *Bacteria* foi menor e mais variável (59 a 75%) que o do domínio *Archaea* (94 a 95%).

7. CONCLUSÃO

7.1 Conclusão referente a metodologia de medição da dimensão dos grânulos

O estudo do *software* analisador de imagem, Image-Pro Plus (versão 6.0), foi realizado para o conhecimento dos limites de precisão no intuito de utilizar o *software* como ferramenta para determinação de diâmetro de grânulos. A resposta do programa não apresentou erro significativo. Portanto, a metodologia estabelecida e o *software* Image-Pro Plus (versão 6.0) foram considerados ferramentas adequadas para análise granulométrica. O volume de amostra de lodo determinado para o ensaio foi de 10 mL, podendo ser utilizado o montante de 5 mL, caso os grânulos sejam oriundos de reator em escala de bancada.

7.2 Conclusão referente ao estudo das características físicas - distribuição da dimensão dos grânulos e resistência mecânica dos grânulos

Os grânulos analisados apresentaram diâmetro variando entre 0,4 e 5,0 mm em todas as amostras: nos inóculos e nos quatro reatores, R1, R2, R3 e R4.

Os reatores submetidos às porcentagens de recirculação mais elevadas (R3 com 200% e R4 com 400%) apresentaram, na COV 5 gDQOL⁻¹d⁻¹, maior frequência de grânulos na faixa entre 1,6 e 2,0 mm de diâmetro, com 39,4 e 37% de frequência, respectivamente. O aumento gradativo de carga orgânica e velocidade ascensional gerou redução do diâmetro granular para a menor faixa estabelecida, 0,4 a 1,0 mm. Na COV 20 gDQOL⁻¹d⁻¹, R3 e R4 apresentaram 63,6 e 79,1% de grânulos com diâmetro médio na faixa 0,4 a 1,0 mm, respectivamente.

Os reatores submetidos às porcentagens de recirculação menores (R1 com 50% e R2 com 100%) apresentaram diâmetro médio de grânulos na menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm), em todas as fases analisadas. O incremento gradativo de carga orgânica e velocidade ascensional ocasionou aumento da frequência de grânulos na menor faixa de diâmetro: R1 passou de 47,8 para 87,9% e R2, de 39,4 para 52,1%.

A diferença encontrada na distribuição granulométrica dos reatores estudados pôde ser atribuída às diferentes características operacionais aplicadas. A análise da distribuição dos grânulos do inóculo e da manta de lodo nas quatro cargas orgânicas e hidráulicas demonstrou que esses parâmetros, principalmente carga hidráulica, contribuíram para estabelecer a dinâmica de distribuição de tamanho dos grânulos nos sistemas UASB.

A diluição baixa da vinhaça em R1 e a maior velocidade ascensional em R4 causaram alteração mais abrupta no tamanho dos grânulos, em relação aos grânulos dos reatores R2 e R3.

Na última fase analisada, os reatores R1 e R4 apresentaram 87,9 e 79,1% dos grânulos com diâmetros entre 0,4 e 1 mm, respectivamente; enquanto que em R2 e R3, foi de 52,1 e 63,6%, respectivamente. Diante do analisado, concluiu-se que a menor recirculação (50%) e a maior (400%) influenciaram mais significativamente a redução da dimensão granular que as recirculações intermediárias, 100 e 200%. Estatisticamente, a recirculação de 100% foi a que menos causou alterações significativas do diâmetro granular, considerando todo o período de operação.

A agitação de 770 s^{-1} aplicada às amostras reforçou que a agitação hidráulica dentro do reator, que pode ser causada por mecanismos diferentes, como vazão hidráulica e vazão de biogás, causou redução na frequência de grânulos de diâmetro entre 2,1 e 2,5 mm (36,4%) do inóculo.

Nas amostras dos reatores R3 e R4 submetidos a $\text{COV } 5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, a agitação fez com que a maior frequência de grânulos passasse a apresentar diâmetro médio entre 0,4 e 1,0 mm, com 44,8 e 46,2%, respectivamente. Nas demais cargas, 10, 15 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$, observou-se tendência a diminuição da frequência de grânulos na faixa de 0,4 a 1,0 mm. A diminuição notada ocorreu devido à redução do diâmetro dos grânulos pequenos (0,4 a 1,0 mm) a tamanhos que não puderam ser contabilizados ($<0,4 \text{ mm}$).

Observou-se que após agitação ocorreu alteração no montante de partículas. Em alguns casos ocorreu aumento da quantidade de grânulos presentes nas amostras após agitação, quando comparado ao número de grânulos nas amostras antes da agitação. Em outros casos, o número de grânulos na amostra diminuiu. Esse comportamento evidenciou que a agitação de fato causou modificação nos grânulos avaliados. O aumento do número de partículas nas amostras após agitação se deu pela quebra dos grânulos maiores em partículas menores, elevando o montante final de grânulos; e a redução ocorreu devido ao fato das partículas menores que 0,4 mm não serem contabilizadas, devido à limitação do método.

Apesar de terem ocorrido mudanças no tamanho das partículas após a agitação aplicada (teste de resistência), a estrutura granular se manteve, evidenciando que os grânulos analisados eram resistentes, apesar da redução dos diâmetros.

7.3 Conclusão referente ao estudo das características químicas - determinação dos metais presentes na manta de lodo

A manta de lodo de todos os reatores apresentou aumento nas concentrações de magnésio, sódio e potássio em relação ao lodo utilizado como inóculo. Estes metais estavam

presentes em maior quantidade na vinhaça. A concentração de ferro na manta de lodo, no entanto, variou menos, apesar de se encontrar na vinhaça de alimentação em concentrações relativamente altas. As alterações na concentração de cálcio da manta de lodo, em relação ao inóculo, ocorreu devido à variação da concentração de cálcio na vinhaça de alimentação.

A concentração dos elementos químicos presentes na vinhaça utilizada, apesar de elevada quando comparada à utilizada em outros estudos verificados, não causaram danos à estrutura granular, nem ao desempenho do sistema. A eficiência de remoção de matéria orgânica foi maior que 80%, o conteúdo de metano acima de 65% e o rendimento de metano variando de $0,289 \pm 0,060$ a $0,344 \pm 0,064$ $\text{LCH}_4\text{.gDQO}_{\text{removido}}^{-1}$ indicaram a adequação do desempenho dos reatores ao longo da operação.

O aumento lento e gradual da concentração de vinhaça associado às taxas de recirculação aplicadas foram estratégias eficientes para adaptação da biomassa aos constituintes da vinhaça.

7.4 Conclusão referente ao estudo das características biológicas

Em todos os reatores foram visualizados organismos metanogênicos relacionados aos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Também foram observados organismos metanogênicos hidrogenotróficos. A vinhaça de alimentação utilizada em R1 e R2, entre as fases com COV 10 e 20 $\text{gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ apresentou aumento de ácido acético, resultando em possível benefício para as células de *Methanosarcina*, que conseguiram competir com as de *Methanosaeta*. No entanto, a diminuição de acetato presente na vinhaça de alimentação dos reatores R3 e R4 e a maior carga hidráulica favoreceram as células de *Methanosaeta*.

A manutenção de microrganismos metanogênicos ativos e do sistema em equilíbrio, apesar do aumento gradativo de carga orgânica e de vazão, pode ter relação com a presença de elementos químicos na água residuária. Na quantidade fornecida e devido à lenta exposição dos microrganismos à água residuária, os nutrientes não inibiram a atividade microbiana. Zinco, ferro, magnésio, cálcio, sódio e potássio estavam dentre as substâncias encontradas na água residuária.

As análises de PCR e DGGE mostraram que as populações metanogênicas apresentaram índices de similaridade maiores que os de bactérias. Foi possível concluir também que o reator R4 apresentou menor similaridade quanto a manutenção da microbiota de ambos os domínios, em relação aos demais reatores. No entanto, esses resultados não indicaram redução da eficiência geral de R4 no período de tempo analisado.

8. CONCLUSÃO FINAL

Mesmo com resultados elevados de eficiência de tratamento para todos os sistemas, a redução mais acentuada do diâmetro granular, observada para os reatores R1 e R4, sugerem que as taxas de recirculação de 100 e 200% são mais estáveis para a manutenção da granulometria da manta de lodo, no tratamento de vinhaça, em reatores UASB.

O fator observado que foi fundamental para a manutenção dos sistemas em equilíbrio foi o controle da exposição dos grânulos aos constituintes da vinhaça, feito por meio do aumento gradual de carga orgânica volumétrica, promovendo a adaptação da biomassa. A recirculação teve papel importante para o amortecimento da carga orgânica e diluição dos nutrientes em excesso.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desvincular e analisar isoladamente o efeito da velocidade ascensional do líquido e o efeito das forças cisalhantes devido à liberação de biogás dos grânulos;
- Estabelecer protocolo de análise de resistência mecânica dos grânulos de modo a padronizar esse tipo de análise, possibilitando comparação com outros trabalhos;
- Avaliar o efeito isolado do tempo na estrutura granular.

10. REFERÊNCIA

- Abbasi, T. e Abbasi, S. A. 2012. “Formation and Impact of Granules in Fostering Clean Energy Production and Wastewater Treatment in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16(3):1696–1708.
- Abreu, E. F. 2007. “Estudo Da Diversidade Microbiana Metanogênica Em Reatores UASB Tratando Esgoto Sanitário.” Dissertação. Escola de Engenharia da UFMG.
- Agler, M. T., Garcia, M. L., Lee, E. S., Schlicher, M. e Angenent, L. T. 2008. “Thermophilic Anaerobic Digestion to Increase the Net Energy Balance of Corn Grain Ethanol.” *Environmental Science & Technology* 42(17):6723–29.
- Alves, I. 2015. “Caracterização de Grânulos de Reator UASB Empregado No Processamento de Vinhaça.” Dissertação. Escola de engenharia da USP.
- Alves, I., Del Nery, V., Pozzi, E., Damianovic, M. H. R. Z. e Pires, E. C. 2018. “Determining the Distribution of Granule Diameter from Biological Sludge.” *MethodsX* 5: 727-736.
- APHA, AWWA, WEF, 2005. “Standard methods for the examination of water and wastewater”. 21 st. ed. Washington DC, APHA.
- Barbosa, M. Y. U. 2017. “Reator Anaeróbio Alimentado Com Vinhaça Da Cana-de-Açúcar: Avaliação Dos Efeitos Causados Pela Interrupção Na Alimentação e Estratégias Para Mitigação.” Escola de Engenharia da USP.
- Barros, V. G., Duda, R. M., Vantini, J. S., Omori, W. P., Ferro, M. I. T., Oliveita, R. A. 2017. “Improved Methane Production from Sugarcane Vinasse with Filter Cake in Thermophilic UASB Reactors, with Predominance of Methanothermobacter and Methanosarcina Archaea and Thermotogae Bacteria.” *Bioresource Technology* 244:371–81.
- Batstone, D. J., Keller, J. e Blackall, L. L. 2004. “The Influence of Substrate Kinetics on the Microbial Community Structure in Granular Anaerobic Biomass.” 38:1390–1404.
- Bernal, A. P., Santos, I. F. S., Silva, A. P. M., Barros, R. M. B. e Ribeiro, E. M.. 2017. “Vinasse Biogas for Energy Generation in Brazil An Assessment of Economic Feasibility, Energy Potential and Avoided CO₂ emissions.” *Journal of Cleaner Production* 151:260–71.
- Bhunia, P. e Ghangrekar, M. M. 2007. “Required Minimum Granule Size in UASB Reactor and Characteristics Variation with Size.” *Bioresource Technology* 98:994–99.
- Bishop, P. L., Zhang, T. C. e Fu, Y. 1995. “Effects of Biofilm Structure, Microbial Distributions and Mass Transport on Biodegradation Processes.” *Water Science and Technology* 31(1):143–52.
- Boonyakitsombut, S., Kim, M. I., Ahn, Y. H. e Speece, R. E. 2002. “Degradation of Propionate

- and Its Precursors: The Role of Nutrient Supplementation.” *KSCE Journal of Civil Engineering* 6(4):379–87.
- Campos, J. R.. 1999. *Tratamento de Esgotos Sanitários Por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada No Solo*. 1ª edição. Rio de Janeiro.
- Chatterjee, P. e Ghangrekar, M. M.. 2017. “Biomass Granulation in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor Treating 500 m³/Day Low-Strength Sewage and Post Treatment in High-Rate Algal Pond.” *Water Science and Technology* 76(5):1234–42.
- Chen, J. e Lun, S. 1993. “Study on Mechanism of Anaerobic Sludge Granulation in UASB Reactors.” *Water Science and Technology* 28(7):171–78.
- Chen, Y., Cheng, J. J. e Creamer, K. S. 2008. “Inhibition of Anaerobic Digestion Process: A Review.” *Bioresource Technology* 99(10):4044–64.
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U. e Fontanetti, C. S. 2013. “Sugarcane Vinasse: Environmental Implications of Its Use.” *Waste Management* 33(12):2752–61.
- Conklin, A., Stensel, H. D., Ferguson, J. 2006. “Growth Kinetics and Competition Between Methanosarcina and Methanosaeta in Mesophilic Anaerobic Digestion.” *Water Environment Research* 78(5): 486-96.
- Costa, F. J. C. B., Rocha, B. B. M., Viana, C. E. e Toledo, A. C.. 1986. “Utilization of Vinasse Effluents from an Anaerobic Reactor.” *Water Science and Technology* 18(12):135–41.
- Cruz-salomón, A., Meza-Gordillo, R., Rosales-Quintela, A., Venture-Canseco, C., Lagunas-Rivera, S., Carrasco-Cervantes, J. 2017. “Biogas Production from a Native Beverage Vinasse Using a Modified UASB Bioreactor.” *Fuel* 198:170–74.
- Danianovic, M. H. R. Z. e Foresti, E.. 2009. “Dynamics of Sulfidogenesis Associated to Methanogenesis in Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass Reactor.” *Process Biochemistry* 44:1050–54.
- Díaz, miliano E., Alfons, J. M. Stams, R. A. e Sanz, J. L. 2006. “Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater.” *Applied and Environmental Microbiology* 72(7):4942–4949.
- Drissen, W. J. B. M., Tielbaard, M. H. e Vereijken, T. L. F. M. 1994. “Experience on Anaerobic Treatment of Distillery Effluent with the UASB Process.” *Water Science and Technology* 30(12):193–201.
- Fermoso, F. G. Bartacek, J., Manzano, Van Leeuwen, H. P. e Lens, P. N. L. 2010. “Dosing of Anaerobic Granular Sludge Bioreactors with Cobalt: Impact of Cobalt Retention on

- Methanogenic Activity.” *Bioresource Technology* 101(24):9429–37.
- Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., Zaiat, M. 2017. “Thermophilic Two-Phase Anaerobic Digestion Using an Innovative Fixed-Bed Reactor for Enhanced Organic Matter Removal and Bioenergy Recovery from Sugarcane Vinasse.” *Applied Energy* 189:480–91.
- Ghangrekar, M. M., Asolekar, S. R., Ranganathan, K. R. e Joshi, S. G.. 1996. “Experience with UASB Reactor Start-up under Different Operating Conditions.” *Water Science and Technology* 34(5–6).
- De Graaff, M. S., Temmink, H., Zeeman, G. Van Loosdrecht, M. C. M. e Buisman, C. J. N.. 2011. “Autotrophic Nitrogen Removal from Black Water: Calcium Addition as a Requirement for Settleability.” *Water Research* 45:63–74.
- Grady, C. P. Leslie, Glen T. Daigger, Nancy G. Love, and Carlos D. M. Filipe. 1999. *Biological Wastewater Treatment*. edited by IWA Publishing.
- Grotenhuis, J. T. C., Kissel, J. C., Plugoe, C. M., Stams, A. J. M. e Zehnder, A. J. B.. 1991. “Role of Substrate Concentration in Particle Size Distribution of Methanogenic Granular Sludge in Uasb Reactors.” *Water Research* 25(1):21–27.
- Grotenhuis, J. T. C., Smit, M., Plugge, C. M., Van Xu, Y. 1991. “Bacteriological Composition and Structure of Granular Sludge Adapted to Different Substrates.” *Applied and Environmental Microbiology* 57(7):1942–49.
- Guiot, S. R., Pauss, A. e Costerton, J. W. 1992. “A Structured Model of the Anaerobic Granule Consortium.” *Water Science and Technology* 25(7):1–10.
- Gujer, W. e Zehnder, A. J. B.. 1983. “Conversion Processes in Anaerobic Digestion.” *Water Science and Technology* 15(8–9):127–67.
- Van Haandel, A. C. 2005. “Integrated Energy Production and Reduction of the Environmental Impact at Alcohol Distillery Plants.” *Water Science and Technology* 52(1–2):49–57.
- Van Haandel, Adrianus C. and Paula Frassinetti Cavalcanti Catunda. 1994. “Profitability Increase of Alcohol Distilleries by the Rational Use of Byproducts.” *Water Science and Technology* 29(8):117–24.
- Hashemian, S. J., Torkian, A., Hakimjavadi, M. e Azimi, E. 2005. “Anaerobic Degradation of Molasses Stillage in a Pilot UASB Reactor.” *Scientia Iranica* 12(3):255–61.
- Huang, J. e Pinder, K. L. 1994. “Effects of Calcium on Development of Anaerobic Acidogenic Biofilms.” *Biotechnology and Bioengineering* 45(3):212–18.
- Hulshoff Pol, L. W., Lopes, S. I. C. Lettinga, G. e Lens, P. N. L. 2004. “Anaerobic Sludge Granulation.” *Water Research* 38(6):1376–89.

- Hulshoff Pol, L. W., De Zeeuw, W. J., Velzeboer, C. T. M. e Lettinga, G. 1983. “Granulation in UASB-Reactors.” *Water Science and Technology* 15(8–9):291–304.
- Jackson-Moss, C. A. e Duncan, J. R.. 1991. “The Effect of Aluminium on Anaerobic Digestion.” *Biotechnology Letters* 13(2):143–48.
- Kosaric, N., Blaszczyk, R., Orphan, L. e Valladares, J.. 1990. “The Characteristics Of Granules From Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors.” *Water Research* 24(12):1473–77.
- Kroeker, E. J., Schulte, D. D., Sparling, A. B. e Lapp, H. M. 1979. “Anaerobic Treatment Process Stability.” *Water Environment Federation* 51(4):718–27.
- Kugelman, I. J. e McCarty, P. L. 1965. “Cation Toxicity and Stimulation in Anaerobic Waste Treatment.” *Water Pollution Control Federation* 37(1):97–116.
- Leenawat, A., Jutakradsada, P., Laungphairojana, A., Rodriguez, J. F. e Kamwilaisak, K. 2016. “Effect of Temperature on Increasing Biogas Production from Sugar Industrial Wastewater Treatment by UASB Process in Pilot Scale.” *Energy Procedia* 100:30–33.
- Lettinga, G., Field, J., Van Lier, J. Zeeman, G. e Huishoff Pol, L. W. 1997. “Advanced Anaerobic Wastewater Treatment in the near Future.” *Water Science and Technology* 35(10).
- Lettinga, G., Van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., De Zeeuw, W. e Klapwijk, A. 1980. “Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment, Especially for Anaerobic Treatment.” *Biotechnology and Bioengineering* 22(4):699–734.
- Li, J., Wang, J., Zhaokun, L., Ji, Z. e Yu, L. 2012. “Biological Sulfate Removal from Acrylic Fiber Manufacturing Wastewater Using a Two-Stage UASB Reactor.” *Journal of Environmental Sciences* 24(2):343–50.
- Van Lier, J. B., Van der Zee, F. P., Frijters, C. T. M. J. e Ersahin, M. E. 2015. “Celebrating 40 Years Anaerobic Sludge Bed Reactors for Industrial Wastewater Treatment.” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14(4):681–702.
- Lim, S. J. e Kim, T. 2014. “Applicability and Trends of Anaerobic Granular Sludge Treatment Processes.” *Biomass and Bioenergy* 60:189–202.
- Liu, Y., Liu, Z., Wang, F., Chen, Y., Kuschik, P., Wang, X. 2014. “Regulation of Aerobic Granular Sludge Reformulation after Granular Sludge Broken: Effect of Poly Aluminum Chloride (PAC).” *Bioresource Technology* 158:201–8.
- Longo, R. R. 2015. “Geração de Metano Em Reator UASB: Avaliação de Parâmetros de Monitoramento Para Controle Do Processo de Tratamento Anaeróbio de Vinhaça.” Universidade de São Paulo.

- Lu, X., Zhen, G., Estrada, A. L., Chen, M., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y. 2015. "Operation Performance and Granule Characterization of Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor Treating Wastewater with Starch as the Sole Carbon Source." *Bioresource Technology* 180:264–73.
- Lu, Y., Slater, F., Bello-Mendoza, R. e Batstone, D. J. 2013. "Shearing of Biofilms Enables Selective Layer Based Microbial Sampling and Analysis." *Biotechnology and Bioengineering* 110(10):2600–2605.
- MacLeod, F. A., Guiot, S. R. e Costerton J. W. 1990. "Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in an Upflow Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor." *Applied and Environmental Microbiology* 56(6):1598–1607.
- McCarty, P. L. 1964. "Anaerobic Waste Treatment Fundamentals." *Public Works* 95(9):107–112.
- McHugh, S., ÓReilly, C., Mahony, T., Colleran, E. e ÓFlaherty, V. 2003a. "Tracking Historical Papers and Their Citations." *Environmental Science and Bio/Technology* (2):225–45.
- Miqueleto, A. P. 2006. "Polímeros Extracelulares Insolúveis (ESP) Nos Reatores Anaeróbios Operados Em Bateladas Sequenciais: Caracterização e Fatores Que Favorecem a Produção." Universidade de São Paulo.
- Mirsepasi, A., Honary, H. R., Mesdaghinia, A. R., Mahvi, A., Vahid, H., e Karyab, H. 2006. "performance evaluation of full scale in uasb reactor" 3(2):79–84.
- Moraes, B. S., Junqueira, T. L., Pavanello, L. G., Cavalett, O., Mantelatto, P. E., Bonomi, A. e Zaiat, M. 2014. "Anaerobic Digestion of Vinasse from Sugarcane Biorefineries in Brazil from Energy, Environmental, and Economic Perspectives: Profit or Expense?" *Applied Energy* 113:825–35.
- Morgan, J. W., Evison, L. M. e Forster, C. F.. 1991. "The Internal Architecture of Anaerobic Sludge Granules." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 50(2):211–26.
- Del Nery, V., Damianovic, M. H., Moura, R. B, Pozzi, E., Pires, E. C., Foresti, E. 2016. "Poultry Slaughterhouse Wastewater Treatment Plant for High Quality Effluent." *Water Science and Technology* 73(2):309–16.
- Del Nery, V., Alves, I., Damianovic, M. H. R. Z. e Pires, E. C. 2018. "Hydraulic and Organic Rates Applied to Pilot Scale UASB Reactor for Sugar Cane Vinasse Degradation and Biogas Generation." *Biomass and Bioenergy* 119:411–17.
- Del Nery, V., .Pozzi, E. Damianovic, M. H. R. Z. Domingues, M. R. e Zaiat, M. 2008. "Granules Characteristics in the Vertical Profile of a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor Treating Poultry Slaughterhouse Wastewater." *Bioresource Technology*

- 99(6):2018–24.
- Neto, J. A. L. 2008. “Monitoramento de Componentes Químicos Da Vinhaça Aplicados Em Diferentes Tipos de Solo.” Escola Superior de Agricultura da USP.
- Nnaji, C. C. 2014. “A Review of the Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor.” *Desalination and Water Treatment* 52(22–24):4122–43.
- Odriozola, M., López, I. e Borzacconi, L. 2016. “Modeling Granule Development and Reactor Performance on Anaerobic Granular Sludge Reactors.” *Journal of Environmental Chemical Engineering*.
- Parkin, G. F., Lynch, N. A., Kuo, W. C., Vankeuren, E. L. e Bhattacharya, S. K.. 1990. “Interaction between Sulfate Reducers and Methanogens Fed Acetate and Propionate.” *Research Journal of the Water Pollution Control Federation* 62(6):780–88.
- Parkin, G. F., Speece, R. E., Yang, C. H. J. e Kocher, W. M.. 1983. “Response of Methane Fermentation Systems to Industrial Toxicants.” *Water Environment Federation* 55(1):44–53.
- Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., Zaiat, M. 2013. “Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors” *International journal of hydrogen energy*, 38: 6137-6145.
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C.; Fontes, D. M. L., Borzacconi, L., Etchebehere, C. 2013. “Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey”. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1): 54–62.
- Petta, L., De Gisi, S., Casella, P., Farina, R. e Notarnicola, M. 2017. “Evaluation of the Treatability of a Winery Distillery (Vinasse) Wastewater by UASB, Anoxic-Aerobic UF-MBR and Chemical Precipitation/Adsorption.” *Journal of Environmental Management* 201:177–89.
- Puñal, A., S. Brauchi, J. G. R. e Chamy, R. 2003. “Dynamics of Extracellular Polymeric Substances in UASB and EGSB Reactors Treating Medium and Low Concentrated Wastewaters.” *Water Science and Technology* 48(6):41–49.
- Puñal, A. e Lema, J. M. 1999. “Anaerobic Treatment of Wastewater from a Fish-Canning Factory in a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor.” *Water Science and Technology* 40(8):57–62.
- Rajagopal, R., Saady, N. M. C., Torrijos, M., Thanikal, J. V. e Hung, Y. 2013. “Sustainable Agro-Food Industrial Wastewater Treatment Using High Rate Anaerobic Process.” *Water*

5:292–311.

- Ribas, M. M. F.. 2006. “Tratamento de Vinhaça Em Reator Anaeróbio Operado Em Batelada Seqüencial Contendo Biomassa Imobilizada Sob Condições Termofílicas e Mesofílicas.” Universidade de São Paulo.
- Ripley, L. E., Boyle, W. C. e Converse, J. C. 1986. “Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion Of Wastes.” *Water Pollution Control Federation* 58(5):406–11.
- Robles-gonzález, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N. e Poggi-Varaldo, H. M. 2012. “Treatment of Mezcal Vinasses : A Review.” *Journal of Biotechnology* 157:524–46.
- Rosa, A. P., Chernicharo, C. A. L., Lobato, L. C. S., Silva, R. V., Padilha, R. F., Borges, J. M. 2018. “Assessing the Potential of Renewable Energy Sources (Biogas and Sludge) in a Full-Scale UASB-Based Treatment Plant.” *Renewable Energy* 124:21–26.
- Saiki, Y., Iwabuchi, C., Katami, A. e Kitagawa, Y. 2002. “Microbial Analyses by Fluorescence in Situ Hybridization of Well-Settled Granular Sludge in Brewery Wastewater Treatment Plants.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93(6):601–6.
- Sam-Soon, P., Loewenthal, R. E., Dold, P. L. e Marais, G. V. R. 1987. “Hypothesis for Pelletisation in the Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor.” *Water SA* 13(2):69–80.
- Schmidt, J. E. e Ahring, B. K.. 1995. “Review: Granular Sludge Formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors.” *Biotechnology and Bioengineering* 49(3):229–46.
- Şentürk, E., İnce, M. e Engin, G. O. 2010. “Treatment Efficiency and VFA Composition of a Thermophilic Anaerobic Contact Reactor Treating Food Industry Wastewater.” *Journal of Hazardous Materials* 176(1–3):843–48.
- Show, K. Y., Wang, Y., Foong, S. F. e Tay, J. H. 2004. “Accelerated Start-up and Enhanced Granulation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors.” *Water Research* 38(9):2292–2303.
- Soubes, M. 1994. “Microbiologia de La Digestion Anaerobia.” *Anais III Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales . Montevideo, Uruguay.*, 15–28.
- Dias, M. O. S., Maciel, R., Mantelatto, P. E., Cavalett, O., Rossell, C. E. V., Bonomi, A., Leal, M. R. L. V. 2015. “Sugarcane Processing for Ethanol and Sugar in Brazil.” *Environmental Development* 15:35–51.
- Souza, M. E., G. F. e Polegato, A. R. 1992. “Thermophilic Anaerobic Digestion of Vinasse in Pilot Plant UASB Reactor.” *Water Science and Technology* 25(7):213–22.

- Speece, R. E. 1988. "A Survey of Municipal Anaerobic Sludge Digesters and Diagnostic Activity Assays." *Water Research* 22(3):365–72.
- Sterritt, R. M. e Lester, J. N. 1980. "Interactions of Heavy Metals with Minerals." *The Science of the Total Environment* 14:5–17.
- Subramanyam, R. e Mishra, I. M.. 2013. "Characteristics of Methanogenic Granules Grown on Glucose in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor." *Biosystems Engineering* 114(2):113–23.
- Takashima, M. e Speece, R. E. 1989. "Mineral Nutrient Requirements for High Rate Methane Fermentation Acetate at Low SRT." *Research Journal WPCF* 61(11):1645–50.
- Tian, Z., Mohan, G. R., Ingram, L. e Pullammanappallil, P. 2013. "Anaerobic Digestion for Treatment of Stillage from Cellulosic Bioethanol Production." *Bioresource Technology* 144:387–95.
- UNICA. 2018a. Acompanhamento Quinzenal Da Safra Na Região Centro-Sul: Posição Até 01/11/2018. Acesso em 19 de novembro de 2018 (<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=63>).
- UNICA. 2018b. Relatório Final Da Safra 2017/2018 Da Região Centro-Sul. Acesso em dezembro de 2018 (<file:///C:/Users/inaea/Downloads/b851e3557530ca223a81fccc166a6c3e.pdf>).
- UNICA. 2016. "Vinhaça é Opção Viável Para Produção de Energia Limpa." Acesso em 6 de junho de 2018 (<http://www.unica.com.br/na-midia/41597945920337549416/vinhaca-e-opao-viavel-para-producao-de-energia-limpa-/>).
- Varesche, M. B. A., Sakamoto, I. K. e Oliveira, L. L. 2013. "Técnicas de Biologia Molecular." *Engenharia Ambiental - Conceitos, Tecnologia e Gestão*, editado por Elsevier Editora Ltda, 80-91.
- Wang, Z., Liu, I., Yao, J. e Cai, W. 2006. "Effects of Extracellular Polymeric Substances on Aerobic Granulation in Sequencing Batch Reactors." *Chemosphere* 63(10):1728-1735.
- Wiegant, W. M. 1987. "The 'Spaghetti Theory' on Anaerobic Sludge Formation, or the Inevitability of Granulation". *Granular Anaerobic Sludge: Microbiology and Technology, The Netherlands: Wageningen*.
- Wilkie, A. C., Riedesel, K. J. e Owens, J. M. 2000. "Stillage Characterization and Anaerobic Treatment of Ethanol Stillage from Conventional and Cellulosic Feedstocks." *Biomass and Bioenergy* 19(2):63–102.
- Xing, B., Guo, Q., Yang, G., Zhang, Z., Li, P., Guo, L., Jin, R. 2015. "The Properties of Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Granules : Roles of Ambient Temperature,

Salinity and Calcium Concentration.” *Separation And Purification Technology* 147:311–18.

Yan, Y. e Tay, J. 1997. “Characterisation of the Granulation Process during UASB Start-Up.” *Water Research* 31(7):1573–80.

Yang, J. e Speece, R. 1986. “The Effects of Chloroform Toxicity on Methane Fermentation.” *Water Research* 20(10):1273–79.

Yu, H. Q., Tay, J. H. e Fang, H. H. P. 2001. “The Roles of Calcium in Sludge Granulation during UASB Reactor Start-Up.” *Water Research* 35(4):1052–60.

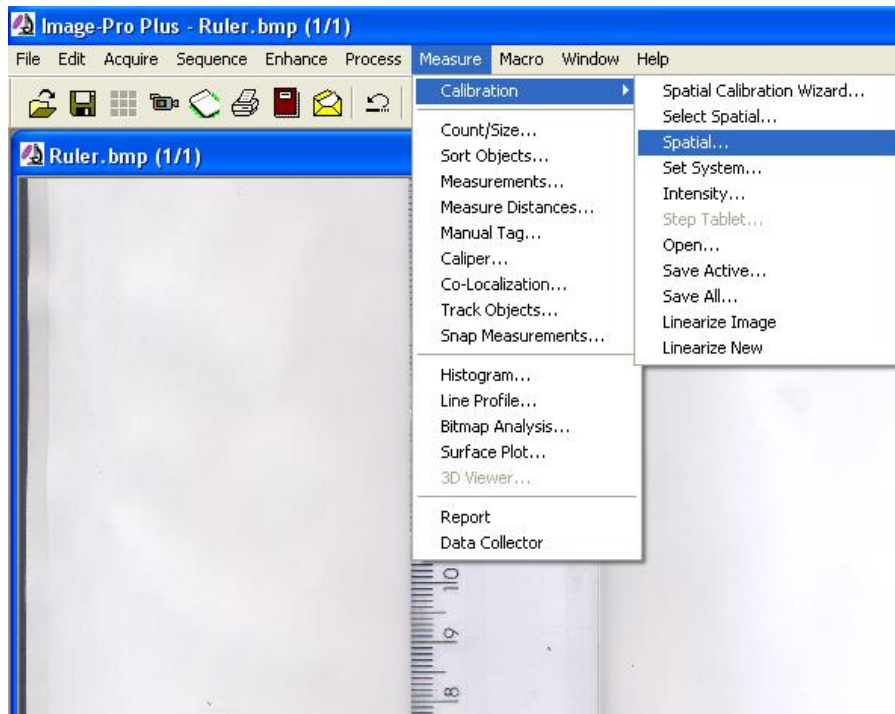
Zeeuw, W. 1984. “Acclimatization of Anaerobic Sludge for Uasb-Reactor Start-Up.” 1–168.

APÊNDICE A:

Imagens pormenorizadas dos procedimentos de calibração inicial do *software* e de análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)

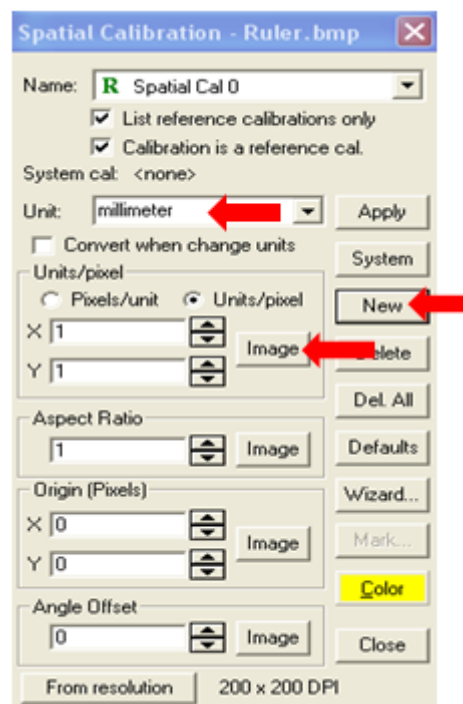
Procedimentos de calibração inicial do *software* analisador de imagem

Figura A1. Passo 1 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0)



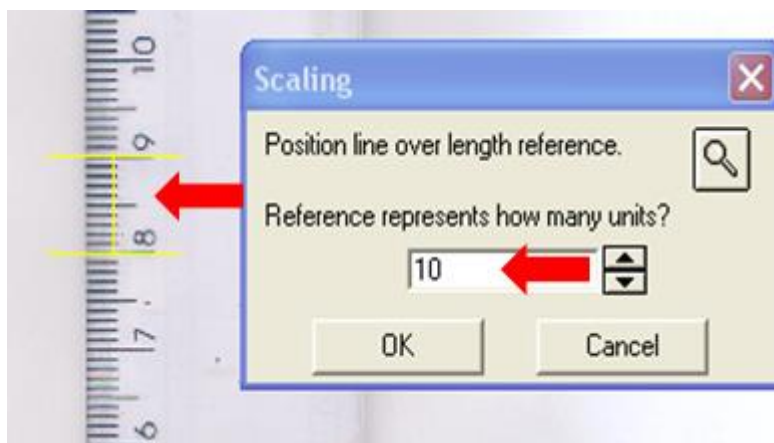
Fonte: elaborada pela autora

Figura A2. Passo 2 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0)



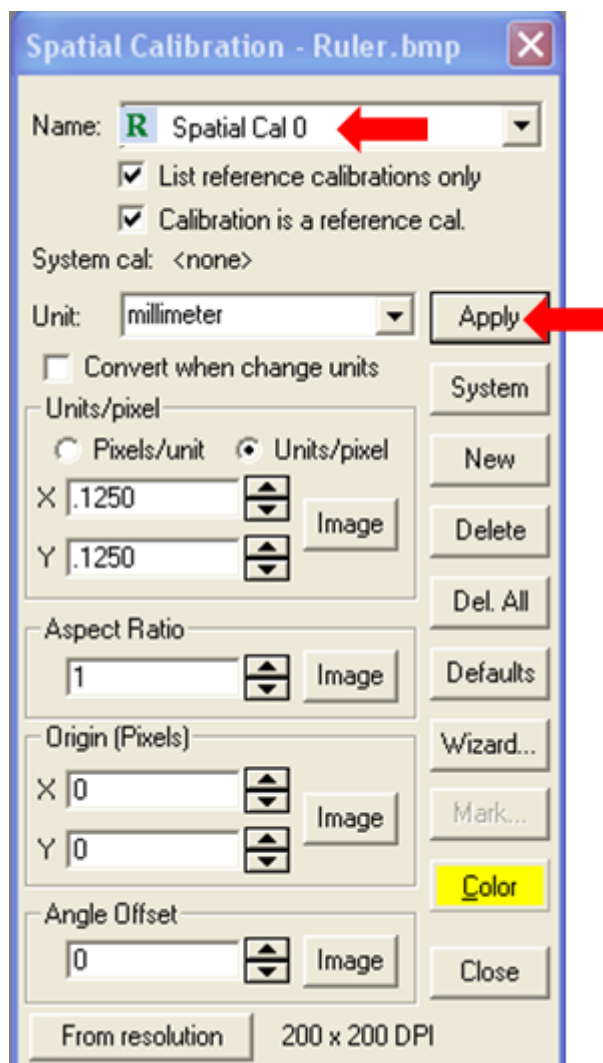
Fonte: elaborada pela autora

Figura A3. Passo 3 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0)



Fonte: elaborada pela autora

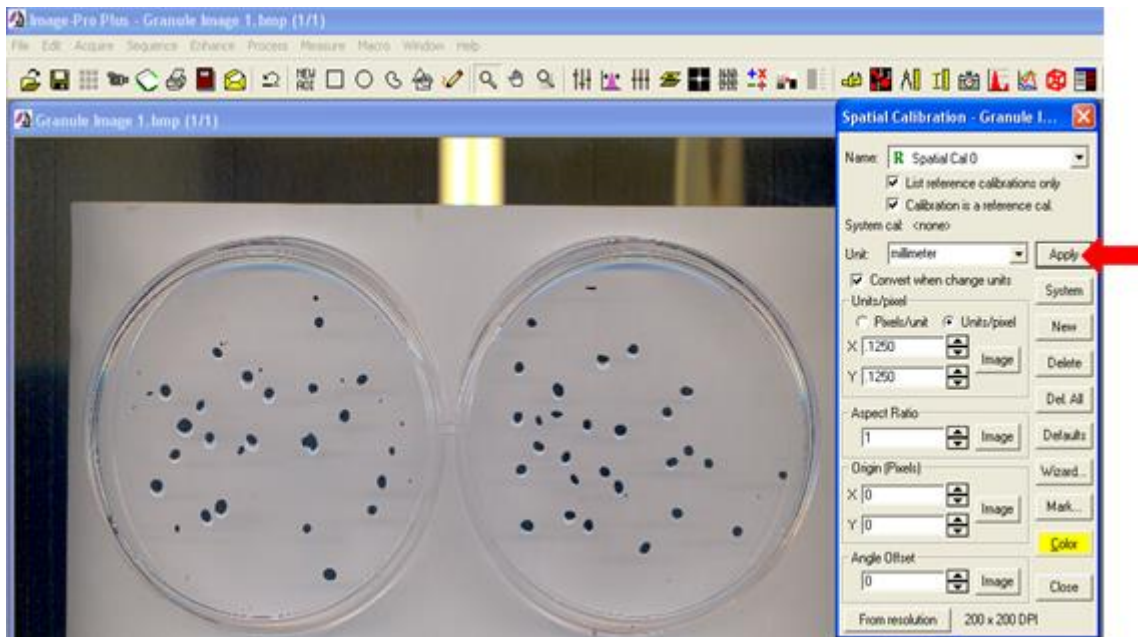
Figura A4. Passo 4 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0)



Fonte: elaborada pela autora

Procedimentos de análise de imagem

Figura A5. Passo 1 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



Fonte: elaborada pela autora

Figura A6. Passo 2 para análise da imagem utilizando o software ImagePro-Plus (versão 6.0)



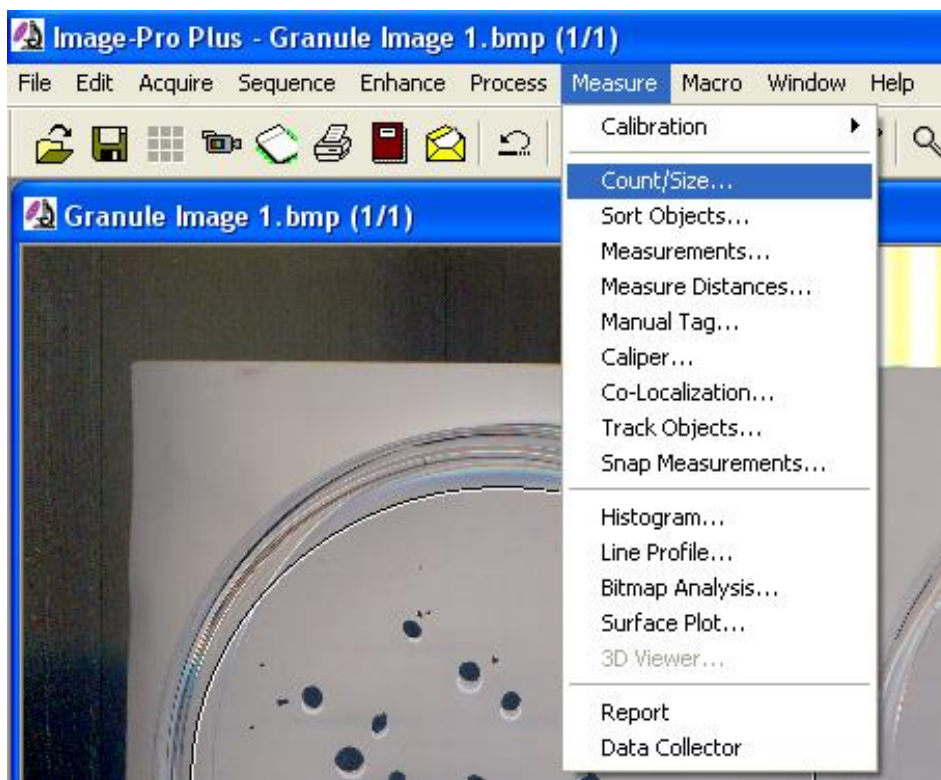
Fonte: elaborada pela autora

Figura A7. Passo 3 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



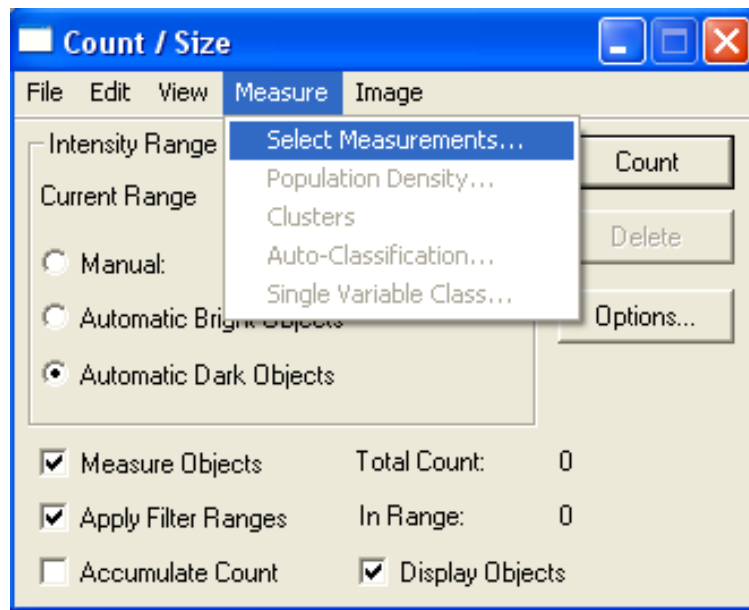
Fonte: elaborada pela autora

Figura A8. Passo 4 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



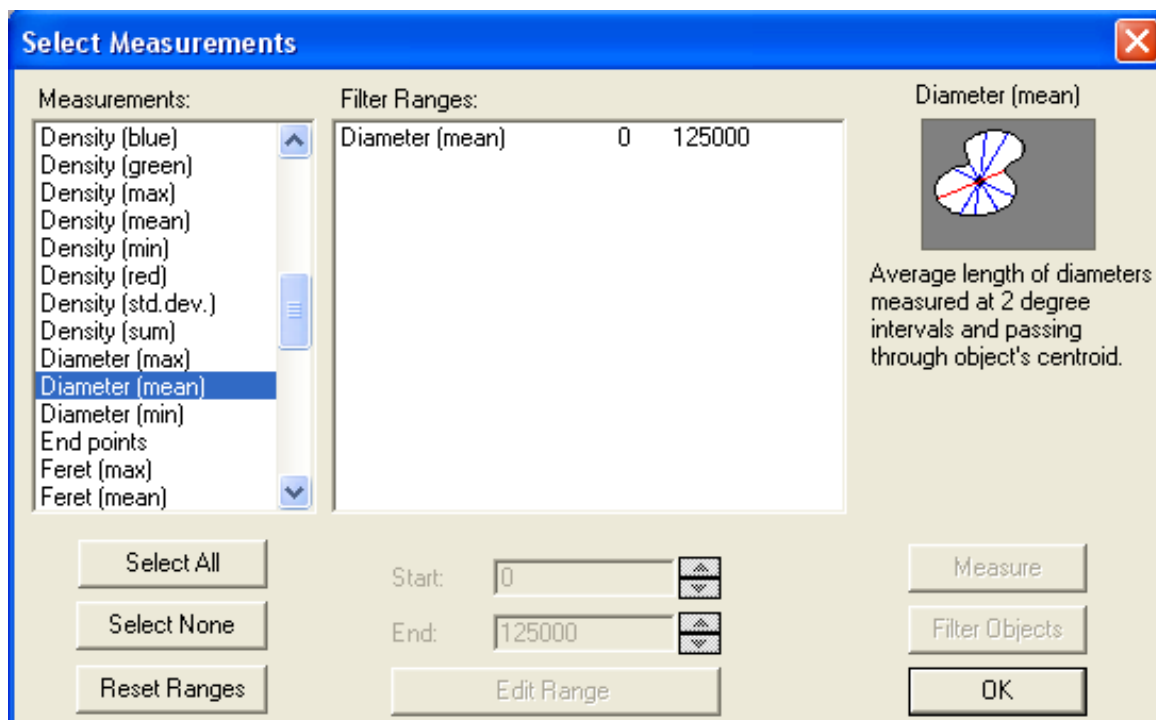
Fonte: elaborada pela autora

Figura A9. Passo 5 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



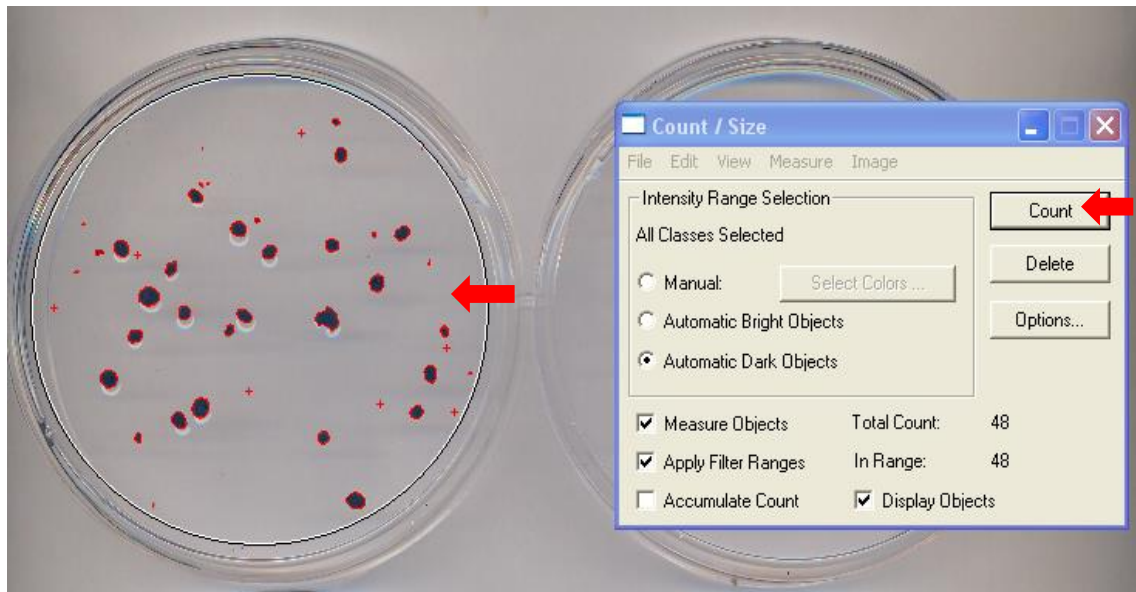
Fonte: elaborada pela autora

Figura A10. Passo 6 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



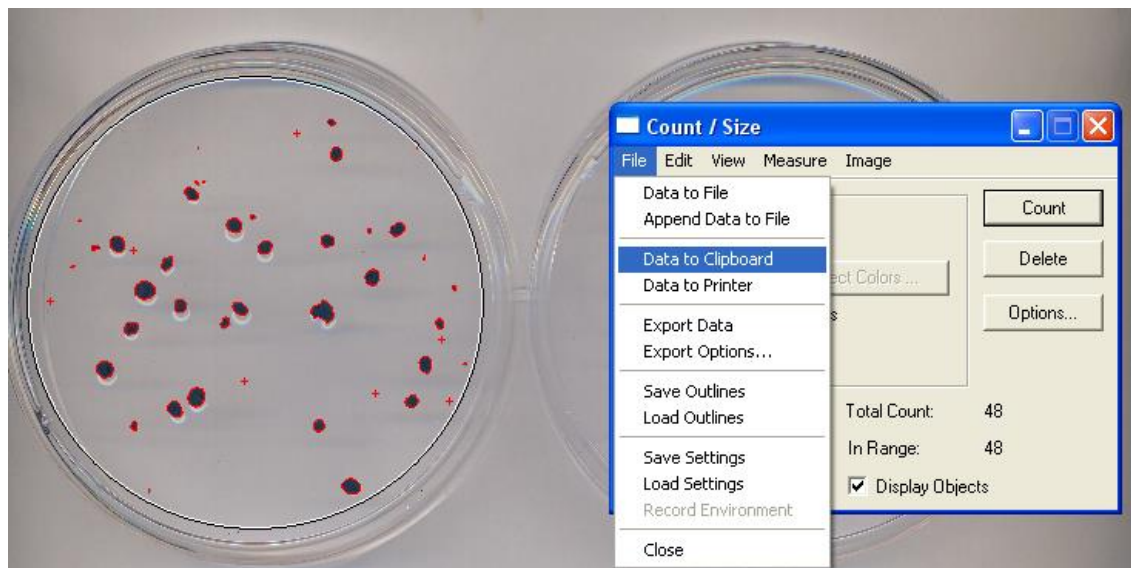
Fonte: elaborada pela autora

Figura A11. Passo 7 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



Fonte: elaborada pela autora

Figura A12. Passo 8 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0)



Fonte: elaborada pela autora

APÊNDICE B:

Análise estatística dos dados de distribuição granulométrica dos grânulos do inóculo e dos reatores R1, R2, R3 e R4 para avaliação do efeito do aumento da carga hidráulica e orgânica nos grânulos biológicos

Teste estatístico aplicado aos dados de distribuição granulométrica para o reator R1 - 50% de recirculação

O resultado do teste de Kruskal-Wallis implicou em $p = 0$, (Tabela B1). Portanto, é possível afirmar que há pelo menos uma amostra diferente das demais. A partir dos resultados do teste de Tukey (Tabela B2), pode-se dizer que há diferença significativa entre todas as amostras analisadas do reator R1.

Tabela B1. *Output* do teste de Kuskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R1

Kruskal-Wallis test for equal medians

| | |
|---------------------------------------|------|
| <i>H</i> (chi^2): | 2556 |
| <i>H_c</i> (tie corrected): | 2593 |
| <i>p</i> (same): | 0 |

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela B2. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R1

Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.
Significant comparisons are pink.

| | Inóculo | COC 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
|----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Inóculo | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COC 5,0 | 25,19 | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 10,0 | 45,97 | 20,78 | | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 15,0 | 55,18 | 29,99 | 9,205 | | 1,724E-05 |
| COV 20,0 | 75,93 | 50,74 | 29,96 | 20,75 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Teste estatístico aplicado aos dados de distribuição granulométrica para o reator R2 - 100% de recirculação

O resultado do teste de Kruskal-Wallis implicou em $p = 2,259E^{-53}$ (Tabela B3). Portanto, pode-se afirmar que há pelo menos uma amostra diferente das demais. A partir dos resultados do teste Tukey (Tabela B4), pode-se dizer que há diferença significativa na maioria das comparações realizadas pelo teste. Foram consideradas iguais apenas as amostras expostas às COV 5 e 10 $gDQOL^{-1}d^{-1}$ (com $p = 0,9834$) e as expostas às COV 15 e 20 $gDQOL^{-1}d^{-1}$ (com $p = 0,9918$).

Tabela B3. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R2**Kruskal-Wallis test for equal medians**

H (*chi*²): 251,1
*H*_c (tie corrected): 252,1
p (same): 2,259E-53

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela B4. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R2

Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.
 Significant comparisons are pink.

| | Inóculo | COV 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
|----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Inóculo | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 5,0 | 18,05 | | 0,9834 | 4,947E-05 | 2,04E-05 |
| COV 10,0 | 18,81 | 0,7602 | | 0,0004023 | 6,754E-05 |
| COV 15,0 | 24,61 | 6,564 | 5,804 | | 0,9918 |
| COV 20,0 | 25,24 | 7,195 | 6,435 | 0,6311 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Teste estatístico aplicado aos dados de distribuição granulométrica para o reator R3 - 200% de recirculação

O resultado do teste de Kruskal-Wallis implicou em $p = 0$ (Tabela B5). Portanto, como p foi menor que 0,05, descarta-se a hipótese nula. Sendo assim, pode-se afirmar que há pelo menos uma amostra que apresenta mediana diferente das demais. A partir dos resultados do teste Tukey (Tabela B6), pode-se dizer que há diferença significativa entre todas as amostras analisadas do reator R3.

Tabela B5. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R3**Kruskal-Wallis test for equal medians**

H (*chi*²): 1724
*H*_c (tie corrected): 1732
p (same): 0

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela B6. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R3

Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.
Significant comparisons are pink.

| | inóculo | COV 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
|----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| inóculo | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 5,0 | 36,87 | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 10,0 | 58,05 | 21,17 | | 0,003879 | 0,0001116 |
| COV 15,0 | 53,06 | 16,18 | 4,987 | | 1,724E-05 |
| COV 20,0 | 64,29 | 27,42 | 6,247 | 11,23 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Teste estatístico aplicado aos dados de distribuição granulométrica para o reator R4 - 400% de recirculação

O resultado do teste de Kruskal-Wallis, assim como o resultado para as amostras do reator R3, implicou em $p = 0$ (Tabela B7). Portanto, descarta-se a hipótese nula. Sendo assim, pode-se afirmar que há pelo menos uma amostra que apresenta mediana diferente das demais. A partir dos resultados do teste Tukey (Tabela B8), pode-se dizer que há diferença significativa entre todas as amostras analisadas do reator R4.

Tabela B7. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R4

Kruskal-Wallis test for equal medians

$H(\chi^2)$: 2514
 H_c (tie corrected): 2536
 p (same): 0

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela B8. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R4

Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal.
Significant comparisons are pink.

| | Inóculo | COV 5,0 | COV 10,0 | COV 15,0 | COV 20,0 |
|----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Inóculo | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 5,0 | 33,81 | | 1,724E-05 | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 10,0 | 50,87 | 17,07 | | 1,724E-05 | 1,724E-05 |
| COV 15,0 | 69,59 | 35,78 | 18,71 | | 2,902E-05 |
| COV 20,0 | 76,44 | 42,63 | 25,56 | 6,846 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

APÊNDICE C:

Análise estatística dos dados de distribuição granulométrica dos grânulos do inóculo e dos reatores R1, R2, R3 e R4, antes e após agitação, para avaliação do efeito da agitação mecânica nos grânulos biológicos

Análise estatística dos grânulos do inóculo e dos reatores R2, R3, R4 e R5 – antes e após agitação

Para facilitar a identificação, as amostras submetidas à agitação estão, aqui nesta seção, ressaltadas por *.

O teste de Kruskal-Wallis aplicado as amostras, antes e após agitação, dos reatores R1, R2, R3 e R4 apresentou $p = 0$ (Tabela C1), $p = 1,877E^{-96}$ (Tabela C2), $p = 0$ (Tabela C3), $p = 0$ (Tabela C4), respectivamente. Como $p < 0,05$ em todos os casos, constatou-se que poderia haver diferença significativa, em pelo menos uma das amostras analisadas em cada reator, devido à agitação.

O teste Tukey, aplicado em R1, mostrou que na menor COV ($5 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$) houve mudança na distribuição de diâmetro médio após agitação, enquanto, nas demais cargas, não ocorreram alterações significativas (Tabela C5).

Em R2, não houve diferença estatística, causada pela agitação, na distribuição granulométrica em nenhuma das fases analisadas (Tabela C6).

Em R3, as amostras nas COV 5 e $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ apresentaram diferença significativa quando comparadas antes e após agitação. Já nas cargas mais altas (COV 15 e $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), a agitação não provocou mudanças representativas no diâmetro dos grânulos (Tabela C7).

A agitação aplicada na amostra submetida às COV 10 e $15 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ não causou diferença significativa para a distribuição granulométrica. No entanto, na menor e na maior COV (5 e $20 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$), a agitação influenciou na distribuição granulométrica do reator R4, consideravelmente. A amostra de grânulos submetidos à COV $10 \text{ gDQOL}^{-1}\text{d}^{-1}$ apresentou distribuição granulométrica estatisticamente igual a amostra da COV 5* (Tabela C8).

Tabela C1. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R1, antes e após agitação

Kruskal-Wallis test for equal medians

H (*chi*²): 3579
*H*_C (tie corrected): 3617
p (same): 0

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C2. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R2, antes e após agitação

Kruskal-Wallis test for equal medians

H (*chi*²): 472,5
*H*_C (tie corrected): 474,2
p (same): 1,877E-96

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C3. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R3, antes e após agitação

Kruskal-Wallis test for equal medians

H (*chi*²): 3024
*H*_C (tie corrected): 3038
p (same): 0

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C4. *Output* do teste de Kruskal-Wallis para os dados de distribuição granulométrica do R4, antes e após agitação

Kruskal-Wallis test for equal medians

H (*chi*²): 3885
*H*_C (tie corrected): 3914
p (same): 0

There is a significant difference between sample medians

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C5. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica de R1, antes e após agitação

| | Inóculo | Inóculo* | COV 5,0 | COV 5,0* | COV 10,0 | COV 10,0* | COV 15,0 | COV 15,0* | COV 20,0 | COV 20,0* |
|------------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Inóculo | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| Inóculo* | 10,7 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0 | 23,98 | 13,28 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0* | 36,93 | 26,23 | 12,95 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 10,0 | 60,9 | 50,2 | 36,92 | 23,97 | | 1 | 1,257E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 10,0* | 61,02 | 50,32 | 37,04 | 24,08 | 0,1165 | | 1,254E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 15,0 | 52,48 | 41,78 | 28,49 | 15,54 | 8,427 | 8,543 | | 0,949 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 15,0* | 50,61 | 39,91 | 26,63 | 13,67 | 10,3 | 10,41 | 1,869 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 20,0 | 72,2 | 61,5 | 48,21 | 35,26 | 11,29 | 11,18 | 19,72 | 21,59 | | 0,9988 |
| COV 20,0* | 71,08 | 60,38 | 47,1 | 34,15 | 10,18 | 10,06 | 18,6 | 20,47 | 1,115 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C6. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R2, antes e após agitação

| | Inóculo | inóculo* | COV 5,0 | COV 5,0* | COV 10,0 | COV 10,0* | COV 15,0 | COV 15,0* | COV 20,0 | COV 20,0* |
|------------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Inóculo | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| inóculo* | 9,199 | | 1,249E-05 | 0,0004128 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0 | 18,44 | 9,242 | | 0,5307 | 0,9999 | 1 | 0,0001005 | 0,0003605 | 2,048E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0* | 15,48 | 6,279 | 2,963 | | 0,1969 | 0,5128 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 10,0 | 19,22 | 10,02 | 0,7768 | 3,74 | | 1 | 0,001157 | 0,003711 | 0,0001518 | 1,249E-05 |
| COV 10,0* | 18,48 | 9,277 | 0,03536 | 2,999 | 0,7415 | | 0,0001121 | 0,0004263 | 2,167E-05 | 1,249E-05 |
| COV 15,0 | 25,15 | 15,95 | 6,708 | 9,671 | 5,931 | 6,672 | | 1 | 1 | 0,2037 |
| COV 15,0* | 24,74 | 15,55 | 6,303 | 9,266 | 5,526 | 6,268 | 0,4047 | | 0,9992 | 0,1011 |
| COV 20,0 | 25,79 | 16,59 | 7,352 | 10,32 | 6,576 | 7,317 | 0,6449 | 1,05 | | 0,4752 |
| COV 20,0* | 28,87 | 19,67 | 10,43 | 13,39 | 9,649 | 10,39 | 3,719 | 4,123 | 3,074 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C7. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R3, antes e após agitação

| | inóculo | inóculo* | COV 5,0 | COV 5,0* | COV 10,0 | COV 10,0* | COV 15,0 | COV 15,0* | COV 20,0 | COV 20,0* |
|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| inóculo | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| inóculo* | 14,07 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0 | 38,73 | 24,66 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0* | 56,65 | 42,59 | 17,93 | | 0,07089 | 1,249E-05 | 0,9997 | 0,9997 | 1,249E-05 | 4,243E-05 |
| COV 10,0 | 60,96 | 46,89 | 22,23 | 4,306 | | 1,437E-05 | 0,008177 | 0,3401 | 0,0001573 | 0,6626 |
| COV 10,0* | 68,67 | 54,6 | 29,94 | 12,02 | 7,711 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 0,9984 | 0,01448 |
| COV 15,0 | 55,73 | 41,66 | 17 | 0,9284 | 5,234 | 12,95 | | 0,9482 | 1,249E-05 | 1,322E-05 |
| COV 15,0* | 57,6 | 43,53 | 18,87 | 0,9451 | 3,361 | 11,07 | 1,874 | | 1,249E-05 | 0,0007859 |
| COV 20,0 | 67,52 | 53,46 | 28,8 | 10,87 | 6,564 | 1,147 | 11,8 | 9,925 | | 0,1607 |
| COV 20,0* | 63,66 | 49,59 | 24,93 | 7,006 | 2,7 | 5,011 | 7,935 | 6,061 | 3,864 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST

Tabela C8. *Output* do teste de Tukey para os dados de distribuição granulométrica do R4, antes e após agitação

| | inóculo | inóculo* | COV 5,0 | COV 5,0* | COV 10,0 | COV 10,0* | COV 15,0 | COV 15,0* | COV 20,0 | COV 20,0* |
|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| inóculo | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| inóculo* | 12,07 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0 | 35,41 | 23,34 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 5,0* | 49,17 | 37,09 | 13,75 | | 1 | 0,2028 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 10,0 | 49,16 | 37,09 | 13,75 | 0,007079 | | 0,205 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 10,0* | 45,44 | 33,37 | 10,03 | 3,722 | 3,715 | | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 | 1,249E-05 |
| COV 15,0 | 67,24 | 55,17 | 31,83 | 18,08 | 18,08 | 21,8 | | 0,05963 | 0,000134 | 0,9406 |
| COV 15,0* | 62,85 | 50,78 | 27,44 | 13,69 | 13,69 | 17,41 | 4,39 | | 1,249E-05 | 0,7667 |
| COV 20,0 | 73,86 | 61,79 | 38,45 | 24,69 | 24,7 | 28,41 | 6,615 | 11,01 | | 1,254E-05 |
| COV 20,0* | 65,33 | 53,25 | 29,91 | 16,16 | 16,17 | 19,88 | 1,916 | 2,475 | 8,531 | |

Fonte: gerada pela autora por meio do programa estatístico PAST