UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
FACULDADE DE ENGENHARIAS, ARQUITETURA E URBANISMO E GEOGRAFIA - FAENG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS AMBIENTAIS - PGTA

Edinéia Lazarotto Formagini

Produção de metano e ácidos orgânicos a partir da digestão anaeróbia da vinhaça

Tese de Doutorado

Campo Grande – MS
Outubro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
FACULDADE DE ENGENHARIAS, ARQUITETURA E URBANISMO E GEOGRAFIA - FAENG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS AMBIENTAIS - PGTA

Edinéia Lazarotto Formagini

Produção de metano e ácidos orgânicos a partir da digestão anaeróbia da vinhaça

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Orientador (a): Drª. Paula Loureiro Paulo
Co-orientador (UFMS): Dr. Marc Árpád Boncz
Co-orientador (UVA): Dr. Fernando Fernández-Polanco
Supervisor (UVA): Dr. Pedro Antonio García-Encina

Campo Grande – MS
Outubro de 2015

DEDICATÓRIA

...Meu marido Sidiclei, pelo carinho e apoio em todos os momentos!!!

Meus pais, Maria e Diomir, por todo amor, dedicação e ensinamentos...

AGRADECIMENTOS

Acredito ser esta uma das parte mais difíceis, pois foram tantas as pessoas que passaram pela minha vida durante este período e que, de alguma maneira colaboraram para eu estar aqui e agora!

Bem, para começar agradeço a Deus, presente em todos os momentos de minha vida, sempre me protegendo e abençoando. Á minha família... marido, pai, mãe, irmão, sogro, sogra... enfim todos da família, inclusive os agregados! Sem esquecer os amores da minha vida, Manu e João. Obrigado pelo carinho, apoio e os momentos vividos!

Aos meus orientadores Prof.ª Dr.ª Paula Loureiro Paulo e Prof. Dr. Marc Árpád Boncz, pela orientação, apoio, dedicação e carinho. Acima de tudo, obrigado pela amizade e por fazer parte da minha vida e permitir que eu faça parte da vida da Sofia.

Meninas... Thais, Mayara, e Larissa... Amigas e companheiras para todas as horas, de alegrias e de desespero... amo vocês! Aos amigos do LabE e da vida: Arima, Grazi, Mirian, Felipe, Rafão, Fernanda, Laura, Priscila, Vanessa, Soneca.. e outros mais! Enfim, a todos os que passaram por lá, o meu muito obrigado.

A todos os amigos do Laqua e do PGTA, por todos os momentos de alegrias, festas, angustias e desespero pelas amostras perdidas e resultados incompreensíveis! Aos professores, por todo conhecimento compartilhado, à Letícia e à Jaque, pelo carinho e suporte burocrático.

A mis tutores, Pedro y Fernando, por la recepción, enseñamientos y ayuda! A Rebeca, por el cariño, y las análisis de PCR. Los técnicos de la UVA, Enrique, Araceli y Sara por las análisis, suporte y compañía en el lab.

Sara, Roxy y el grupo IQ, muchísimas gracias por hacer mis días en Valladolid muy especial, los guardaré siempre en mi corazón. Chicas, gracias por las noches y los findes en el lab… los vinos, las cañas y todo más! A mis compañeras, Lety y Vane… gracias por todo todo todo, las quiero mucho!

Ao CNPq e Capes auxílio financeiro e bolsa concedida, À UFMS pelo suporte e infraestrutura.

E a todos os que não foram citados, mas que de alguma forma participaram desta fase da minha vida, o meu muito obrigado e sejam felizes!!!

SUMÁRIO

Dedicatória I
Agradecimentos II
Sumário III
Lista de figuras VI
Lista de Tabelas IX
Lista de siglas e Abreviaturas XII
Lista de símbolos XIII
Resumo XIV
Abstract XV

1 Introdução Geral 1

Antecedentes e justificativa 1

Revisão de Literatura 2

Produção de etanol e geração de vinhaça 2

Vinhaça 4

Tratamento Anaeróbio 5

Digestão anaeróbia da vinhaça 9

Produção de ácidos graxos voláteis pela fermentação da vinhaça. 13

Objetivo geral 14

Hipóteses 14

Escopo e estrutura da tese 14

2 Utilização de microalgas ou seu meio de cultivo para a produção de biogás em um ciclo integrado 16

Introdução 17
Metodologia 20
resultados e discussão 22
Conclusões 25
3 Efeitos da utilização da ureia como agente tamponante na digestão anaeróbia da vinhaça .. 26
Introdução 27
Metodologia 29
Experimento em batelada 29
Experimento contínuo 30
Análises físico-químicas 31
Análise microbiológica 31
Resultados e discussão 33
Experimento em batelada 33
Operação de reator de fluxo contínuo 35
Análise microbiológica 38
Conclusões 47
4 Influência do agente tamponante na biomassa e na produção de metano 48
introdução 49
Materiais e métodos 51
Delineamento experimental 51
Monitoramento físico-químico 52
Análises microbiológicas 53
Resultados e discussão 54
Resultados físico-químicos 54
Resultados microbiológicos 60

Conclusões 67

5 Produção de ácidos orgânicos voláteis utilizando vinhaça 69

Introdução 70

Metodologia 72

Resultados e Discussão 74

Influência da concentração de $NaHCO_3$ 74

Influência da composição do substrato 79

Conclusões 83

6 Discussão geral e Conclusões 85

Justificativas 85

Produção de biogás 86

Potencial de geração de ácidos orgânicos. 88

Conclusões gerais 90

Recomendações 90

7 Referências bibliográficas 92

Anexo 1 101

Coleta, armazenamento e caracterização dos lotes de vinhaça utilizados nos experimentos 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 Fluxograma da atual produção de etanol e açúcar (**Fonte:** Ludovice (1997)**.**..... 3

Figura 1-2: Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia com redução de sulfato. (Fonte: van Haandel e Lettinga, 1994) 6

Figura 2-1: A - Ciclo atual da produção etanol a base de cana-de-açúcar; B - Integração da digestão anaeróbia da vinhaça como alternativa de tratamento deste efluente e consequente aumento na produção de energia..... 17

Figure 2-2: A- Integração do cultivo de microalgas para a produção de biodiesel com a utilização do sobrenadante resultante da separação como fonte de alcalinidade para a digestão anaeróbia da vinhaça; B – Utilização de toda a suspenção de algas como fonte de alcalinidade e aumento na produção de biogás em co-digestão com a vinhaça; C – Digestão anaeróbia das microalgas somente para a produção de biogás. 19

Figura 2-3: (a) Detalhes das medições de metano; (b) Esquema do método utilizado para as medições. (Fonte: Aquino *et al*. (2007))..... 22

Figura 2-4: Resultados de produção de metano (em DQO (●)); pH (▲) e AGV (■) para os testes com sobrenadantes e vinhaça, com e sem a adição de $NaHCO_3$. 23

Figura 2-5: Resultados de produção de metano (em DQO (●)); pH (▲) e AGV (■) para os experimentos utilizando a suspenção de microalgas. 24

Figura 3-1: A – pH, metano ($mgDQO.L^{-1}$) e ácidos graxos voláteis ($mgDQO.L^{-1}$); B - Concentrações de $N\text{-}NH_3$, NH_3 e NH_4^+ (em $mg.L^{-1}$) obtidos para o experimento em batelada utilizando vinhaça com: 2 $gDQO.L^{-1}$(1); 8 $gDQO.L^{-1}$ (2) e; 18 $gDQO.L^{-1}$ (3). 34

Figura 3-2: A – Percentual de remoção de DQO e pH; B – CH_4 (em mgDQO.L^{-1}) e ácidos graxos voláteis (AGV em mgDQO.L^{-1}); para as cinco fases de operação do reator: Fases I e II utilizando $NaHCO_3$ e ureia e; Fases III, IV e V somente com ureia.. 36

Figura 3-3: Perfis de DGGE das arqueas metanogênicas obtidos pela amplificação do gene 16S RNAr para as amostras A: Inicio da operação do reator (tempo 0); B: Inicio da operação somente com ureia (33 dias de operação); C: Final da operação do reator (102 dias de operação e; D: Massa acumulada no topo do reator (mescla de amostras coletada nos dias 83, 92 e 102).com os respectivos índices de diversidade (H). 39

Figura 4-1: Ácidos graxos voláteis (mg.L^{-1}) e pH para a primeira e a ultima batelada realizadas para as condições: A_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); A_{G2} (glicose e ureia); A_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$) e; A_{V2} (vinhaça e ureia) 57

Figura 4-2: Ácidos graxos voláteis (mg.L^{-1}) e pH para a primeira e a ultima batelada realizadas para as condições B_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); B_{G2} (glicose e ureia); B_{V1} (vinhaça e $NaHCO_3$) e;B_{V2} (vinhaça e ureia) utilizando a biomassa B. 60

Figura 4-3: Perfis de DGGE das arqueas metanogênicas obtidos pela amplificação do gene 16S RNAr para as amostras iniciais (A_0 e B_0) e finais para as condições: A_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); A_{G2} (glicose e ureia); A_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$); A_{V2} (vinhaça e ureia); B_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); B_{G2}(glicose e ureia); B_{V1} (vinhaça e $NaHCO_3$) e; B_{V2} (vinhaça e ureia) com os respectivos índices de diversidade (H). 62

Figura 5-1: Resultados dos parâmetros pH, DQO, CH_4 e AGV monitorados ao longo dos experimentos realizados no 1º experimento para as condições: V-0B (utilizando somente vinhaça); V-0,1B (vinhaça + 0,1 g$NaHCO_3$.gDQO^{-1}); V-0,3B (vinhaça + 0,3 g$NaHCO_3$.gDQO^{-1}) e; V-0,5B (vinhaça + 0,5 g$NaHCO_3$.gDQO^{-1}). 75

Figura 5-2: Correlação entre o grau de acidificação (em %), o pH do meio e a dosagem utilizada de $NaHCO_3$ (sem e com 0,1; 0,3 e; 0,5 g.gDQO^{-1}) para o 1º experimento. 76

Figura 5-3: Grau de acidificação, com a composição dos ácidos (apresentados em porcentagem) obtidos no 8° dia de experimento para a condições V-0B (utilizando somente vinhaça), 13° para a condição V- 0,1B (vinhaça + 0,1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$), e 4° para as condições V-0,3B (vinhaça + 0,3 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$) e V-0,5B (vinhaça + 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$)..... 76

Figura 5-4: Concentrações individuais dos ácidos formados na condição para as condições V-0,5B (vinhaça + 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$)..... 77

Figura 5-5: Resultados dos parâmetros pH, DQO, CH4 e AGV monitorados ao longo dos experimentos realizados no 2º experimento para as condições: V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e; V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol)..... 79

Figura 5-6: Grau de acidificação, com a composição dos ácidos (apresentados em porcentagem) obtidos no 5,6° dia de experimento para a condições V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e 3,6º dia para a condição V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol)..... 80

Figure 5-7: Grau de acidificação, com a composição dos ácidos (apresentados em porcentagem) obtidos no 20° dia de experimento para a condições: V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e; V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol)..... 81

Figura 5-8: Porcentagem individual dos ácidos, dentro do grau de acidificação calculado para o 20º dia de experimento, em relação à porcentagem de etanol na vinhaça (condições: V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e; V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol))..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1: Energia livre de Gibs e taxa de crescimento específico para algumas reações acidogênicas,..... 7

Tabela 1-2 - Energia livre de Gibs e taxa de crescimento para algumas reações acetogênicas. 7

Tabela 1-3 - Energia livre de Gibs e taxa de crescimento específico para algumas reações metanogênicas 8

Tabela 2-1: Características apresentadas pelos sobrenadantes utilizados. 21

Tabela 2-2: Caracterização das amostras de sobrenadantes utilizados denominados de acordo com o processo de separação. 22

Tabela 2-2-3: Parâmetros avaliados no inicio e final dos experimentos 23

Tabela 2-4: Parâmetros avaliados no inicio e final dos experimentos 24

Tabela 3-1: Condições experimentais para as cinco fases de operação do reator UASB tratando vinhaça em modo contínuo. 35

Tabela 3-2- Médias de pH, nitrogênio amoniacal (NH_3-N), amônia livre (NH_3), íon amônia (NH_4^+) em $mg.L^{-1}$, e alcalinidade total ($mgCaCO_3.L^{-1}$) do afluente para as cinco fases de operação do reator. 37

Tabela 3-3- Médias de alcalinidade (total, bicarbonato e intermediaria) do efluente para as cinco fases de operação do reator, bem como a relação entre a alcalinidade intermediaria (AI) e alcalinidade bicarbonato (AB). 38

Tabela 3-4: Índice de similaridade (em %) de bactérias e arqueas, observada pelas bandas identificadas no DGGE. 40

Tabela 3-5: Classificação RDP das bandas DGGE sequenciadas para Bactérias e seus correspondentes (BLAST), utilizando o banco de dados NCBI com indicação das

percentagens de similaridade e fontes de origem. A presença de cada banda é indicada pelo "X". 42

Tabela 3-6: Classificação RDP das bandas DGGE sequenciadas para arqueas e seus correspondentes (BLAST), utilizando o banco de dados NCBI com indicação das percentagens de similaridade e fontes de origem. A presença de cada banda é indicada pelo "X". 44

Tabela 4-1: Delineamento experimental empregado para as duas biomassas testadas com suas respectivas identificações. 52

Tabela 4-2: Duração de cada série de teste em batelada (tempo, em dias), produção de metano e remoção de DQO utilizando a biomassa A, provinda de uma indústria de leveduras. 55

Tabela 4-3: Alcalinidade parcial e total (em $mgCaCO_3.L^{-1}$) para cada série testes em batelada utilizando a biomassa A. 56

Tabela 4-4: Duração de cada série teste em batelada (tempo, em dias), produção de metano e remoção de DQO utilizando a biomassa B, provinda de uma indústria açucares. 58

Tabela 4-5: Alcalinidade parcial e total (em $mgCaCO_3.L^{-1}$) para cada série de testes em batelada utilizando a biomassa A. 59

Tabela 4-6: Taxa de similaridades (%) obtidas utilizando os dados da PCR-DGGE..... 62

Tabela 4-7: Classificação RDP das bandas DGGE sequenciadas para arqueas e seus correspondentes (BLAST), utilizando o banco de dados NCBI com indicação das percentagens de similaridade e fontes de origem. A presença de cada banda é indicada pelo "X". 64

Tabela 5-1: Diferentes condições testadas: combinação de substratos, $NaHCO_3$ e DQO inicial utilizadas na realização dos experimentos. 73

Tabela 5-2: Acúmulo máximo de ácidos graxos voláteis (AGV) e grau de acidificação, bem como tempo e o pH em que os valores foram atingidos. 75

Tabela 5-3 Acúmulo máximo de ácidos graxos voláteis (AGV) e grau de acidificação, bem como tempo e o pH em que os valores foram atingidos. 80

Tabela 7-1: Características físico-químicas dos três lotes de vinhaça utilizados nos experimentos. 102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	Alcalinidade bicarbonato
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AI	Alcalinidade intermediaria
AME	Atividade Metanogênica Específica
AP	Alcalinidade Parcial
AT	Alcalinidade Total
BESA	2-bromoetanosulfônico
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DQO_{CH4}	Carga de DQO removida e convertida em metano
EDTA	Etileno amino tetraacetato de sódio diidratado
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
SVT	Sólidos Voláteis Totais
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAr	RNA ribossomal
RPM	Rotação por minuto
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
Tris	(hidroximetil) aminometano
UASB	Upflow Anaerobic Slugde Blanket Reactor
ΔG_0	Variação de energia livre

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μ_{max}	Taxa de crescimento específico
Ca	Cálcio
$Ca(OH)_2$	Cal hidratada
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
CH_4	Metano
$CO(NH_2)_2$	Ureia
CO_2	Dióxido de carbono
d^{-1}	Dia
G	Grama
HCO_3^-	Bicarbonato
K	Potássio
Kg	Quilograma
kJ/mol	Quilojoule por mol
L^{-1}	Litros
M	Metro
m^3	Metro cúbico
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	MiliMol
N_2	Gás nitrogênio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_3	Amônia livre
NH_3-N	Nitrogênio amoniacal
NH_4^+	Íon Amônio
ºC	Graus Celsius
PO_4^{3-}	Fosfato
S	Enxofre

RESUMO

Formagini, E. L. (2015). *Aprimoramento da digestão anaeróbia da vinhaça*. Campo Grande, 2015. 119 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

Atualmente, a vinhaça (principal resíduo da produção de etanol) é utilizada na fertirrigação por ser rica em nutrientes. Por outro lado, a vinhaça possui elevado teor de matéria orgânica e pH ácido, o que pode ocasionar riscos ambientais caso seja aplicada de maneira incorreta. Uma forma de minimizar este risco é o tratamento por meio da digestão anaeróbia, com o qual é possível gerar produtos de valor agregado (biogás e/ou ácidos orgânicos), e obter um efluente final apto para a fertirrigação (por conter os nutrientes desejados) com menor risco de contaminação ambiental. Assim, este trabalho teve dois objetivos principais: i) avaliar diferentes compostos como agentes tamponantes para viabilizar a geração de biogás com digestão anaeróbia da vinhaça e, ii) avaliar a produção de ácidos orgânicos voláteis com valor agregado, intermediários da digestão anaeróbia da vinhaça. Para alcançar os objetivos, foram realizados experimentos distintos, todos em condições mesofílicas. O primeiro teste avaliou a utilização do sobrenadante resultante do cultivo de microalgas como regulador do pH na digestão anaeróbia da vinhaça, bem como o uso da suspensão de microalgas, em co-digestão com a vinhaça. Após foram realizados dois experimentos, um contínuo com um reator UASB (com pré-teste determinar as condições ser empregadas) e outro em bateladas, utilizando ureia e bicarbonato de sódio como compostos de tamponamento. A fim de avaliar a possibilidade produzir de ácidos orgânicos intermédios com valor agregado, foram realizados testes para verificar o efeito do pH (usando $NaHCO_3$), e a possibilidade gerar ácidos de cadeia média (pelo alongamento de cadeia) com adição de etanol. Com os resultados obtidos em relação à produção de metano, a hipótese de se utilizar o sobrenadante do cultivo de microalgas e a suspensão das microalgas como agentes tamponantes mostrou-se inviável, visto que o mesmo não possui alcalinidade suficiente para elevar o pH e tamponar o sistema. Por outro lado, o pré-teste realizado com ureia, mostrou que a relação de 0,22 $gUREIA.gDQO^{-1}$ pode ser utilizada durante a digestão da vinhaça sem riscos ao sistema. Assim, esta concentração foi aplicada no reator UASB. Na 1ª etapa de operação do reator utilizou-se ureia e $NaHCO_3$, nesta etapa o pH se manteve neutro e estável, favorecendo a produção de biogás e remoção de DQO (≈85%). Por outro lado, na 2ª etapa, realizada somente com ureia, mesmo mantendo o pH neutro, houve uma redução no percentual de remoção de DQO para ≈43%, com acúmulo de AGVs e consequente queda na produção de biogás. Uma das causas desta instabilidade pode ser a baixa concentração de alcalinidade bicarbonato disponível no meio, aliada a uma possível alteração nos microrganismos presentes na biomassa, especialmente nas produtoras de metano que podem ser dependentes do $NaHCO_3$. No segundo teste em bateladas, com a realização da identificação das arqueas presentes na biomassa, pode-se comprovar que a eficiência da ureia na digestão anaeróbia da vinhaça está relacionada às características dos microrganismos presentes (visto que alguns gêneros são mais sensíveis), juntamente com a formação de alcalinidade bicarbonato e a concentração e de ácidos acumulados no sistema. Com os resultados obtidos em relação à produção de ácidos, foi possível constatar que utilizando vinhaça, sem adição de algum composto, foram obtidos somente 38% do potencial total de formação de ácidos, com predomínio de ácidos de cadeia curta. Com o aumento do pH (pela dosagem de $NaHCO_3$), o potencial de acidificação foi reduzido, visto que as condições torna-se propicias para a produção de metano. Utilizando o etanol com a vinhaça, verificou-se que a maior formação de ácidos de cadeia média, em especial butírico, propiônico e capróico, foram proporcionais à relação de etanol e vinhaça utilizada, com maiores concentrações para relação 1:1.

Palavras-chave: Biogás; Ácidos Graxos Voláteis; Estabilidade do pH, Alcalinidade, PCR-DGGE.

ABSTRACT

Formagini, E. L. (2015). *Improving the anaerobic digestion of vinasse*. Campo Grande, 2015. 119 p. Thesis (Ph.D.) - Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil.

Currently, vinasse (the main residue of ethanol production) is used in fertirrigation, as this effluent is rich in nutrients. However, vinasse has a high organic matter concentration and a low pH, meaning it can cause environmental risks if applied incorrectly. One way to reduce this risk is to treat the vinasse by means of anaerobic digestion, with which it is possible to generate value-added products like biogas and/or organic acids, as well as a final effluent suitable for fertigation (as the treated effluent will still contain the desired nutrients), with less risk of environmental contamination. This work had two main objectives: i) evaluate different compounds suitable for buffering to improve the anaerobic digestion of vinasse, and ii) evaluate the production of volatile organic acids, which are valuable intermediates produced during the anaerobic digestion of vinasse. In order to evaluate the different possibilities of buffering the anaerobic digestion of vinassem under mesophilic conditions, first a batch test was carried out using first the supernatant from microalgae cultivation, and second a suspension of microalgae as buffering, while later on two tests in were conducted, one in batch and another in a continuously operating UASB reactor, both using urea and sodium bicarbonate as buffering compounds. In order to evaluate the possibility to increase the production of value-added intermediate organic acids, batch experiments were performed to examine the effect of pH (using $NaHCO_3$), and the possibility of chain extension of the intermediate fatty acids by means of addition of ethanol, also under mesophilic conditions. With respect to buffering the anaerobic digestion of vinasse, in order to improve methane production, the possibility of using the supernatant from microalgae cultivation or a suspension of microalgae for buffering of the system proved unfeasible since neither of these materials, although having a high pH, have sufficient alkalinity to raise the pH of the system. On the other hand, the tests with bicarbonate and urea addition showed that dosing 0.22 $gUREA.gCOD^{-1}$ can be used for buiffering vinasse digestion without risk to the system. This concentration was then applied in a continuous experiment using a UASB reactor. In the 1st stage of reactor operation both urea and $NaHCO_3$ were used, and the pH remained neutral and stable, with a biogas production and COD removal of around 85%. In the 2nd step, using only urea, although the pH remained neutral, a reduction in COD removal to ≈43% was observed, with VFAs accumulating and a reduction of the biogas production. One of the causes of these phenomena can be the low concentration of bicarbonate alkalinity available in the medium, together with a possible change in the microorganisms present in the biomass, especially the methanogenic organisms which may have become dependent on $NaHCO_3$. A second batch test proved that the efficiency of using urea in the anaerobic digestion of vinasse is related to the characteristics of the organisms present (since some genres are more sensitive) along with the formation of bicarbonate alkalinity and the concentration of acids retained in the system. With the results obtained in the experiments carried out to study the production of volatile and intermediate chain fatty acids, we found that using vinasse without the addition of any buffering compound only 38% of the potential of acids formation was obtained, with predominance of short-chain acids. With the increase of pH (dosage $NaHCO_3$), the potential to produce acids was reduced even further, since more neutral conditions are more favorable for the production of methane. Adding ethanol to the vinasse, an increased formation of medium chain carboxylic acids was observed, in particular production of butyric, propionic and caproic acid was proportional to the amount of ethanol added, with higher concentrations of these acids obtained at the 1: 1 vinasse:ethanol (in terms of COD) ratio.

Keywords: Biogas; Volatile fatty acids; pH stabilization, alkalinity, PCR-DGGE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Antecedentes e justificativa

O desenvolvimento da sociedade moderna, desde a revolução industrial, é consequência, em grande parte, da disponibilidade e utilização de energia proveniente de recursos fósseis como carvão mineral, gás natural e petróleo. Destes, o petróleo é mais utilizado mundialmente, pois além de ser matéria-prima para a produção de materiais essenciais como polímeros, medicamentos e fertilizantes, é o principal combustível utilizado pelos meios de transporte terrestres. Entretanto, por ser de origem não renovável, este recurso se esgotará. Além deste problema, a utilização do petróleo é responsável por grande parte da liberação do gás carbônico para a atmosfera, responsável pelo aquecimento global e outras mudanças climáticas (Schrank*et al*., 2004; Wilkinson *et al.,* 2007).

Devido a este fato, há a necessidade de desenvolver e aprimorar tecnologias de produção de combustíveis alternativos, baseadas em fontes renováveis, das quais as mais conhecidas são a energia solar, eólica, hidráulica, geotérmica e biomassa. Esta última é uma das fontes de energia mais diversificadas, englobando entre outros animais, plantas e algas, que podem ser transformadas em, por exemplo, calor, vapor, eletricidade, hidrogênio, etanol ou biogás (Converti *et al.,* 2009). O Brasil vem se destacando globalmente com a produção do etanol utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima. O primeiro passo na produção do etanol é a moagem da cana para obter o caldo rico em sacarose, o qual é transformado em álcool, gás carbônico e outros componentes orgânicos pela fermentação. Posteriormente, utiliza-se a centrifugação para separar os resíduos sólidos e, por último, a destilação, para separar o etanol da mistura líquida (Van Haandel, 2005).

Além do etanol, o processo industrial gera vários subprodutos, sendo em maior quantidade a vinhaça. O volume deste rejeito é de, no mínimo, 12 vezes o volume do álcool hidratado produzido. Junto com os rejeitos dos processos de lavagem e da produção de açúcar

sobram até 15 m^3 de vinhaça por m^3 de álcool produzido (Van Haandel, 2005). A vinhaça é utilizada como fertilizante nas áreas cultivadas com a cana, devido ao fato de conter nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas. Este processo é denominado fertirrigação (van Haandel, 2005; Garcia, 2005).

A vinhaça também contém alto teor de matéria orgânica e pH ácido, o que pode representar riscos de contaminação ambiental (van Haandel, 2005). Uma alternativa a ser adotada para minimizar este risco é a digestão anaeróbia. Esse processo reduz o teor de matéria orgânica na vinhaça, mantém os nutrientes e neutraliza o pH, além de produzir energia em forma de biogás. Entretanto, devido ao fato de ser um efluente ácido, e a metanogênese (ultima etapa da digestão anaeróbia responsável pela formação do metano) ser restrita ao pH neutro, torna-se necessária a utilização de produtos que neutralizem e estabilizem o pH da vinhaça (van Haandel e Lettinga, 1994). Outra opção interessante é a utilização da vinhaça na produção de ácidos orgânicos durante a digestão anaeróbia, visto que as etapas de produção de ácidos graxos voláteis (fases intermediárias da digestão anaeróbia) não são restritas ao pH neutro como as arqueas metanogênicas.

Revisão de Literatura

Produção de etanol e geração de vinhaça

O etanol tem sido considerado uma excelente alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis, bem como ante a poluição por eles causada. Comparado aos combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia e de contribuir para a redução das emissões de dióxido de carbono.

Segundo previsões feitas pela Conab (2014), a produção total de cana-de-açúcar para a safra brasileira de 2013/2014 seria de 652,02 milhões de toneladas, gerando 23,64 bilhões de litros de etanol. Entretanto, dados mais atualizados da UNICA (União nacional dos produtores de cana-de-açúcar), indicam uma produção de cana-de-açúcar realizada (safra 2013/2014) entre 570 e 586 milhões de toneladas, abaixo do esperado. Esta redução se deve aos fatores climáticos adversos (seca), especialmente em São Paulo que é o maior produtor. Desta

produção, a região centro sul é responsável por 92,13%, com 8,05% correspondendo ao estado de Mato Grosso do Sul.

No processo convencional de produção de etanol à base de cana-de-açúcar, a primeira etapa é a moagem da cana para obter o caldo rico em sacarose. Depois de extraído, este caldo passa pelo processo de fermentação, o qual transforma este componente em álcool, gás carbônico e outros componentes orgânicos. O teor alcoólico da massa fermentada (denominado vinho ou caldo) geralmente é mantido entre 8 e 10%. A separação do álcool dos sólidos presentes no vinho é realizada por centrifugação. Após esta etapa é realizada a destilação, onde é separado o álcool da mistura líquida (van Haandel, 2005).

Além do álcool hidratado, outros subprodutos são gerados, sendo eles: vinhaça (vinhoto), torta de filtro, cinza do bagaço da cana e CO_2. A figura 1-1 apresenta um fluxograma completo deste processo.

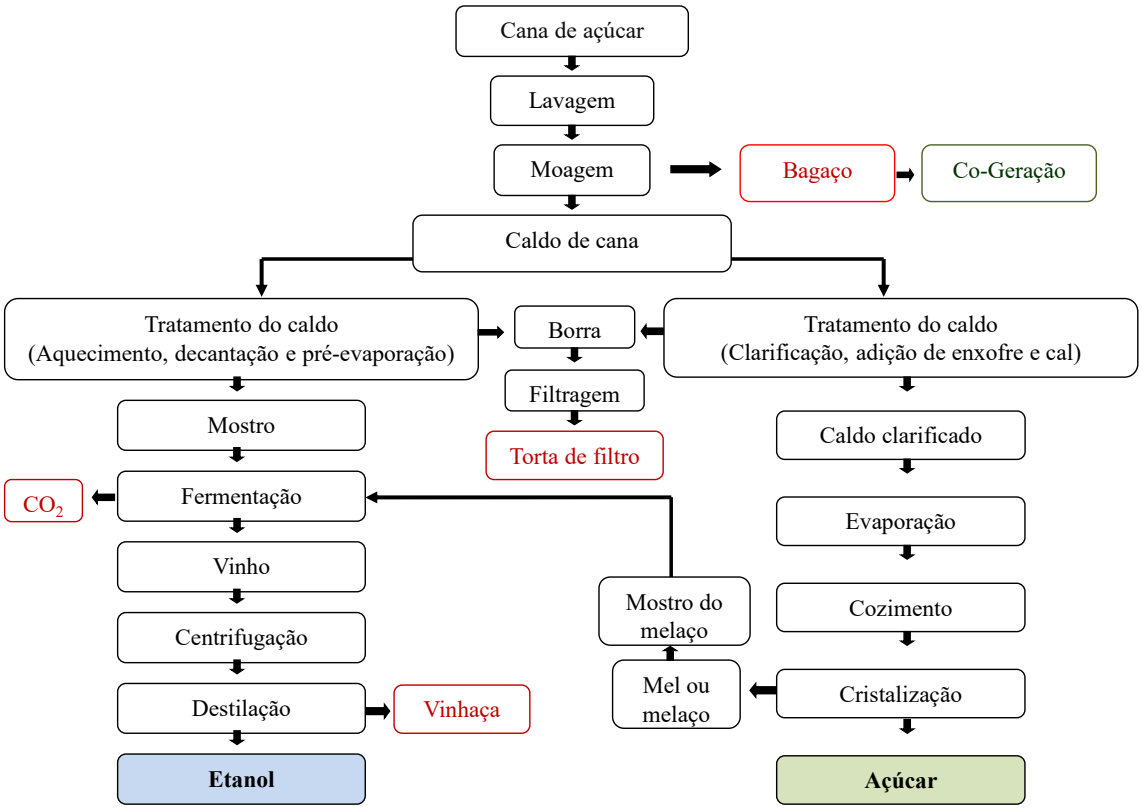


Figura 1-1 Fluxograma da atual produção de etanol e açúcar (**Fonte:** Ludovice (1997)**.**

Além da produção de etanol, as usinas sucroalcoleiras também produzem energia elétrica pela queima do bagaço de cana, o qual é utilizado para alimentar caldeiras e fornecer energia térmica a geradores elétricos. Esta prática torna as usinas autossuficientes energeticamente. Entretanto, nos últimos anos a técnica de produção de etanol foi aprimorada, permitindo que o mesmo seja produzido também pelo bagaço gerado na moagem. Este novo etanol, conhecido como Etanol 2G (2ª geração), contém as mesmas características químicas do etanol já utilizado (Pacheco, 2011), embora exija outras etapas para sua produção.

Segundo a UNICA (União nacional dos produtores de cana-de-açúcar)), a primeira usina que utiliza o bagaço na produção de etanol já está em operação no Brasil desde setembro deste ano, em São Miguel dos Campos, Alagoas.

Com a utilização do bagaço para a produção de etanol, a utilização de outros resíduos como a vinhaça, na produção de energia, torna-se cada vez mais atraente, não só pelo ponto de vista ambiental, como também econômico.

Vinhaça

A vinhaça é o principal resíduo líquido resultante da produção do etanol, pois é produzida em grande volume, na proporção de até 15 litros para cada litro de etanol. Em geral, a vinhaça é rica em matéria orgânica e alguns minerais e nutrientes, como o potássio (K), cálcio (Ca) e enxofre (S). Devido a esta composição, e ao grande volume gerado, a vinhaça é utilizada como fertilizante nas áreas de plantio de cana-de-açúcar, processo denominado fertirrigação (Moraes *et al.,* 2014; España-Gamboa *et al.*, 2011).

Quando a fertirrigação é realizada de forma correta, ela pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos que atuam sobre os diversos processos biológicos, tais como mineralização e imobilização de nitrogênio, e sua nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. De uma maneira indireta, facilita a ação dos microrganismos na aglutinação das partículas do solo, aumentando a sua estruturação (Silva *et al.,* 2007; Duarte, 2003). Contudo, a prática da fertirrigação não deve ser excessiva e indiscriminada, pois pode comprometer as características do meio e provocar impactos como lixiviação de metais e sulfato, salinização do solo, emissões de gases do efeito estufa, contaminação das águas subterrâneas, além da

libertação de odores desagradáveis e a possível atração de insetos (Moraes *et al.,* 2015;Silva *et al*., 2007; Piacente, 2005).

Hoje, a principal normativa utilizada para o processo da fertirrigação é a norma técnica P4.231 da SETESB (Norma técnica SETESB P4.231, 2015), a qual é utilizada em vários estados, incluindo Mato Grosso do Sul. Mesmo utilizando como base a legislação ambiental brasileira, os critérios e procedimentos são considerados superficiais, pois a aplicação de vinhaça (por área) é prescrita somente considerando a concentração de potássio presente (máximo de 185 kg de K_2O por hectare), desconsiderando outros fatores que podem ocasionar impactos ambientais, como o teor de matéria orgânica, pH e outros elementos químicos (Moraes *et al*., 2015).

Algumas alternativas podem ser empregadas para reduzir o risco na utilização da vinhaça, dentre elas o tratamento anaeróbio, com o qual é possível converter a matéria orgânica em biogás, gerando energia, além de oferecer um efluente com menor carga orgânica e pH neutro.

Tratamento Anaeróbio

A digestão anaeróbia tem ganhado espaço mundialmente no tratamento de efluentes devido as suas várias particularidades, tais como grande tolerância a elevadas cargas orgânicas, maior simplicidade operacional, baixos custos de implantação e operacionais, além da produção de metano, um gás combustível que pode ser utilizado como fonte de energia (van Haandel e Lettinga, 1994).

A digestão ocorre por consórcio de microrganismos anaeróbios, onde a matéria orgânica é convertida em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia (figura 1-2). Todo este processo pode ser divido em quatro fases: Hidrólise; acetogênese; acidogênese e; Metanogênse.

Hidrólise

A hidrólise é a primeira fase de degradação da matéria orgânica, transformado materiais particulados complexos (polímeros), em moléculas menores, como açúcares, ácidos graxos de cadeia longa e aminoácidos (Pohland, 1992). Estes compostos são hidrolisados pela

ação de exoenzimas liberadas das bactérias hidrolíticas e servirão de substrato para as etapas seguintes da digestão anaeróbia. A hidrolise geralmente é considerada como uma etapa limitante na digestão anaeróbia de substratos complexos, não devido à falta de atividade enzimática, mas sim às características do próprio substrato a ser degredado (Angelidaki *et al.*, 2009) (van Haandel e Lettinga, 1994)

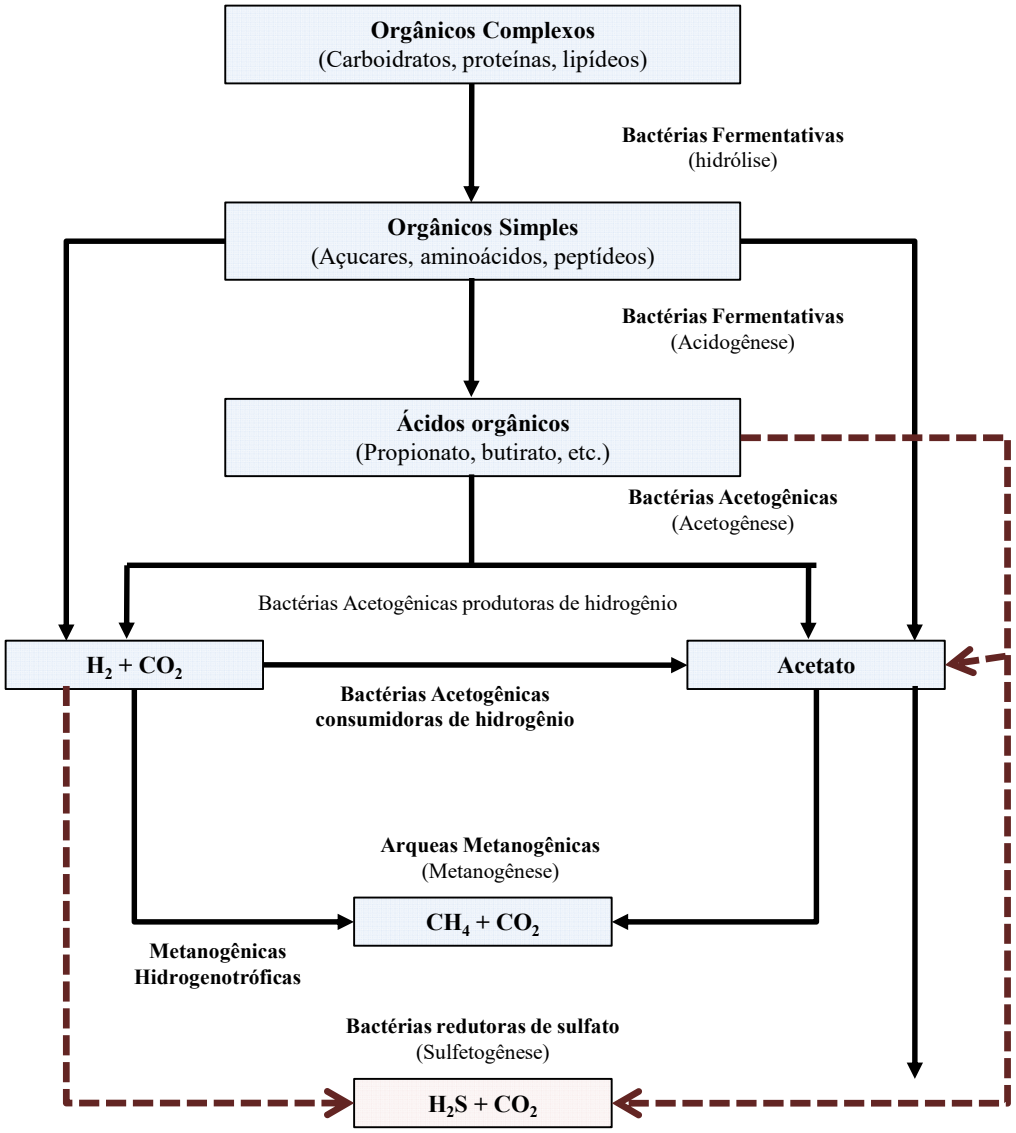


Figura 1-2: Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia com redução de sulfato. (Fonte: van Haandel e Lettinga, 1994)

Acidogênese

A acidogênese é efetuada por diversas bactérias que utilizam os compostos provenientes da etapa hidrolítica, convertendo-os em ácido lático, etanol, ácidos graxos de

cadeira média, entre outros (Van Haandel e Lettinga 1994). Os microrganismos fermentativos são os que mais se beneficiam energeticamente com as maiores taxas de crescimento especifico (tabela 1-1), bem como tem alta resistência a perturbações externas devido à sua capacidade de formar esporos. Os microrganismos formadores de ácidos são pouco sensitivos ao pH do meio, podendo ainda se mostrar bastante ativos, mesmo para valores de pH tão baixos quanto 4,5 (Chernicharo, 2007; van Haandel e Lettinga, 1994).

Tabela 1-1: Energia livre de Gibs e taxa de crescimento específico para algumas reações acidogênicas,

Reação			ΔG (kJ/mol)[1]	μ_{max} (d^{-1})
$C_6H_{12}O_6$	→	$CH_3COO^- + 2CO_2 + H^+ + 4\ H_2$	-206	7,2 a 30
$C_6H_{12}O_6$	→	$C_2H_5COO^- + 2H^+ + 2\ H2O$	-358	
$C_6H_{12}O_6$	→	$C_3H_7COO^- + 2CO2 + H^+ + 2\ H2$	-255	

[1]: Energia livre padrão (pH igual a 7,0 e pressão de 1 atm), considerando temperatura de 25ºC
Fonte: adaptado de Lettinga; Hulsoff-Pol e Zeeman (1998) e Chernicharo (2007).

Acetogênese

Nesta etapa, bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação de compostos orgânicos intermediários, como propionato e butirato, em substrato para os microrganismos metanogênicos: acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (Chernicharo 2007). Em condições padrões, esta etapa não é termodinamicamente favorável, visto que o rendimento energético é negativo (tabela 1-2). Contudo, sob condição de digestão anaeróbia, em que microrganismos metanogênicos trabalham em sintrofia com os acetogênicos, removendo hidrogênio do meio, deixando-o sob pressão abaixo de 10^{-6} atm, a conversão desses produtos se torna exotérmica, passando a produzir energia para as acetogênicas (Lettinga *et al*., 1998).

Tabela 1-2 - Energia livre de Gibs e taxa de crescimento para algumas reações acetogênicas.

Reação[1]			ΔG (kJ/mol)	μ_{max} (d^{-1})
$C_3H_5O_3^-$	→	$CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2\ H_2$	- 4,2	0,085 a 1,2
C_2H_6O	→	$CH_3COO^- + H^+ + 2\ H_2$	+ 9,6	
$C_3H_7COO^-$	→	$2\ CH_3COO^- + H^+ + 2\ H_2$	+ 48,1	
$C_2H_5COO^-$	→	$CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3\ H_2$	+ 76,1	
CH_4O	→	$3\ CH_3COOH + 2\ H_2O$	- 2,9	
HCO_3^-	→	$CH_3COO^- + 4\ H_2O$	- 70,3	

[1]: Energia livre padrão (pH igual a 7,0 e pressão de 1 atm), considerando temperatura de 25ºC
Fonte: adaptado de Lettinga *et a,* (1998) e Chernicharo (2007).

Comparando-se os dados das tabelas 1-1 e 1-2, é possível verificar que os microrganismos acetogênicos tem menor beneficiamento energético na digestão anaeróbia e,

consequentemente, menor taxa de crescimento específico (μ_{max}) em relação aos microrganismos acidogênicos.

Metanogênese

A metanogênese ocorre pela ação de arqueas metanogênicas que convertem acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, em metano e dióxido de carbono (figura 1-2).

Aproximadamente, 70% do metano produzido é pela redução de acetato, a partir do grupo metil (CH_3) que é incorporado à molécula de metano enquanto que o grupo carboxila (COO^-) é convertido a dióxido de carbono ou bicarbonato. Os 30% restantes, tem origem na redução do CO_2 pelo H_2, que apresentam fundamental importância na regulagem da pressão parcial de hidrogênio no meio, ocasionando o aumento do pH, e permitindo a produção de energia suficiente para viabilizar o crescimento dos microrganismos acetogênicos (Leitão *et al.*, 2009; Chernicharo, 2007; Mandigan *et al.*, 2004).

As arqueas metanogênicas atuam em sintrofia com os microrganismos acetogênicos, produzindo energia para crescimento de ambos e, devido a isso, esses microrganismos também apresentam menores taxa de crescimento específico (tabela 1-3).

Tabela 1-3 - Energia livre de Gibs e taxa de crescimento específico para algumas reações metanogênicas

Reação[1]			ΔG (kJ/mol)	μmax (d^{-1})
CH_3COO^-	→	$CH_4 + HCO_3^-$	-31	0,08 a 4,07
H_2	→	¼ CH_4 + ¾ H2O	-33,9	
HCOO	→	¼ CH_4 + ¾ HCO_3^-	-32,6	
HCO_3^-	→	$CH_4 + 3\ H_2O$	-135,6	

[1]: Energia livre padrão (pH igual a 7,0 e pressão de 1 atm), considerando temperatura de 25ºC
Fonte: adaptado de Lettinga *et al.* (1998) e Chernicharo (2007).

As arqueas metanogênicas são extremamente sensíveis à mudanças no pH, apresentando crescimento ótimo na faixa de pH de 6,6 a 7,4 (embora ainda possam conseguir formar metano em uma faixa mais ampla entre 6 e 8) (Chernicharo 2007), enquanto as bactérias fermentativas acidogênicas são menos sensíveis à variação do pH. Desta forma, quando os ácidos intermediários são produzidos em maior velocidade que o seu consumo, pode resultar no decaimento do pH com consequente inibição da atividade de microrganismos metanogênicos. Isto ocorre especialmente com substratos (efluentes de acidificação rápida),

que possuem em sua composição maior concentração de compostos facilmente degradáveis, como carboidratos e açúcares. Para prevenir o decaimento do pH, com consequente inibição na produção de metano, são utilizados produtos que realizam o tamponamento durante o processo anaeróbio.

Digestão anaeróbia da vinhaça

Uma das grandes dificuldades encontradas na digestão anaeróbia da vinhaça é que, além de possuir baixo pH (a alcalinidade natural deste resíduo é praticamente zero), também é um efluente que possui como característica a acidificação rápida. Assim, torna-se necessária a adição de produtos que além de elevaram o pH, ajudem na formação de alcalinidade bem como no tamponamento do processo (España-Gamboa *et al.,* 2012; Souza *et al.*, 1992; España-Gamboa *et al.*, 2011; van Haandel, 2005).

Os principais produtos químicos utilizados na suplementação de alcalinidade em sistemas anaeróbios podem ser divididos basicamente em três grupos: a) os que fornecem alcalinidade diretamente, como o hidróxido de sódio, o (bi) carbonato ou o (bi) fosfato; b) os que reagem com o gás carbônico para formar a alcalinidade bicarbonato, como a cal virgem e a cal hidratada (Chernicharo, 2007); c) os que fornecem alcalinidade indiretamente, liberando componentes básicos por meio de alguma reação, como a uréia ($CO(NH_2)_2$).

Na maioria dos trabalhos realizados em escala de bandada, utilizando vinhaça como substrato, o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) é a forma de tamponamento mais utilizada (Mota *et al.,* 2013; España-Gamboa *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2001), com dosagens variando entre 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ (Harada *et al.*, 1996) a 1,0 $gNaHCO_3.DQO^{-1}$ (Siqueira *et al.*, 2008). Em trabalhos não publicados, realizados no laboratório de efluentes da UFMS, obteve-se uma concentração mínima de 0,2 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ para manter um reator anaeróbio estável com eficiente produção de biogás.

Alternativas como a adição de cal hidratada $Ca(OH)_2$ (Torres *et al.*, 1998) foram testadas como meio de estabilização do pH da vinhaça. Todavia, o uso deste produto não é recomendado pela possibilidade de ocorrer petrificação da biomassa dentro do reator. A utilização de hidróxido de sódio (NaOH) é outra medida encontrada para estabilizar o pH da

vinhaça (Torres *et al.*, 1998; Cabello *et al.*, 2009), porém, o hidróxido de sódio não auxilia na formação de alcalinidade, somente na regulação do pH.

De todas estas alternativas já estudas para a digestão anaeróbia da vinhaça, a utilização do bicarbonato é a que apresenta maior eficiência em relação à estabilidade do pH, formação de alcalinidade e, consequentemente, produção de biogás. No entanto, ao considerar um reator em escala real (considerando o volume médio produzido de vinhaça em uma usina) a utilização do $NaHCO_3$ pode apresentar um custo elevado de operação. Devido a este motivo, a busca por compostos com menor custo torna-se imprescindível.

Ureia como agente tamponante

A vinhaça possui muitos nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, inobstante, a concentração de compostos nitrogenados é muito baixa, o que torna necessária a utilização de ureia como fertilizante complementar a fertirrigação. Por consequência disso, Van Haandel (2005) sugeriu a adição de ureia na digestão anaeróbia da vinhaça como estratégia de controle do pH. Como resultado final deste processo, além do tamponamento, os sais de amônio liberados estariam presentes na vinhaça tratada, obtendo um único produto pronto para a fertirrigação, sem custos adicionais.

O tamponamento a partir da ureia ($CO(NH_2)_2$) decorre da hidrólise deste composto durante a digestão anaeróbia formando amônia (NH_3) e CO_2 (Equação 1-1). Estes, por sua vez, quando combinados com a água, formam o íon amônio (NH_4^+) e o ânion bicarbonato (HCO_3^-) (Equação 1-2), fornecendo alcalinidade ao meio.

$$H_2N\text{-}CO\text{-}NH_2 + H_2O \rightarrow 2NH_3 + CO_2 \qquad \text{(Eq. 1-1)}$$

$$NH_3 + H_2O + CO_2 \rightarrow NH_4^+ + HCO_3^- \qquad \text{(Eq. 1-2)}$$

Um estudo realizado por Boncz *et al.* (2012) verificou que a adição de 0,40 $mg.L^{-1}$ de ureia é suficiente para elevar o pH da vinhaça e mantê-lo próximo de 7,0 em testes em bateladas. No entanto, quando os pesquisadores aplicaram somente ureia em um reator de fluxo continuo o sistema entrou em colapso, com queda na produção de biogás e no pH. Este resultado foi atribuído a uma dosagem insuficiente de ureia, onde a alcalinidade formada foi

abaixo do necessário e não à toxicidade que a amônia pode ocasionar em sistemas anaeróbios, visto que a concentração máxima deste composto foi de 96 $mg.L^{-1}$.

O risco na utilização de ureia como agente tamponante é que, dependendo da concentração de amônia formada, esta pode ser potencialmente tóxica para os microrganismos anaeróbios (Sterling Jr. *et al.*, 2001). Se a concentração de amônia livre estiver entre 1500 a 3000 $mg.L^{-1}$,com pH em torno de 7,5, este pode inibir a atividade dos organismos. Em concentrações superiores a 3000 $mg.L^{-1}$ pode ser tóxica (Chernicharo, 2007). Considerando estas informações e o fato de que 53% da massa de ureia é hidrolisada em amônia, teoricamente pode-se utilizar uma concentração de até 2000 $mg.L^{-1}$ de ureia durante a digestão anaeróbia sem apresentar riscos, desde que o pH seja mantido neutro.

Considerando a digestão da vinhaça (seja utilizando $NaHCO_3$ ou ureia) um processo eficiente, o efluente deste processo contem os principais nutrientes necessários para a agricultura, porém livre de matéria orgânica e com pH neutro, o qual pode ser devolvido às áreas cultivadas com cana, reduzindo os riscos ambientais ou utilizando como meio de cultivo para outras atividades, como o cultivo de algas.

Utilização de microalgas na digestão anaeróbia

As algas são organismos unicelulares capazes de transformar CO_2, água e nutrientes em matéria orgânica, usando luz solar como fonte de energia. Devido a sua estrutura simples, apresentam maior rendimento em termos energéticos por hectare quando comparadas às plantas, e ainda são capazes de crescer usando resíduos como o esgoto doméstico ou industrial como fonte de nutrientes. Por este motivo, desde a década de 70 (com maior impulso a partir dos anos 90) tem-se intensificado a busca e o desenvolvimento de projetos visando o cultivo de algas e a subsequente transformação destes em energia (Chisti, 2007). A maior parte destes projetos visa à produção de biodiesel, entretanto, outra linha de investigação tem se destacado nos últimos anos: a transformação direta de algas em biogás por meio da digestão anaeróbia (Vestraete *et al.,* 2010).

Segundo alguns autores (Gunaseelan, 1997; Verstraete *et al.,* 2010) a digestão anaeróbia das algas apresenta diversas vantagens, dentre elas o fato das algas serem seres unicelulares e de estrutura celular simples, o que as tornam mais fáceis de serem digeridas,

permitindo trabalhar com altas taxas de carga orgânica em reatores anaeróbios. Outra vantagem se deve ao fato de que as algas normalmente possuem poucos compostos sulfúricos, e, consequentemente, o biogás produzido a base destas algas deve conter uma concentração baixa deste gás. Deste modo, o biogás produzido por meio da digestão anaeróbia das algas é menos corrosivo, o que pode reduzir os custos na produção de energia, quando comparado ao biogás produzido à base de outros insumos (Verstraete *at al.*, 2010;Chisti, 2007).

Não obstante, alguns autores relatam que algumas espécies de microalgas podem ser muito resistentes à hidrólise, o que reduz drasticamente a sua biodegradalidade anaeróbia. De acordo com Okuda (2002), algumas espécies como o *Scenedesmus sp*. e a *Chlorella sp*. são conhecidas por terem parede celular recalcitrante. Durante seus experimentos, Golueke *et al*. (1957), identificaram células intactas no digestor e Uziel (1978) relatou a mesma observação mesmo depois de 30 dias. A utilização de técnicas de pré-tratamento, antes da utilização na digestão anaeróbia, pode melhorar significativamente sua biodegradabilidade. Isso pode fazer com que a matéria orgânica fique mais acessível às bactérias, degradando-a mais facilmente (Spanjers *et al.*, 2006; Bonmati *et al*., 2001).

Durante o seu crescimento as algas necessitam principalmente de CO_2, nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) e fósforo (PO_4^{3-}), em relações bem definidas, além de alguns outros elementos em menor quantidade (Chisti, 2007).

Considerando a quantidade e as características de vinhaça produzida em uma usina de etanol, o único fator limitante para a utilização da vinhaça tratada (via digestão anaeróbia) na produção de algas seria a baixa quantidade de nitrogênio presente no efluente. O restante dos requisitos são facilmente supridos, pois a vinhaça contém o restante dos nutrientes necessários, com liberação de CO_2 em grande quantidade durante a produção do etanol na indústria. Deste modo, é viável o cultivo de microalgas em usinas de etanol, onde as mesmas podem ser utilizadas na produção de biodiesel ou serem digeridas para a produção de biogás.

Devido aos fatores abordados e a experimentos realizados por Serejo (2012), os quais mostraram que as algas, durante o seu cultivo, tem por característica elevar o pH do meio, pode ser viável utilizar as microalgas cultivadas para a digestão anaeróbia em conjunto com a vinhaça (co-digestão), a fim de aumentar a produção de biogás. Além do aumento na produção de biogás, a utilização das algas pode ser empregada como uma forma de neutralizar

a vinhaça e viabilizar a sua digestão em meio anaeróbio, evitando assim o gasto com a adição de produtos tamponantes necessários para a digestão anaeróbia da vinhaça.

Produção de ácidos graxos voláteis pela fermentação da vinhaça.

Grande parte das pesquisas envolvendo a digestão anaeróbia da vinhaça visa à produção de biogás, entretanto, devido às características deste efluente, outra linha de investigação pode ser interessante: a utilização deste efluente na produção de ácidos orgânicos pela fermentação anaeróbia. Como já visto anteriormente, uma das fases do processo anaeróbio é a acidogênese, onde são formados ácidos orgânicos de cadeias curtas de carbono, tais como ácido acético, butírico, valérico e capróico.

A principal via de produção industrial de ácidos orgânicos é a partir de recursos fósseis (Eggeman e Verser, 2005), mas também são produzidos em menor escala, pela fermentação anaeróbia de substratos ricos em matéria orgânica, o que apresenta maior vantagem devido ao aumento do preço e da demanda por produtos petroquímicos (Huang *et al.,* 2007).

Os AGVs são amplamente utilizados pela indústria química na produção de álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e olefinas (Eggeman e Verser, 2005). São também utilizados para produção de bioplásticos (Cai *et al.,* 2009), bioenergia (Choi *et al.,* 2011; Uyar *et al.,* 2009 e) e na remoção biológica de nutrientes, azoto e fósforo, de água residuais (Lee *et al.,* 2014; Zheng *et al.,* 2010).

Dentre os ácidos graxos, o ácido propiônico se destaca pela ampla possibilidade de uso, onde o mesmo pode ser utilizado na indústria alimentar, farmacêutica, insumos agrícolas, produção de aromatizantes artificiais, perfumes, fungicidas, herbicidas e emulsionante (Playne, 1985). O ácido butírico pode ser empregado na fabricação de ésteres para composição de sabores artificiais na indústria alimentícia, fabricação de agentes emulsificantes e plastificantes. O ácido capróico ou hexanóico, por sua vez, pode ser utilizado no processo de esterificação para produção de ésteres de cadeia curta com aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (Skoronski. 2013).

Os principais fatores que influenciam na produção dos AGVs via fermentação anaeróbia são o pH e as composição do substrato utilizado (Chernicharo, 2007). As bactérias fermentativas acidogênicas atuam em uma ampla faixa de pH, entretanto, são extremamente sensíveis a pHs abaixo de 3,0 ou maiores que 11,0. Quando há a manutenção do pH em uma faixa de 4,0 a 8,0 a composição do substrato torna-se o parâmetro mais influente na produção dos ácidos (Liu *et al*., 2012). Levando em conta estes fatores, a vinhaça apresenta-se como um substrato ideal na produção de ácidos via fermentação anaeróbia, pois, além de apresentar pH entre 3,5 e 5,0, possui elevadas concentrações de açúcares e carboidratos na sua composição.

Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes agentes tamponantes na digestão anaeróbia da vinhaça, com o fim de produzir biogás e/ou ácidos orgânicos.

Hipóteses

1. É viável a utilização de produtos alternativos (ureia, sobrenadante do cultivo de algas ou a co-digestão com algas) na estabilização do pH durante a digestão anaeróbia da vinhaça, visando a produção de metano.

2. A vinhaça pode ser utilizada na obtenção de ácidos orgânicos produzidos na fase intermediária da digestão anaeróbia (acidogênese).

Escopo e estrutura da tese

Considerando os aspectos já apresentados, esta tese foi organizada em capítulos, na seguinte estrutura:

Capítulo 2: Apresentação de resultados de experimentos realizados com o intuito de avaliar: i) a utilização do sobrenadante resultante da produção de microalgas como regulador do pH, fornecendo a alcalinidade necessária para a digestão anaeróbia da vinhaça; ii) utilização da suspensão de algas cultivadas, pois esta, além de suprir a alcalinidade necessária, pode intensificar a produção de biogás pela co-digestão.

Capítulo 3: Identificação e aplicação de uma concentração de ureia que possa ser utilizada como agente tamponante na digestão anaeróbia da vinhaça, visando a produção de biogás, sem apresentar riscos de toxicidade.

Capítulo 4: Com os resultados obtidos nos capítulos anteriores, objetivou-se verificar a influência do agente tamponante na atividade e variabilidade de microrganismos durante o processo de digestão anaeróbia da vinhaça.

Capítulo 5: Considerando as características originais da vinhaça (pH e composição), realizaram-se testes preliminares para avaliar a viabilidade na produção de ácidos graxos voláteis de valor comercial por meio da fermentação anaeróbia da vinhaça.

Capítulo 6: Conclusões e recomendações gerais.

Capítulo 7: Referências bibliográficas utilizadas.

2 UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS OU SEU MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE BIOGÁS EM UM CICLO INTEGRADO[1]

Resumo: Com o efluente resultante da digestão anaeróbia da vinhaça é possível cultivar microalgas tanto para a produção de biodiesel quanto outros produtos, pois, mesmo depois de tratada, a vinhaça ainda contém os nutrientes para o cultivo das algas. Outro produto necessário para este cultivo é o CO_2, o qual também esta disponível em usinas de etanol. As microalgas têm por característica elevar o pH do meio de cultivo durante o seu crescimento, enquanto a vinhaça possui pH baixo. Desta forma, pode ser possível utilizar o sobrenadante resultante da separação após o cultivo de algas como forma de neutralizar a vinhaça, realizando a mistura da vinhaça com o sobrenadante na entrada do sistema e, viabilizar a sua digestão em meio anaeróbio, evitando assim o gasto com a adição de produtos químicos. Outra opção é a utilização da suspensão completa após o cultivo das algas, o que além de favorecer no tamponamento, pode elevar a produção de biogás, já que as algas são seres unicelulares e de estrutura celular simples. Para comprovar esta teoria foram realizados experimentos em bateladas utilizando sobrenadantes (proveniente de diferentes formas de separação) e suspenção de microalgas. Estes ensaios mostraram que a alcalinidade do sobrenadante resultante do cultivo de microalgas, apesar do seu pH elevado, é muito baixa (apenas 350 $mgCaCO_3.L^{-1}$), o que o torna ineficiente para ajudar a estabilizar o pH durante a digestão anaeróbia da vinhaça. Os resultados dos experimentos realizados utilizando a suspenção de microalgas mostrou que, mesmo contendo alcalinidade alta, a suspenção não é suficiente para estabilizar o pH durante a co-digestão com a vinhaça, sendo necessária a adição de outros produtos (como $NaHCO_3$) que auxiliem na estabilização do pH.

Palavras-chaves: alcalinidade, bioenergia, produção de metano, ácidos graxos voláteis, digestão de vinhaça.

[1]Artigo publicado: "Formagini, E.L., Marques, F.R., Serejo, M.L., Paulo, P.L., Boncz, M.A., 2013. **The use of microalgae and their culture medium for biogas production in an integrated cycle**. Water Science & Technology 1–6. doi:10.2166/wst.2013.803".

INTRODUÇÃO

O Brasil possui destaque mundial na produção de etanol à base de cana-de-açúcar, no entanto, esta atividade gera vários subprodutos, com destaque para a vinhaça. Para cada m^3 de etanol, são gerados aproximadamente 12 m^3 de vinhaça (van Haandel 2005).

Atualmente, este efluente é utilizado como fertilizante para as áreas de cultivo de cana-de-açúcar por meio do processo de fertirrigação (Figura 2-1 - A), mas além do grande volume gerado, este resíduo possui alta concentração de matéria orgânica e pH baixo, o que pode representar riscos durante o seu uso na fertirrigação (quando aplicado sem controle).

Como alternativa para reduzir este risco é a utilização do processo de digestão anaeróbia para o tratamento da vinhaça, o qual além de remover a matéria orgânica, oferece um efluente rico em nutrientes para ser utilizado na fertirrigação e ainda produz energia pelo biogás formado (Van Haandel, 2005). Esta alternativa altera o ciclo de produção de etanol, colocando uma nova fonte de energia, como pode ser visualizado na figura 2-1- B.

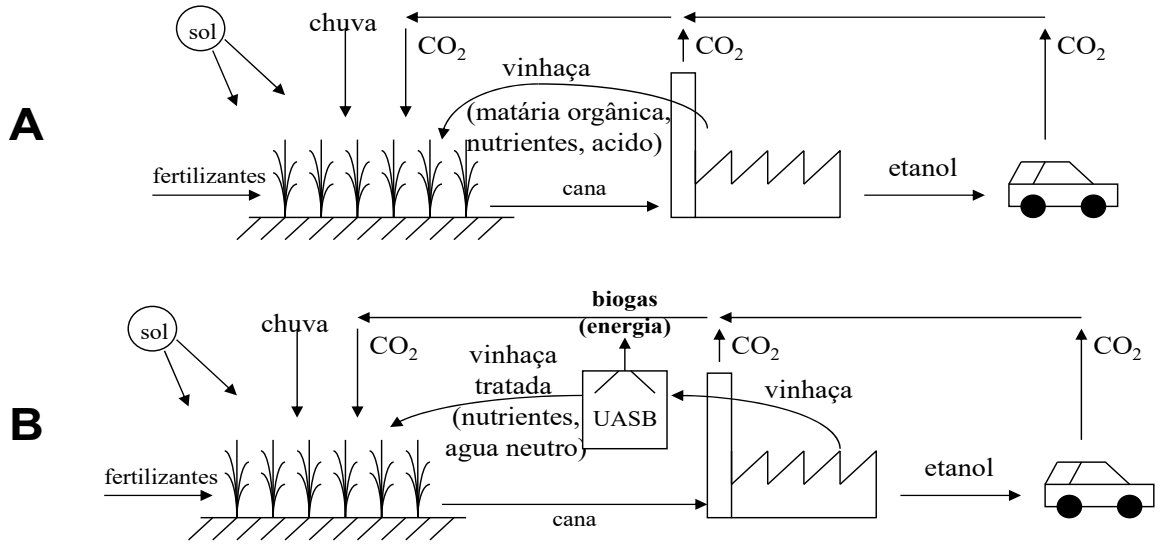


Figura 2-1: A - Ciclo atual da produção etanol a base de cana-de-açúcar; B - Integração da digestão anaeróbia da vinhaça como alternativa de tratamento deste efluente e consequente aumento na produção de energia.

Considerando que o efluente resultante da digestão anaeróbia da vinhaça é rico em nutrientes, este pode ser utilizado como máteria-prima em outros processos, como, por exemplo, em meio de cultivo para a produção de microalgas (Cenciani *et al.,* 2011), as quais

podem ser utilizadas para a produção de biodiesel ou outros compostos com valor agregado (Koller *et al.*, 2012). Uma das características do processo de cultivo de algas é a tendência das algas aumentarem o pH do seu meio de cultivo como resultado da sua absorção contínua de CO_2. Ao mesmo tempo, a vinhaça possui pH baixo, o que é fator limitante para a digestão anaeróbia e o controle inadequado deste parâmetro tende a resultar em ainda mais acidificação, podendo inibir a produção de biogás.

Pensando em um sistema composto da digestão anaeróbia da vinhaça com consequente cultivo de microalgas, outro sistema torna-se interessante: a utilização de sobrenadante resultante da separação após o cultivo de algas como forma de neutralizar o pH da vinhaça e viabilizar a sua digestão em meio anaeróbio, evitando assim o gasto com a adição de produtos químicos (Figura 2-2 - A).

Com foco na geração de energia por meio de biogás, outra opção que pode ser incorporada neste ciclo é a digestão anaeróbia das microalgas, a qual pode ser realizada com a utilização da suspensão inteira de microalgas em co-digestão com a vinhaça. Esse processo, além de favorecer no tamponamento, pode elevar a produção de biogás (Figura 2-2 – B). Ainda, podem ser utilizados reatores separados (um para digerir vinhaça e outro para microalgas) com foco somente na geração de energia (Figura 2-2 – C).

As microalgas são seres de composição celular simples, sem a presença de estruturas complexas como lignina e celulose, o que as torna mais fáceis de serem digeridas (Gunaseelan, 1997). Além de possuírem poucos compostos sulfúricos e, consequentemente, o biogás produzido a base destas algas deve conter concentração baixa deste gás. Assim, o biogás produzido por meio da digestão anaeróbia das algas é menos corrosivo, garantindo maior vida útil dos equipamentos necessários e menor custo na produção da energia quando comparado ao biogás produzido à base de outros insumos (Verstraete *at al.,* 2010, Chisti, 2007).

Em todas as opções apresentadas, a possibilidade de reciclar os nutrientes para o cultivo de cana-de-açúcar por meio da fertirrigação permanece inalterada. Deste modo, seja com a simples digestão anaeróbia da vinhaça (como apresentada na figura 2-1- B) ou com os sistemas propostos na figura 2-2 (tanto para a produção de biodiesel quanto para a produção

de biogás) os efluentes resultantes são capazes de suprir grande parte da demanda de nutrientes necessários para o cultivo de cana.

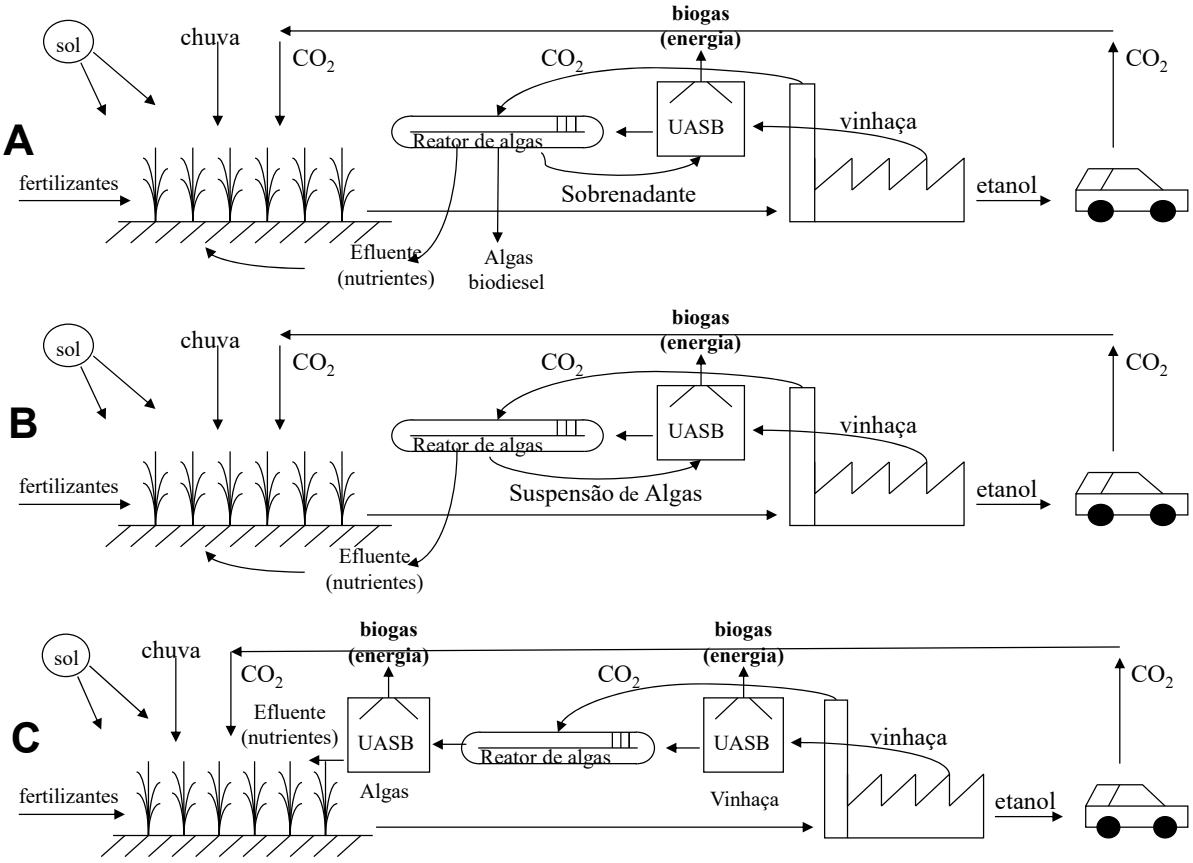


Figure 2-2: A- Integração do cultivo de microalgas para a produção de biodiesel com a utilização do sobrenadante resultante da separação como fonte de alcalinidade para a digestão anaeróbia da vinhaça; B – Utilização de toda a suspenção de algas como fonte de alcalinidade e aumento na produção de biogás em co-digestão com a vinhaça; C – Digestão anaeróbia das microalgas somente para a produção de biogás.

Considerando que, durante o processo de fermentação são liberados cerca de 755 kg de CO_2 para cada m^3 de etanol produzidos, bem como cerca de 6,45 kg de N e 1,65 kg de P (valores médios estimados, visto que a composição da vinhaça pode sofrer variações devido a vários fatores como: origem do caldo, processos industriais, características de solo entre outros), e considerando a fórmula molecular para biomassa de microalgas de $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ (Larsdotter 2006), o elemento limitante entre os recursos disponíveis é o nitrogênio.

Uma forma para suprir esta deficiência é a utilização de ureia como fonte de nitrogênio. Atualmente, a ureia é aplicada no solo cultivado com cana como complemente a fertirrigação, entretanto, a mesma pode ser utilizada para a digestão anaeróbia da vinhaça como alternativa de baixo custo para controlar a alcalinidade no reator UASB e estabilizar o processo (Boncz et al., 2012; van Haandel A.C., 2005). Deste modo, a utilização da vinhaça digerida anaerobiamente para o cultivo de algas poderia produzir biomassa suficiente para produzir mais 26,9 kg de metano por m^3 de etanol produzido, o que significa aumento de 40% do potencial de produção de energia.

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da utilização do meio de cultivo (sobrenadante) da produção de algas como fonte de alcalinidade, a fim de estabilizar o pH durante a digestão anaeróbica da vinhaça, bem como avaliar o potencial de produção de biogás com a digestão anaeróbia da suspensão de microalgas separadamente ou em co-digestão com a vinhaça.

METODOLOGIA

Para a realização dos experimentos foi utilizado consórcio de microalgas (composto predominantemente por *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*, identificadas por microscopia) cultivadas em um fotobioreator situado no laboratório de efluentes da UFMS, com capacidade de 40 litros, alimentado com uma mescla de vinhaça tratada e meio BBM.

A vinhaça utilizada foi oriunda de uma usina produtora de etanol, situada no município de Fátima do Sul, MS (vinhaça utilizada pertencente ao lote A, descrita no anexo 1). Todos os experimentos foram realizados em duplicata, utilizando frascos de vidro com capacidade de 500 mL, com 20% de *headspace*. Em todos os experimentos foram utilizados 4 $gSVT.L^{-1}$ de biomassa oriunda de um reator tipo UASB alimentado com vinhaça no mesmo laboratório. Todos os ensaios foram conduzidos seguindo a metodologia para ensaios de atividade metanogênica específica (Owen *et al.,* 1979).

Depois de preenchidos, os frascos foram selados com tampa de borracha e lacre de alumínio, onde a purga do oxigênio presente foi realizada utilizando N_2. Os frascos foram monitorados e analisados de acordo com cada experimento realizado.

O primeiro experimento foi realizado com o objetivo de verificar a possibilidade de utilizar o sobrenadante (meio de cultivo das microalgas) como fonte de alcalinidade, a fim de elevar e manter o pH neutro durante a digestão anaeróbia da vinhaça, verificando ao mesmo tempo o efeito de diferentes tipos de processo de separação na adequação do material para este propósito. Os sobrenadantes avaliados foram obtidos por separação utilizando processo físico, por meio do método da filtração (sobrenadante denominado "filtrado") e processos químicos (utilizando teste de Jarros), onde foram utilizados dois reagentes, natural e outro químico.

Como produto natural foi utilizado solução salina de *Moringa oleifera*, e como produto químico foi utilizado uma solução de cloreto férrico. A Tabela 2-1 apresenta as características dos diferentes sobrenadantes avaliados. As soluções testadas foram obtidas com a mistura de 50% de sobrenadante e 50% de vinhaça diluída, onde cada sobrenadante foi testado separadamente. Cada mistura foi testada com e sem a adição de bicarbonato de sódio como agente tamponante auxiliar (visto que o objetivo é a utilização do sobrenadante como tampão).

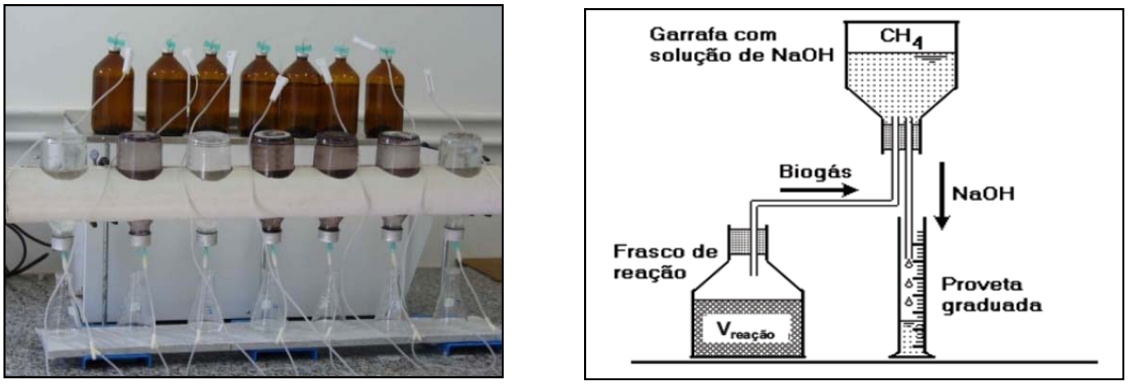
Tabela 2-1: Características apresentadas pelos sobrenadantes utilizados.

Sobrenadante	**pH**	**Alcalinidade ($mgHCO_3^-.L^{-1}$)**	**Processo de separação**
Filtrado	9,26	210,0	Filtração (filtro com 0,45µm de porosidade)
Coagulante: *Moringa oleífera*	9,15	210,0	Coagulação e floculação (solução salina de Moringa com média de 500 $mg.L^{-1}$).
Coagulante: Cloreto Férrico	7,43	95,0	Coagulação e floculação (solução utilizada de cloreto férrico com média de 500 $mg.L^{-1}$).

A dosagem de $NaHCO_3$ foi realizada com base nos resultados obtidos em experimentos realizados no laboratório (dados não publicados) que indicam uma concentração de 0,2 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$. Deste modo, foram adicionados 2016,0 $mgNaHCO_3.L^{-1}$ para os sobrenadantes filtrado e moringa, o qual já continha 210 $mgHCO_3.L^{-1}$, e 1136,0 $mgNaHCO_3.L^{-1}$ para o sobrenadante cloreto férrico.

No inicio e no final dos experimentos foram analisadas a demanda química de oxigênio (DQO), a alcalinidade formada, o pH e os ácidos voláteis totais (AGV) de acordo com metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Waterand Wastewater* (APHA, 2005). A produção de metano foi quantificada diariamente utilizando a metodologia

de deslocamento de líquido descrita em Aquino *et al.* (2007), utilizando frascos de Mariotte contendo solução de NaOH 18% para captura do gás CO_2 presente no biogás. A Figura 2-3 apresenta detalhes do teste e um esquema do método utilizado.



(a) (b)

Figura 2-3: (a) Detalhes das medições de metano; (b) Esquema do método utilizado para as medições. (Fonte: Aquino *et al*. (2007)).

O segundo experimento foi realizado utilizando a suspensão de microalgas, onde foi testada somente a digestão das microalgas, uma mescla de microalgas com vinhaça, na proporção de 50% (com e sem a adição de $NaHCO_3$) e uma solução padrão de vinhaça com $NaHCO_3$ (0,2g.gDQO^{-1}). O monitoramento foi realizado da mesma forma que o primeiro experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos na caracterização dos sobrenadantes utilizados (Tabela 2-2) é possível visualizar que mesmo com o pH elevado, nos casos dos sobrenadantes separados por filtração e por solução salina de *Moringa oleífera*, os mesmos não apresentaram alcalinidade elevada como se esperava. Como consequência, a adição destes sobrenadantes, mesmo que na mesma proporção de vinhaça, não resulta na neutralização do pH, favorecendo a acidificação rápida (Figura 2-4).

Tabela 2-2: Caracterização das amostras de sobrenadantes utilizados denominados de acordo com o processo de separação.

Amostra	Nº de amostras	pH	Alcalinidade ($mgCaCO_3/L$)	DQO (mg/L)	AGV (mg/L)
Filtrado	3	9,26 ± 0,04	348,2 ± 2,1	112,9± 21,0	ND*
Coagulante: *Moringa oleífera*	3	9,15 ± 0,06	352,0 ± 3,0	244,0 ± 54,9	ND*
Coagulante: Cloreto Férrico	3	7,43 ± 0,1	158,2 ± 2,6	118,3 ± 29,3	ND*

*Não determinado pela método utilizado.

Também na figura 2-4 é possível observar que a similaridade entre os resultados obtidos é decorrente da adição de $NaHCO_3$, e não pela forma de separação do sobrenadante. Mesmo com maior produção de metano pelas soluções onde foram adicionados $NaHCO_3$, os resultados não foram satisfatórios quando analisados a DQO removida e o potencial de produção de metano de acordo com a carga orgânica aplicada (Tabela 2-3). Isto pode ser devido a queda do pH, o qual ficou em torno de 4,5 para as soluções sem $NaHCO_3$ e 5,5 com $NaHCO_3$, e ao acumulo de ácidos em todas as soluções.

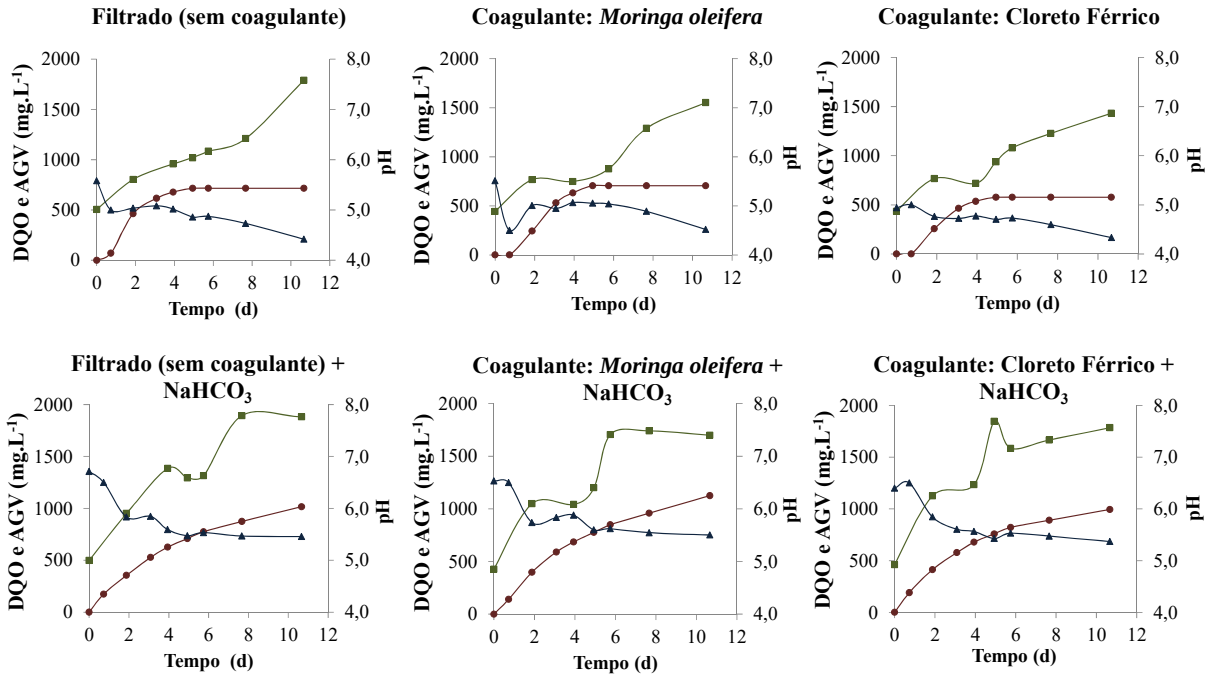


Figura 2-4: Resultados de produção de metano (em DQO (●)); pH (▲) e AGV (■) para os testes com sobrenadantes e vinhaça, com e sem a adição de $NaHCO_3$.

Tabela 2-2-3: Parâmetros avaliados no inicio e final dos experimentos

Amostra	Alcalinidade Inicial (mg/L)	Alcalinidade final(mg/L)	DQO Inicial (mg/L)	% remoção de DQO	CH_4 - COD (mg/L)	% de DQO em CH_4
Filtrado	118,0	250,0	6016,0	31,5	716,2	37,8
Filtrado + $NaHCO_3$	1672,0	1698,0	6257,7	34,0	1016,3	47,8
Coagulante: *Moringa oleífera*	108,0	394,0	6300,4	26,1	705,2	42,9
Coagulante: *Moringa oleifera* + $NaHCO_3$	1626,0	1740,0	6243,6	30,7	1125,9	49,4
Coagulante: Cloreto Férrico	60,0	176,0	6272,0	35,3	577,3	26,1
Coagulante: Cloreto Férrico + $NaHCO_3$	1492,0	1540,0	6499,6	33,9	994,4	45,1

A figura 2-5 e a tabela 2-4 apresentam os resultados obtidos com os testes utilizando a suspenção de algas. É possível observar que, da mesma forma que o sobrenadante, a

suspenção de algas não é capaz de estabilizar o pH da vinhaça, quando testada a mescla (50%) de microalgas e vinhaça. Na condição em que o $NaHCO_3$ foi adicionado como agente tamponante, mesmo com taxa de remoção de DQO de 54,7% (momento de parada do teste), 89% desta DQO foi convertida em CH_4.

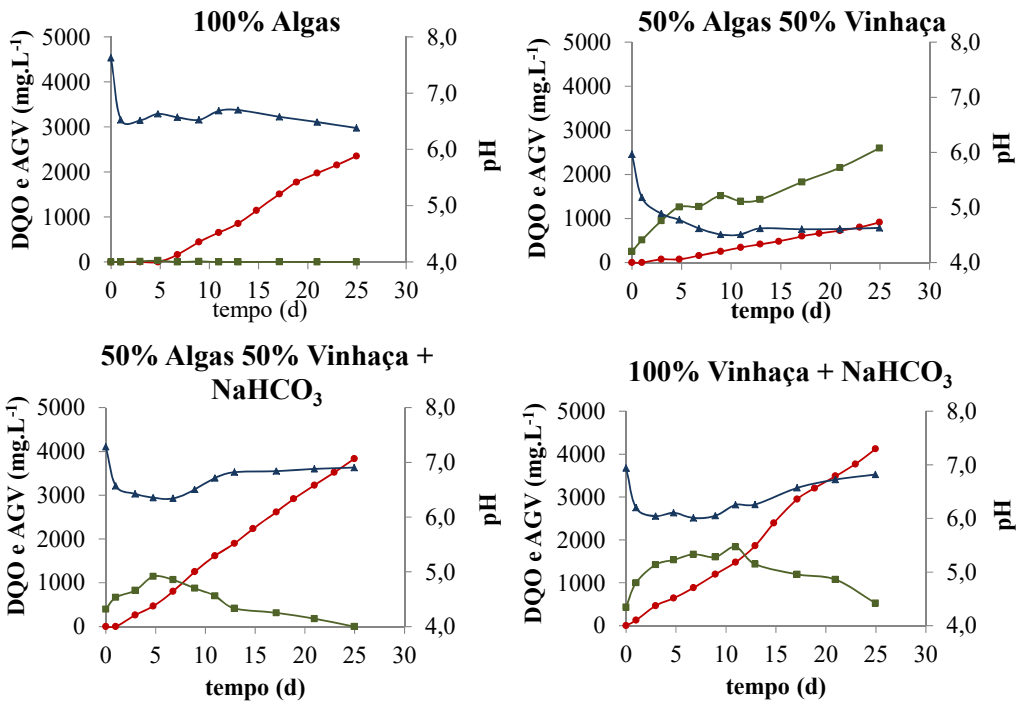


Figura 2-5: Resultados de produção de metano (em DQO (●)); pH (▲) e AGV (■) para os experimentos utilizando a suspenção de microalgas.

Tabela 2-4: Parâmetros avaliados no inicio e final dos experimentos

Amostra	Alcalinidade Inicial (mg/L)	Alcalinidade final (mg/L)	DQO Inicial (mg/L)	% remoção de DQO	CH4 - COD (mg/L)	% de DQO removida convertida em CH4
100 % Alga	603,0	1160,0	8690,5	33,2	2354,2	81,6
50% Alga 50% Vinhaça	206,0	370,0	8214,1	37,4	912,9	29,7
50% Alga 50% Vinhaça+ $NaHCO_3$	1962,0	2190,0	7867,6	54,7	3833,4	89,1
100 % Vinhaça + $NaHCO_3$	1547,0	1650,0	7477,9	67,3	4121,6	82,0

Com a digestão somente das algas, há queda acentuada do pH na primeiras 24 horas e, após isso o mesmo se mantem estável. Este fato é devido ao aumento na alcalinidade no sistema e a ausência (sem acúmulo) de ácidos graxos voláteis. A remoção da DQO até a finalização do teste foi baixa (33,2%), entretanto, 81,6% da DQO removida encontrava-se na forma de CH_4. Considerando uma avaliação teórica com base em Sialve *et al.* (2009), é

possível estimar a produção de 0,24 $gCH_4.gDQO^{-1}$ ou 0,8 $LCH_4.gSV^{-1}$ durante a digestão das algas. Aplicando esta estimativa para os testes realizados, a produção de metano deveria ser em torno de 1,09 litros, no entanto, foi encontrada somente a metade deste valor. Estes resultados são similares aos observados por Vestrate *et al.* (2010), os quais obtiveram entre 0,24 a 0,36 litros de CH_4 por grama de SV.

CONCLUSÕES

A hipótese de utilizar o sobrenadante da produção de algas na digestão anaeróbia da vinhaça não se comprovou nos testes em batelada, pois o mesmo não possui alcalinidade suficiente, bem como a utilização da suspenção de algas juntamente com a vinhaça. A digestão anaeróbia das algas mostrou-se viável em relação ao aumento no potencial de produção de biogás, com um rendimento de 0,5 L de biogás por grama de SVT de microalgas, consolidando a hipótese de colocar dois reatores, um digerindo vinhaça e outro digerindo algas. Entretanto, ainda há a necessidade da realização de testes mais completos e com biomassa com melhor qualidade.

3 EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DA UREIA COMO AGENTE TAMPONANTE NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA

Resumo: A eficiência da ureia como agente tamponante na digestão anaeróbia da vinhaça foi avaliada por meio de experimentos em batelada e contínuo, ambos em condições mesofílicas (31 ±3°C). Para o teste em batelada, utilizou-se 4 $g.L^{-1}$ de ureia combinado com três diferentes concentrações de DQO (2, 8 e 20 $g.L^{-1}$). Os resultados obtidos neste experimento indicaram que a relação de 0,22 $gUREIA.gDQO^{-1}$ é viável para ser empregada na digestão anaeróbia da vinhaça, quando o objetivo é manter o pH neutro e estável e viabilizar a produção de biogás. Em seguida, esta concentração foi testada na operação de um reator tipo UASB em escala de bancada operado em fluxo contínuo e com recirculação. O reator foi alimentado com vinhaça utilizando uma carga orgânica volumétrica de 7,92 ± 1,07 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 1 dia. A operação do reator foi dividida em duas etapas de acordo com o agente tamponante utilizado. Na 1ª etapa, com duração de 33 dias, foram utilizados ureia e $NaHCO_3$, onde a concentração de $NaHCO_3$ foi reduzida até cessar a sua utilização. Esta etapa foi subdividida em 2 fases. Na 2ª etapa (69 dias) foi utilizado somente ureia, com o aumento gradativo na concentração aplicada. Os resultados mostraram que, utilizando a combinação de ureia e $NaHCO_3$ o pH se manteve estável (7,59) favorecendo a produção de biogás e remoção da DQO (eficiência acima de 80%). Na 2ª etapa, mesmo com o pH neutro, houve redução no percentual de remoção de DQO (para 50%), com acumulo de AGVs e consequente queda na produção de biogás. Embora a hidrólise da ureia tenha sido eficiente na formação da alcalinidade total, uma possível causa da instabilidade pode ter sido a baixa disponibilidade de alcalinidade bicarbonato disponível no meio, uma vez que a relação entre a alcalinidade intermediaria e bicarbonato (AI/AB) chegou a 4,02 e 3,35 nas ultimas fases de operação do reator, quando o ideal é uma relação abaixo de 0,3. Aliado a estes fatores, uma possível alteração nos microrganismos presentes na biomassa, especialmente nas produtoras de metano que podem ser dependentes do $NaHCO_3$, o qual foi retirado na segunda etapa.

Palavras chaves: controle do pH, toxicidade da amônia, UASB.

INTRODUÇÃO

A digestão anaeróbia ocorre pelo consórcio de microrganismos anaeróbios, onde a matéria orgânica é convertida, principalmente, em gás metano e carbônico. Esse processo se dá basicamente em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. O grau e taxa de atividade em que os microrganismos anaeróbios operam são influenciados por diversos fatores, tais como temperatura, tipo de substrato utilizado e carga orgânica aplicada (van Haandel e Lettinga, 1994; McCarty, 1964). Contudo, os microrganismos que mais requerem atenção são as arqueas metanogênicas, visto que, são mais sensíveis que os demais, e possuem coeficiente de produção celular mais baixo (van Haandel e Lettinga, 1994; Pohland, 1992; McCarty, 1964).

Além destes fatores, o desempenho das arqueas metanogênicas, também é influenciado pela ausência ou excesso de nutrientes, presença de compostos tóxicos e principalmente, pela faixa de pH do meio, visto que a faixa ideal de atuação destes microrganismos é entre 6,3 e 7,8 (Pohland, 1992).

Em um sistema anaeróbio estável ocorre o equilíbrio entre o dióxido de carbono e os íons carbonato e bicarbonato, oferecendo resistência à mudanças bruscas no pH. No entanto, essa capacidade de tamponamento é proporcional à concentração de bicarbonato presente no meio (Ward *et al*., 2008). Como a vinhaça não possui alcalinidade significante, são necessárias medidas que ajudem a neutralizar e estabilizar o pH.

Várias estratégias podem ser empregadas para auxiliar neste parâmetro e viabilizar a digestão anaeróbia da vinhaça, dentre as quais se destacam, principalmente, a utilização de produtos químicos. Estes produtos podem ser divididos basicamente em três grupos, sendo eles: a) Os que fornecem alcalinidade diretamente, como o hidróxido de sódio e o bicarbonato (Ribas-Döll e Foresti, 2010; Siqueira *et al*., 2008; Harada *et al*., 1996); b) Os que reagem com o gás carbônico para formar a alcalinidade bicarbonato, como a cal virgem e a cal hidratada (Chernicharo, 2007); c) Os que fornecem alcalinidade indiretamente, liberando alcalinidade por meio de alguma reação, como a ureia ($CO(NH_2)_2$) (Boncz *et al*., 2012; van Haandel, 2005).

A adição da ureia na digestão anaeróbia da vinhaça como fonte de alcalinidade foi relatada nos experimentos apresentados Boncz *et al*. (2012), onde evidenciaram em testes em bateladas, que a adição de 0,40 $mg.L^{-1}$ de ureia é suficiente para elevar e manter o pH próximo de 7,0 durante a digestão anaeróbia da vinhaça. No entanto, quando os autores aplicaram esta concentração de ureia em um reator de fluxo contínuo, o sistema entrou em colapso, com queda na produção de biogás e no pH. Este resultado foi atribuído à dosagem insuficiente de ureia, onde a alcalinidade formada não foi suficiente para manter o pH neutro, e não à algum tipo de inibição ou toxicidade ocasionada pela amônia, visto que, a concentração máxima deste composto foi de 96 $mgN\text{-}NH_3.L^{-1}$.

Budiyono *et al*. (2013) e Syaichurrozi *et al*. (2013) também apresentam trabalhos utilizando a adição de ureia para a digestão anaeróbia da vinhaça em experimentos em bateladas. Todavia, o objetivo destes autores não foi à utilização deste composto como tampão (para manter o pH neutro durante a realização dos experimentos os autores utilizaram uma solução de NaOH 2N). O objetivo de ambos os autores foi avaliar qual a melhor relação carbono/nitrogênio para melhor eficiência na produção de biogás.

A ureia, ao ser hidrolisada durante a digestão anaeróbia, forma $N\text{-}NH_3$ e CO_2, contribuindo com o aumento da alcalinidade dentro do reator. Além de fornecer alcalinidade, pode contribuir como fonte de nitrogênio para cana-de-açúcar durante a fertirrigação, visto que a quantidade de nitrogênio presente na vinhaça é inferior à necessidade nutricional dos solos cultivados com cana-de-açúcar (Van Haandel, 2005). Entretanto, é necessário cautela na utilização da ureia, visto que existem riscos na sua utilização, pois a amônia resultante da hidrólise, mesmo sendo um composto importante para o crescimento dos microrganismos (Chen *et al*., 2008), dependendo da concentração, é potencialmente tóxica para os microrganismos anaeróbios (Sterling Jr. *et al*., 2001).

A forma que a amônia se apresenta dentro do sistema esta diretamente relacionada ao pH do meio. Quando há a presença elevada de íons de hidrogênio (pH igual ou inferior a 7,2) toda a amônia se encontra na forma de íon amônio (NH_4^+).

Quando há a redução dos íons de hidrogênio e o aumento do pH, a amônia passa para a forma de amônia livre (NH_3) (Yenigün e Demirel, 2013).

Alguns autores, como Rajagopal *et al*. (2013), Chen *et al*. (2008) e McCarty (1964), indicam que a concentração de amônia presente no sistema não deve ultrapassar 3000 $mg.L^{-1}$ para não ocorrer inibição. Concentrações de amônia entre 1500 a 3000 $mg.L^{-1}$, com pH em acima de 7,5 também apresentam riscos, pois valores acima de 200 $mgNH_3.L^{-1}$ são tóxicos para as metanogênicas . (Chen *et al*., 2008; McCarty, 1964). Estas concentrações inibitórias podem apresentar variações para cada sistema, pois além dos fatores citados, outros fatores como a composição do substrato, tipo de inoculo, condições ambientais (especialmente temperatura, pH) e períodos de aclimatação do lodo também influenciam na inibição dos microrganismos em conjunto com a amônia (Chen *et al*., 2008).

Considerando estes fatores, este trabalho objetivou determinar e avaliar a concentração de ureia a ser utilizada durante a digestão anaeróbia da vinhaça, a fim de proporcionar efeito tamponante, estabilidade no sistema e produção de biogás.

METODOLOGIA

Experimento em batelada

Para determinar a relação entre a concentração de ureia e a carga orgânica aplicada, realizou-se um teste em batelada utilizando uma concentração constante de ureia, para três concentrações de DQO. O teste foi realizado em bateladas, seguindo a metodologia descria por Angelidaki *et al*. (2009), utilizados frascos de vidro com volume útil de 500 mL, com 400 mL de fase líquida e em duplicata. Como substrato foi utilizado vinhaça (proveniente no lote B apresentado no capítulo 2) diluída em três concentrações de DQO: 2, 8 e 18 $gDQO.L^{-1}$. Para todas as concentrações de DQO foi utilizado 4 $gCO(NH_2)_2.L^{-1}$ de ureia como agente tamponante (concentração única de ureia para todas as diluições de vinhaça). Em cada frasco foram utilizados 4 $gSTV.L^{-1}$ de lodo de inoculo, proveniente de um reator tipo UASB em escala de bancada, alimentado com vinhaça e $NaHCO_3$ como agente tamponante.

Após os frascos serem devidamente tampados, a purga do oxigênio presente foi realizada utilizando nitrogênio gasoso (N_2). O teste foi realizado em uma sala climatizada a uma temperatura média de 30 ± 3°C, com agitação manual diária.

A medição do volume de biogás foi realizada diariamente, por meio do método de deslocamento de volume apresentado por Aquino *et al*. (2007), onde o biogás é lavado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 18%) para a absorção do CO_2.

Para melhor compreensão das reações também foram monitorados os seguintes parâmetros: pH; ácidos graxos voláteis (AGV); demanda química de oxigênio solúvel (DQO) e nitrogênio amoniacal; seguindo a metodologia descrita em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Experimento contínuo

Para a realização deste experimento foi utilizado um reator UASB com volume útil de 900 ml, mantido em uma sala climatizada a uma temperatura média de 32 ± 2°C. Um terço do volume total do reator foi preenchido com lodo, provindo de outro reator UASB escala de bancada, no qual foram utilizados no tratamento de vinhaça com bicarbonato de sódio e ureia como agentes. O reator foi operado em fluxo continuo com recirculação do efluente, onde ambas as vazões foram de 0,9 $L.d^{-1}$, com 6,7 ± 1,2 $gDQO.L.d^{-1}$ de carga orgânica volumétrica aplicada (vinhaça utilizada nos experimentos foi proveniente no lote B, com informações descritas no anexo 1).

A operação do reator foi dividia basicamente em duas etapas, nas quais os tampões utilizados e suas concentrações variaram da seguinte forma:

1ª Etapa: Consistiu na adaptação do lodo para a utilização somente de ureia como agente tamponante, reduzindo gradativamente a concentração de bicarbonato de sódio na sua alimentação. Esta etapa teve duração de 33 dias.

2ª Etapa: Após a completa retirada de bicarbonato de sódio de sua alimentação, o reator foi operado por 69 dias, utilizando somente ureia como agente tamponante, com concentração inicial de 0,22 $gCO(NH_2)_2.gDQO^{-1}$.

No decorrer do experimento a concentração da ureia variou de 0,22 a 0,30 $gCO(NH_2)_2.gDQO^{-1}$ devido as variações observadas no pH.

Análises físico-químicas

Para a avaliação do comportamento do reator sob tais condições, em todas as fases, foram analisados a alcalinidade total, a DQO, o nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e os AGV para o afluente e o efluente. A metodologia utilizada para análise foi de acordo com o descrito em "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 2005).

A produção de biogás foi monitorada *on-line* por meio do software "Guardian 1.2" (Boncz *et al*., 2008), conectado a um computador. Para isso foi utilizado um medidor de pulso (para o pH) desenvolvido por Boncz *et al*. (2008). As leituras foram registradas pelo software a cada 15 segundos e armazenadas em um banco de dados.

O volume total da produção de biogás foi calculado a partir dos dados obtidos pelo medidor de vazão de biogás, corrigidos em função da temperatura ambiente, pressão parcial de vapor d'água e pressão hidrostática do medidor de vazão de gás. Para tais correções foi utilizado o princípio das leis dos gases geral, dada pela equação 3-1 da MilliGascounter®10 (Ritter, 2005).

$$VN = Vi \,.\, \frac{Pa - Pv + Pl}{Pn} \,.\, \frac{Tn}{Ta} \qquad \text{Eq. 3-1}$$

Em que *VN* é o volume normalizado de biogás (mL), *Vi* é o volume medido (mL), *Pa* é a pressão atmosférica (mbar), *Pv* é a pressão hidrostática sobre a câmara de medição (1,5 mbar); *Pn* é a pressão atmosférica (1013,25 mbar), *Tn* é a temperatura normal (273,15 K), e *Ta* é a temperatura ambiente (K).

Análise microbiológica

Como avaliação complementar foram determinadas as taxas de diversidade e similaridade de quatro amostras de lodo, selecionadas durante a operação do reator. As amostras foram identificadas como: A – lodo inoculado no reator no inicio da operação

(tempo: 0); B – lodo retirado do reator quando cessou a utilização de $NaHCO_3$, iniciando a 2ª etapa (tempo: 33 dias); C – lodo final retirado do reator quando finalizou o experimento (tempo: 102 dias) e; D – mescla da massa de lodo formada no topo do reator durante a etapa em que foi utilizada somente a ureia como agente tamponante (amostra mista coletadas nos dias 83, 92 e 102) . As amostras foram armazenadas imediatamente após a retirada do reator e mantidas a -18ºC até o seu transporte até o local de realização da análise molecular.

A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Fast® DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, LLC), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. Após a extração o DNA foi mantido a uma temperatura de -20ºC. As regiões V2-V3 dos genes 16S RNAr das arqueas foram amplificados pelo método DGGE, utilizando os *primers* A 109(T)-F e 515-GC-R (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Lane 1991; Muyzer *et al*., 1993; Grosskopf *et al*., 1998). A mistura da PCR, com volume final de 50 µL, continha: 1 µl de cada *primer* (10 ng μl^{-1} para cada *primer*); 25 µL de BIOMIX (mistura de tampão para reação de PCR e desoxinucleótido-trifosfatos (dNTPs) pronta para uso (Bioline, Ecogen)); 2 µL do DNA extraído e água Milli-Q até completar o volume final. A PCR foi realizada em um termociclador (Bio Rad Laboratories, Inc.), com o seguinte programa de termociclagem para amplificação das arqueas: 2 minutos de pré-desnaturação à 95ºC; 35 ciclos de desnaturação à 95ºC por 30 segundo; anelamento à 52ºC por 40 segundos e; alongamento à 72ºC por 90 segundos, com o alongamento final à 72ºC por 5 minutos (Rodríguez *et al*., 2012). Para a verificação do tamanho e tipo de fragmento de DNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,8%, com marcador de peso molecular de 2000 bp Hypperladder II (Bioline, USA Inc).

A análise de DGGE para amplificação das arqueas foi realizada de acordo com Rodríguez *et al*. (2012), utilizando gel de poliacrilamida 8% (w/v), com gradiente desnaturante de ureia e formanida de 30-60% (Ben-Amor et al., 2005; Roest et al., 2005). A elétroforese foi realizada utilizando *D-Code Universal Mutation Detection System* (Bio Rad Laboratories, Inc) com tampão TAE 0,5x há 60°C e 65V durante 18 horas. A coloração do gel foi realizada com *GelRed Nucleic Acid Gel* (1/10000 de diluição; Biotium).

Os perfis de DGGE foram comparados utilizando o programa "GelCompar IITM" (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). Para calcular o índice de diversidade de *Shannon-Wiener* (H), bem como o coeficiente de similaridade foi adotada a metodologia descrita em Lebrero *et al*. (2013).

A extração das bandas individuais do gel de DGGE e a purificação dos produtos da PCR foram realizadas de acordo com Rodriguez *et al*. (2012). A posição taxonômica das sequências foi obtida por meio da ferramenta de classificação RDP, com nível de confiança de 80% (Wang *et al*., 2007). Além disso, as sequências foram comparadas com as sequências armazenadas no GenBank, pela ferramenta de busca BLAST, no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (National Centre for Biotechnology Information - NCBI) website (McGinnis e Madden, 2004). Juntamente com os programas BLAST, o programa DECIPHER foi utilizado como ferramenta controle (Wright *et al*., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento em batelada

A figura 3-1 apresenta os resultados de CH_4 e AGV (em mgDQO.L^{-1}), pH bem como as variações de amônia (N-NH_3 NH_3 e NH_4^+) obtidos no experimento em batelada. É possível observar que em todas as condições testadas a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) foi semelhante (1773 ± 64 mg.L^{-1}), entretanto, devido ao pH elevado (9,5) na condição com 2 gDQO.L^{-1}, toda amônia estava presente na forma de NH_3. Para a condição com 8 gDQO.L^{-1} o pH também apresentou altos valores (8,89 no segundo dia do experimento e estabilizando em 8,20), resultando em uma concentração máxima de 517 mgNH_3.L^{-1} com estabilização em 176 mgNH_3.L^{-1}. Este fator explica a baixa redução na DQO e, consequentemente, baixa produção de metano, pois concentrações de amônia livre acima de 150 mg.L^{-1} são potencialmente toxicas para os organismos metanogênicos (McCarty, 1996). Adicionalmente, um pH alto (acima de 7,5) também resulta na inibição destes microrganismos (Pohland, 1992). Considerando os resultados obtidos com 18 gDQO.L^{-1}, é possível observar que a concentração utilizada de ureia foi eficiente para manter o pH neutro e, devido a isto, a concentração formada de NH_3 foi muito baixa, ocasionando a redução da eficiência

DQO e consequente produção de CH_4. Durante o período de monitoramento, 91% da DQO removida foi encontrada na forma de metano.

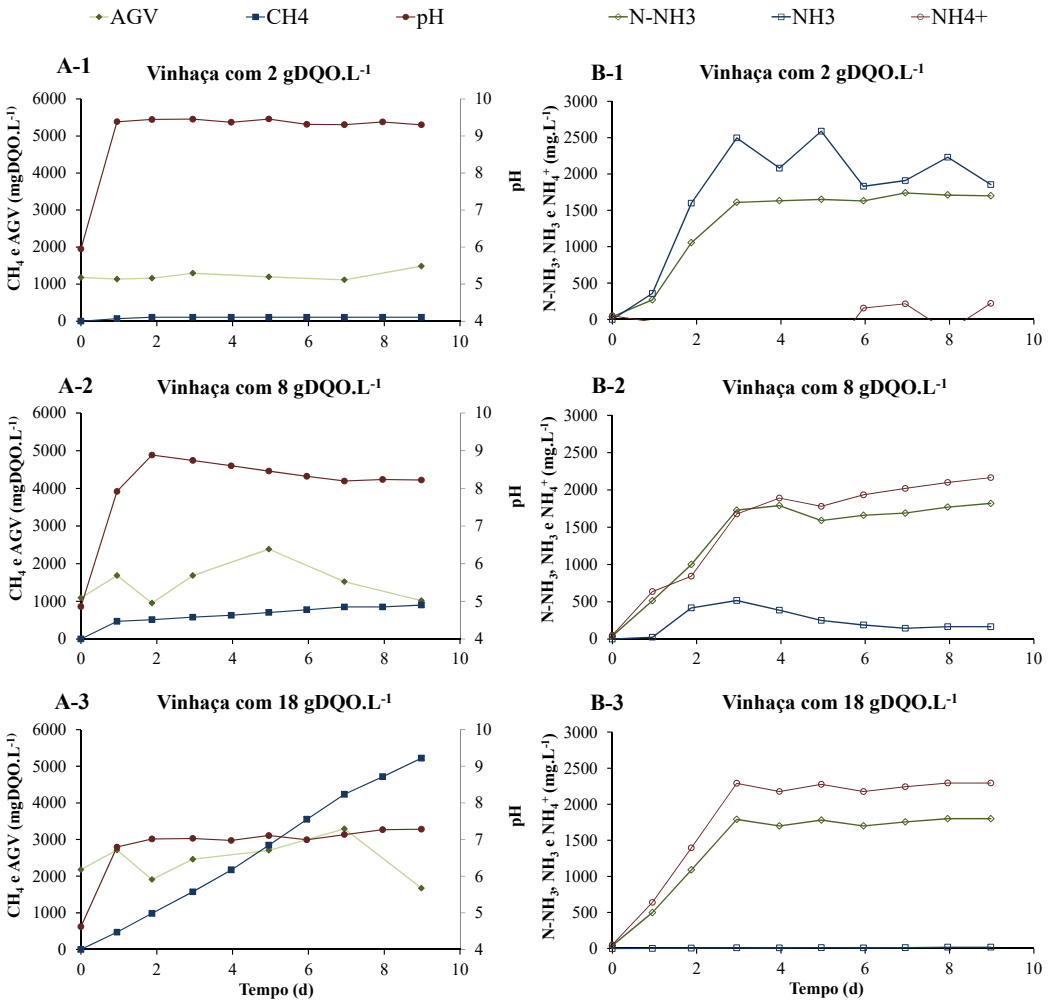


Figura 3-1: A – pH, metano (mgDQO.L^{-1}) e ácidos graxos voláteis (mgDQO.L^{-1}); B - Concentrações de N-NH_3, NH_3 e NH_4^+ (em mg.L^{-1}) obtidos para o experimento em batelada utilizando vinhaça com: 2 gDQO.L^{-1}(1); 8 gDQO.L^{-1} (2) e; 18 gDQO.L^{-1} (3).

A partir destes resultados foi possível constatar que a hidrólise da ureia na digestão anaeróbia ocorre independente da concentração de matéria orgânica utilizada, porém, a regulação e manutenção do pH em valores desejados é proporcional a concentração de DQO aplicada.

Considerando estas informações, mantendo a relação em torno de 0,22 $gCO(NH_2)_2.gDQO^{-1}$ é suficiente para manter o pH neutro durante a digestão anaeróbia da vinhaça, sem apresentar riscos ao sistema, visto que o pH neutro viabiliza a atividade dos organismos metanogênicos e a amônia liberada pela ureia permanece na forma de íon amônio (NH_4^+). Com dosagens acima de 0,50 $gCO(NH_2)_2.gDQO^{-1}$ o pH

do sistema fica elevado, o que inibiu as arqueas metanogênicas, além de influenciar na formação de NH_3.

Operação de reator de fluxo contínuo

Para melhor apresentação dos resultados, as duas etapas de operação do reator foram subdivididas em cinco fases, de acordo com as concentrações de ureia e $NaHCO_3$ utilizadas em cada fase. As variações nas concentrações dos tampões utilizados foram decorrentes: i) do objetivo de retirar o $NaHCO_3$ na primeira etapa de operação, e ii) das variações observadas no pH na segunda etapa (Tabela 3-1).

Tabela 3-1: Condições experimentais para as cinco fases de operação do reator UASB tratando vinhaça em modo contínuo.

Etapas	Fase	Tempo (dias)	COV $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$	$NaHCO_3$ $g.gDQO^{-1}$	$NaHCO_3$ $g.L^{-1}$	Ureia $g.gDQO^{-1}$	Ureia $g.L^{-1}$
1ª	I	0-18	7,40 ± 1,02	0,15	1,06	0,22	1,56
	II	18-33	7,65 ± 1,19	0,07	0,57	0,22	1,68
2ª	III	33-61	7,90 ± 0,50	-	-	0,22	1,73
	IV	61-80	8,11 ± 0,72	-	-	0,27	2,19
	V	80-102	8,52 ± 0,60	-	-	0,30	2,65

A figura 3-2 apresenta os resultados percentual de remoção de DQO, pH, AGV_{DQO} (considerando somente como ácido acético) e a produção de produção de biogás em CH_4-DQO durante a operação do reator em modo contínuo. O cálculo do metano foi realizado utilizando os dados de biogás obtido pelo monitoramento *on-line*, considerando que o CH_4 correspondeu à 70% do biogás total.

Durante a operação do reator utilizando ureia e $NaHCO_3$ como agentes tamponantes (1ª etapa – Fases I e II), o reator se manteve estável, com pH neutro (7,59) e eficiência na remoção de DQO, mesmo apresentando as maiores variações na COV aplicada (tabela 3-1). Na 2ª etapa de operação, onde foi utilizado somente ureia como agente tamponante (fases III, IV e V), houve redução significativa na remoção de DQO de 89,7 ± 3% (fase II) para 43,6 ± 7% (fase V), com consequente redução na produção de metano e acúmulo de ácidos graxos voláteis (figura 3-2).

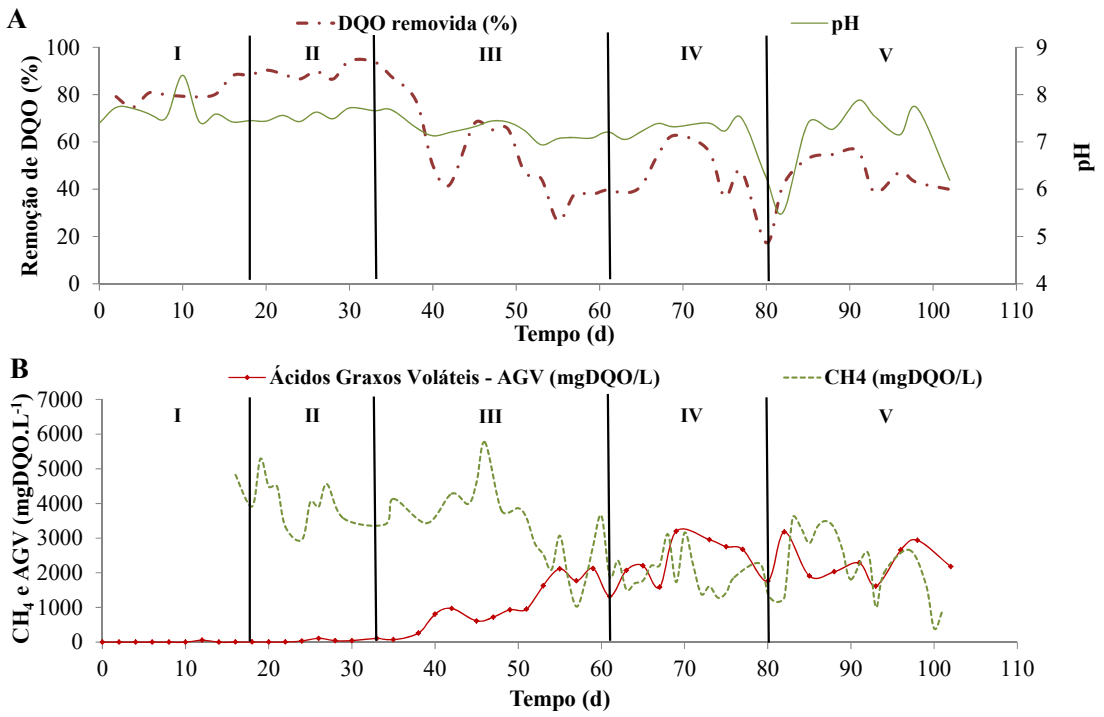


Figura 3-2: A – Percentual de remoção de DQO e pH; B – CH_4 (em $mgDQO.L^{-1}$) e ácidos graxos voláteis (AGV em $mgDQO.L^{-1}$); para as cinco fases de operação do reator: Fases I e II utilizando $NaHCO_3$ e ureia e; Fases III, IV e V somente com ureia.

A concentração calculada de DQO convertida a metano, decaiu de 4122 ± 687 $mg.L^{-1}$ na fase II, para 2193 ± 990 $mg.L^{-1}$ na fase V. Mesmo com o acúmulo de ácidos no sistema, o pH se manteve neutro até o final da fase IV, onde houve uma queda chegando a 5,5. Por consequência disso, elevou-se a concentração de ureia utilizada, ocasionando na elevação do pH na fase V. Como durante praticamente toda a operação do reator o pH se mante neutro, não foi este parâmetro responsável pela inibição das arqueas metanogênicas.

O decaimento na eficiência de remoção de DQO e produção de metano, com acúmulo de ácidos no reator nas fases III, IV e V, poderia ser atribuído à possível inibição causada por excesso (ou toxicidade) da amônia decorrente da adição de ureia. Entretanto, esta hipótese pode ser descartada ao observar a tabela 3-2, onde verifica-se que as concentrações de amônia livre se mantiveram abaixo do limite de 150 $mgNH_3.L^{-1}$, considerado inibidor (Chernicharo, 2007; Yenigün and Demirel, 2013). O mesmo é válido para a concentração total obtida de NH_3-N, onde a concentração máxima observada foi de 614 ± 40 $mg.L^{-1}$ na fase V, e não possuem efeito adverso na atividade dos organismos anaeróbios.

Tabela 3-2- Médias de pH, nitrogênio amoniacal (NH_3-N), amônia livre (NH_3), íon amônia (NH_4^+) em $mg.L^{-1}$, e alcalinidade total ($mgCaCO_3.L^{-1}$) do afluente para as cinco fases de operação do reator.

Etapas	Fase	pH	N-NH_3 ($mg.L^{-1}$)	NH_3 ($mg.L^{-1}$)	NH_4^+ ($mg.L^{-1}$)
1ª	I	7,62 ± 0,3	469,6 ± 28	18,9 ± 22	583,6 ± 43
	II	7,56 ± 0,1	493,7 ± 31	13,0 ± 3	621,0 ± 39
2ª	III	7,27 ± 0,2	524,0 ± 28	7,0 ± 3	666,2 ± 36
	IV	7,16 ± 0,4	575,7 ± 27	7,6 ± 4	732,1 ± 32
	V	7,08 ± 0,8	613,8 ± 40	12,2 ± 11	776,3 ± 49

Segundo McCarty, (1964) pode ocorrer inibição no sistema quando a concentração de nitrogênio amoniacal encontra-se na faixa de 1500 e 3000 $mg.L^{-1}$ em sistema que o pH esteja maior que 7,6, já concentrações acima de 3000 $mgN\text{-}NH_3.L^{-1}$ já apresentam toxidade independente da faixa em que o pH se encontre. Niu *et al*. (2013) trabalhando com digestão anaeróbia de esterco de galinha em um reator de mistura completa, observaram que a partir de 5000 $mgN\text{-}NH_3.L^{-1}$ o processo começa a ser inibido, com inibição completa em concentrações acima de 10000 $mgN\text{-}NH_3.L^{-1}$, ocasionando acúmulo de ácidos voláteis e cessando a produção de metano, mesmo com o pH acima de 7,0.

Outro fator que influencia diretamente na estabilidade e eficiência dos sistemas anaeróbios é a alcalinidade presente no meio. Pela concentração de alcalinidade total formada durante as cinco etapas (tabela 3-3), é possível concluir que a ureia atendeu ao objetivo de formar alcalinidade no meio. Não obstante, ao calcularmos a alcalinidade bicarbonato (ou alcalinidade parcial) verificamos o forte decréscimo na concentração deste parâmetro na 2ª etapa. Este fator está diretamente relacionado aos AGVs formados no sistema, visto que a alcalinidade bicarbonato, ou alcalinidade verdadeira da digestão anaeróbia, é responsável pelo tamponamento do sistema e neutralização do pH frente as consequências de acidificação do meio causada pelo acúmulo dos ácidos (Foresti, 1994; Björnsson *et al*., 2001).

Tabela 3-3- Médias de alcalinidade (total, bicarbonato e intermediaria) do efluente para as cinco fases de operação do reator, bem como a relação entre a alcalinidade intermediaria (AI) e alcalinidade bicarbonato (AB).

Etapas	Fase	Alcalinidade ($mgCaCO_3.L^{-1}$)			Relação AI/AB
		Total	Bicarbonato[1]	Intermediaria[2]	
1ª	I	3356,8 ± 743,2	3353,0	3,7	0,00
	II	2912,5 ± 543,8	2880,4	32,0	0,01
2ª	III	2125 ± 637,5	1396,3	728,7	0,52
	IV	1987,5 ± 606,3	395,3	1592,1	4,03
	V	2022,5 ± 152,5	464,5	1558,0	3,35

[1] Calculado utilizando a formula AB = AT – 0,85 x 0,85 x AGV onde: AB = alcalinidade bicarbonato; AT = alcalinidade total; 0,85 fator de correção considerando 85% de ionização dos ácidos; 0,85 = fator de conversão do ácido acético em alcalinidade e; AGV = ácidos graxos voláteis (mg ácido acético / L). Fonte: Foresti, 1994.

[2] Obtido pela diferença entre a alcalinidade total e a alcalinidade bicarbonato.

Um fator que pode ser considerado como indicador de estabilidade no processo de digestão anaeróbia é a relação entre a alcalinidade intermediária e a alcalinidade bicarbonato (AI/AB), cujos valores devem permanecer abaixo de 0,3 (Foresti, 1994; Ripley *et al.*, 1986). Ao observarmos a relação AI/AB (tabela 3-3) obtida para cada fase, foi observado que nas fases I e II (1ª etapa) esta relação é muito baixa, o que comprova a eficiência e bom funcionamento do reator durante esta etapa. Na 2ª etapa, em que foi utilizado somente ureia, a relação começa a aumentar da fase III (0,52), chegando a valores de 4,03 e 3,35 para as fases IV e V, respectivamente. Estes resultados indicam que mesmo com o pH neutro, a alcalinidade necessária para manter o reator estável e neutralizar o efeito dos ácidos produzidos não foi suficiente, o que pode ter contribuído para a redução na produção de biogás e remoção de matéria orgânica.

Durante as fases onde foi utilizada somente a ureia como tampão, observou-se a formação de uma massa densa no topo do reator, possivelmente biomassa. Essa massa interferiu na saída do biogás, pois obstruía a passagem do mesmo, sendo necessária a remoção da mesma algumas vezes.

Análise microbiológica

O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) permite a obtenção de resultados semi-quantitativos da DGGE. Este índice pode variar entre 1,5 e 3,5, e é utilizado tanto para avaliar a riqueza de espécies (número) quanto a uniformidade das

espécies (avaliando e comparando a intensidade das bandas) (McDonald, 2003). Os resultados de diversidade obtidos tanto para bactéria, quanto para arqueas, mostram uma grande variabilidade de espécies, especialmente para as amostras de bactérias, visto que para todas as amostras o índice é maior de 3,0 (figura 3-3).

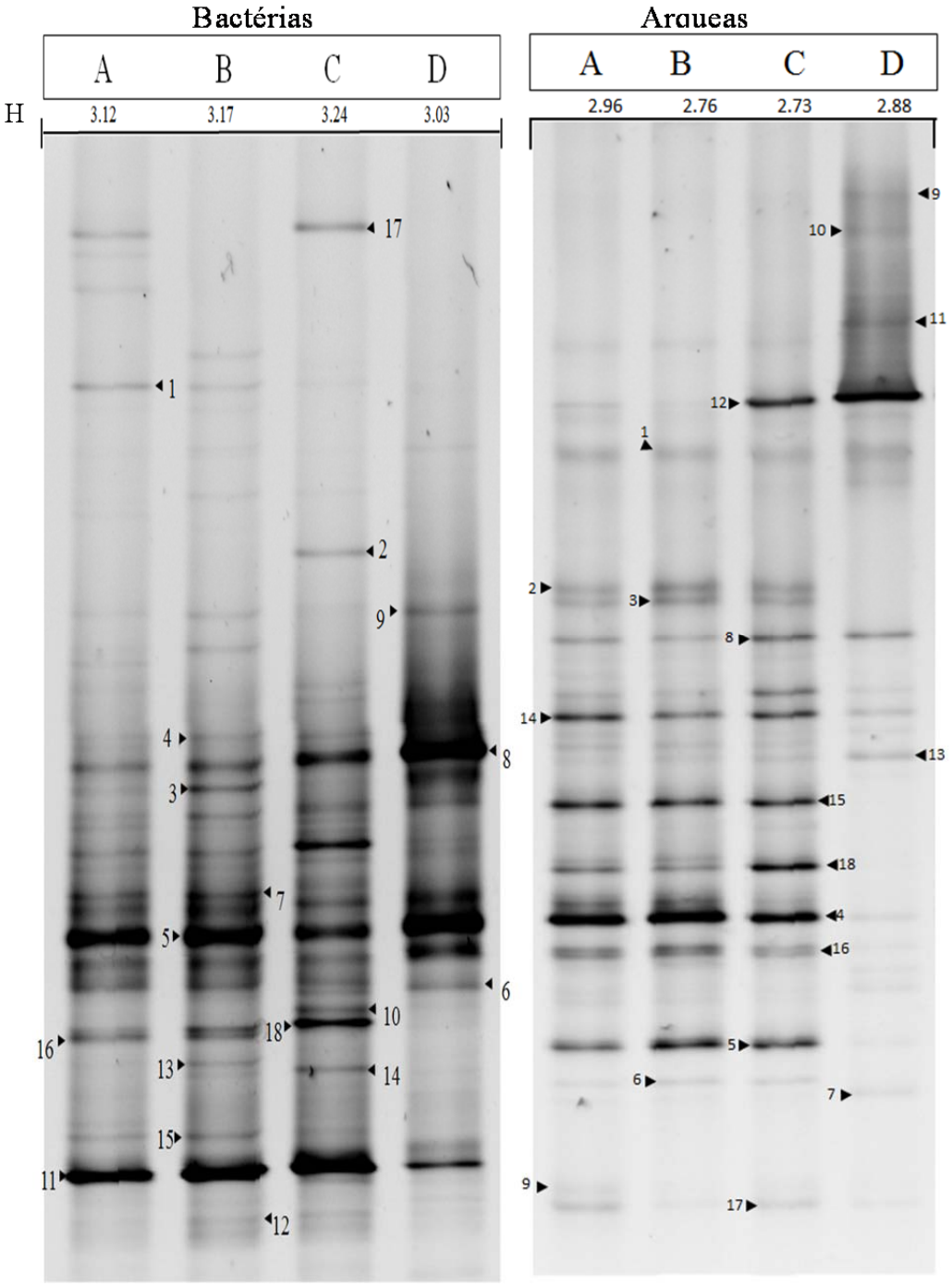


Figura 3-3: Perfis de DGGE das arqueas metanogênicas obtidos pela amplificação do gene 16S RNAr para as amostras A: Inicio da operação do reator (tempo 0); B: Inicio da operação somente com ureia (33 dias de operação); C: Final da operação do reator (102 dias de operação e; D: Massa acumulada no topo do reator (mescla de amostras coletada nos dias 83, 92 e 102).com os respectivos índices de diversidade (H).

Outra analise realizada utilizando as é a Os resultados de similaridade entre as amostras identificadas (tabela 3-4), obtidos utilizando as bandas selecionadas no DGGE, indicam semelhança de cerca de 90% para as bactérias entre as amostras A, B e C. Quando comparadas estas três amostras com a amostra D (topo do reator) a similaridade diminui, entretanto, possuem valores muito próximos (70%). Nos resultados obtidos para arqueas é possível verificar que a similaridade diminui entre as amostras A, B e C. Isso indica que provavelmente iniciou-se uma seleção ou até mesmo uma mudança nas arqueas entre o inicio de operação do reator (utilizando $NaHCO_3$ com ureia – amostra A) para o final da operação (utilizando somente ureia como tampão – amostra C). O resultado mais expressivo é na comparação com a amostra D (topo do reator), onde é possível observar que só há similaridade com a amostra C (final da operação).

Tabela 3-4: Índice de similaridade (em %) de bactérias e arqueas, observada pelas bandas identificadas no DGGE.

Bactérias				Arqueas			
Amostras	**B[2]**	**C[3]**	**D[4]**	**Amostras**	**B[2]**	**C[3]**	**D[4]**
A[1]	97,2	86,2	69,0	**A[1]**	95,4	84,2	0
B[2]		90,6	72,0	**B[2]**		79,1	0
C[3]			67,0	**C**			13,0

[1]: Inicio da operação do reator (tempo 0); [2]: Inicio da operação somente com ureia (33 dias de operação); [3]: Final da operação do reator (102 dias de operação; [4]: Massa acumulada no topo do reator (mescla de amostras coletada nos dias 83, 92 e 102).

A partir dos géis de DGGE (figura 3.3) foram sequenciadas 18 bandas para bactérias (tabela 3-5) e 19 bandas para arqueas (tabela 3-6) de acordo com o classificador RDP (nível de confiança de 80 %).

Das sequências obtidas para bactérias, as bandas: 4, 5, 6 pertencem ao gênero *Trichococcus*; 8 e 9 pertencem ao gênero *Enterococcus* e; 11 e 12 pertencem a família *Propionobcteriaceae* estiveram presentes em todas as amostras analisadas (A, B, C e D). Destas, as bandas 5, 8 e 11 são as que apresentam maior intensidade. A banda 5 presenta redução na intensidade na ultima etapa de operação do reator (amostra C), entretanto não reduz a intensidade na amostra coletada no topo do reator (D). Já a banda 8, apresentou aumento na intensidade nas amostras finais, especialmente o final da operação do reator (C) e a amostra coletada no topo (D). A banda 11 apresentou a mesma intensidade na amostra coletadas durante a operação do reator (A, B e C) com

redução apenas na amostra D. O indivíduos pertencentes ao gênero *Enterococcus* possuem como característica maior resistência a variações de pH, alcalinidade e acidez (España-Gamboa *et al*., 2012), o que condiz com o resultado obtido, visto que há variações destes parâmetros durante as ultimas etapas de operação do reator e as bandas classificadas como pertencentes a este gênero apresentaram maior intensidade no final da operação.

Nas sequenciadas obtidas para o domínio arquea (tabela 3-6), observa-se que a amostra coletada no topo do reator (D) há predomínio de arqueas hidrogênotroficas, especialmente as pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter* (bandas 9, 10, 11 e 12). Nas amostras coletadas durante a operação de reator (A, B e C), os gêneros *Methanothrix* (bandas 1 a 6) e *Methanobacterium* (bandas 13 a 15), bem como a classe *thermoprotei* (bandas 17 e 18) estiveram presentes em todas as etapas. A classe *thermoprotei* apresentou aumento na intensidade da banda na ultima etapa de operação do reator (D) em que somente a ureia foi empregada como agente tamponanete. Este aumento está relacionado as características dos indivíduos desta classe, visto que os mesmos podem sobreviver em condições extremas e utilizam o NH_3 como fonte de energia.

Avaliando o número de bandas sequenciadas para o gênero *Methanothrix*, bem como as características deste gênero, é possível relacionar a queda na eficiência do reator à redução na atividade deste grupo devido a dois fatores: i) As *Methanothrix* podem utilizar o $NaHCO_3$ como co-substrato para a produção de metano (Lin *et al*., 2013; Paulo *et al*., 2003): ii) Este gênero é mais sensível a presença de NH_3 que outros organismos acetotróficos, onde concentrações a partir de 560 $mgN\text{-}NH_3.L^{-1}$ podem inibir por completo a ação deste gênero (Rajeshwari *et al*., 2000; Yenigün and Demirel, 2013). Com estas informações, é possível formular a hipótese de que a principal via de formação de metano era realizada por organismos pertencentes ao gênero *Methanothrix* e os mesmo foram inibidos devidos as condições operacionais do reator na 2ª fase (retirada do $NaHCO_3$ e concentrações superiores a 500 $mg.L^{-1}$ de $N\text{-}NH_3$). Entretanto, considerando a presença de arqueas hidrogenotróficas, especialmente na massa formada no topo do reator, acredita-se que após um período maior de adaptação, o reator voltaria a operar com estabilidade e eficiência na produção de biogás.

Tabela 3-5: Classificação RDP das bandas DGGE sequenciadas para Bactérias e seus correspondentes (BLAST), utilizando o banco de dados NCBI com indicação das percentagens de similaridade e fontes de origem. A presença de cada banda é indicada pelo "X".

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Bandas	A[1]	B[2]	C[3]	D[4]	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
Filo *Firmicutes*								
Classe *Bacilli*								
	1	X	X	X		Uncultured bacterium (JX271989)	88	Activated sludge in lab-scale reactor at 0 cm depth with dissolved oxygen
						Uncultured Carnobacteriaceae bacterium (KJ600255)	88	Biocathode
						Lactobacillus animalis (AB911535)	88	Japan Collection of Microorganisms 8697.
	2			X		Uncultured bacterium (FR775404)	83	Anaerobic digester
						Uncultured bacterium (KF427951)	83	Sewage activated sludge
						Uncultured bacterium (KF533774)	83	Full-scale EBPR activated sludge plant
Ordem *Lactobacillales*								
Família *Carnobacteriaceae*								
	3	X	X		X	Uncultured Firmicutes bacterium (AB780940)	95	Anaerobic reactor treating corn straw
						Uncultured bacterium (KF427952)	95	Sewage activated sludge with phosphorous removal
						Uncultured bacterium (KJ808426)	95	Activated sludge
Gênero *Trichococcus*								
	4	X	X	X		Uncultured bacterium (KF533774)	99	Full-scale EBPR activated sludge plant
						Trichococcus sp (JN688044)	99	An anaerobic cellulolytic microbial
						Uncultured bacterium(KF427951)	99	Sewage activated sludge with phosphorous removal
	5	X	X	X	X	Uncultured bacterium (KF533767)	99	Full-scale EBPR activated sludge plant
						Trichococcus sp (JN688044)	99	An anaerobic cellulolytic microbial
						Uncultured bacterium (KF427951)	99	Sewage activated sludge with phosphorous removal
	6	X	X	X	X	Uncultured bacterium (KF564575)	97	Anaerobic sludge treating diluted pharmaceutical wastewater
						Uncultured bacterium (KF427952)	97	Sewage activated sludge with phosphorous removal
						Uncultured Trichococcus (GU35604)	97	Microbial community within urban sewer infrastructure
	7	X	X		X	Uncultured bacterium (KF533774)	95	Full-scale EBPR activated sludge plant
						Trichococcus sp (JN688044)	95	An anaerobic cellulolytic microbial
						Uncultured bacterium (KF427952)	95	Sewage activated sludge with phosphorous removal
Família *Enterococcaceae*								
Gênero *Enterococcus*								
	8	X	X	X	X	Uncultured bacterium (GQ138494)	99	ASBR reactor treating swine waste

Continuação.

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Bandas	A[1]	B[2]	C[3]	D[4]	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
						Uncultured Lactobacillales bacterium (JN173116)	99	Low temperature anaerobic bioreactor
Gênero *Enterococcus*	9	X	X	X	X	Uncultured Lactobacillales bacterium (JN173116)	99	Low temperature anaerobic bioreactor
						Uncultured bacterium (GQ138494)	99	ASBR reactor treating swine waste
Filo *Actinobacteria* Classe *Actinobacteria*	10			X	X	Uncultured bacterium (AB447639)	85	Anaerobic granular sludge developed at low temperature
						Uncultured Propionibacterium (JX079493)	82	Contaminated soil
Sub-classe *Actinobacteridae* Ordem *Actinomycetales* Sub-Ordem *Propionibacterineae* Família *Propionibacteriaceae*	11	X	X	X	X	Uncultured bacterium (FR775421)	99	Anaerobic digester
						Uncultured bacterium (HQ008212)	99	EGSB anaerobic filter
						Uncultured bacterium (KJ206774)	99	Anaerobic bioreactor
						Uncultured bacterium (AB447631)	99	anaerobic granule sludge developed at low temperature
	12	X	X	X	X	Uncultured bacterium (KM046968)	99	Mesophilic glucose-fed and starch-fed anaerobic reactor
						Uncultured bacterium (KJ206774)	99	anaerobic bioreactors
						Uncultured bacterium (FR775421)	98	anaerobic digester
	13	X	X		X	Uncultured bacterium (KM046968)	99	Mesophilic glucose-fed and starch-fed anaerobic reactor
						Uncultured bacterium (KJ206774)	99	anaerobic bioreactors
						Uncultured bacterium (FR775421)	99	anaerobic digester
	14		X	X	X	Uncultured bacterium (KM046968)	98	Mesophilic glucose-fed and starch-fed anaerobic reactor
						Uncultured bacterium (KJ206774)	98	anaerobic bioreactors
						Uncultured bacterium (FR775421)	98	anaerobic digester
	15	X	X	X		Uncultured bacterium (KM046968)	99	Mesophilic glucose-fed and starch-fed anaerobic reactor
						Uncultured bacterium (KJ206774)	99	anaerobic bioreactors
						Uncultured bacterium (FR775421)	98	anaerobic digester
	16	X	X			Uncultured bacterium (KM046968)	96	Mesophilic glucose-fed and starch-fed anaerobic reactor
						Uncultured bacterium (KJ206774)	96	anaerobic bioreactors
						Uncultured bacterium (HQ008212)	96	EGSB anaerobic filter

Continuação.

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Bandas	A[1]	B[2]	C[3]	D[4]	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
Filo *Lentisphaerae* Classe *Lentisphaerae* *Ordem Victivallales* *Família Victivallaceae* Gênero *Victivallis*								
	17	X		X		Uncultured Victivallaceae bacterium (JQ724328)	95	Biofilm in a microbial fuel cell
						Uncultured bacterium (U81755)	94	Fluidized bed anaerobic digestor fed by vinasses
						Uncultured bacterium (KM505005)	94	Biotrickling filter for nitrous oxide abatement
Bacteria não classificada	18	X	X	X	X	Uncultured bacterium (AB266958)	88	Mesophilic UASB sludge granules
						Uncultured bacterium (FJ535554)	88	Swine wastewater in an anaerobic UASB
						Uncultured delta proteobacterium (AB288681)	82	Methane-producing consortia

[1]: Inicio da operação do reator (tempo 0); [2]: Inicio da operação somente com ureia (33 dias de operação); [3]: Final da operação do reator (102 dias de operação; [4]: Massa acumulada no topo do reator (mescla de amostras coletada nos dias 83, 92 e 102).

Tabela 3-6: Classificação RDP das bandas DGGE sequenciadas para arqueas e seus correspondentes (BLAST), utilizando o banco de dados NCBI com indicação das percentagens de similaridade e fontes de origem. A presença de cada banda é indicada pelo "X".

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Bandas	A[1]	B[2]	C[3]	D[4]	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
Filo *Euryarchaeota* Classe *Methanomicrobia* *Ordem Methanosarcinales* *Família Methanotrichaceae* *Gênero Methanothrix*								
	1	X	X	X	X	Uncultured archaeon (KM821362)	92	WWTP sewage sludge digesters fed with phenylacetic acid pulses
						Uncultured archaeon (JF937223)	92	biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
						Uncultured archaeon (JN995525)	92	syntrophic butyrate degrading consortia
	2	X	X	X		Uncultured archaeon (JF937223)	99	Biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
						Uncultured archaeon (JN995525)	99	syntrophic butyrate degrading consortia
						Uncultured archaeon (EF512457)	99	mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities

Continuação.

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Bandas	A[1]	B[2]	C[3]	D[4]	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
	3	X	X	X		Uncultured archaeon (JF937223)	99	Biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
						Uncultured archaeon (JN995525)	99	syntrophic butyrate degrading consortia
						Uncultured archaeon (EF512457)	99	mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities
	4	X	X	X	X	Uncultured archaeon (JF937223)	98	biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
						Uncultured archaeon (JN995525)	98	syntrophic butyrate degrading consortia
						Uncultured archaeon (EF512457)	98	mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities
	5	X	X	X	X	Uncultured archaeon (JN995525)	99	syntrophic butyrate degrading consortia
						Uncultured archaeon (JF937223)	99	biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
						Uncultured archaeon (EF512457)	99	mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities
	6	X	X	X		Uncultured archaeon (JN995525)	98	syntrophic butyrate degrading consortia
						Uncultured archaeon (EF512457)	98	mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities
						Uncultured archaeon (JF937223)	97	biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
Família *Methanosarcinaceae* Gênero *Methanosarcina*								
	7	X	X		X	Archaeon enrichment culture clone (EU544171)	99	Tinto River sediment
						Uncultured euryarchaeote (AB244741)	99	Mesophilic anaerobic glycerol-fed reactor
						Uncultured archaeon (JF937234)	98	biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse
Ordem *Methanomicrobiales* Família *Methanospirillaceae* Gênero *Methanospirillum*								
	8	X	X	X	X	Uncultured archaeon (GQ458206)	87	Microbial community structure of anaerobic co-digestion of cassava pulp and pig manure
						Uncultured Methanospirillum (KJ730049)	86	Prokaryotic community structure of household biogas digesters in tropical climate
Classe *Methanobacteria* Ordem *Methanobacteriales* Família *Methanobacteriaceae* Gênero *Methanobrevibacter*								
	9	X			X	Uncultured Methanobrevibacter (EF376991)	99	Methanethiol degradation in anaerobic bioreactors at elevated pH
						Methanobrevibacter arboriphilus (AY196662)	99	Coolection of the Wadsworth Centre for Lab and Research. Albany
						Methanobrevibacter arboriphilus (AB065294)	99	Methanobrevibacter arboriphilus SA isolate from a paddy field soil

Continuação.

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Bandas	A[1]	B[2]	C[3]	D[4]	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similarida de (%)	Pesquisa de origem
	10				X	Uncultured Methanobrevibacter (EF376991)	99	Methanethiol degradation in anaerobic bioreactors at elevated pH
						Methanobrevibacter arboriphilus (AY196662)	99	Coolection of the Wadsworth Centre for Lab and Research. Albany
						Methanobrevibacter arboriphilus (AB065294)	99	Methanobrevibacter arboriphilus SA isolate from a paddy field soil
	11				X	Uncultured Methanobrevibacter (EF376991)	99	Methanethiol degradation in anaerobic bioreactors at elevated pH
						Methanobrevibacter arboriphilus (AY196662)	99	Coolection of the Wadsworth Centre for Lab and Research. Albany
						Methanobrevibacter arboriphilus (AB065294)	99	Methanobrevibacter arboriphilus SA isolate from a paddy field soil
	12	X	X	X	X	Uncultured Methanobrevibacter (EF376991)	99	Methanethiol degradation in anaerobic bioreactors at elevated pH
						Methanobrevibacter arboriphilus (AY196662)	99	Coolection of the Wadsworth Centre for Lab and Research. Albany
						Methanobrevibacter arboriphilus (AB065294)	99	Methanobrevibacter arboriphilus SA isolate from a paddy field soil
Gênero *Methanobacterium*								
	13	X	X	X	X	Uncultured Methanobacterium (HQ231791)	99	Microbial fuel cell anode treating cattle dung
						Uncultured archaeon (HQ438747)	98	Phenanthrene-degrading methanogenic communities
	14	X	X	X	X	Uncultured archaeon (EF512383)	95	Mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities
						Methanobacterium sp. (HQ133107)	95	Hexadecane-degrading methanogenic consortium
						Uncultured archaeon (KC736145)	95	UASB reactor biomass treating brewery waste water
	15	X	X	X		Uncultured archaeon (KJ206662)	94	Lab-scale anaerobic bioreactors
						Uncultured archaeon (FR823834)	94	UASB reactor for brewery wastewater treatment
						Uncultured archaeon (AB744712)	94	Anaerobic reactor for municipal wastewater at ambient temperature
Classe *Halobacteria*								
	16	X		X	X	Uncultured archaeon (LN874181)	88	mesophilic lab-scale biogas reactor treating poultry manure
						Uncultured archaeon (HQ438754)	87	Phenanthrene-degrading methanogenic communities
						Uncultured archaeon (EF512456)	87	mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities
Filo *Crenarchaeota* Classe *Thermoprotei*	17	X	X	X	X	Uncultured archaeon (KJ806545)	99	anaerobic digester sludge
						Uncultured archaeon (FR823876)	97	UASB reactor for brewery wastewater treatment
	18	X	X	X		Uncultured archaeon (CU916897)	96	Mesophilic anaerobic digester treating municipal wastewater sludge
						Uncultured archaeon (KF670183)	95	Anaerobic digester sludge at 35 degree
						Uncultured archaeon (LN624357)	95	Mesophilic UAF reactor
	19	X		X		Uncultured crenarchaeote (KJ730062)	99	Biogas digester sediment
						Uncultured archaeon (FR823876)	97	UASB reactor for brewery wastewater treatment

[1]: Inicio da operação do reator (tempo 0); [2]: Inicio da operação somente com ureia (33 dias de operação); [3]: Final da operação do reator (102 dias de operação; [4]: Massa acumulada no topo do reator (mescla de amostras coletada nos dias 83, 92 e 102).

CONCLUSÕES

Os testes em batelada indicam que a liberação de amônia independe da carga orgânica, entretanto, a estabilidade do pH é condicionada à carga orgânica aplicada. Deste modo, uma relação de 0,22 $g.gDQO^{-1}$ é suficiente para liberar alcalinidade e manter o pH neutro sem riscos ao sistema.

Na operação do reator de fluxo contínuo notou-se que, ao aplicar somente ureia como tampão, a eficiência do reator, antes operado com bicarbonato de sódio e ureia, passou de 89% na fase II para menos que 50% nas fases III, IV e V, derivando em um acúmulo de ácidos intermediários (AGV) no reator, prejudicando a remoção de DQO e formação do biogás. Mesmo com a manutenção do pH neutro e com formação de alcalinidade total devido a hidrólise da ureia, as concentrações de alcalinidade bicarbonato não foi suficiente para neutralizar os AGVs no sistema.

A hipótese mais plausível para a redução na eficiência do reator esta associada à uma inibição de alguns grupos de microrganismos presentes, especialmente as arqueas pertencentes ao gênero *Methanothix,* visto que este gênero é mais sensível a presença de NH_3 que os demais, e pode utilizar o $NaHCO_3$ como co-substrato para a formação de metano, o qual foi retirado na 2ª fase de operação.

4 INFLUÊNCIA DO AGENTE TAMPONANTE NA BIOMASSA E NA PRODUÇÃO DE METANO

Resumo: A influência do bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e da ureia ($CO(NH_2)_2$) como agentes tamponantes na digestão anaeróbia da vinhaça foram avaliados considerando os seguintes parâmetros: i) eficiência na conversão da DQO a metano; ii) formação de alcalinidade e; iii) diversidade das arqueas presente na biomassa (PCR-DGGE). Foram utilizadas duas biomassas distintas (A e B), além de dois substratos (vinhaça e uma solução de glicose com macro e micronutrientes), e dois agentes tamponantes (0,6 $gNaHCO_3$.gDQO e 0,22 gUREIA.gDQO), num total de 6 condições.O teste foi realizado em bateladas sequenciais (mínimo de três bateladas para cada condição), em condições mesofílicas (35 ± 2ºC), utilizando uma relação substrato/lodo de 0,5 $gDQO_{(substrato)}.gSVT_{(biomassa)}^{-1}$, com DQO_{total} inicial de 4 $g.L^{-1}$. Os resultados mostraram que todas as condições com $NaHCO_3$ apresentaram resultados satisfatórios quanto à formação de alcalinidade, remoção de DQO e produção de metano. Para a biomassa A, as condições glicose + $NaHCO_3$ e vinhaça + $NaHCO_3$ apresentaram converções de 72% da DQO a metano, semelhantes à condição com glicose + $NaHCO_3$ (71%), porém inferiores à vinhaça + $NaHCO_3$ (85%), ambas utilizando a biomassa B. De outra forma, as condições utilizando vinhaça + ureia apresentaram resultados distintos para as biomassas utilizadas. Na biomassa A, a produção de metano, bem como a remoção de DQO foram reduzidas (43%), ocasionando o acúmulo de ácidos. Já para a biomassa B, houve formação de alcalinidade, especialmente a bicarbonato, com conversão de DQO a metano (66% da DQO removida) e pH neutro. Para as condições utilizando glicose + ureia (ambas as biomassas), houve acúmulo de ácidos (especialmente o acético) no sistema, baixa formação de alcalinidade bicarbonato e, consequentemente, redução na remoção de DQO. Com os resultados obtidos pela PCR-DGGE, a biomassa A apresentou menor diversidade em relação à B, com várias bandas sequenciadas pertencentes ao gênero *Methanosaeta*. A biomassa B apresentou maior diversidade de gêneros, com a presença de metanogênicas metilotróficas, hidrogenotróficas e acetotróficas. Estas características podem ser atribuídas à ineficiência de produção de metano com vinhaça + ureia utilizando a biomassa A, visto que houve acúmulo de ácidos inibindo a ação das *Methanosaetas.*

Palavras-chave: Alcalinidade, Metano, Ácidos graxos voláteis, PCR-DGGE, arqueas

INTRODUÇÃO

A utilização de processos biológicos no tratamento de efluentes requer atenção e cuidado em todos os parâmetros para atingir a eficiência desejada. O conhecimento específico das comunidades de microrganismos presentes em um sistema, aliado às informações ambientais, como pH e temperatura, são fundamentais, pois deste modo é possível aperfeiçoar e garantir melhor eficiência no processo, tanto para a produção de biogás, quanto para o desenvolvimento de técnicas na busca de produtos intermediários que possuam valor agregado (Wu *et al*., 2013).

As técnicas de identificação molecular de microrganismos estão sendo cada vez mais aprimoradas, especialmente em relação aos métodos que envolvem a análise dos genes que codificam as sequências do RNAr 16S, utilizados especialmente na caracterização de comunidades microbianas de amostras ambientais (Narihiro and Sekiguchi, 2011).

O desenvolvimento de técnicas como o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) proporcionou um grande avanço na identificação molecular, pois a mesma permite a amplificação da região de DNA específica a partir de uma pequena quantidade de amostra. Em conjunto com a PCR, a técnica da eletroforese em gel de gradiente desnaturante ou DGGE, desenvolvida por Muyzer *et al* (1993), permite a separação de fragmentos amplificados de DNA que possuem diferenças na sua constituição química, permitindo a identificação de cada indivíduo *(*Reyes *et al*., 2015; Wu *et al*., 2013; Rodríguez *et al*., 2012).

As arqueas metanogênicas podem ser classificadas basicamente em três grupos fisiológicos, de acordo com o tipo de substrato utilizado para o crescimento e formação de metano: metanogênicas metilotróficas, que utilizam compostos metilados como metilaminas, metanol e metanotiol; as metanogênicas hidrogenotróficas (maioria das espécies), que utilizam o gás carbônico e o hidrogênio, formiato ou alguns álcoois e; as metanogênicas acetotróficas ou acetoclásticas, que utilizam acetato (Whitman *et al*., 1992). Geralmente, é observada maior diversidade de arqueas durante a partida de sistemas anaeróbios, com redução na diversidade, quando o sistema alcança desempenho estável. Este fato é observado devido à transição e adaptação da população ao novo substrato ou a novas condições, visto que, normalmente, os reatores são inoculados com lodo proveniente de outros sistemas de

tratamento (McHugh *et al*., 2003). Em reatores operados em situações estáveis e com baixa concentração de AGV, há predomino de arqueas acetoclásticas do gênero *Methanosaeta* (van Haandel *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2005; McHugh *et al*., 2003).

Pesquisas realizadas por Rodríguez *et al*. (2012) avaliaram a diversidade microbiana durante a operação de um reator UASB utilizado para o tratamento de vinhaça sintética, com variações na concentração de sulfato no afluente. Os resultados indicaram predomínio dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanomethylovorans* ao longo de toda a operação do reator. Resultados semelhantes foram observados por España-Gamboa *et al*. (2012), que observaram o domínio dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanobacterium* durante a operação de um reator UASB, utilizado para o tratamento de vinhaça proveniente da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, com 69% de eficiência na remoção de DQO e de 84% de metano no biogás produzido. van Haandel *et al*. (2013), também trabalhando com vinhaça de cana-de-açúcar, em um reator tipo UASB (em escala piloto) por 180 dias, observaram que mesmo com as condições operacionais propícias para as arqueas pertencentes ao gênero *Methanosarcina* devido à sobrecarga, as arqueas pertencentes ao gênero *Methanosaeta* foram as *que* apresentaram dominância no sistema. A explicação para este fato foi atribuída à baixa afinidade de incorporação aos grânulos de lodo das *Methanosarcinas,* em relação às *Methanosaetas.*

Além do tipo e composição do substrato, outro fator que pode influenciar na diversidade e atividade dos microrganismos é o agente tamponante. O bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), utilizado amplamente em experimentos em batelada, também pode ser utilizado como co-substrato na formação de metano, pelas arqueas hidrogenotróficas (Lin *et al*., 2013; Paulo *et al*., 2004). Além disto, concentrações elevadas de sódio podem ser potencialmente inibitórias ou tóxicas para os organismos anaeróbios (Lin *et al*., 2013; Torres *et al*., 1998). Assim como o Sódio, a amônia também pode ser prejudicial em sistemas anaeróbios, especialmente em sistemas com predominância de arqueas acetoclásticas (sobretudo as pertencentes ao o gênero *Methanosaeta*), visto que estas são mais sensíveis a elevados níveis de amônia livre, que as arqueas hidrogenotróficas (Calli *et al*., 2005).

Este trabalho tem como objetivo verificar a influência do bicarbonato de sódio e da ureia na produção de biogás, estabilidade do sistema e na diversidade das arqueas

metanogênicas durante a digestão anaeróbia da vinhaça utilizando biomassas de origem distintas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Para a realização do experimento foram utilizadas duas biomassas distintas, uma proveniente de um reator UASB, em operação no tratamento de efluentes de uma fábrica de levedura (biomassa A), em forma granular e com 96,6 $gSVT.L^{-1}$, e a outra, proveniente do tratamento do efluente de uma fábrica de açúcares (biomassa B), com característica dispersa e 80,6 $gSVT.L^{-1}$.

Além da vinhaça como substrato (proveniente do lote C, descrito no anexo 1), também foi utilizado uma solução de glicose com macro e micronutrientes como substrato sintético padrão (Angelidaki *et al*., 2009). Em todos os testes foram utilizados frascos de vidro com capacidade total de 300 ml. Nos experimentos realizados com a biomassa "A" foi utilizado 150 ml de fase liquida. Já para os frascos com biomassa "B" foi utilizado 200 ml de fase liquida. Todos os frascos foram mantidos sob agitação constante, a uma temperatura de 35 ± 2ºC.

Para cada substrato foram empregados dois agentes tamponantes (separadamente), sendo eles a ureia (0,25 $g.gDQO^{-1}$) e o bicarbonato de sódio (0,6 $g.gDQO^{-1}$) (tabela 4-1).

Os testes foram realizados em duplicatas, com bateladas sequenciais (mínimo de três bateladas para cada condição), utilizando uma relação substrato/lodo de 0,5 $gDQO_{(substrato)}.gSVT_{(biomassa)}^{-1}$, com DQO_{total} inicial de 4 $g.L^{-1}$ (Angelidaki *et al*., 2009). Em todos os testes, a primeira batelada foi realizada utilizando somente água deionizada, a fim de garantir que a biomassa entrasse na fase endógena e a produção de biogás durante o experimento fosse decorrente da degradação do substrato testado, e não de resíduos presentes na biomassa. Após cessar a produção de biogás foi realizada a troca da fase líquida por meio de centrifugação, utilizando 8000 rpm por 5 minutos. A biomassa foi pesada e inoculada

novamente, utilizando os substratos com os respectivos agentes tamponantes (tabela 4-1). O procedimento foi utilizado para todas as trocas da fase líquida em todas as bateladas testadas. Para iniciar uma nova batelada foi adotado como parâmetro a estabilização na produção de biogás.

Tabela 4-1: Delineamento experimental empregado para as duas biomassas testadas com suas respectivas identificações.

Biomassa	Substrato	Agente Tamponante	Identificação
A **(A_0)**	Glicose	$NaHCO_3$	A_{G1}
		Ureia	A_{G2}
	Vinhaça	$NaHCO_3$	A_{V1}
		Ureia	A_{V2}
B **(B_0)**	Glicose	$NaHCO_3$	B_{G1}
		Ureia	B_{G2}
	Vinhaça	$NaHCO_3$	B_{V1}
		Ureia	B_{V2}

Para os testes com a biomassa "B", além da batelada utilizando somente água deionizada para garantir a fase endógena, também foram realizadas quatro bateladas subsequentes utilizando somente os substratos (sem adição de tampão), a fim de consumir toda a alcalinidade da biomassa. Após a quarta batelada, iniciou-se o teste utilizando as condições especificadas na tabela 4-1. Esta medida foi escolhida devido aos resultados obtidos em testes preliminares, onde verificou-se que esta biomassa possuía uma alcalinidade muito alta, o que elevava e mantinha o pH neutro.

No inicio dos experimentos, como também após cada troca da fase líquida, a purga do oxigênio presente no *headspace* foi realizado com gás hélio.

Monitoramento físico-químico

A produção do metano foi monitorada periodicamente (de acordo com o desenvolvimento de cada teste), por meio de cromatografia gasosa. Para isso foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Varian CP 3800 GC), com um detector de condutividade de íons com duas colunas, sendo a primeira coluna capilar (CP-Molsieve 5A), com um tubo de 3 m x 0,53 milímetros e 15 mm de diâmetro. A segunda coluna é uma coluna capilar (CP-Porabond-Q) com um tubo de 25 m x 0,53 milímetros e 10 mm de diâmetro. Como gás de arraste foi utilizado o hélio.

Além do metano, também foram avaliados o pH, a alcalinidade total e parcial, bem como o nitrogênio amoniacal (a periodicidade variou de acordo com a necessidade de cada teste). No inicio e no final de cada batelada foi avaliada a remoção da carga orgânica pela $DQO_{solúvel}$ seguindo os métodos descritos em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005);

Na primeira e na última batelada de cada condição testada foi realizada a análise dos ácidos graxos voláteis (AGVs) formados, utilizando cromatografia gasosa. O cromatógrafo utilizado foi da marca HP 5890 GC série II com um detector de ionização de chama (FID) e provido de uma coluna de 10% + 1% de H_3PO_4 SP100, marca Teknokroma, com tubo de 2 m x 1/8" e 2,1 mm de diâmetro. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste e o hidrogênio e ar sintético como oxidante.

Análises microbiológicas

A identificação das arqueas metanogênicas foi realizada pela técnica de PCR-DGGE, utilizando uma amostra inicial de cada biomassa (amostra separada antes da adição dos substratos) e uma amostra da biomassa final (ultima batelada) para cada condição testada. As amostras foram armazenadas a -18ºC e descongeladas somente no momento da realização da análise.

A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Fast® DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, LLC), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. Após a extração o DNA foi mantido a uma temperatura de -20ºC. As regiões V2-V3 do gene 16S RNAr das arqueas foram amplificados pelo método DGGE, utilizando os *primers* A 109(T)-F e 515-GC-R (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Lane 1991; Muyzer *et al*., 1993; Grosskopf *et al*., 1998). A mistura da PCR, com volume final de 50 µL, continha: 1 µl de cada *primer* (10 ng μl^{-1} para cada *primer*); 25 µL de BIOMIX (mistura de tampão para reação de PCR e desoxinucleótido-trifosfatos (dNTPs) pronta para uso (Bioline, Ecogen)); 2 µL do DNA extraído e água Milli-Q até completar o volume final. A PCR foi realizada em um termociclador (Bio Rad Laboratories, Inc.), com o seguinte programa de termociclagem para amplificação das arqueas: 2 minutos de pré-desnaturação à 95ºC; 35 ciclos de desnaturação à 95ºC por 30 segundo; anelamento à 52ºC por 40 segundos e; alongamento à 72ºC por 90

segundos, com o alongamento final à 72ºC por 5 minutos (Rodríguez *et al*., 2012). Para a verificação do tamanho e tipo de fragmento de DNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,8%, com marcador de peso molecular de 2000 bp Hypperladder II (Bioline, USA Inc).

A análise de DGGE para amplificação das arqueas foi realizada de acordo com Rodríguez *et al*. (2012), utilizando gel de poliacrilamida 8% (w/v), com gradiente desnaturante de ureia e formanida de 30-60% (Ben-Amor et al., 2005; Roest et al., 2005). A elétroforese foi realizada utilizando *D-Code Universal Mutation Detection System* (Bio Rad Laboratories, Inc) com tampão TAE 0,5x há 60°C e 65V durante 18 horas. A coloração do gel foi realizada com *GelRed Nucleic Acid Gel* (1/10000 de diluição; Biotium).

Os perfis de DGGE foram comparados utilizando o programa "GelCompar IITM" (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). Para calcular o índice de diversidade de *Shannon-Wiener* (H), bem como o coeficiente de similaridade foi adotada a metodologia descrita em Lebrero *et al*. (2013).

A extração das bandas individuais do gel de DGGE e a purificação dos produtos da PCR foram realizadas de acordo com Rodriguez *et al*. (2012). A posição taxonômica das sequências foi obtida por meio da ferramenta de classificação RDP, com nível de confiança de 80% (Wang *et al*., 2007). Além disso, as sequências foram comparadas com as sequências armazenadas no GenBank, pela ferramenta de busca BLAST, no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (National Centre for Biotechnology Information - NCBI) website (McGinnis e Madden, 2004). Juntamente com os programas BLAST, o programa DECIPHER foi utilizado como ferramenta controle (Wright *et al*., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados físico-químicos

A tabela 4-2 apresenta os resultados referentes ao tempo (em dias), rendimento de metano em relação à biomassa (em $mgDQO_{CH4}.gSVT^{-1}$) e remoção de DQO (%), para os testes realizados com a biomassa "A". Nos resultados em que o $NaHCO_3$ foi empregado como agente tamponante, não houve diferença significativa entre os testes realizados para cada

substrato (vinhaça e glicose) (P>0,05). Considerando a produção de metano, mesmo com valores diferentes (produção em $mgDQO_{CH4}.gSVT^{-1}$), ambas os substratos obtiveram uma média de 72% da DQO disponível convertida a metano.

Tabela 4-2: Duração de cada série de teste em batelada (tempo, em dias), produção de metano e remoção de DQO utilizando a biomassa A, provinda de uma indústria de leveduras.

Biomassa A															
Parâmetros	Tempo (d)					Produção de metano ($mgDQO_{CH4}.gSVT^{-1}$)					DQO removida (%)				
Testes	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º
A_{G1}[1]	5	5	5	5	5	321,1	370,4	359,9	331,5	355,5	95,1	98,1	97,4	91,0	95,1
A_{G2}[2]	6	27	27	-	-	76,5	64,7	0,9	-	-	9,3	1,8	3,6	-	-
A_{V1}[3]	5	5	5	5	5	261,1	272,5	288,6	269,6	272,2	82,5	87,3	89,8	88,9	87,8
A_{V2}[4]	6	27	27	-	-	255,7	112,7	185,9	-	-	64,3	5,3	37,3	-	-

[1]A_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); [2]A_{G2} (glicose e ureia); [3]A_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$) e; [4]A_{V2} (vinhaça e ureia).

Para as condições utilizando ureia, o tempo necessário para a 2ª e a 3ª batelada de cada teste foi maior (27 dias), com redução na produção específica de CH_4. Na condição utilizando vinhaça e ureia (A_{v2}), houve um decaimento na produção de metano na 2ª batelada em relação à primeira, entretanto, na 3ª batelada a produção de metano voltou a aumentar, chegando a 185,9 $mgDQO_{CH4}.gSVT^{-1}$, com consequente aumento na remoção de DQO (tabela 4-2). Devido ao tempo necessário para cada batelada, foi possível realizar cinco bateladas para as condições utilizando $NaHCO_3$ como agente tamponante, já para as condições utilizando ureia somente 3.

As concentrações de alcalinidade total apresentaram valores elevados para todas as condições avaliadas, com destaque para aquelas em que a ureia foi utilizada como agente tamponante (tabela 4-3), visto que estas apresentaram concentrações superiores as condições em que o $NaHCO_3$ foi utilizado. Entretanto, ao observar os resultados de alcalinidade bicarbonato (alcalinidade parcial), os valores se invertem, com valores mais elevados para as condições utilizando $NaHCO_3$.

Um aspecto importante para determinar a ocorrência de distúrbios no sistema é a relação entre a alcalinidade intermediária e a alcalinidade bicarbonato (AI/AB), cujos valores acima de 0,3 indicam instabilidade no sistema (Foresti, 1994; Ripley *et al.*, 1986). Para as condições utilizando bicarbonato a relação AI/AB foi 0,26 ± 0,04, o que indica estabilidade

no sistema. Esta estabilidade também foi comprovada pela eficiência na produção de metano apresentada na tabela 4-2, pela estabilidade do pH e pela conversão dos ácidos graxos voláteis em biogás (figura 4-1).

Tabela 4-3: Alcalinidade parcial e total (em $mgCaCO_3.L^{-1}$) para cada série testes em batelada utilizando a biomassa A.

Biomassa A										
Parâmetros	Alcalinidade parcial ($mgCaCO_3.L^{-1}$)					Alcalinidade total ($mgCaCO_3.L^{-1}$)				
Testes	1º	2º	3º	4º	5º	1º	2º	3º	4º	5º
A_{G1}[1]	1240	1280	1500	1320	1240	1600	1560	1840	1680	1620
A_{G2}[2]	440	800	750	-	-	1800	2640	2525	-	-
A_{V1}[3]	1560	1560	1700	1600	1600	1980	1920	2100	2100	2040
A_{V2}[4]	1480	1120	1675	-	-	2000	2420	2625	-	-

[1]A_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); [2]A_{G2} (glicose e ureia); [3]A_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$) e; [4]A_{V2} (vinhaça e ureia).

Em relação ao uso da ureia, a condição A_{G2} foi a que apresentou menor formação de alcalinidade bicarbonato, com uma relação AI/AB muito alta (3,09 para a 1ª batelada e 2,26 para a 3ª batelada), esse distúrbio está associado ao acúmulo de ácidos graxos no sistema (figura 4-1), o que causou a redução da produção de metano e consequente redução na remoção de DQO. A condição A_{V2}, mesmo com boa formação de alcalinidade bicarbonato, obteve valores de relação AI/AB de 0,35, 1,16 e 0,56 para a 1ª, 2ª e 3ª batelada, respectivamente. Esses resultados influenciaram diretamente na formação de biogás, onde o rendimento da 2ª batelada foi praticamente a metade do rendimento obtido na 1ª batelada, mesmo com o aumento do tempo utilizado. Já para 3ª batelada os valores (AI/AB, bem como biogás), indicam que o sistema estava se recuperando.

Na figura 4-1, observa-se que para todas as condições há a predominância de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o acético, propiônico e butírico. Nas condições com a utilização de ureia, a formação dos ácidos é muito semelhante na ultima batelada realizada, onde os ácidos butírico e acético se destacam, com acumulo final do acido acético. Na condição A_{V2}, há o consumo (lento) deste ácido a partir do 18º dia, com consequente formação de metano (tabela 4-2).

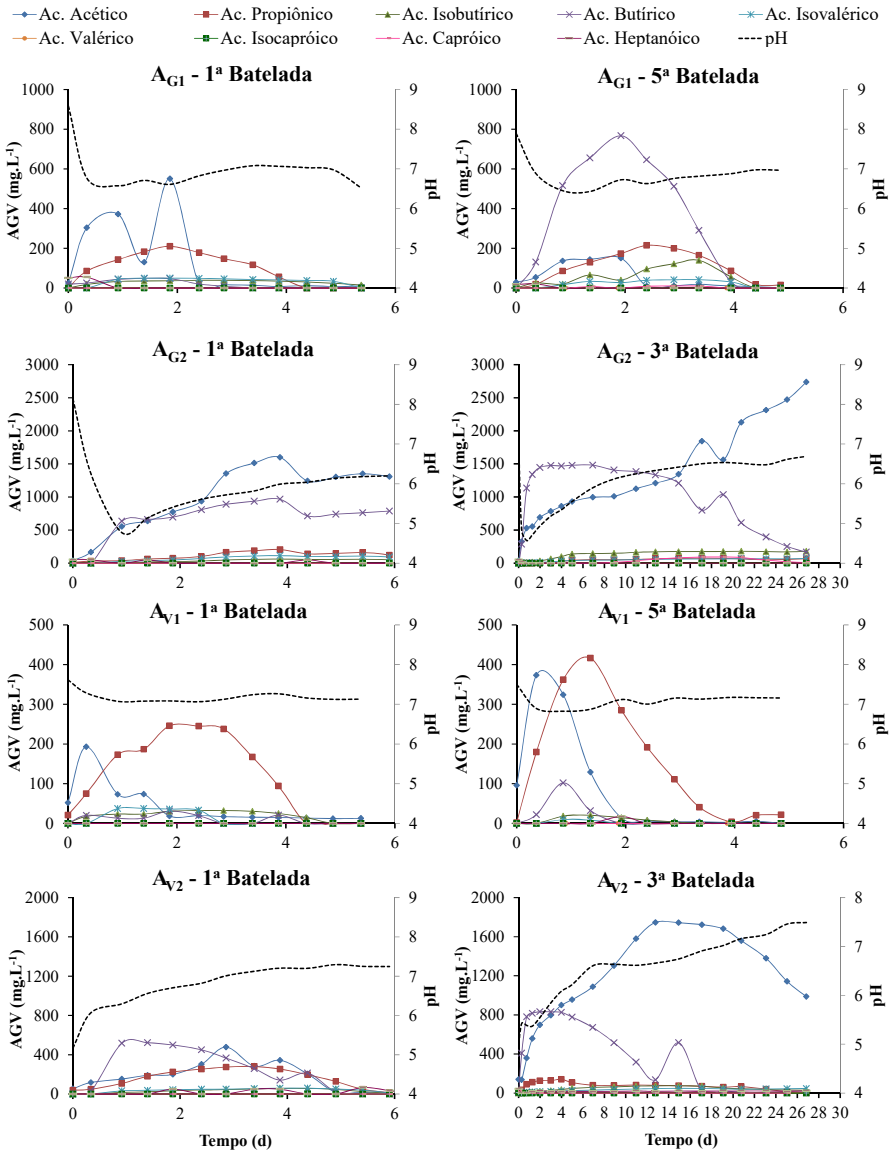


Figura 4-1: Ácidos graxos voláteis ($mg.L^{-1}$) e pH para a primeira e a ultima batelada realizadas para as condições: A_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); A_{G2} (glicose e ureia); A_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$) e; A_{V2} (vinhaça e ureia)

Nos resultados obtidos utilizando a biomassa "B", observa-se que há um aumento da velocidade de produção de biogás, com redução do tempo para cada teste (tabela 4-4). Para os dois substratos (vinhaça e glicose) utilizando $NaHCO_3$, os valores obtidos para em cada teste não apresentaram diferença significativas, com médias de produção de metano de 365,1 ± 26 e 322,3 ± 48 $mgDQO_{CH4}.gSVT^{-1}$ para a as condições B_{G1} e B_{V1}, respectivamente. Mesmo com valores muito semelhantes, avaliando o potencial de formação de metano com base na DQO solúvel, a condição B_{V1} se destaca, com 85% da DQO solúvel convertida a metano, contra

71% da condição B_{G1}. Utilizando ureia com glicose (B_{G2}) a produção de metano foi muito baixa no primeiro teste e praticamente nula no terceiro, resultado este muito diferente da condição utilizando vinhaça com ureia (B_{G2}). Na condição B_{G2}, a produção de metano e a remoção de DQO se mantiveram constante em todas as bateladas, mesmo com o decaimento no rendimento de metano em relação aos sólidos.

Tabela 4-4: Duração de cada série teste em batelada (tempo, em dias), produção de metano e remoção de DQO utilizando a biomassa B, provinda de uma indústria açucares.

Biomassa B									
Parâmetros	Tempo (d)			Produção de metano ($mgDQO_{CH4}.gSVT^{-1}$)			DQO removida (%)		
Bateladas	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
B_{G1}[1]	12	8	8	339,1	392,8	363,6	88,4	90,8	91,3
B_{G2}[2]	16	12	8	7,6	2,5	0,7	2,9	8,5	8,8
B_{V1}[3]	12	8	8	377,3	303,1	286,7	81,7	86,8	89,8
B_{V2}[4]	16	12	8	285,2	210,6	207,0	81,8	75,7	80,3

[1]: B_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); **[2]:** B_{G2}(glicose e ureia); **[3]:** B_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$) e; **[4]:** B_{V2}(vinhaça e ureia).

Os resultados de alcalinidade total e parcial, apresentados na tabela 4-5, indicaram concentrações mais elevadas para as condições utilizando vinhaça (B_{V1} e B_{V2}), independente do agente tamponante utilizado. Além das concentrações serem mais elevadas, a relação AI/AB foi muito semelhante às condições com vinhaça, com 0,28±0,04 para a condição B_{V1} e 0,28±0,02 para a condição B_{V2}. A condição B_{G1}, mesmo apresentando bons resultados quanto a produção de metano e remoção de DQO, obteve valor médio da relação AI/AB de 0,33±0,03, o que mesmo acima de 0,30, indicado como crítico por Foresti (1994), não ocasionou danos ao sistema. Para a condição B_{G2}, a relação AI/AP aumentou em batelada realizada, com 3,10, 4,00 e 5,75 para a 1ª, 2ª e 3ª batelada, respectivamente.

Ao analisar somente os valores de alcalinidade total obtidos para todas as condições em que a ureia foi empregada, tanto para a biomassa "A" quanto para a "B", é possível verificar que a ureia foi hidrolisada e formou bicarbonato de amônia, o que era esperado com a utilização deste produto. Entretanto, quando avaliada a alcalinidade bicarbonato (parcial), ou alcalinidade real para sistemas anaeróbios, somente a condição B_{V2} apresentou resultado satisfatório onde, para as demais, a ureia foi ineficiente no tamponamento do sistema.

Tabela 4-5: Alcalinidade parcial e total (em $mgCaCO_3.L^{-1}$) para cada série de testes em batelada utilizando a biomassa A.

Biomassa B						
Parâmetros	Alcalinidade parcial ($mgCaCO_3.L^{-1}$)			Alcalinidade total ($mgCaCO_3.L^{-1}$)		
Bateladas	1º	2º	3º	1º	2º	3º
B_{G1}[1]	1280	1280	1280	1700	1740	1680
B_{G2}[2]	380	300	200	1560	1500	1350
B_{V1}[3]	1500	1580	1600	1960	2080	1980
B_{V2}[4]	1640	1880	1825	2140	2360	2350

[1]: B_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); [2]: B_{G2}(glicose e ureia); [3]: B_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$) e; [4]: B_{V2}(vinhaça e ureia).

Avaliando a composição e concentração dos ácidos graxos voláteis utilizando a biomassa B (figura 4-2), é possível observar que, assim como os resultados de alcalinidade, a composição dos ácidos também apresentou maior semelhança pelo substrato utilizado e não pelo agente tamponante empregado. Uma possível justificativa para este resultado pode ser o pré-tratamento realizado para retirar a alcalinidade em excesso que havia na biomassa B, onde foram realizadas quatro bateladas antes da adição do agente tamponante somente com os substratos.

Outro aspecto observado na figura 4-2 foi a elevada velocidade conversão dos ácidos em metano na ultima batelada, em relação à primeira. Contudo, esses resultados não influenciaram no aumento na produção de metano, pois o rendimento de metano em relação aos sólidos foi reduzido à medida que as bateladas foram realizadas.

Em todas as bateladas em que a ureia foi utilizada como agente tamponante, em ambas as biomassas, a concentração de amônia formada não ultrapassou 500 $mgN\text{-}NH_3.L^{-1}$.

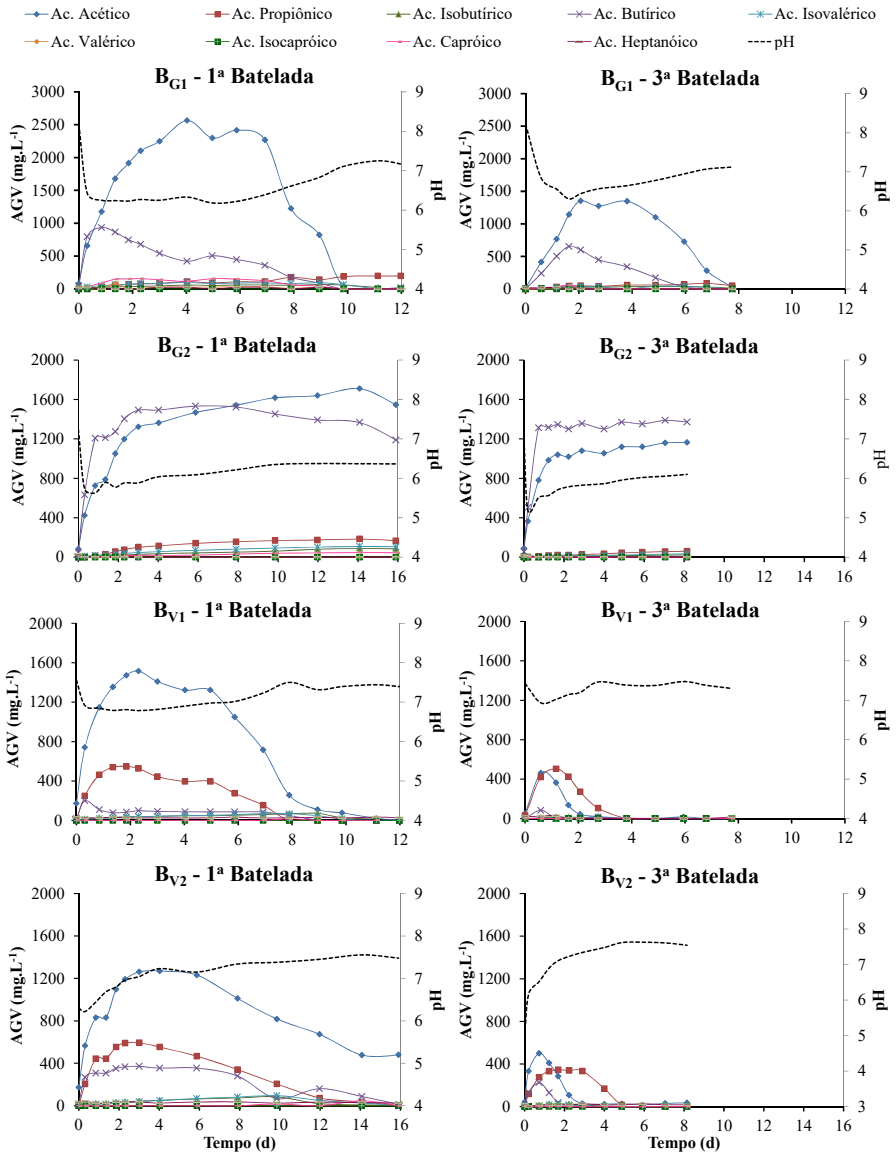


Figura 4-2: Ácidos graxos voláteis ($mg.L^{-1}$) e pH para a primeira e a ultima batelada realizadas para as condições B_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); B_{G2} (glicose e ureia); B_{V1} (vinhaça e $NaHCO_3$) e;B_{V2} (vinhaça e ureia) utilizando a biomassa B.

Resultados microbiológicos

Afim de verificar a dinâmica das arqueas metanogênicas em relação as condições testadas, uma amostra inicial de cada biomassa (A – tratando efluente de uma fabrica de levedura e B – tratando efluente de uma fabrica de açucares), bem como uma amostra da biomassa resultante após cada condição testada, foram analisadas por meio da técnica de PCR-DGGE.

Taxa de diversidade e similaridade

Com as bandas obtidas no DGGE, foram calculados as taxas de diversidade e similaridade. O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) (figura 4-3), é utilizado para avaliar tanto a diversidade de espécies (número) como a uniformidade das espécies (avaliando e comparando a intensidade das bandas), podendo variar de 1,5 a 3,5 (McDonald, 2003). Os valores obtidos para as amostras da biomassa "A" foram moderados e não apresentaram grandes variações, quando comparando à biomassa inicial e as obtidas para cada condição testada, no final. Já para a biomassa "B", este índice apresentou uma grande variação entre a amostra inicial (B_0) e as finais obtidas para cada condição, o que indica uma redução da diversidade de arqueas após os testes realizados com esta biomassa.

Comparando a similaridade entre as bandas obtidas (tabela 4-6) para as amostras da biomassa "A" e "B", percebe-se que as amostras das biomassas iniciais (A_0 e B_0) apresentaram pouca similaridade, mesmo com índice H de moderado a elevado. Quando avaliadas individualmente, a biomassa "A" apresentou maior similaridade entre as amostras em que o $NaHCO_3$ foi empregado como agente tamponante (A_{G1} e A_{V1}), com 97,7%. Este resultado é similar aos obtidos nas análises físico-químicas para esta biomassa, onde os resultados com adição de $NaHCO_3$ apresentaram melhores resultados, independente do substrato utilizado (especialmente na composição dos AGVs na ultima batelada realizada para cada teste). Para a biomassa "B", as amostras B_{G1}, B_{V1} e B_{V2} apresentaram resultados muito próximos de similaridade, com: 96,5% entre as amostras B_{G1} e B_{V1}; 94,3% entre B_{G1} e B_{V2} e; 96,2% entre as amostras B_{V1} e B_{V2}. Estes resultados também corroboram com os resultados físico-químicos, visto que para a biomassa "B".

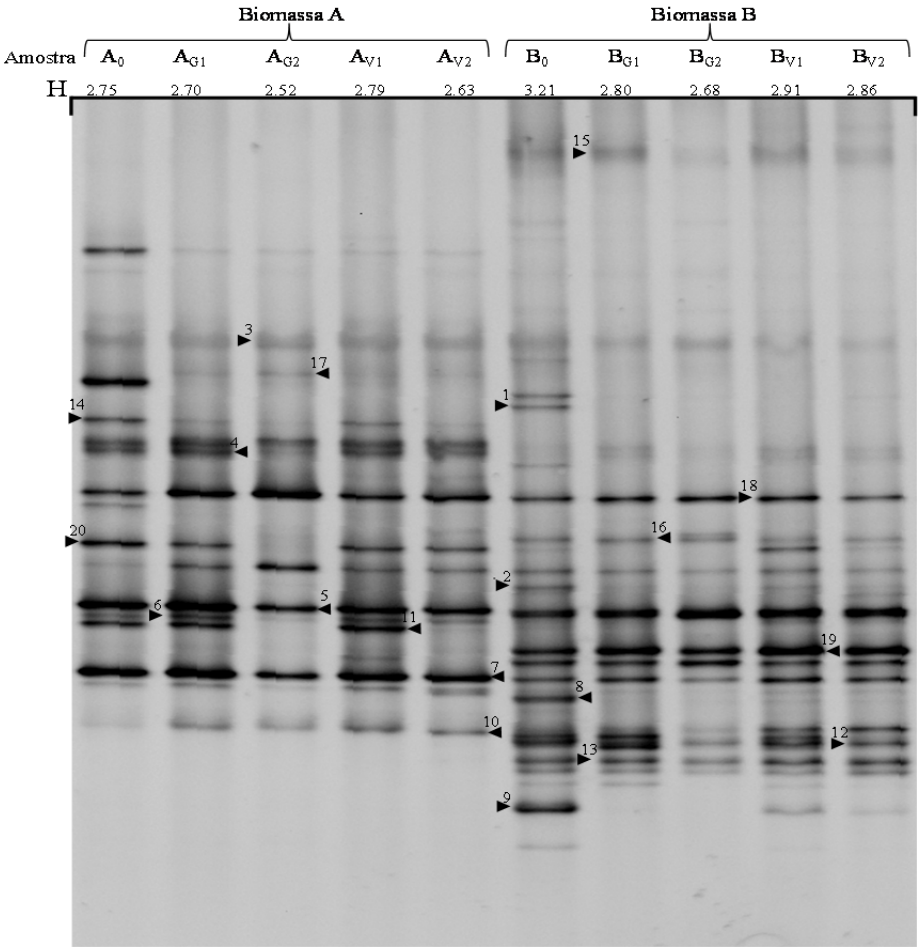


Figura 4-3: Perfis de DGGE das arqueas metanogênicas obtidos pela amplificação do gene 16S RNAr para as amostras iniciais (A_0 e B_0) e finais para as condições: A_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); A_{G2} (glicose e ureia); A_{V1}(vinhaça e $NaHCO_3$); A_{V2} (vinhaça e ureia); B_{G1} (glicose e $NaHCO_3$); B_{G2}(glicose e ureia); B_{V1} (vinhaça e $NaHCO_3$) e; B_{V2} (vinhaça e ureia) com os respectivos índices de diversidade (H).

Tabela 4-6: Taxa de similaridades (%) obtidas utilizando os dados da PCR-DGGE.

Amostras	A_{G1}	A_{G2}	A_{V1}	A_{V2}	B_0	B_{G1}	B_{G2}	B_{V1}	B_{V2}
A_0	83,4	64,3	82,4	79,2	32,7	40	47,7	47,2	42,7
A_{G1}	-	79,3	97,7	93,9	46,3	56,8	59,9	62,5	58
A_{G2}	-	-	72,6	88,2	32,6	42,6	48,5	48,4	42,7
A_{V1}	-	-	-	91,5	53	60,1	62,7	65,5	61,9
A_{V2}	-	-	-	-	48	57,9	61	64,3	58,9
B_0	-	-	-	-	-	84,4	72,5	85,2	82,5
B_{G1}	-	-	-	-	-	-	86,6	96,5	94,3
B_{G2}	-	-	-	-	-	-	-	88,9	91,1
B_{V1}	-	-	-	-	-	-	-	-	96,2

A_0 (amostra da inicial da biomassa "A"); A_{G1} (final do teste com glicose e $NaHCO_3$); A_{G2}(final do teste com glicose e ureia); A_{V1}(final do teste com vinhaça e $NaHCO_3$) e;A_{V2}(final do teste com vinhaça e ureia); B_0 (amostra da inicial da biomassa "B"); B_{G1} (final do teste com glicose e $NaHCO_3$);B_{G2}(final do teste com glicose e ureia); B_{V1}(final do teste com vinhaça e $NaHCO_3$) e;B_{V2}(final do teste com vinhaça e ureia)

Análise do DGGE

A partir do gel de DGGE (figura 4-3) foram sequenciadas 20 bandas (Tabela 4-7), sendo que deste total, as amostras provenientes da biomassa "A" possuem 11 bandas sequenciadas e as amostras provenientes da biomassa "B" 16 bandas. De acordo com o classificador RDP (nível de confiança de 80%), 19 bandas pertencem ao filo *Euryarchaeota*, e uma banda ao filo *Crenarchaeota*, na classe *Thermoprotei*.

Avaliando somente a biomassa "A" verifica-se que das 11 bandas selecionadas, 8 estão presentes em todas as condições, ou seja, eram comunidades que estavam presentes na biomassa (A_0) e se mantiveram no teste até o final para todas as condições de substrato e agente tamponante utilizados. Destas, 5 bandas (3 - 7) foram classificadas dentro do gênero *Methanosaeta*, uma banda (10) pertencente ao gênero *Methanosarcina*, uma banda (14) ao gênero *Methanospirillum* e uma banda (18) ao gênero gênero *Methanobacterium*. Uma banda pertencente ao gênero *Methanomethylovorans* (11) não foi observada nas condições em que a ureia foi utilizada (A_{G2} e A_{V2}). Resultado semelhante a este foi observado em uma banda (20) pertencente à classe *Thermoprotei*, em que na condição verificou-se a ausência somente na condição utilizando glicose e ureia (A_{G2}). O aparecimento de organismos pertencentes ao gênero *Methanobacterium* foi observado na banda 17, onde verificou-se a ausência da banda para a amostra inicial de biomassa (A_0) e presença para todas as amostras obtidas após a realização dos experimentos.

Para as bandas sequenciadas para as amostras da biomassa "B", observou-se que das 16 bandas obtidas, 9 estavam presentes em todas as condições sendo elas pertencentes ao gêneros: *Methanosaeta* (5 e 7), *Methanolinea* (12 e 13), *Methanomicrobiaceae* (15 e16) e *Methanobacterium* (18 e 19) apresentaram 2 bandas cada, e uma banda classificada para o gênero *Methanosarcina* (10). Em quatro sequências, foram verificadas ausência de bandas nas condições utilizando glicose como substrato (B_{G1} e B_{G2}) sendo elas: banda 2, classificada dentro da ordem *Methanosarcinales*; bandas 8 e 9, pertencentes ao gênero *Methanosaeta* e; 20, dentro da classe *Thermoprotei*. A banda 1, identificada apenas em relação ao filo Euryarchaeota, foi observada somente na biomassa utilizada no inicio dos experimentos (B_0) e a banda 4, sequenciada como pertencente ao gênero *Methanosaeta,* foi observada após a realização dos experimentos nas amostras B_{G1}, B_{V1} e B_{V2}.

Tabela 4-7: Classificação RDP das bandas DGGE sequenciadas para arqueas e seus correspondentes (BLAST), utilizando o banco de dados NCBI com indicação das percentagens de similaridade e fontes de origem. A presença de cada banda é indicada pelo "X".

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Banda n°	A_0	A_{G1}	A_{G2}	A_{V1}	A_{V2}	B_0	B_{G1}	B_{G2}	B_{V1}	B_{V2}	Parentesco mais próximo no Blast Nome e número de acesso	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
Filo *Euryarchaeota*	1						X					Unculturedarchaeon(KJ644990) Unculturedarchaeon(JF937221)	99 98	Wetlandsoil anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse
Classe*Methanomicrobia* Ordem*Methanosarcinales*	2						X			X	X	Unculturedarchaeon(JF937223)	91	anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse
Família*Methanosaetaceae* Gênero*Methanosaeta*	3	X	X	X	X	X	X	X	X		X	Unculturedarchaeon(EU287866)	91	1.5 L UASB reactor fed with 5 sulfate loading rates
	4	X	X	X	X	X		X		X	X	Unculturedarchaeon(EU287864) Unculturedarchaeon(JF937222) Unculturedarchaeon(KM024408)	99 99 99	1.5 L UASB reactor fed with 5 sulfate loading rates anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse Anaerobicdigester
	5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Unculturedarchaeon(JF937222) Unculturedarchaeon(KJ574121) Unculturedarchaeon(KM024408)	100 100 99	anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse Anaerobicsludge Anaerobicdigester
	6	X	X	X	X	X						Unculturedarchaeon(JF937222) UnculturedMethanosaetasp. (KC769087)	90 90	anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse Activesludge
	7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Unculturedarchaeon(EF512457) Unculturedarchaeon(JF937223)	91 91	expanded granular sludge bed reactor anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse
	8						X			X	X	Unculturedarchaeon(JN995525) Unculturedarchaeon(KJ206674) UnculturedMethanosarcinales (KF198800)	99 99 99	syntrophic butyrate degrading consortia revealed by stable-isotope-probing anaerobic bioreactor for auto-generative high pressure digestion mesophilic anaerobic digester treating municipal wastewater sludge
	9						X			X	X	UnculturedMethanosaetasp. (JN394592) Unculturedarchaeon(HM639831) Archaeonenrichmentculture (GU196184)	99 99 99	Anaerobicbioreactor activated sludge wastewater treatment plant lab-scaleanaerobicdigester
Família*Methanosarcinaceae* Gênero*Methanosarcina*	10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Unculturedmethanogenicarchaeon (AY652483) Methanosarcinabarkeri (AF028692)	94 94	Water Culturecollection
Gênero*Methanomethylovorans*	11	X	X		X							Unculturedarchaeon(AY161250) Unculturedarchaeon(JF937219) Archaeonenrichmentculture (KP064474)	99 98 97	Psychrophilicanaerobicdigesters anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse enrichment culture fed with acetate and methanol at 35 degrees in a sequencing batch reactor(SBR)
Ordem*Methanomicrobiales* Família*Methanomicrobiales-incertae-sedis* Gênero*Methanolinea*	12						X	X	X	X	X	Unculturedarchaeon(AY032988) Unculturedarchaeon(DQ478739)	99 99	environmental_sample UASB reactor treating brewery wastewater
	13						X	X	X	X	X	UnculturedMethanomicrobiales (KF198790) UnculturedMethanomicrobiales (JX023133)	99 99	mesophilic anaerobic digester treating municipal wastewater sludge sludge samples of anaerobic digesters treating sewage sludge

Continuação.

Taxonomia (Nível de confiança 80%)	Banda n°	A_0	A_{G1}	A_{G2}	A_{V1}	A_{V2}	B_0	B_{G1}	B_{G2}	B_{V1}	B_{V2}	Parentesco mais próximo no Blast (Nome e número de acesso)	Similaridade (%)	Pesquisa de origem
Família*Methanospirillaceae*														
Gênero*Methanospirillum*	14	X	X	X	X	X						Unculturedarchaeon(EU838550)	89	slurryofbiogas-reactor
Família*Methanomicrobiaceae*	15						X	X	X	X	X	Unculturedarchaeon(EF512389)	88	expanded granular sludge bed reactor
	16						X	X	X	X	X	Unculturedarchaeon(DQ089007)	86	Northernpeatland
Classe*Methanobacteria*														
Ordem*Methanobacteriales*														
Família*Methanobacteriaceae*														
Gênero*Methanobacterium*	17		X	X	X	X						Unculturedarchaeon(KC736151)	96	UASB granulated biomass from brewery waste waters
												Unculturedarchaeon(KC676296)	96	sludge from full-scale UASB reactor treating PTA wastewater
	18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Unculturedeuryarchaeote (KF360017)	99	UASB granulated biomass from brewery waste waters
												Unculturedarchaeon(KC676296)	98	sludge from full-scale UASB reactor treating PTA wastewater
	19						X	X	X	X	X	Unculturedarchaeon(JF937231)	99	anaerobic fluidized bed reactor treating vinasse
												Unculturedarchaeon(FN547088)	98	mesophilic biogas reactor fed with beet silage
Filo*Crenarchaeota*														
Classe*Thermoprotei*	20	X	X		X	X	X			X	X	Unculturedcrenarchaeote (JN052746)	97	Anaerobicdigestion
												Unculturedcrenarchaeote (GU475166)	97	mesophilic anaerobic digester which treats dairy cow manure and chicken litter

A_0 (amostra da inicial da biomassa "A"); A_{G1} (final do teste com glicose e $NaHCO_3$); A_{G2}(final do teste com glicose e ureia); A_{V1}(final do teste com vinhaça e $NaHCO_3$) e;A_{V2}(final do teste com vinhaça e ureia); B_0 (amostra da inicial da biomassa "B"); B_{G1} (final do teste com glicose e $NaHCO_3$);B_{G2}(final do teste com glicose e ureia); B_{V1}(final do teste com vinhaça e $NaHCO_3$) e;B_{V2}(final do teste com vinhaça e ureia).

Devido à característica granular da biomassa "A", e o número de bandas sequenciadas, pode-se considerar que há predomínio das arqueas pertencentes ao gênero *Methanosaeta*. As espécies pertencentes a este gênero formam filamentos longos e finos, o que auxilia na formação da trama microbiana de grânulos em reatores anaeróbios (van Haandel *et al*., 2014). Já a biomassa "B", apresenta alta diversidade de organismos, com a presença de gêneros pertencentes aos três grupos fisiológicos: metilotróficos; hidrogenotróficos e; acetotróficos (Wu *et al*., 2013; Tang *et al*., 2007; Madigan *et al*., 2003), o que condiz com a forma dispersa da biomassa.

Considerando as sequências obtidas pela DGGE para as arqueas presentes nas duas biomassas, e os resultados físico-químicos, algumas hipóteses foram formuladas para os resultados obtidos nas condições em que a ureia foi utilizada. Aplicando-se a vinhaça e a ureia com a biomassa "B" (B_{V2}), a eficiência na remoção de DQO e produção de CH_4, pode estar relacionada ao fato de que: i) esta biomassa possui maior diversidade, com a presença de arqueas capazes de produzir metano por todas as vias fisiológicas. Desta forma, a conversão dos compostos intermediários não esta restrita a uma única via; ii) não ocorreu acúmulo de AGVs, visto que os mesmos eram prontamente convertidos a metano e, deste modo, houve aumento do pH e da formação de alcalinidade bicarbonato.

Para a mesma condição (vinhaça e ureia) utilizando a biomassa "A" (A_{V2}), a possível hipótese para os resultados obtidos é combinação de três fatores: i) tempo necessário para este composto formar alcalinidade parcial; ii) acúmulo de ácidos graxos voláteis no sistema e; iii) características das arqueas metanogênicas presentes na biomassa. Para esta condição, a produção de ácidos, especialmente o acético, foi mais rápido do que a formação da alcalinidade necessária para tamponar o efeito destes ácidos. Considerando que para esta biomassa, a principal via de formação de metano, foi pela degradação do acetato pelas *Methanosaeta*, é possível que o acúmulo de AGVs (especialmente o acido acético) tenham inibido parcialmente a ação destes organismos, visto que as acetoclásticas, principalmente o gênero *Methanosaeta* são sensíveis à concentrações elevadas de acetato (Haandel *et al*., 2013; van Haandel & Lettinga 1994). Um parâmetro que auxilia nesta hipótese é o pH. Com 6 dias de experimento (considerando a 3ª batelada) o pH estava em 6,65, o eu já propício para as arqueas

metanogênicas, entretanto, a formação de metano foi nula com aumento na concentração de ácido acético até o 15º dia.

Devido à presença de organismos hidrogenotróficos, é possível que a via de formação de metano tenha sido alterada, ocorrendo então a oxidação do acetato presente, formando H_2 e CO_2, que por sua vez são transformados em metano pelas hidrogenotróficas (Lü *et al*., 2013; Wilson *et al*.,. 2012). Um fator que pode reforçar esta hipótese é que a conversão do acetato a metano é termodinamicamente favorável, com liberação de energia (-31kJ/mol). Em contrapartida, a oxidação do acetato em H_2 e CO_2 é desfavorável (+104 kJ/mol) (Lü *et al*., 2013). Com isto, a oxidação só vai ocorrer quando não há a possiblidade da degradação direta do acetato, o que explica a demora na formação do biogás. Por isso a produção de metano somente ocorreu após um longo período de adaptação.

Para as amostras utilizando glicose, a inibição pode estar relacionada à acidificação do sistema, independente da diversidade dos microrganismos presentes. Considerando a concentração dos ácidos formados em relação à DQO solúvel (grau de acidificação), foi verificado que em apenas 3 dias de teste (considerando a última batelada), 87% da DQO estava presente na forma de ácidos para a condição A_{G2} e 86% para a B_{G2}, com pH abaixo de 6,0. Como a glicose é um substrato simples, a acidificação ocorre muito rápida, fazendo com que o pH também decaia nas primeiras horas. Quando o tampão utilizado fornece alcalinidade diretamente, no caso o$NaHCO_3$, os ácidos foram rapidamente neutralizados. De outra forma, quando foi utilizada a ureia, que necessita de alguma reação para fornecer alcalinidade ao sistema, os ácidos praticamente não foram neutralizados, acumulando-se no sistema e, conseqüentemente, não produzindo metano.

CONCLUSÕES

A utilização de $NaHCO_3$ como agente tamponante mostrou-se eficiente em todas as condições testadas, com resultados satisfatórios quanto à: formação de alcalinidade; remoção de DQO e; produção de metano. Além disso, não foi verificado diferença significativa entre as séries de bateladas realizadas para cada teste tanto nos resultados físico-químicos quanto para os microbiológicos.

Nos testes em que a ureia foi empregada os resultados foram distintos. Utilizando glicose como substrato (ambas as biomassas), houve acúmulo de ácidos (especialmente o acético) no sistema, baixa formação de alcalinidade bicarbonato e consequente, redução na remoção de DQO e produção de metano. Estes resultados foram relacionados a alta acidificação do sistema, independente da diversidade dos microrganismos presentes.

Para os testes com vinhaça e ureia com biomassa "A", a produção de metano, bem como a remoção de DQO foram reduzidas, ocasionando o acúmulo de ácidos. Este fato pode ser relacionado ao predomínio de arqueas pertencentes ao gênero *Methanosaetas* na biomassa "A", as quais foram inibidas pela alta concentração de acetato. Nesta mesma condição (vinhaça e ureia) para a biomassa "B", os resultados foram distintos, com formação de alcalinidade, especialmente a bicarbonato, pH estável e degradação dos AGVs (não apresentando acúmulo de acetato principalmente na 3ª batelada). Mesmo apresentando aumento na remoção da DQO, foi observada redução no potencial de produção de metano, com apenas 66% da DQO disponível. Estes resultados estão associados a diversidade de arqueas presente na biomassa "B", deste modo, a produção de metano não estava restrita a uma via ou gênero especifico.

5 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS UTILIZANDO VINHAÇA

Resumo: A viabilidade da produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) pela digestão anaeróbia da vinhaça, em condições mesofílicas (30 ± 2 ºC), foi verificada por meio de experimentos em bateladas. O primeiro foi realizado para verificar a influência de diferentes dosagens de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) na produção do biogás e ácidos intermediários. Para isso, foram testadas quatro condições: somente vinhaça (V-0B); vinhaça com bicarbonato de sódio nas concentrações 0,1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ (V-0,1B); 0,3 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ (V-0,3B) e; 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ (V-0,5B). O segundo experimento foi realizado com a adição de etanol como co-substrato, para verificar a formação de ácidos de cadeia média pela junção de átomos de carbono do etanol com ácidos de cadeia curta onde, para isso, testou-se diferentes proporções de vinhaça e etanol (1/1, 3/1 e 9/1). Para os resultados obtidos no primeiro experimento, o maior grau de acidificação foi encontrado na condição utilizando somente vinhaça (V-0B), com 0,38, seguido da condição V-0,1B, com 0,33. Em ambas as condições (sem e com a presença do etanol) o pH manteve-se abaixo de 5,0, e houve predominância na produção de ácidos de cadeia curta, principalmente o acético e o propiônico. Para as condições V-0,3B e V-0,5B, o pH permaneceu neutro, favorecendo a produção de metano e remoção de DQO. O grau de acidificação obtido para estas condições foi de 0,11 e 0,15, respectivamente, com maior variabilidade dos ácidos produzidos. No 2º experimento, ocorreu o acúmulo de ácidos em todas as condições testadas. Além disso, o grau de acidificação foi proporcional à adição de etanol utilizada com a vinhaça (0,72, 0,54 e 0,48 para as condições V/E 1:1, V/E 3:1 e V/E 9:1, respectivamente). Da mesma forma, a formação de ácidos de cadeia média, especialmente os ácidos capróico e valérico no 20º dia de experimento, também foi proporcional à porcentagem de etanol utilizada.

Palavras-chave: Vinhaça, Etanol, Ácidos Graxos Voláteis; Fermentação Anaeróbia.

INTRODUÇÃO

Os ácidos orgânicos são compostos que incluem ácidos carboxílicos, enóis, fenóis e ácidos sulfônicos, entre outros (Huang *et al*., 2007). Dentre os ácidos carboxílicos estão os Ácidos Graxos Voláteis (AGV), formados por ácidos de cadeia curta e média (de 2 a 8 carbonos), tais como os ácidos acético, propiônico, butírico e capróico. Estes ácidos podem ser empregados nos mais variados setores, como matéria-prima para a produção de bioplásticos (Cai *et al.,* 2009), produção de bioenergia (Zheng *et al*., 2010; Uyar *et al*., 2009) e na remoção de nutrientes, nitrogênio e fósforo de água residuária (Lee *et al*., 2014a; Zheng *et al*., 2010), além de aplicações nas industrias farmacêuticas, alimentícia, cosmética e de defensivos agrícolas.

Atualmente, os ácidos graxos voláteis são produzidos por processos químicos a partir de recursos fósseis (Eggeman and Verser, 2005), entretanto, também podem ser obtidos pela fermentação anaeróbia de efluentes ou resíduos orgânicos. A produção via fermentação apresenta algumas vantagens quando comparadas aos processos químicos, tais como: utilização de recursos renováveis como matéria prima, seguindo os preceitos do desenvolvimento sustentável; podem ser utilizados resíduos que até então não possuíam importância econômica como matéria prima; os produtos gerados da fermentação possuem maior segurança, o que é importante para a saúde humana (Huang *et al.,* 2007). Além destas vantagens, a produção dos AGV a partir da fermentação anaeróbia de efluentes e resíduos possui baixo custo, o que pode tornar este processo mais competitivo (Lee *et al.,* 2014).

O processo de digestão anaeróbia pode ser divido basicamente em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Os AGVs são formados nas primeiras etapas e consumidos na ultima etapa (metanogênese) com a formação do CH_4 e CO_2 (Pohland, 1992). Quando o objetivo da digestão anaeróbia é a remoção de matéria orgânica ou a produção de biogás, um cuidado maior deve ser tomado em relação às arqueas metanogênicas, pois estas são mais sensíveis a variações no sistema, especialmente ao pH (a faixa ótima para as arqueas metanogênicas é uma faixa estreita entre 6,8 e 7,3) (Pohland, 1992). Contudo, quando se muda o foco da digestão anaeróbia para a formação e o acúmulo de AGVs ou outros compostos intermediários no sistema, tornam-se necessárias medidas que inibam a última etapa do processo.

Várias técnicas vêm sendo estudadas para inibir a etapa metanogênica e promover a formação e acúmulo de produtos intermediários, principalmente de hidrogênio. O pré-tratamento do lodo de inóculo para inativação de microrganismos metanogênicos é uma dessas técnicas e pode ser realizada a partir do choque térmico (aquecimento ou congelamento), aeração, choque de carga ou choque ácido ou básico (Penteado *et al*., 2013; Kim, Lee, and Kim, 2011; Luo *et al*., 2011). Além disso, a adição de substâncias como clorofórmio ou ácido sulfônico 2-bromoetano (BESA), ao reator de digestão também pode promover o efeito inibitório de metanogênese (O-Thong *et al*., 2009; Zhu and Beland, 2006; Bouwer and McCarty, 1983).

Grande parte dos estudos realizados para a produção de ácidos via digestão anaeróbia relatam a formação de ácidos de cadeia com 2 a 4 átomos de carbonos (Agler *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2009; Bengtsson *et al*., 2008), como o acético e o propiônico. Devido às propriedades físicas, os ácidos graxos de cadeia média possuem vantagem em relação aos ácidos de cadeia curta, na utilização em processos industriais (produção de combustíveis e produtos químicos). Isso se deve ao fato de que ácidos com 6 ou 8 átomos de carbono possuem uma maior cadeia carbônica hidrofóbica e uma menor relação oxigênio/carbono, o que aumenta a densidade energética das moléculas e faz com que a separação do meio de fermentação seja mais fácil, reduzindo o custo de produção (Steinbusch *et al*., 2011).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para promover o aumento de cadeia de ácidos graxos voláteis. Alguns deles sugerem a utilização do etanol como doador de elétrons para aumentar a cadeia a partir de ácidos como acético e butiríco (Grootscholten *et al*., 2013; Agler *et al*., 2012; Steinbusch *et al*., 2011). O alongamento de cadeia de ácidos graxos ocorre devido a um processo chamado oxidação β reversa (Spirito *et al*., 2014), que ocorre na presença de doadores de elétrons no substrato de digestão. O processo é oposto ao de degradação dos ácidos, onde o metabolismo começa com a oxidação do etanol a acetato. Consequentemente, o acetato é adicionado a acetil CoA (acetil + coenzima A) e alongado em processo cíclico a butirato. De maneira similar o butirato pode ser alongado a caproato via butil CoA (Agler *et al*., 2012; Steinbusch *et al*., 2011).

Considerando que os microrganismos metanogênicos são restritos ao pH neutro, enquanto as bactérias responsáveis pelas etapas anteriores da digestão anaeróbia (especialmente pela produção de ácidos) são menos susceptíveis a mudanças no pH, efluentes que possuem como características a acidificação rápida, como a vinhaça, apresentam vantagem em relação a produção e acúmulo de ácidos. Devido ao baixo pH (ou a queda acentuada deste nas primeiras horas) ocorre a inibição natural da atividade metanogênica, sem que haja a necessidade de adicionar algum produto ou processo, reduzindo os custos de operação do sistema. Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar o potencial de utilização da vinhaça como matéria prima na produção de ácidos graxos voláteis de valor comercial via digestão anaeróbia.

METODOLOGIA

O teste foi realizado em batelada (em triplicata), utilizando frascos de vidro com capacidade total de 500 mL, com 400 mL de fase líquida. Para cada frasco foram adicionados 4 $gSVT.L^{-1}$ de lodo, proveniente de um reator UASB em escala de bancada, que tratava vinhaça, adicionando $NaHCO_3$ como tampão (a vinhaça utilizada foi proveniente do lote B, apresentado no anexo 1).

Os experimentos foram divididos de acordo com o objetivo e o substrato. O primeiro foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da concentração do $NaHCO_3$ na estabilização do pH (em diferentes faixas), na formação de biogás e ácidos graxos. Para isto, foram utilizadas três concentrações de bicarbonato de sódio de acordo com a DQO da vinhaça. O segundo experimento foi conduzido para avaliar a influência da composição do substrato na formação dos ácidos, mantendo o mesmo pH. Desta forma, foi utilizada uma combinação de etanol e vinhaça em três proporções, mantendo constante a concentração (em termos da DQO) final. As concentrações e características das diferentes condições do teste estão descritas na tabela 5-1.

Após preencher e lacrar os frascos, a purga do oxigênio presente no *headspace* foi realizada com nitrogênio (N_2) para frascos sem agente tamponante, e uma mistura de nitrogênio e gás carbônico (N_2 + CO_2, 75% e 25% respectivamente) para os frascos com $NaHCO_3$. Os frascos foram mantidos a 30 ± 2 ºC com agitação constante (75 rpm).

A quantificação do metano produzido foi realizada de acordo com a metodologia de deslocamento de líquido descrita em Aquino *et al*. (2007), com uso de solução de hidróxido de sódio 18%. O pH e a DQO solúvel foram determinados de acordo com a metodologia descrita em "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 2005).

Tabela 5-1: Diferentes condições testadas: combinação de substratos, $NaHCO_3$ e DQO inicial utilizadas na realização dos experimentos.

Experimentos	Identificação	Substrato	Proporção do substrato	$NaHCO_3$ ($g.gDQO^{-1}$)	$DQO_{solúvel}$ ($g.L^{-1}$)
1ª	**V-0B**	Vinhaça	100% vinhaça	-	17,9
	V-0,1B	Vinhaça	100% vinhaça	0,1	17,3
	V-0,2B	Vinhaça	100% vinhaça	0,3	17,9
	V-0,3B	Vinhaça	100% vinhaça	0,5	16,6
2º	**V/E 1:1**	Vinhaça e Etanol	1:1 (50% etanol)	-	7,2
	V/E 3:1	Vinhaça e Etanol	3:1 (25% etanol)	-	7,3
	V/E 9:1	Vinhaça e Etanol	9:1 (10% etanol)	-	7,0

A determinação dos ácidos graxos voláteis foi realizada por cromatografia gasosa, seguindo a metodologia descrita em Buchanan (2008). Para isso foi utilizado um cromatógrafo GC 2010 da marca Shimadzu, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna NUKOL, de 30 m x 0,53 mm (diâmetro interno) x 0,50 µm (espessura de filme). As amostras foram preparadas por centrifugação a 10.000 rpm para remoção de material em suspensão por 10 minutos e acondicionadas em frasco-padrão (vials) até a sua utilização. As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor (230°C); temperatura do detector (230°C); razão de *split*: 15; fluxo do gás de arraste (H_2) - 1,97 $mL.min^{-1}$; fluxo do gás auxiliar (N_2) – 30 $mL.min^{-1}$; fluxos dos gases da chama - ar sintético (400 $mL.min^{-1}$) e H_2 (40 $mL.min^{-1}$).

Para avaliar o potencial de formação de ácidos, foi utilizado como base o grau de acidificação, obtido pela equação 5-1 descrita por Bengtsson *et al*. (2008).

$$\text{Grau de acidificação} = \frac{\Delta AGV}{DQO_i} \qquad \text{Eq. 5-1}$$

Onde: DQO_i é a DQO inicial solúvel e ΔAGV é a concentração máxima de AGV obtida durante o experimento menos a concentração inicial. Todos os parâmetros em $gO_2.L^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da concentração de $NaHCO_3$

Na figura 5.1 são apresentados resultados de pH, produção de CH_4, DQO e o total de AGVs obtidos para o 1º experimento. A condição V-0B apresentou oscilações no pH nos primeiros dias do teste, com variações de 4,8 à 4,0, estabilizando-se em 4,5 após o 8º dia. Assim como o pH, a produção de AGVs também apresentou pouca variação na concentração após 8 dias de experimento. A condição V-0,1B apresentou uma leve produção de metano com remoção de DQO até o 4º dia de experimento. Esta produção inicial de metano pode ser atribuída ao pH, visto esta condição iniciou com o pH em 5,8 (devido a adição de $NaHCO_3$) com queda até o 4 dia, quando chegou a 5,0. As condições V-0,3B e V-0,5B apresentaram resultados muito semelhantes. Para estas condições, a concentração utilizada de $NaHCO_3$ foi suficiente para manter o pH neutro o que possibilitou a produção de metano. A remoção de DQO foi de 68% para a condição V-0,3B e 79% para a condição V-0,5B, entretanto somente 45 e 55 % (Condições V-0,3B e V-0,5B, respectivamente) da DQO removida foi convertida a CH_4. Para ambas as condições a concentração total de AGVs permaneceu constante (cerca de 2500 $mgAGV_{DQO}.L^{-1}$).

Segundo Bengtsson *et al*. (2008) o grau de acidificação é uma forma de se calcular o desempenho de reatores acidogênicos, sendo que, quanto mais próximo de 1,0 for o valor do grau de acidificação, maior será o potencial do reator em formar ácidos. Avaliando o grau de acidificação obtido para a 1ª etapa (Tabela 5-2), as condições V-0B e V-0,1B apresentaram índices superiores às condições V-0,3B e V- 0,5B, o que já era esperado devido as condições de realização do teste, mais propícias para a produção de biogás. A condição V-0B apresentou produção máxima de ácidos após 8 dias de testes, com grau de acidificação de 0,38, e pH em torno de 4,5. A condição V-0,1B apresentou grau de acidificação 13% menor que a condição V-0B (0,33), com a produção máxima de ácidos ocorrendo somente após 13 dias de

experimento. Para ambas as condições, a concentração total e a composição dos ácidos se mantiveram estáveis após atingir o máximo de acidificação.

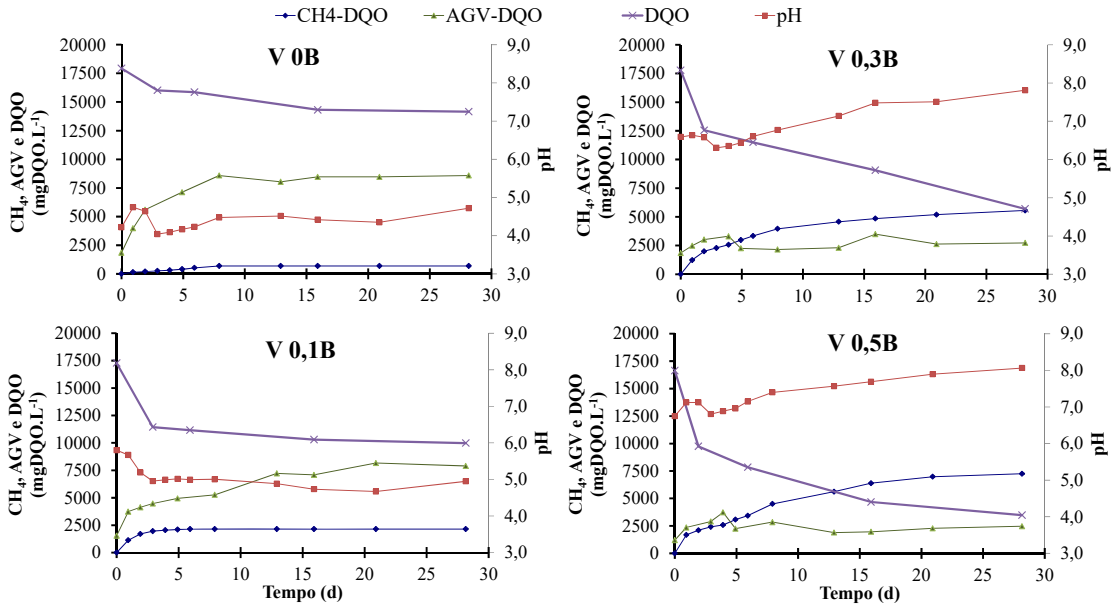


Figura 5-1: Resultados dos parâmetros pH, DQO, CH_4 e AGV monitorados ao longo dos experimentos realizados no 1º experimento para as condições: V-0B (utilizando somente vinhaça); V-0,1B (vinhaça + 0,1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$); V-0,3B (vinhaça + 0,3 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$) e; V-0,5B (vinhaça + 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$).

As condições V-0,3B e V-0,5B apresentaram grau de acidificação de 0,11 e 0,15, respectivamente, ambos obtidos após 4 dias de experimento (tabela 5-2) . O baixo grau de acidificação para estas condições era esperado, visto que a dosagem de $NaHCO_3$ utilizada foi suficiente para manter o pH neutro, favorecendo a ação das arqueas metanogênicas, propiciando a conversão dos AGVs a metano. Mesmo com estas condições, a concentração total AGVs formada nas duas condições foi mantida até o final do experimento.

Tabela 5-2: Acúmulo máximo de ácidos graxos voláteis (AGV) e grau de acidificação, bem como tempo e o pH em que os valores foram atingidos.

Condição	**V-0B[1]**	**V- 0,1B[2]**	**V-0,3B[3]**	**V-0,5B[4]**
Acúmulo máximo de ácidos ($gDQO.L^{-1}$)[5]	6,73	5,69	1,94	2,52
Tempo (d)	8	13	4	4
pH	4,48±0,03	4,89±0,06	6,35±0,03	6,89±0,05
Grau de acidificação	0,38	0,33	0,11	0,15

[1]: Somente vinhaça; [2]: Vinhaça com 0,1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$; [3]: Vinhaça com 0,3 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$; [4]: Vinhaça com 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$; [5]: Diferença na concentração de AGV no acúmulo máximo e no início do experimento.

Correlacionando o grau de acidificação obtido para cada condição, com o pH e com a concentração adicionada de $NaHCO_3$, verifica-se que o potencial de acidificação

foi influenciado muito mais pelo pH do meio, que a concentração adicionada de $NaHCO_3$ (figura 5-2).

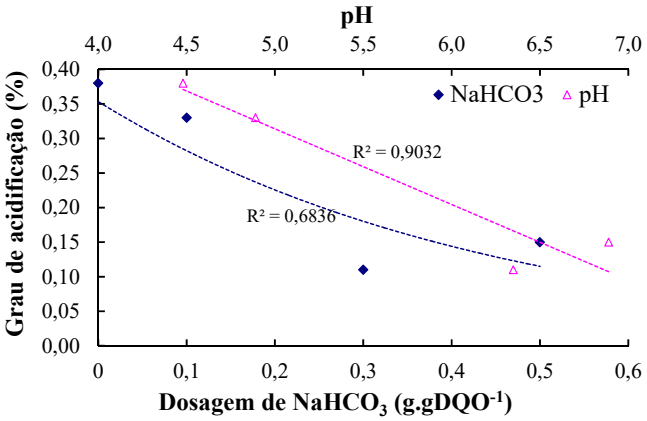


Figura 5-2: Correlação entre o grau de acidificação (em %), o pH do meio e a dosagem utilizada de $NaHCO_3$ (sem e com 0,1; 0,3 e; 0,5 $g.gDQO^{-1}$) para o 1º experimento.

Avaliando a composição dos ácidos formados no ponto onde ocorreu o grau máximo de acidificação, é possível observar a predominância de ácidos de cadeia curta nas condições V-0B e V-0,1B (figura 5-3). Na condição V-0B as maiores concentrações são de ácido propiônico, seguido pelos ácidos acético e butírico. Já para a condição V-0,1B o ácido predominante é o butírico, seguido pelo propiônico e acético. Em ambas as condições foram observadas a presença de ácidos de cadeia média, especialmente o capróico e heptanóico, porém, em menor concentração. A condição V-0,3B apresenta domínio, mesmo que discreto, do ácido heptanóico seguido pelos ácidos propiônico e butírico.

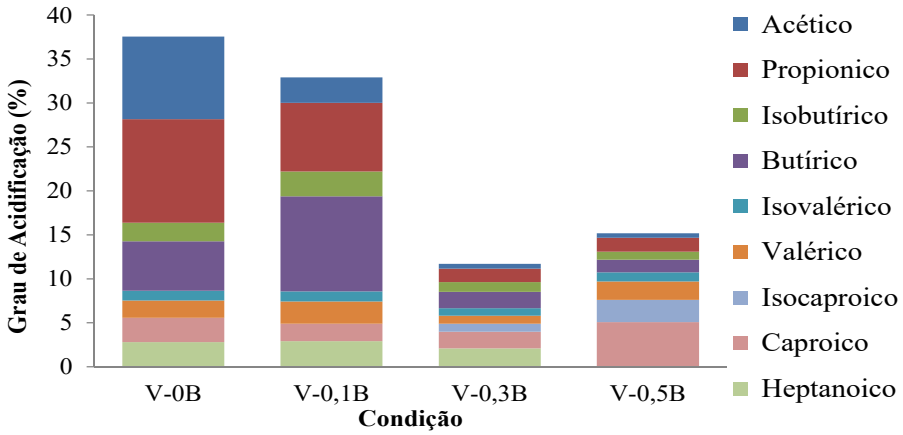


Figura 5-3: Grau de acidificação, com a composição dos ácidos (apresentados em porcentagem) obtidos no 8° dia de experimento para a condições V-0B (utilizando somente vinhaça), 13° para a condição V-0,1B (vinhaça + 0,1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$), e 4° para as condições V-0,3B (vinhaça + 0,3 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$) e V-0,5B (vinhaça + 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$).

Avaliando a condição V-0,5B na figura 5-3, observa-se o domínio dos ácidos de cadeia média, com destaque especial para o ácido capróico. Entretanto, ao analisar a figura 5-4, é possível observar que este ácido foi produzido somente nos primeiros dias (com pico no 4ª dia) onde, após este período, predominaram os ácidos isocapróico e propiônico. A presença de ácidos de cadeia média nas condições em que o pH se manteve neutro (V-0,3B e V-0,5B), pode estar relacionada à via de formação de metano. Neste contexto, conversão dos ácidos de cadeia curta em metano é termodinamicamente mais favorável ($\Delta G < 0$) quando comparados aos ácidos de cadeia média. Assim, os ácidos de cadeia curta foram rapidamente convertidos a metano em pH neutro, o que refletiu na detecção de ácidos de cadeia média (van Haandel, A C. Lettinga, 1994).

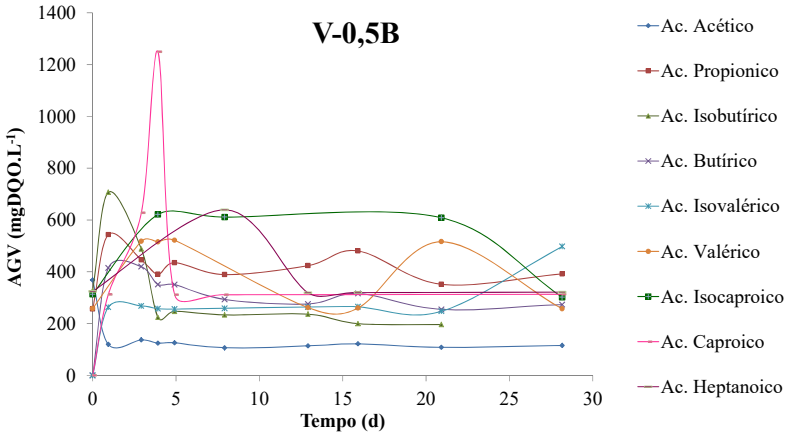


Figura 5-4: Concentrações individuais dos ácidos formados na condição para as condições V-0,5B (vinhaça + 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$).

Bengtsson *et al.* (2008), avaliaram a produção de AGVs utilizando diferentes efluentes, com experimentos em bateladas com duração de 17 a 56 dias e temperatura mesofílica. O efluente que apresentou maior grau de acidifição foi o da produção de queijo (0,67) com 8 dias, seguido pelo efluente de uma fabrica de papel reciclado, com 0,67 após 11 dias. A DQO solúvel inícial destes efluentes foi de 4,5 e 7,6 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Para os efluentes de uma fabrica de papel e celulose, bem como o do processamento da polpa de celulose, o grau de acididição foi de 0,56 e 0,55 com 17 dias para ambos, e com DQO solúvel inicial de 2,3 e 12,9 $mg.L^{-1}$. Em todos os testes, o pH foi mantido em 6,0 utilizando NaOH.

Alkaya e Demirer (2011), estudaram a produção de ácidos graxos voláteis a partir da co-digestão anaeróbia de efluente proveniente da industrialização da beterraba

e da polpa de beterraba, com variações na mistura dos substratos (2:1 e 1:1) e dois tempos de detenção hidráulica (2 e 4 dias). Os testes foram realizados em um reator de mistura completa operado continuamente por 40 dias em temperatura mesofílica. Os autores obtiveram o maior grau de acidificação (0,47) com o reator operando com tempo de detenção de 2 dias, carga orgânica volumétrica de 5,4 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ e pH entre 5,7 e 6,8 (sem adição de agente tamponante).

A produção de AGV a partir de lodo primário em diferentes valores de pH foi estudada por Wu *et al.* (2010). Para a realização do experimento os autores utilizaram 10 reatores idênticos, os quais foram alimentados com lodo primário com concentração de 11 $gSVT.L^{-1}$ e 17 $gDQO.L^{-1}$. O ajuste do pH para as faixas desejadas ocorreu por meio de soluções de NaOH e HCl. Os pesquisados obtiveram os maiores rendimentos de AGVs com valores de pH entre 10 e 11 (0,301 e 0,312 $gAGV_{DQO}.gSSV$, respectivamente) após 5 dias de experimento. Zhang, Chen e Zhou (2009), avaliando a produção de AGV a partir da hidrólise de lodo ativado em condição mesofílica, obtiveram resultados similares aos obtidos por Wu *et al.* (2010), com as melhores condições para produção e acúmulo de AGV (principalmente ácido acético) com um pH de 9,0 (0,298 $gAGV_{DQO}.gSSV^{-1}$). Ambos os autores atribuem esses resultados à inibição das arqueas metanogênicas nesta faixa de pH.

Os resultados observados nas pesquisas destacadas sugerem que o pH ótimo para a produção de AGV é altamente dependente do tipo de substrato utilizado. Em substratos que há predominância de compostos mais complexos, que necessitam ser hidrolisados, como lodos, manter o pH alcalino auxilia na hidrólise do substrato, o que facilita a produção de AGV e inibe a produção de metano (Zhang *et al.*, 2009). Já para substratos oriundos de efluentes, grande parte dos trabalhos indicam que a maior formação de AGVs ocorre em faixas de pH entre 5,0 e 6,0. Mesmo com procedimentos e substratos diferentes, todos trabalhos citados, bem como os resultados obtidos nas condições V-0B e V-0,1B, possuem predominância na formação de ácidos de cadeia curta (principalmente acético, propiônico e butírico).

Influência da composição do substrato

Os resultados obtidos onde etanol foi adicionado para verificar maior presença de ácidos graxos voláteis de cadeia média, apresentaram resultados muito similares em relação aos parâmetros pH, CH_4 e DQO para as três condições testadas (figura 5-5). O valor do pH se manteve abaixo de 5,0, com isso ocorreu a inibição das arqueas metanogênicas, favorecendo o acúmulo de ácidos no sistema. A concentração total de AGVs foi diretamente proporcional à porcentagem adicionada de etanol, com maior concentração na condição V/E 1:1.

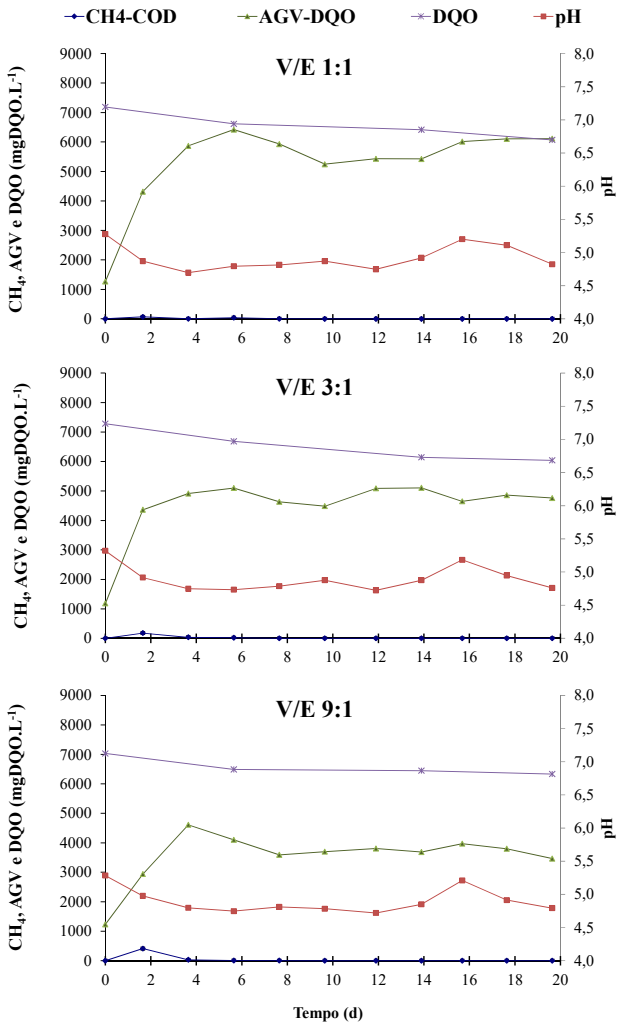


Figura 5-5: Resultados dos parâmetros pH, DQO, CH4 e AGV monitorados ao longo dos experimentos realizados no 2º experimento para as condições: V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e; V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol).

Além da concentração total de AGVs, o grau de acidificação calculado com base no 1º pico de ácidos formado para as três condições, apresentaram correlação com a adição de etanol (tabela 5-3). As condições V/E 1:1 e V/E 3:1 apresentaram grau de

acidificação de 0,72 e 0,54 após 5,6 dias de experimento. A condição V/E 9:1 apresentou grau de acidificação de 0,48, com 4,6 dias. Avaliando os resultados obtidos nesta etapa, juntamente com o resultado da condição V-0B, é possível verificar que a incorporação do etanol à vinhaça aumenta a capacidade de formação dos ácidos no sistema, em relação ao potencial de formação destes ácidos.

Tabela 5-3 Acúmulo máximo de ácidos graxos voláteis (AGV) e grau de acidificação, bem como tempo e o pH em que os valores foram atingidos.

Condição	**V/E 1:1[1]**	**V/E 3:1[2]**	**V/E 9:1[3]**
Acúmulo máximo de ácidos ($gDQO.L^{-1}$)[4]	6,42	5,10	4,61
Tempo (d)	5,6	5,6	3,6
pH	4,79	4,73	4,80
Grau de acidificação	0,72	0,54	0,48

[1]: Vinhaça e etano 1:1; [2]: Vinhaça e etano 3:1; [3]: Vinhaça e etano 9:1; [4]: Diferença na concentração de AGV no acúmulo máximo e no início do experimento.

Avaliando a composição dos ácidos formados dentro do grau de acidificação obtidos nos dias 5,6 para as condições V/E 1:1 e V/E 3:1, e 3,6 para a condição V/E 9:1 (figura 5-6), observa-se que há predominância de ácidos de cadeia curta, especialmente nas condições V/E 1:1 e V/E 3:1, onde a concentração dos ácidos butírico, propiônico e acético são também diretamente proporcionais à porcentagem adicionada de etanol.

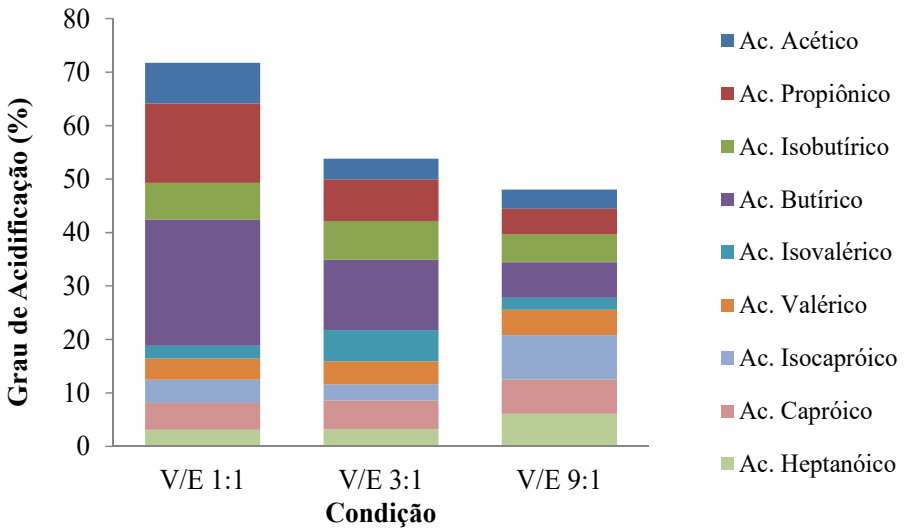


Figura 5-6: Grau de acidificação, com a composição dos ácidos (apresentados em porcentagem) obtidos no 5,6° dia de experimento para a condições V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e 3,6º dia para a condição V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol).

A concentração total de AGVs obtida nas três condições não apresentaram variações significativas após alcançarem o grau máximo de acidificação (figura 5-5),

contudo, a composição dos AGVs formados durante o experimento apresentou grandes variações até o 8º dia de experimento. Após este período, além de estabilizar a composição, ácidos de cadeia média aumentaram a concentração. Devido a este fator, recalculou-se o grau de acidificação para as três condições utilizando o último dia de experimento (20º dia), como máximo de ácidos produzidos (figura 5-7).

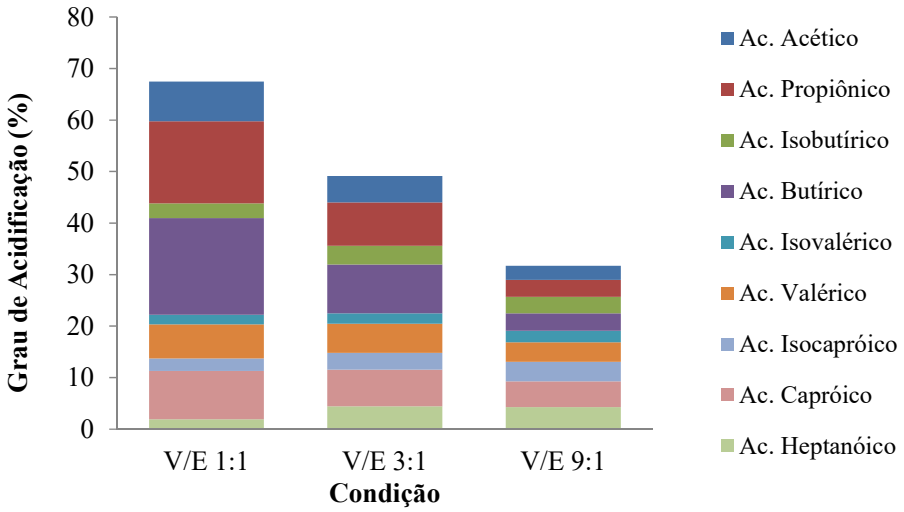


Figure 5-7: Grau de acidificação, com a composição dos ácidos (apresentados em porcentagem) obtidos no 20° dia de experimento para a condições: V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e; V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol).

Comparando o grau de acidificação obtido no início (5,6º e 3,6 dias) com o final do experimento (20º dia), as condições V/E 1:1 e V/E 3:1 apresentaram a respectiva redução de 6 e 8%, já a condição V/E 9:1 reduziu o grau de acidificação em 33%. Em relação à composição dos ácidos no 20º dia, observa-se que mesmo com o predomínio dos ácidos de cadeia curta, os ácidos capróico e valérico já aparecem com mais destaque. Quando comparadas as concentrações dos ácidos individuais, dentro do grau de acidificação de cada condição, observa-se que a concentração dos ácidos acético, propiônico, butírico e capróico é proporcional a relação de vinhaça e etanol (figura 7-8). Outro fator interessante é que em todas as condições o pH foi muito semelhante (4,79 ± 0,03 no 20º dia), o que mostra que a composição dos AGVs formados foi decorrente da composição do substrato utilizado.

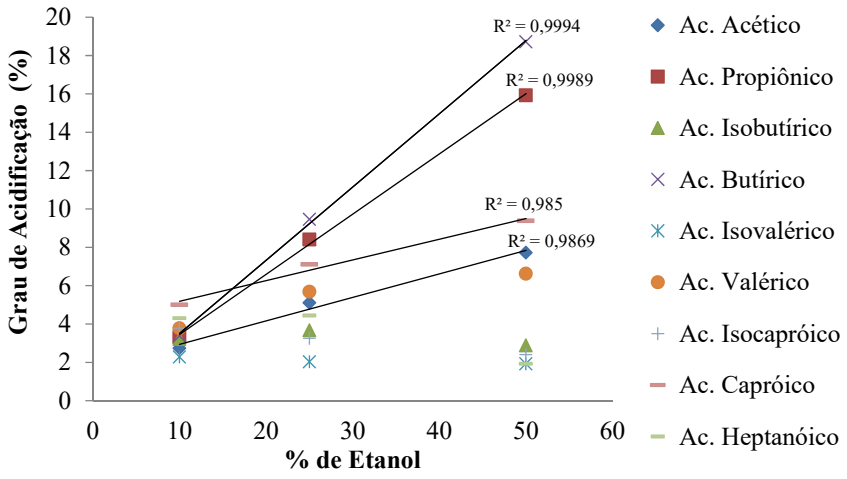


Figura 5-8: Porcentagem individual dos ácidos, dentro do grau de acidificação calculado para o 20º dia de experimento, em relação à porcentagem de etanol na vinhaça (condições: V/E 1:1 (50% vinhaça e 50% etanol); V/E 3:1 (75% vinhaça e 25% etanol) e; V/E 9:1 (90% vinhaça e 10% etanol)).

Segundo Agler *et al.* (2012) e Steinbusch *et al.* (2011), a formação de ácido capróico pela incorporação de átomos do etanol no ácido butírico (processo de oxidação β reversa), promove a formação de ácido acético, o que por sua vez, também é convertido a ácido butírico pela incorporação de mais 2 átomos de carbono oriundo de mais uma molecula de etanol. Com este processo de alongamento de cadeia, há o aumento simultâneo das concentrações dos ácidos acético, butírico e capróico dentro do sistema, o que corresponde aos resultados obtidos no final do 2º experimento (especialmente V/E 1:1).

Alguns trabalhos específicos para a produção de ácidos de cadeia média, mostram que além da adição do etanol, o pH e as bactérias presentes no sistema também influenciam na produção destes ácidos, especialmente o ácido capróico. Grootscholten *et al.* (2013) estudaram o alongamento de cadeia a partir de acetato e etanol (3,1 e 5 $gDQO.L^{-1}$, respectivamente) em um filtro anaeróbio inoculado com biomassa proveniente de um reator anaeróbio de mistura completa, utilizando BESA para a inibição da metanogênese.

Durante a operação do reator, o pH foi ajustado a uma faixa de 6,5 a 7 com uma solução de hidróxido de sódio. Os autores obtiveram uma taxa máxima (e estável) de produção de 15,7 $g.L^{-1}.d^{-1}$ de ácido capróico. Além disso, o ácido caprílico também foi produzido, a uma taxa máxima de 0,9 $g.L^{-1}.d^{-1}$. Nos experimentos realizados por Vasudevan *et al.* (2014), com uma mistura de ácido acético e etanol (relação 1:1), em um sistema de biorreator integrado com *syngas*, a produção de ácido butírico foi

predominante em relação aos outros ácidos (88% da DQO aplicada), com apenas 9,6% da DQO aplicada sendo convertida a ácido capróico. Neste caso, o biorreator foi operado com carga orgânica volumétrica de 45 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ e pH de 5,4.

Kenealy, Cao e Weimer (1995) utilizaram uma mistura de bactérias ruminais celulósica com a bactéria *Clostridium kluyveri*, afim de verificar a formação do ácido capróico. Os autores obtiveram rendimento máximo de 2,6 $g.L^{-1}$ de ácido butírico e 4,6 $g.L^{-1}$ de ácido capróico, utilizando uma mistura com 6 $gDQO.L^{-1}$ de celulose e 4,4 $gDQO.L^{-1}$ de etanol, e mantendo o pH em 6,8. Weimer *et al*. (2015), utilizando a mesma mistura de microrganismos, realizaram experimentos em bateladas, afim de aumentar a produção dos ácidos capróico e valérico em períodos curtos. Como substrato, os autores utilizaram biomassa celulósica e etanol, e obtiveram rendimento de 4,9 6,1 $g.L^{-1}$ de ácido capróico com um período de 2 a 3 dias de incubação. O pH variou de 6,8 (inicial) para 5,9 após 24 horas.

CONCLUSÕES

Utilizando diferentes concentrações de $NaHCO_3$, o maior grau de acidificação obtido foi na condição utilizando somente vinhaça (V-0B), com 0,38 após 8 dias, seguido da condição V-0,1B (vinhaça com 0,1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$) com 0,33 após 13 dias. Em geral, o grau de acidificação para este efluente aumentou com uma redução do pH. Em ambas as condições houve predominância na produção de ácidos de cadeia curta, principalmente o acético e o propiônico e o pH manteve-se abaixo de 5,0. Para as condições V-0,3B e V-0,5B (0,3 e 0,5 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$), a concentração adicionada de $NaHCO_3$ foi suficiente para manter o pH, favorecendo a produção de metano e a remoção de DQO. O grau de acidificação obtido para estas condições foi de 0,11 para V-0,3B e 0,15 para V-0,5B obtidos no 4º dia de experimento. A composição dos ácidos produzidos apresentou maior variabilidade em relação às condições V-0B e V-0,1B.

Nos experimentos utilizando etanol como co-substrato ocorreu o acúmulo de ácidos em todas as condições. O grau de acidificação obtidos no início do experimento (dias 5,6 e 3,6), foi proporcional à porcentagem de etanol adicionada (0,72, 0,54 e 0,48 para as condições V/E 1:1, V/E 3:1 e V/E 9:1, respectivamente), com predominância de ácidos de cadeia curta. Recalculando o grau de acidificação utilizando o ultimo dia do experimento como produção máxima de ácidos (20º dia), verificou-se a formação de

ácidos de cadeia média (especialmente os ácidos capróico e valérico). As porcentagens dos ácidos acético, propiônico, butírico e capróico, dentro do grau de acidificação, foram diretamente proporcionais à relação vinhaça/etanol.

6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Justificativas

O Brasil ocupa posição de destaque com a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, visto que se trata de uma matéria-prima renovável, com produtividade relativamente alta em relação às outras matérias-primas para biocombustíveis. Contudo,a cadeia produtiva da indústria sucroalcoleira gera grandes quantidades de resíduos, dentre eles a vinhaça, que constitui um grave problema ambiental, quando disposta de maneira incorreta. A vinhaça é obtida após destilação do etanol, onde são gerados cerca de 10 a 15 litros para cada litro de etanol produzido. O destino mais comum desse resíduo líquido é a sua aplicação no solo como adubo para o cultivo da cana (processo conhecido por fertirrigação), devido ao alto teor de nutrientes (principalmente potássio). Do ponto de vista econômico, esta aplicação representa a solução mais barata e mais simples para a descarga de efluente, entretanto com base no grande volume gerado, e em outras características deste efluente, como o pH ácido e a alta concentração de matéria orgânica, esse procedimento pode apresentar riscos ambientais.

Devido ás características da vinhaça, uma alternativa que pode ser utilizada é a digestão anaeróbia. Esse processo além de reduzir o teor de matéria orgânica, mantém os nutrientes e neutraliza o pH, reduzindo assim os riscos ambientais, além de produzir energia em forma de biogás. Entretanto, devido ao fato de ser um efluente ácido, e a metanogênese (ultima etapa da digestão anaeróbia responsável pela formação do metano) ser restrita ao pH neutro, é necessária a utilização de produtos que neutralizem e estabilizem o pH da vinhaça (agentes tamponantes) e viabilize a produção de biogás. Por outro lado, devido a estas mesmas características, torna-se interessante verificar o potencial de geração de ácidos orgânicos, formados nas fases intermediarias da digestão anaeróbia, visto que as etapas intermedias não são tão restritas ao pH neutro.

Considerando estes aspectos, os experimentos foramrealizados no intuito de: i)Verificar a utilização de alguns produtos como agentes tamponantes, visando à produção de biogás pela digestão anaeróbia da vinhaça. ii) Avaliar o potencial geração de ácidos orgânicos, produzidos na fase intermediária da digestão anaeróbia (acidogênese) da vinhaça.

Produção de biogás

Para viabilizar a produção de biogás a partir da vinhaça, foram verificadas algumas alternativas para tentar elevar o pH deste efluente e fornecer alcalinidade ao meio. No capitulo 2, é apresentada a hipótese de desenvolver um clico integrado de digestão anaeróbia da vinhaça com o cultivo de microalgas, e utilizar o sobrenadante resultante após a separação das microalgas como meio de neutralizar o pH da vinhaça. Esta ideia se deve ao fato que durante o crescimento, as microalgas tem por característica elevar o pH do meio. Outra hipótese seria a utilização da suspenção de microalgas, o que além de elevar o pH, aumentaria o potencial de geração de metano pela co-digestão com a vinhaça. Em outros dois capítulos (3 e 4) foi utilizado bicarbonato de sódio para estabilizar e tamponar o pH. Este composto é amplamente utilizado em experimentos de bancada, devido ao fato de adicionar alcalinidade direta ao meio. Também nos capítulos 3 e 4, foi estudada a utilização da ureia como fonte indireta de alcalinidade, visto que este composto ao ser hidrolisado libera amônia e CO_2, então bicarbonato de amônia. Assim como a ureia, outra opção alternativa é utilização de pedras de calcário, as quais são hidrolisadas lentamente liberando bicarbonato ao meio (alternativa estudada por outros pesquisados no laboratório de efluentes – UFMS).

A alternativa da utilização do sobrenadante resultante do cultivo de microalgas, apresentada no capítulo 2, mostrou-se ineficiente com os experimentos realizados. Mesmo com pH elevado, o sobrenadante apresentou alcalinidade muito baixa (apenas 350 $mgCaCO_3.L^{-1}$), o que o torna inadequado para ajudar a estabilizar o pH durante a digestão anaeróbia da vinhaça. Da mesma forma, os resultados dos experimentos com a suspensão de microalgas mostrou que, mesmo contendo alcalinidade total alta, a suspensão não foi suficiente para estabilizar o pH durante a co-digestão com a vinhaça, sendo necessária a adição de outros produtos (como $NaHCO_3$) que auxiliem na estabilização do pH.

O $NaHCO_3$ foi empregado de duas formas: i) juntamente com a ureia em experimento contínuo apresentado no capítulo 3 (reator operado em duas fases, na fase I com ureia e $NaHCO_3$ e na fase II somente com ureia) e; ii) sozinho em testes em bateladas utilizando vinhaça e glicose apresentados no capítulo 4. Os resultados obtidos para todos os experimentos apresentaram estabilidade no pH, eficiência na remoção de DQO, com consequente formação de metano e concentrações elevadas de alcalinidade (especialmente bicarbonato). As relações entre alcalinidade intermediaria e bicarbonato (AI/AB) apresentaram valores inferiores a 0,3 o que indica estabilidade no sistema. Estes resultados são relacionados ao fato do $NaHCO_3$ adicionar alcalinidade diretamente no sistema, deste modo, mesmo que ocorra acúmulo de AGVs, a alcalinidade presente é capaz de neutralizar os efeitos destes na estabilização do pH e produção de biogás. Mesmo apresentando eficiência no tamponamento durante a digestão anaeróbia da vinhaça, quando considerado a aplicação em escala real para geração de biogás, a utilização do bicarbonato torna-se inviável devido ao seu custo ser elevado.

A ureia como agente tamponante alternativo, apresentou resultados distintos em todos os experimentos realizados. Os resultados obtidos no primeiro experimento em batelada apresentado no capítulo 3, mostraram que este composto ao ser adicionado à digestão anaeróbia, é hidrolisado formando amônia e CO_2. Esta reação ocorre independente da carga orgânica aplicada no sistema. Entretanto, a elevação e estabilidade do pH, é diretamente relacionada à carga orgânica, deste modo, a aplicação da ureia deve ser feita em relação a concentração de DQO aplicada. Com isto, obteve-se a relação de 0,22 $gUREIA.gDQO^{-1}$ a ser utilizada para a digestão anaeróbia da vinhaça. Avaliando a aplicação desta relação em um experimento contínuo, verificou-se que, mesmo com o pH neutro, a eficiência do reator na remoção de DQO e consequente formação de biogás foi reduzida, resultando em um acúmulo de ácidos intermediários (AGV). Para os experimentos em bateladas mostrados no capítulo 4, os resultados da aplicação de ureia para a digestão anaeróbia da vinhaça variaram de acordo com a biomassa utilizada. Para a biomassa “B”, oriunda da estação de tratamento de efluentes de uma fabrica de levedura, os resultados mostraram que houve formação de alcalinidade, especialmente a bicarbonato, mantendo o pH estável, com produção de metano e remoção de DQO. Para a biomassa “A”, oriunda da estação de tratamento de efluentes de fabrica de levedura, ocorreu a redução na produção de metano e remoção

de DQO, culminando no acúmulo de ácidos no sistema, especialmente acetato, resultado similar aos obtidos no experimento contínuo apresentado no capítulo 3.

Avaliando os microrganismos presentes nos experimentos utilizando ureia e vinhaça, especialmente as arqueas metanogênicas, verifica-se que nas condições em que houve redução na produção de metano, havia predomínio de bandas pertencestes as arqueas acetotróficas, enquanto que para a condição que manteve eficiente a produção de metano (biomassa "B", capitulo 4) havia grande diversidade de gêneros, com arqueias pertencentes aos três níveis fisiológicos (metilotróficas, hidrogenotróficas e acetotróficas). Estes resultados influenciam diretamente na eficiência dos sistemas, pois arqueas acetotróficas, são mais sensíveis a alterações no sistema, bem como à concentrações elevadas de ácido acético(van Haandel *et al.,* 2013; Fredriksson *et al.,* 2012). Além disso, o gênero *Methanotrix* (presente no reator apresentado no capitulo 3) possui com característica a utilização do bicarbonato e acetato como substrato na formação de metano e maior sensibilidade a presença de amônia no meio, o que contribuiu para a redução na produção de metano, com consequente aumento da concentração de ácidos intermediários.

Considerando estas informações, posse afirmar que a utilização da ureia é mais eficiente em sistemas onde a principal via de formação de metano é realizada por arqueas hidrogenotróficas. Em sistemas em que a via de formação de metano referencial é por arqueas acetotróficas, há a necessidade de um tempo longo para a adaptação do sistema.

Potencial de geração de ácidos orgânicos.

Além das características de baixo pH e elevada concentração de matéria orgânica, a dificuldade em estabilizar o sistema viabilizando a produção de biogás com baixo custo, tornam a produção de ácidos orgânicos intermediários da digestão anaeróbia ainda mais interessantes. Considerando que os microrganismos metanogênicos são restritos ao pH neutro, enquanto as bactérias responsáveis pelas etapas anteriores da digestão anaeróbia (especialmente pela produção de ácidos) são menos susceptíveis a mudanças no pH, a vinhaça pode apresentam vantagens em relação à produção e acúmulo de ácidos. Devido ao baixo pH ocorre a inibição natural da atividade metanogênica, sem que haja a necessidade de adicionar algum produto,

reduzindo assim os custos de operação do sistema. Diante disso, foram realizados experimentos para verificar o potencial de produção e a composição dos ácidos formado na digestão anaeróbia da vinhaça.

Avaliando somente a vinhaça (sem adição de agente tamponante) e com a adição de diferentes dosagens de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o maior grau de acidificação foi observado para a condição utilizado somente vinhaça (38% de acidificação após 8 dias), seguido da com vinhaça e 0,1 $gNaHCO_3.gDQO$ (33% de acidificação após 13 dias). Em ambas as condições, o pH manteve-se abaixo de 5,0, e houve predominância na produção de ácidos de cadeia curta, principalmente o acético e o propiônico. Nas condições em que foram utilizados vinhaça com 0,3 e 0,5 $gNaHCO_3.gDQO$, o pH se manteve neutro, o que possibilitou a remoção de DQO e formação de metano. Em decorrência disso, o grau de acidificação obtido para estas condições foi baixo, com 11 e 15% (com 0,3 e 0,5 $gNaHCO_3.gDQO$, respetivamente). Nestas condições observou-se uma maior diversidade na composição dos ácidos.

Devido às propriedades físicas, os ácidos graxos de cadeia média possuem vantagem em relação aos ácidos de cadeia curta, na utilização em processos industriais. Isso se deve ao fato de que ácidos com 6 ou 8 átomos de carbono (capróico e caprílico) tem uma maior cadeia carbônica hidrofóbica e uma menor relação oxigênio/carbono, o que aumenta a densidade energética das moléculas e faz com que a separação do meio de fermentação seja mais fácil, reduzindo o custo de produção (Steinbusch *et al.*, 2011). Uma forma de se direcionar a produção de ácidos para os de cadeia média é a adição de etanol no meio. Este composto pode atuar como doador de átomos de carbono, os quais são ligados aos ácidos de cadeia curta pelo processo de alongamento de cadeia. Para verificar o potencial de formação de ácidos de cadeia média a partir da vinhaça, foi realizado um experimento com diferentes proporções de vinhaça e etanol (1/1, 3/1 e 9/1), sem a adição de agentes tamponantes. Com os resultados obtidos, foi possível verificar que a formação de ácido capróico é diretamente proporcional a relação de etanol utilizada. Mesmo com esta relação, a concentração deste ácido foi baixa, com 9,3% do total de ácidos produzidos, obtendo destaque após 20 dias do início do experimento.

Conclusões gerais

Dos produtos estudados para neutralizar o pH do sistema, visando a produção de biogás, o mais eficiente foi o $NaHCO_3$. Entretanto, a utilização deste em escala real torna-se inviável devido ao alto custo deste produto.

A ureia mostrou-se eficiente para manter o pH neutro e formar alcalinidade total durante a digestão anaeróbia da vinhaça, quando utilizado uma relação entre 0,22 a 0,30 $gUREIA.gDQO^{-1}$. Entretanto, há a necessidade de um tempo longo de adaptação a este composto quanto a via preferencial de formação de metano na biomassa utilizada é pelas arqueas acetotróficas, visto que as mesmas são mais susceptíveis a alterações no meio. Utilizando como inóculo uma biomassa com grande diversidade de gêneros (arqueas metilotróficas, hidrogenotróficas e acetotróficas), a ureia mostrou-se mais eficiente na estabilização do processo e consequente produção de biogás.

A utilização do meio de cultivo ou a suspensão de microalgas em ciclo integrado com a vinhaça, mostrou-se ineficiente para neutralizar o pH do meio, visto que, mesmo com o pH básico, não possuem alcalinidade suficiente para neutralizar o pH da vinhaça.

Aproveitando as características naturais da vinhaça para a produção de ácidos intermediários, verificou-se que o predomínio de ácidos de cadeia curta, especialmente o acético e propiônico. Contudo, o grau máximo de acidificação obtido utilizando somente vinhaça foi de 38%.

A adição de etanol à vinhaça para viabilizar a produção de ácido capróico, pelo processo de alongamento de cadeia, mostrou-se eficiente no aumento grau de acidificação do meio, porém a formação de ácido capróico foi baixa, com apenas 9,2% do potencial. Este fato pode ter sido influenciado pela falta de etanol no meio, visto que ocorreu aumento na produção dos ácidos acético e butírico.

Recomendações

A ureia pode ser considerada uma opção com menor custo para neutralização do pH viabilizando a produção de biogás pela digestão anaeróbia da vinhaça, quando comparada a produtos tradicionais como o bicarbonato. Contudo, ainda são necessários alguns estudos que comprovem a interação e mudanças ocasionadas por este composto

nos organismos anaeróbios, especialmente as arqueas metanogênicas. Recomenda-se a realização de experimentos em batelada, como testes de crescimento, que permitam avaliar o comportamento dos microrganismos, utilizando como inóculo diferentes biomassas (com organismos acetotróficos e hidrogenotróficos) e monitorando a composição e atuação dos microrganismos até o final do processo.

Outra recomendação para confirmar a viabilidade da utilização da ureia como tamponante é a operação de reator contínuo por um período maior, ou até a estabilização do mesmo, visto que nos resultados obtidos neste trabalho não foram completos para afirmar o tempo necessário para a adaptação do sistema à ureia.

Visando a produção de ácidos, há necessidade de investigação mais aprofundada para verificar o real potencial e a viabilidade econômica da utilização da vinhaça. Sugere-se a realização de experimentos complementares com o etanol afim de produzir ácidos de cadeia média, com proporções maiores que as testadas neste trabalho, como por exemplo 2:1 de etanol e vinhaça. Além disso, a adição de outros efluentes de acidificação rápida (como a manipueira) à vinhaça como co-substrato, podem ser interessantes economicamente, visto que o custo da adição de efluente é inferior ao etanol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agler, M.T., Spirito, C.M., Usack, J.G., Werner, J.J., Angenent, L.T., 2012. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. Energy Environ. Sci. 5, 8189. doi:10.1039/c2ee22101b

Agler, M.T., Werner, J.J., Iten, L.B., Dekker, A., Cotta, M. a, Dien, B.S., Angenent, L.T., 2012. Shaping reactor microbiomes to produce the fuel precursor n-butyrate from pretreated cellulosic hydrolysates. Environmental science & technology 46, 10229–38. doi:10.1021/es302352c

Ahmed, O., Sulieman, A.M.E., Elhardallou, S.B., 2013. Physicochemical , Chemical and Microbiological Characteristics of Vinasse , A By-product from Ethanol Industry 3, 80–83. doi:10.5923/j.ajb.20130303.03

Alkaya, E., Demirer, G.N., 2011. Anaerobic acidification of sugar-beet processing wastes: Effect of operational parameters. Biomass and Bioenergy 35, 32–39. doi:10.1016/j.biombioe.2010.08.002

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, a J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research 59, 927–34. doi:10.2166/wst.2009.040

APHA. (2005). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 21ª ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1368 p

Aquino S F., Chernicharo C. A. L., Foresti E., Florencio L. & Monteggia L. O. Metodologias para determinação da atividade Metanogênica específica(AME) em lodos anaeróbios. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, 12,2 - abr/jun 2007, 197 - 201.

Barker, H., Kamen, M., Bornstein, B., 1945. The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by Clostridium kluyveri. Proceedings of the National … 31.

Ben-Amor K, Heilig H, Smidt H, Vaughan EE, Abee T, de Vos WM (2005) Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. Appl Environ Microbiol 71:4679-4689.

Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. Biochemical Engineering Journal 40, 492–499. doi:10.1016/j.bej.2008.02.004

Björnsson, L., Murto, M., Jantsch, T.G., Mattiasson, B., 2001. Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. Water Research 35, 2833–2840. doi:10.1016/S0043-1354(00)00585-6

Boncz, M. a, Formagini, E.L., Santos, L.D.S., Marques, R.D., Paulo, P.L., 2012. Application of urea dosing for alkalinity supply during anaerobic digestion of vinasse. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research 66, 2453–60. doi:10.2166/wst.2012.476

Bonmati A, Flotats X,Mateu L, Campos E. Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry.Water Sci Technol 2001;44(4):109–16

Bouwer, E.J., McCarty, P.L., 1983. Effects of 2-bromoethanesulfonic acid and 2-chloroethanesulfonic acid on acetate utilization in a continuous-flow methanogenic fixed-film column. Applied and Environmental Microbiology 45, 1408–1410.

Buchanan, M.D., 2008. GC Analyses of Free Fatty Acids.

Budiyono, B., Syaichurrozi, I., Sumardiono, S., 2013. Biogas production from bioethanol waste: the effect of pH and urea addition to biogas production rate. Waste Technology 1, 1–5. doi:http://dx.doi.org/10.12777/wastech.1.1.2013.1-5

Cabello, P.E., Scognamiglio, F.P., Terán, F.J.C., 2009. TRATAMENTO DE VINHAÇA EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO. Engenharia Ambiental 6, 321–338.

Cai, M., Chua, H., Zhao, Q., Sin, N. S., Ren, J. Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation, Bioresour. Technol. 100 (2009) 1399–1405.

Calli, B.; MERTOGLU, B.; INANC, B.; YENIGUN, O. Methanogenic diversity in anaerobic bioreactors under extremely high ammonia levels. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 448-455, 2005.

Cenciani, K., Bittencourt-Oliveira,M. C., Feigl, B. J. &Cerri, C. C. 2011 Sustainable production of biodiesel by microalgae and its application in agriculture. African Journal of Microbiology Research 5 (26), 4638–4645.

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. Bioresource technology 99, 4044–64. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057

Chernicharo, C.A.L., 2007. Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 2nd ed. Belo Horizonnte.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology advances 25, 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Choi, J., Chang, H. N., Han, J., Performance of microbial fuel cell with volatile fatty acids from food wastes, Biotechnol. Lett. 33 (2011) 705–714.

Christofoletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. Waste Management 33, 2752–2761. doi:10.1016/j.wasman.2013.09.005

Conab, 2014. Cana de Açucar - Safra 2013 / 2014 Segundo Levantamento.

Converti, a, Oliveira, R.P.S., Torres, B.R., Lodi, a, Zilli, M., 2009. Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. Bioresource technology 100, 5771–6. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.072

Eggeman, T., Verser, D., 2005. Recovery of organic acids from fermentation broths. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for … 121, 605–618.

España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and

treatments. Waste management & research : the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA 29, 1235–50. doi:10.1177/0734242X10387313

España-Gamboa, E.I., Mijangos-Cortés, J.O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J. a D., Alzate-Gaviria, L.M., 2012. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. Biotechnology for biofuels 5, 82. doi:10.1186/1754-6834-5-82

Foresti E. Fundamentals of anaerobic digestion process. In: Proceedings of III Taller y Seminario Latinoamericano of Tratamiento Anaeróbio de Aguas Residuales. Motevideo, Uruguay; 1994

Fredriksson, N.J., Hermansson, M., Wilén, B.-M., 2012. Diversity and dynamics of Archaea in an activated sludge wastewater treatment plant. BMC microbiology 12, 140. doi:10.1186/1471-2180-12-140

Garcia S. N. P., 2005. A rentabilidade na cadeia de suprimentos vista estrategicamente a partir da margem de contribuição: o caso da indústria do álcool combustível no estado de São Paulo. (Dissertação de mestrado). USP - Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos - SP, Brasil.

Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic digestion of algae. Appl. Microbiol. 5, 47–55.

Grootscholten, T.I.. M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. Bioresource technology 135, 440–5. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.165

Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. Bioresource technology 136, 715–8. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.085

Grosskopf R, Janssen PH, Liesack W (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. Appl Environ Microbiol 64: 960-969.

Gunaseelan, V. N.: "Anaerobic digestion of biomass for methane production: A Review" Biomass and bioenergy, v. 13, p 88-114. 1997.

Häne BG, Jäger K, Drexler HG (1993) The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. Electrophoresis 14(1):967-972.

Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., Chen, G., 2007. Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. Journal of Membrane Science 288, 1–12. doi:10.1016/j.memsci.2006.11.026

Kenealy, W.R., Cao, Y., Weimer, P.J., 1995. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and Clostridium kluyveri grown on cellulose and ethanol. Applied Microbiology and Biotechnology 44, 507–513. doi:10.1007/BF00169952

Kim, D.-H., Lee, D.-Y., Kim, M.-S., 2011. Enhanced biohydrogen production from tofu residue by acid/base pretreatment and sewage sludge addition. International Journal of Hydrogen Energy 36, 13922–13927. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.085

Koller, M., Salerno, A., Tuffner, P., Koinigg, M., Bochzelt, H., Schoberd, S., Pieberd, S., Schnitzer, H., Mittelbach, M. & Braunegg, G. 2012 Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. Journal of Cleaner Production 37, 377–388.

Lane D (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, pp 115-175.

Larsdotter, K. 2006 Wastewater treatment with microalgae – a literature review. Vatten 62,31–38.

Lebrero, R., Volckaert, D., Pérez, R., Muñoz, R., Van Langenhove, H., 2013. A membrane bioreactor for the simultaneous treatment of acetone, toluene, limonene and hexane at trace level concentrations. Water Res. 47, 2199–2212.

Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014a. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. Chemical Engineering Journal 235, 83–99. doi:10.1016/j.cej.2013.09.002

Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014b. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. Chemical Engineering Journal 235, 83–99. doi:10.1016/j.cej.2013.09.002

Lefebvre, O., Quentin, S., Torrijos, M., Godon, J.J., Delgenès, J.P., Moletta, R., 2007. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. Applied microbiology and biotechnology 75, 61–9. doi:10.1007/s00253-006-0799-2

Lettinga, G., Hulshoff-Pol, L., Zeeman, G., 1998. Anaerobic wastewater treatment, in: Lecture Notes Biological Wastewater Treatment. Wageningen, The Netherlands.

Lettinga, G., Pol, L., 1991. UASB-process design for various types of wastewaters. Water Science & Technology 24, 87–107.

Lin, Y., Lü, F., Shao, L., He, P., 2013. Influence of bicarbonate buffer on the methanogenetic pathway during thermophilic anaerobic digestion. Bioresource Technology 137, 245–253. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.093

Loureiro Paulo, P., Villa, G., Bernardus van Lier, J., Lettinga, G., 2003. The anaerobic conversion of methanol under thermophilic conditions: pH and bicarbonate dependence. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, 213–218. doi:10.1016/S1389-1723(03)80184-6

Lü, F., Hao, L., Guan, D., Qi, Y., Shao, L., He, P., 2013. Synergetic stress of acids and ammonium on the shift in the methanogenic pathways during thermophilic anaerobic digestion of organics. Water Research 47, 2297–2306. doi:10.1016/j.watres.2013.01.049

Ludovice M. T., 1997. Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP, Brasil.

Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I., 2011. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. Bioresource technology 102, 8700–6. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.012

M. C. Sterling Jr., R. E. Lacey, C.R.E., S. C. Ricke, 2001. Effects of ammonia nitrogen on H2 and CH4 production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. Bioresource technology 77, 1–10.

Mandigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2004. Microbiologia de Brock, 10th ed. São Paulo.

McCarty, P. L. One hundred years of anaerobic treatment. In: SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION (6-11 september 1981, Travemünde,

Germany), Edited by Hughes *et al*. Elsevier Biomedical Press B. V., Amsterdam, The Netherlands, 1982.

McDonald, G., 2003. Biogeography: introduction to space. Time and Life, Wiley, New York.

McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res 32: W20-W25.

McHugh, S., Carton, M., Mahony, T., O'Flaherty, V., 2003. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. FEMS Microbiology Letters 219, 297–304. doi:10.1016/S0378-1097(03)00055-7

Moraes, B.S., Junqueira, T.L., Pavanello, L.G., Cavalett, O., Mantelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M., 2014. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? Applied Energy 113, 825–835. doi:10.1016/j.apenergy.2013.07.018

Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews 44, 888–903. doi:10.1016/j.rser.2015.01.023

Mota, V.T., Santos, F.S., Amaral, M.C.S., 2013. Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: assessment on biological activity and filtration performance. Bioresource technology 146, 494–503. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.110

Muyzer G, Stams AJM (2008) The ecology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. Nat Rev Microbiol 6:441-454.

Nallathambi Gunaseelan, V., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. Biomass and Bioenergy 13, 83–114. doi:10.1016/S0961-9534(97)00020-2

Narihiro, T., Sekiguchi, Y., 2011. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. Microbial biotechnology. 4, 585–602. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00239.x

Niu, Q., Qiao, W., Qiang, H., Hojo, T., Li, Y.-Y., 2013. Mesophilic methane fermentation of chicken manure at a wide range of ammonia concentration: stability, inhibition and recovery. Bioresource technology 137, 358–67. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.080

Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa detected by temperatue gradient gel electrophoresis. J Bacteriol* 178:5636-5643.

O-Thong, S., Prasertsan, P., Birkeland, N.-K., 2009. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. Bioresource technology 100, 909–18. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.036

Pacheco, T.F., 2011. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? Circlular Técnica - Embrapa Agroenergia.

Paulo, P.L., Jiang, B., Cysneiros, D., Stams, A.J.M., Lettinga, G., 2004. Effect of cobalt on the anaerobic thermophilic conversion of methanol. Biotechnology and bioengineering 85, 434–41. doi:10.1002/bit.10876

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. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.01.067

Piacente F. J., 2005. Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. SP, Brasil

Playne, M.J., Smith, B.R., 1983. Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. Biotechnol. Bioeng. 25, 1251–1265 Rocha, 2012

Pohland, F.G., 1992. Anaerobic treatment: fundamental concepts, applications, and new horizons, in: MALINA, J. F.; POHLAND, F. G. (Ed.). Design of Anaerobic Process for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes. USA: Technomic, pp. 1–40.

Pohland, F.G., 1992. Anaerobic treatment: fundamental concepts, applications, and new horizons, in: MALINA, J. F.; POHLAND, F. G. (Ed.). Design of Anaerobic Process for the Treatment of Industrial and Municipal Wastes. USA: Technomic, pp. 1–40.

Pronk, M., Abbas, B., Al-Zuhairy, S.H.K., Kraan, R., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2015. Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. Applied microbiology and biotechnology 99, 5257–68. doi:10.1007/s00253-014-6358-3

Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. Bioresource technology 143, 632–41. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.030

Reyes, M., Borrás, L., Seco, A., Ferrer, J., 2015. Identification and quantification of microbial populations in activated sludge and anaerobic digestion processes. Environmental technology 36, 45–53. doi:10.1080/09593330.2014.934745

Ribas, M.M.F., Viana, A.B., Foresti, E., 2001. Thermophilic anaerobic digestion of cane alcohol distillery wastewater by an anaerobic sequencing batch biofilm reactor.

Rodríguez, E., Lopes, A., Fdz-Polanco, M., Stams, A.J.M., García-Encina, P. a, 2012a. Molecular analysis of the biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. Applied microbiology and biotechnology 93, 2181–91. doi:10.1007/s00253-011-3529-3

Rodríguez, E., Lopes, A., Fdz-Polanco, M., Stams, A.J.M., García-Encina, P.A., 2012b. Molecular analysis of the biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. Applied microbiology and biotechnology 93, 2181–91. doi:10.1007/s00253-011-3529-3

Roest K, Heilig HG, Smidt H, de Vos WM, Stams AJM, Akkermans ADL (2005) Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. Syst Appl Micriobiol 28:175-185.

Salomon, K.R., Silva Lora, E.E., 2009. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. Biomass and Bioenergy 33, 1101–1107. doi:10.1016/j.biombioe.2009.03.001

Schrank, S. G., José H. J., Moreira, R.F., Schröder, H. F. "Comparison of different Advanced Oxidation Process to reduce toxicity and mineralization of tannery wastewater". Water Science and Technology, v. 50, n. 5, p. 329-334. 2004.

Serejo M.L., 2012. Cultivo de microalgas com vinhaça digerida anaerobiamente. Dissertação de mestrato. Programa de pós graduação em tecnologias ambientas. UFMS

Sialve, B., Bernet, N. & Bernard, O. 2009 Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. Biotechnology Advances 27 (4), 409–416.

Silva, M. a. S. Da, Griebeler, N.P., Borges, L.C., 2007. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 11, 108–114. doi:10.1590/S1415-43662007000100014

Silva, M.A.S., Griebeler, N.P., Borges, L.C., 2007. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater 108–114.

Siqueira, L.M., Barros, A.R., Amorim, E.L.C., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., Silva, E.L., 2008. Influence of increasing organic load on the treatment of sugar cane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor (afbr), in: Taller Y Symposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia. pp. 345–351.

Skoronski, E. Otimização Da Esterificação De Ácidohexanóico com n-Butanol Empregando Lipase (Termomyces Lanuginosus) Imobilizada Em Gelatina. Quim. Nova,Vol. 36, No. 3, 364-367, 2013.

Souza, M.E., Fuzaro, G., Polegato, A.R., 1992. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. Water Science and Technology 25, 213–222.

Spanjers, H., Bouvier, J.C., Steenweg, P., Bisschops, I., Gils, W. va., Versprille, B., 2006. Implementation of in-line infrared monitor in full-scale anaerobic digestion process. Water Science & Technology 53, 55. doi:10.2166/wst.2006.110

Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. Current opinion in biotechnology 27, 115–22. doi:10.1016/j.copbio.2014.01.003

Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Plugge, C.M., Buisman, C.J.N., 2011. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. Energy & Environmental Science 4, 216. doi:10.1039/c0ee00282h

Syaichurrozi, I., Budiyono, Sumardiono, S., 2013. Predicting kinetic model of biogas production and biodegradability organic materials: biogas production from vinasse at variation of COD/N ratio. Bioresource technology 149, 390–7. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.088

Tang, Y.-Q., Fujimura, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K., 2007. Anaerobic treatment performance and microbial population of thermophilic upflow anaerobic filter reactor treating awamori distillery wastewater. Journal of bioscience and bioengineering 104, 281–7. doi:10.1263/jbb.104.281

Torres, P., Pérez, A., Cajigas, A.A., González, A.M.O.M., 1998. Evaluación de diferentes alcalinizantes en el tratamiento anaerobio de aguas fácilmente acidificables . Caso : Agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca 1–4.

Uyar, B., Eroglu, I., Yücel, M., Gündüz, U., 2009. Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. International Journal of Hydrogen Energy 34, 4517–4523. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.057

Uziel, M. Solar energy fixation and conversion with algal bacterial systems. PhD thesis. University of California, Berkeley, CA, USA, 1978

Van Haandel A.C., 2005. Integrated energy production and reduction of environmental impact at alcohol distillery plants. Water science and technology 52, 49–57.

Van Haandel, A., De Vrieze, J., Verstraete, W., dos Santos, V.S., 2013. Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. doi:10.1002/jctb.4255

Van Haandel, A., De Vrieze, J., Verstraete, W., dos Santos, V.S., 2014. Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 89, 1751–1759. doi:10.1002/jctb.4255

Van Haandel, A.C., Lettinga, G., 1994. Anaerobic Sewage Treatment: A practical guide for regions with a hot climate. John Wiley & Sons.

Vasudevan, D., Richter, H., Angenent, L.T., 2014. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. Bioresource technology 151, 378–82. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.105

Vestraete, W., Zamalloa, C., Albrecht, J., Vulsteke, E.: "The techno-economical potential of enewable energy through the anaerobic digestion of microalgae".12th World congress on anaerobic digestion. Guadalajara, Mexico. Anais. 2010.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol 73:5261-5267.

Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. Bioresour. Technol. 99, 7928–40. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.044

Weimer, P.J., Nerdahl, M., Brandl, D.J., 2015. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with Clostridium kluyveri. Bioresource Technology 175, 97–101. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.054

Whitman. B.; BOWEN, T, L.; BOONE, D. R. The methanogenic bacteria. In: The Prokariotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application. H. G. T. A. Balows, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer. NY, Springer-Verlag, p. 719-767, 1992.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass and Bioenergy 19, 63–102. doi:10.1016/S0961-9534(00)00017-9

Wilkinson, P., Smith, K.-R., Joffe, M. e Haines, A.: "Energy and Health 1 - A global perspective on energy: health effects and injustices". Lancet, v.370, n.9591, p.965-978. 2007.

Wilson, C.A., Novak, J., Takacs, I., Wett, B., Murthy, S., 2012. The kinetics of process dependent ammonia inhibition of methanogenesis from acetic acid. Water research 46, 6247–56. doi:10.1016/j.watres.2012.08.028

Wu, H., Gao, J., Yang, D., Zhou, Q., Liu, W., 2010. Alkaline fermentation of primary sludge for short-chain fatty acids accumulation and mechanism. Chemical Engineering Journal 160, 1–7. doi:10.1016/j.cej.2010.02.012

Wu, J.-H., Chuang, H.-P., Hsu, M.-H., Chen, W.-Y., 2013. Use of a hierarchical oligonucleotide primer extension approach for multiplexed relative abundance analysis of methanogens in anaerobic digestion systems. Applied and environmental microbiology 79, 7598–609. doi:10.1128/AEM.02450-13

Yenigün, O., Demirel, B., 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. Process Biochemistry 48, 901–911. doi:10.1016/j.procbio.2013.04.012

Yuan, H., Chen, Y., Zhang, H., Jiang, S., Zhou, Q., Gu, G., 2006. Improved Bioproduction of Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) from Excess Sludge under Alkaline Conditions

Improved Bioproduction of Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) from Excess Sludge under Alkaline Conditions. Environmental Science & Technology 40, 2025–2029. doi:10.1021/es052252b

Zhang, P., Chen, Y., Zhou, Q., 2009. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. Water Research 43, 3735–3742. doi:10.1016/j.watres.2009.05.036

Zheng, X., Chen, Y., Liu, C., 2010. Waste Activated Sludge Alkaline Fermentation Liquid as Carbon Source for Biological Nutrients Removal in Anaerobic Followed by Alternating Aerobic-Anoxic Sequencing Batch Reactors. Chinese Journal of Chemical Engineering 18, 478–485. doi:10.1016/S1004-9541(10)60246-7

Zhu, H., Beland, M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. International Journal of Hydrogen Energy 31, 1980–1988. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.01.019

ANEXO 1

Coleta, armazenamento e caracterização dos lotes de vinhaça utilizados nos experimentos

Para a realização dos experimentos descritos nos próximos capítulos foram utilizados três lotes de vinhaça, oriundas de diferentes usinas situadas no estado de Mato Grosso do Sul. Os lotes de vinhaça foram identificados de acordo com a unidade produtora de etanol de origem, sendo eles: A – Proveniente de uma usina produtora de etanol, situada no município de Fátima do Sul; B – Usina produtora de açúcar e etanol situada no município de Sidrolândia e; C – Usina produtora de etanol situada no município de Nova alvorada do Sul.

Em todos os lotes, a vinhaça, cuja temperatura era torno de 100ºC, foi coletada diretamente na saída do tanque de destilação utilizando tambores com capacidade de 60 litros. Em seguida, a mesma era transportada até o laboratório de efluentes (LabE). Após resfriar naturalmente, a vinhaça era homogeneizada e distribuída em garrafas de polietileno terephthalato (PET) e armazenada a uma temperatura de -18 ºC até a sua utilização.

Durante a distribuição em garrafas, três amostras de cada lote eram separadas aleatoriamente para a obtenção dos seguintes paramentos físico-químicos: pH (4500-H+ - B); Demanda química de oxigênio (DQO) total e solúvel (5220 - C); Série de Sólidos (Sólidos Totais, Sólidos Voláteis Totais, Sólidos Fixos Totais, Sólidos Suspensos, Sólidos Suspensos Voláteis e Sólidos Suspensos Fixos) (2540-D); nitrogênio total (4500-C); nitrogênio amoniacal (4500-NH_3 B); fósforo (valor obtido pela análise defosfato total (4500-P - D)); sulfeto (4500- S^{2-}-F) e; sulfato total (4500-SO_4^{2-} - E). A preservação das amostras, assim como as análises, foi realizada conforme técnicas preconizadas pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

A tabela 7-1 apresenta os resultados obtidos para a caracterização realizada.

Tabela 7-1: Características físico-químicas dos três lotes de vinhaça utilizados nos experimentos.

Parâmetro	Unidade	Resultados		
		A[1]	B[2]	C[3]
pH	-	3,41 ± 0,10	3,20 ± 0,05	3,76 ± 0,07
DQO_{total}	$gO_2.L^{-1}$	18,8 ± 0,9	21,5 ± 0,5	18,1 ± 1,0
$DQO_{Solúvel}$	$gO_2.L^{-1}$	15,8 ± 0,4	17,7 ± 0,3	15,9 ± 0,6
Sólidos Totais	$g.L^{-1}$	18,2 ± 0,3	24,8 ± 1,2	21,6 ± 0,5
Sólidos Voláteis Totais	$g.L^{-1}$	13,6 ± 0,2	20,9 ± 0,4	17,2 ± 0,3
Sólidos Fixos Totais	$g.L^{-1}$	4,6 ± 0,1	3,9 ± 0,6	4,4 ± 0,2
Sólidos Suspensos	$g.L^{-1}$	16,0 ± 0,7	22,2± 0,8	18,2 ± 0,2
Sólidos Suspensos Voláteis	$g.L^{-1}$	11,5 ± 0,3	17,8 ± 0,5	13,6 ± 0,4
Sólidos Suspensos Fixos	$g.L^{-1}$	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,6
Nitrogênio total	$mgN.L^{-1}$	440 ± 5	335 ± 5	415 ± 7
Nitrogênio Amoniacal	$mgNH_3\text{-}N.L^{-1}$	72,5 ± 3,1	61,7 ± 2,8	75,0 ± 3,5
Fosforo	$mgP_2O_5.L^{-1}$	57,8 ± 0,9	45,4 ± 1,2	13,7 ± 0,7
Sulfeto	$mgS_2^{-}.L^{-1}$	143,0 ± 16	169,0 ± 34	148,0 ± 12
Sulfato	$mgSO_4^{2}.L^{-1-}$	1190 ± 35	1080 ± 25	1240 ± 35

[1] - Vinhaça de mosto de caldo proveniente de uma usina produtora de etanol, situada no município de Fátima do Sul; [2] – Vinhaça de mosto de caldo misto, proveniente de uma usina produtora de açúcar e etanol situada no município de Sidrolândia e; [3] – Vinhaça de mosto de caldo, proveniente de umausina no município de Nova alvorada do Sul.