



**JULIANO CURI DE SIQUEIRA**

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA E EFLUENTE  
SECUNDÁRIO DE LATICÍNIO EM REATOR UASB:  
POTENCIAL METANOGENICO E DINÂMICA MICROBIANA  
ENVOLVIDA**

**LAVRAS – MG  
2022**

**JULIANO CURI DE SIQUEIRA**

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA E EFLUENTE SECUNDÁRIO DE  
LATICÍNIO EM REATOR UASB: POTENCIAL METANOGÊNICO E DINÂMICA  
MICROBIANA ENVOLVIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, área de concentração em Saneamento e Geotecnia Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi  
Orientadora

Profa. Dra. Paula Peixoto Assemany  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Siqueira, Juliano Curi de.

Codigestão anaeróbia de vinhaça e efluente secundário de laticínio em reator UASB : Potencial metanogênico e dinâmica microbiana envolvida / Juliano Curi de Siqueira. - 2022.

170 p. : il.

Orientador(a): Luciene Alves Batista Siniscalchi.

Coorientador(a): Paula Peixoto Assemany.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Água residuária agroindustrial. 2. Tratamento biológico. 3. Biogás. I. Siniscalchi, Luciene Alves Batista. II. Assemany, Paula Peixoto. III. Título.

**JULIANO CURI DE SIQUEIRA**

**CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA E EFLUENTE SECUNDÁRIO DE  
LATICÍNIO EM REATOR UASB: POTENCIAL METANOGENICO E DINÂMICA  
MICROBIANA ENVOLVIDA**

**ANAEROBIC CO-DIGESTION OF VINASSE AND DAIRY SECONDARY  
EFFLUENT IN A UASB REACTOR: METHANOGENIC POTENTIAL AND  
INVOLVED MICROBIAL DYNAMICS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, área de concentração em Saneamento e Geotecnia Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 18 de julho de 2022.  
Dr. Marcelo Zaiat – EESC/USP  
Dr. Mateus Pimentel de Matos – UFLA



Profa. Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi  
Orientadora

Profa. Dra. Paula Peixoto Assemany  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2022**

## AGRADECIMENTOS

A construção da presente dissertação somente foi possível em função das mais variadas contribuições, as quais aqui descrevo e dedico meus mais sinceros agradecimentos.

À minha mãe Denise, que nunca mediu esforços para que eu chegasse onde cheguei, e que a todo momento me apoiou e me aconselhou a sempre batalhar para alcançar meus objetivos com honestidade e dignidade.

À minha irmã Marina que, apesar da distância física, sempre esteve presente me apoiando e aconselhando frente a qualquer situação.

Ao meu namorado Nérík, por todo o suporte, companheirismo e disposição para auxiliar na montagem e manutenção do aparato experimental, além da paciência para lidar com minhas dificuldades ao longo do mestrado.

Aos meus familiares, em especial aos tios Nilton, Toninho e Sérgio, pelo apoio e incentivo constantes.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica. Em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Luciene Siniscalchi e à minha coorientadora Profa. Dra. Paula Assemany, por acreditarem no meu trabalho e ajudarem a tornar a presente pesquisa possível. Agradeço pelo constante aprendizado e pelas diversas oportunidades acadêmicas oferecidas. Vocês são profissionais inspiradoras para os ingressantes na carreira científica.

Aos professores Dr. Marcelo Zaiat (EESC-USP) e Dr. Mateus Matos (UFLA), por aceitarem o convite para compor a banca de defesa e contribuírem de forma notável para a melhoria desta dissertação.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEAMB), pela amizade, companheirismo e, não menos importante, pelas festas desde o início da pós.

Aos alunos de iniciação científica Otávio, Marcos, Jainy, Renan e Luana, pela excepcional e dedicada assistência na condução das análises laboratoriais.

Aos técnicos de laboratório Juliana, Aline e Marcos, pelo suporte e auxílio nos experimentos em laboratório.

À Universidade Federal de Lavras, por ter proporcionado a base do meu conhecimento científico e, sobretudo, meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos financeiros providos através da bolsa de mestrado, fundamental para a realização deste trabalho.

*“A ciência pode ser difícil de entender. Pode desafiar opiniões que nutrimos. Quando seus produtos são colocados à disposição de políticos ou industrialistas, pode levar a armas de destruição em massa e a graves ameaças ao meio ambiente. Mas uma coisa é preciso reconhecer: ela cumpre a sua parte.” (Carl Sagan)*

## RESUMO GERAL

O Brasil é um dos países que mais investem na produção de biocombustíveis no mundo, destacando-se na produção de etanol a partir do processamento de cana-de-açúcar. Além de bioetanol, essa atividade também gera subprodutos indesejáveis como a vinhaça, que é comumente utilizada para a fertirrigação. Entretanto, sua aplicação inadequada no solo agrícola pode acarretar impactos ambientais negativos, sendo recomendado seu tratamento antes da disposição final. A digestão anaeróbia, por exemplo, é uma alternativa para o tratamento dessa água residuária, uma vez que reduz o seu potencial poluidor e recupera sua energia química via produção de metano. Contudo, devido às suas propriedades físicas e químicas desfavoráveis, a vinhaça *in natura* pode inibir os microrganismos anaeróbios e cessar o processo de tratamento. Portanto, estratégias que visem viabilizar sua biodegradação tornam-se necessárias. Nesse sentido, o presente estudo avaliou o desempenho da codigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar e efluente secundário da indústria de laticínios (mistura 1:1 v/v) em um reator do tipo *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) em escala laboratorial (16 L). O reator operou durante 91 dias sob temperatura ambiente (26 °C em média), com controle de alcalinidade (0,3 gNaHCO<sub>3</sub> gDQO<sup>-1</sup>), vazão afluente de 3,6 L d<sup>-1</sup>, tempo de detenção hidráulica de 4,44 d e carga orgânica volumétrica média de 1,6 kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Como inóculo do sistema, uma biomassa anaeróbia proveniente de estação de tratamento de esgoto municipal foi selecionada a partir de testes comparativos de atividade metanogênica específica (AME). As respectivas remoções médias e máximas de poluentes registradas foram: demanda química de oxigênio total (69% e 81%), acidez (29% e 53%), sólidos suspensos voláteis (51% e 75%) e totais (48% e 69%), nitrogênio amoniacal (6% e 100%) e total *Kjeldahl* (42% e 73%), fósforo total (19% e 69%), potássio total (0% e 4%), fenóis (51% e 77%) e sulfatos (25% e 67%). Ademais, as produtividades média e máxima de metano foram de, respectivamente, 221 e 308 mLCH<sub>4</sub> gDQO<sub>rem</sub><sup>-1</sup>. O biogás produzido teve concentrações volumétricas médias de 66,47% de CH<sub>4</sub>, 11,43% de CO<sub>2</sub> e 53 ppm de H<sub>2</sub>S. Complementarmente, o presente estudo demonstrou a evolução periódica da comunidade microbiana presente no lodo do sistema avaliado, da inoculação do sistema ao fim da operação, tanto em termos de identificação de microrganismos por meio de sequenciamento por síntese quanto por execução de ensaios de AME. Ao final da operação, houve aumento na abundância relativa do filo Euryarchaeota (+8,6% em relação ao inóculo), com predominância de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (gêneros *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*). Em paralelo, observou-se elevação da AME no decorrer da operação. Esses resultados demonstram uma gradual adaptação da microbiota anaeróbia ao substrato. Em suma, conclui-se que a codigestão proposta conduziu à um tratamento anaeróbio estável e eficiente, permitindo, desse modo, níveis satisfatórios de remoção de poluentes e de produção de metano. Recomenda-se, em futuros estudos, a realização de experimentos adicionais sobre a tratabilidade anaeróbia da vinhaça mediante a adoção de distintas estratégias operacionais nos biorreatores, objetivando tanto uma maior recuperação energética quanto uma redução mais significativa do potencial poluidor do efluente.

**Palavras-chave:** Água residuária agroindustrial. Reator anaeróbio de alta taxa. Biogás. Atividade metanogênica específica. Microrganismos anaeróbios. Sequenciamento de nova geração. Tratamento biológico.

## ABSTRACT

Brazil is one of the countries that has most invested in producing biofuels worldwide, standing out in ethanol production from sugarcane processing. In addition to bioethanol, this activity also generates unintended by-products such as vinasse, which is commonly used for fertigation. However, its inadequate application on agricultural soil may cause negative environmental impacts, and its treatment before final disposal is recommended. For instance, anaerobic digestion is an alternative for the treatment of this wastewater in order to reduce its polluting potential and recover its chemical energy through CH<sub>4</sub> yield. Nevertheless, due to its unfavorable physical and chemical properties, the *in natura* vinasse can inhibit the anaerobic microorganisms and stop the treatment process. Therefore, strategies to enable vinasse biodegradation are required. In this regard, the present study evaluated the performance of the anaerobic co-digestion of sugarcane vinasse and secondary effluent from the dairy industry (mixture 1:1 v/v) in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor (16 L). The reactor operated for 91 days at room temperature (26 °C on average), with alkalinity control (0.3 gNaHCO<sub>3</sub> gCOD<sup>-1</sup>), an influent flow rate of 3.6 L d<sup>-1</sup>, a hydraulic retention time of 4.44 d, and an average organic loading rate of 1.6 kgCOD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. As an inoculum for the system, anaerobic biomass from a municipal sewage treatment plant was selected based on comparative tests of specific methanogenic activity (SMA). The respective recorded average and maximum pollutant removals were: total chemical oxygen demand (69% and 81%), acidity (29% and 53%), volatile (51% and 75%) and total (48% and 69%) suspended solids, ammoniacal (6% and 100%) and total *Kjeldahl* (42% and 73%) nitrogen, total phosphorus (19% and 69%), total potassium (0% and 4%), phenols (51% and 77%), and sulfates (25% and 67%). Moreover, the average and maximum methane yields were 221 and 308 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>, respectively. The biogas produced had average volumetric contents of 66.47% CH<sub>4</sub>, 11.43% CO<sub>2</sub>, and 53 ppm H<sub>2</sub>S. Furthermore, the present study demonstrated the periodic evolution of the microbial community contained in the sludge of the evaluated system, from the inoculation to the end of the operation, both in terms of microorganism identification through sequencing by synthesis and by performing SMA assays. At the end of the operation, there was an increase in the relative abundance of the phylum Euryarchaeota (+8.6% compared to the inoculum), with a predominance of hydrogenotrophic methanogenic archaea (*Methanobacterium* and *Methanobrevibacter* genera). In parallel, an increase in SMA was observed over the operation. These results demonstrate a gradual adaptation of the anaerobic microbiota to the substrate. In summary, it is concluded that the proposed co-digestion resulted in a stable and efficient anaerobic treatment, thus allowing satisfactory levels of pollutant removal and methane production. It is recommended in future studies to conduct experiments on the vinasse anaerobic treatability by adopting different operational strategies in bioreactors, aiming at both a greater energy recovery and a more significant reduction of the polluting potential of the effluent.

**Keywords:** Agroindustrial wastewater. High-rate anaerobic reactor. Biogas. Specific methanogenic activity. Anaerobic microorganisms. Next-generation sequencing. Biological treatment.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2S-AnMBR	<i>Two-stage anaerobic membrane bioreactor</i>
AFBR	<i>Anaerobic fluidized-bed reactor</i>
AME	Atividade metanogênica específica
AnSBBR	<i>Anaerobic sequencing batch biofilm reactor</i>
AOV	Ácido orgânico volátil
ASTBR	<i>Anaerobic structured-bed reactor</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Carbono orgânico
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloreto de cálcio dihidratado
CH <sub>4</sub>	Metano
CHV	Carga hidráulica volumétrica
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico ou dióxido de carbono
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de cobalto (II) hexahidratado
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPAM	Conselho Estadual de Política Ambiental
COD	<i>Chemical oxygen demand</i>
COV	Carga orgânica volumétrica
CSTR	<i>Continuous stirred tank reactor</i>
CTC	Capacidade de troca catiônica
CuCl	Cloreto de cobre (I)
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DBO <sub>5</sub>	Demanda bioquímica de oxigênio após período de incubação de 5 dias sob temperatura de °C
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO <sub>CH<sub>4</sub></sub>	Demanda química de oxigênio removida e convertida em metano

DQO <sub>rem</sub>	Demanda química de oxigênio removida
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
H'	Índice de diversidade de Shannon
H <sub>2</sub>	Gás hidrogênio ou hidrogênio molecular
H <sub>2</sub> S	Gás sulfídrico ou sulfeto de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HAc	Ácido acético
HCl	Ácido clorídrico
HS <sup>-</sup>	Íon sulfídrico
J	Equabilidade de Pielou
K	Potássio
K <sup>+</sup>	Íon potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotássico ou hidrogenofosfato de potássio
K <sub>2</sub> O	Óxido de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico ou dihidrogenofosfato de potássio
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de magnésio hexahidratado
N	Nitrogênio total
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio ou nitrogênio molecular
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico ou hidrogenofosfato dissódico
Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O	Sulfeto de sódio nonahidratado
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monossódico ou dihidrogenofosfato de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>

NH <sub>3</sub>	Amônia livre
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íon amônio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogênio amoniacal
NPK	Razão entre concentração de nitrogênio, fósforo e potássio
NTK	Nitrogênio total <i>Kjeldahl</i>
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio ou oxigênio molecular
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
P	Fósforo total
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
P <sub>disp</sub>	Fósforo disponível
pH	Potencial hidrogeniônico
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
PSA	<i>Pressure swing adsorption</i>
Q	Vazão volumétrica
RAFA	Reator anaeróbico de fluxo ascendente
RAFAMAL	Reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribossomal
s-CSTR	<i>Semi-continuous stirred tank reactor</i>
SAO	<i>Syntrophic acetate oxidation</i>
SGBR	<i>Static granular bed reactor</i>
SMA	<i>Specific Methanogenic activity</i>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Íon sulfato
SRB	<i>Sulfate-reducing bacteria</i>
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TS	<i>Total solids</i>

TVS	<i>Total volatile solids</i>
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i>
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UHRAR	<i>Upflow high-rate anaerobic reactor</i>
v/v	Percentual volume por volume
VSS	<i>Volatile suspended solids</i>
WWTP	<i>Wastewater treatment plant</i>
ZnCl <sub>2</sub>	Cloreto de zinco

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	1
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 1
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....4
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....4
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....4
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....5
<b>3.1</b>	<b>Indústria sucroalcooleira no Brasil e geração de vinhaça</b> .....5
<b>3.2</b>	<b>Digestão anaeróbia</b> .....9
<b>3.2.1</b>	<b>Descrição e vantagens do processo e geração de biogás</b> .....9
<b>3.2.2</b>	<b>Microbiologia do processo</b> ..... 13
<b>3.2.2.1</b>	<b>Técnicas moleculares para análise microbiológica de amostras ambientais</b> ..... 15
<b>3.2.3</b>	<b>Características do substrato que influenciam no processo</b> .....21
<b>3.2.3.1</b>	<b>pH, alcalinidade e acidez</b> .....21
<b>3.2.3.2</b>	<b>Temperatura</b> .....23
<b>3.2.3.3</b>	<b>Nutrientes</b> .....24
<b>3.2.3.4</b>	<b>Concentração e granulometria de sólidos</b> .....26
<b>3.2.3.5</b>	<b>Compostos tóxicos</b> .....27
<b>3.2.4</b>	<b>Configurações de sistemas anaeróbios</b> .....29
<b>3.2.4.1</b>	<b>Reator UASB</b> .....31
<b>3.2.4.2</b>	<b>Modificações operacionais de sistemas anaeróbios</b> .....34
<b>3.2.5</b>	<b>Atividade metanogênica específica</b> .....37
<b>3.2.6</b>	<b>Digestão anaeróbia da vinhaça</b> .....43
<b>3.2.7</b>	<b>Codigestão anaeróbia da vinhaça</b> .....47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....54
	<b>PRODUTO CIENTÍFICO GERADO: Artigo de revisão publicado em periódico internacional</b> .....79
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	80
<b>ARTIGO 1 – SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY OF ANAEROBIC SLUDGES FROM DIFFERENT WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS</b> .....	80
	<b>ABSTRACT</b> .....80
	<b>HIGHLIGHTS</b> .....80
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....81
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....82
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....85

4	CONCLUSIONS .....	89
	ACKNOWLEDGMENTS .....	89
	REFERENCES .....	90
	<b>PRODUTO CIENTÍFICO GERADO: Resumo expandido publicado em anais de congresso internacional</b> .....	94
	<b>ARTIGO 2 – CO-DIGESTING SUGARCANE VINASSE WITH DAIRY SECONDARY EFFLUENT IN A UASB REACTOR: ANALYSIS OF ANAEROBIC TREATABILITY, METHANOGENIC POTENTIAL, AND MICROBIAL DYNAMICS</b> .....	95
	<b>ABSTRACT</b> .....	95
	<b>HIGHLIGHTS</b> .....	95
1	<b>INTRODUCTION</b> .....	96
2	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	98
2.1	Characteristics of the co-substrates and inoculum .....	98
2.2	Experimental set-up and system start-up and operation .....	99
2.3	Evaluation of the substrate anaerobic treatability and biogas quantitative and qualitative analyses .....	101
2.4	Evaluation of the biosolids in the system and microbiota characterization .....	103
3	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	105
3.1	Anaerobic treatment efficiency .....	105
3.1.1	pH and alkalinity and acidity removal .....	106
3.1.2	Organic matter removal and CH <sub>4</sub> productivity .....	110
3.1.3	Suspended solids removal .....	114
3.1.4	Nutrient removal .....	115
3.1.5	Phenol and sulfate removal .....	118
3.2	Evolution of the biosolids .....	121
3.2.1	Microbiota .....	121
3.2.1.1	Bacteroidetes, Firmicutes, and Chloroflexi .....	123
3.2.1.2	Ignavibacteriae, Proteobacteria, and Caldiserica .....	125
3.2.1.3	Euryarchaeota .....	126
3.2.1.4	Pathogens .....	129
3.2.2	Specific methanogenic activity .....	129
3.2.3	Physical and chemical properties of the biosolids profile .....	131
4	<b>CONCLUSIONS</b> .....	134
	<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	135
	<b>REFERENCES</b> .....	135
	<b>APPENDICES</b> .....	153
	<b>PRODUTO CIENTÍFICO GERADO: Artigo original publicado em periódico internacional</b> .....	157

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos grandes produtores globais de biocombustíveis, destacando-se na produção de etanol a partir do processamento de cana-de-açúcar em biorrefinarias. A indústria sucroalcooleira movimentou no país cerca de US\$10 bilhões no ano de 2020, estabelecendo-se como o quarto setor agroindustrial de maior impacto na balança comercial brasileira (NASCIMENTO, 2021). Durante a fabricação de etanol, a etapa de destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado resulta na geração de vinhaça, água residuária de alto teor nutricional produzida na proporção de 10–15 L por litro de etanol e comumente destinada à fertirrigação de canaviais (UNICA, 2019; FUESS *et al.*, 2021). Além da elevada concentração de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, a vinhaça possui em sua composição altos teores de matéria orgânica, acidez, sais e compostos como fenóis e sulfatos, conferindo-lhe, desse modo, grande potencial nocivo ao meio ambiente quando aplicada de maneira inadequada no solo (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019; FERRAZ JUNIOR *et al.*, 2022). A longo prazo, pode resultar em acidificação e salinização do solo, lixiviação e contaminação do lençol freático, eutrofização de cursos d'água, além de emissão de gases de efeito estufa (OLIVEIRA *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2017; BATTISTI *et al.*, 2019).

Uma das estratégias para a redução do potencial poluidor da vinhaça é o seu tratamento via digestão anaeróbia, técnica que consiste na degradação biológica da matéria orgânica complexa na ausência de oxigênio e sua conversão a metano (CH<sub>4</sub>), gás carbônico (CO<sub>2</sub>), gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e água, principais componentes do biogás (APARICIO *et al.*, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2022). Dessa forma, o tratamento anaeróbio permite, além da diminuição do poder contaminante da vinhaça, sua recuperação energética pela produção de CH<sub>4</sub> (SILVA *et al.*, 2021). Entretanto, devido às suas propriedades físicas e químicas adversas ao cultivo e ao estabelecimento da microbiota anaeróbia – tais como a presença de substâncias tóxicas, baixo pH e inadequada relação entre carbono e nutrientes –, a vinhaça *in natura* pode inibir o metabolismo dos microrganismos e cessar o processo de biodigestão (RAMOS *et al.*, 2021; CHAVES *et al.*, 2021). Por essa razão, é necessária a incorporação de estratégias operacionais com o objetivo de tornar a vinhaça um substrato adequado aos microrganismos anaeróbios, o que pode reduzir a aplicabilidade e viabilidade da planta de tratamento (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; FUESS *et al.*, 2017a).

Nesse sentido, a codigestão anaeróbia se apresenta como uma solução interessante e tecnicamente simples para a adequabilidade da vinhaça ao processamento anaeróbio (ALBANEZ *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2019). Essa estratégia consiste na mistura de dois ou mais resíduos orgânicos com características complementares visando aumentar a biodegradabilidade anaeróbia do substrato final e estabelecer um ambiente favorável ao desenvolvimento de uma microbiota devidamente adaptada (VOLPI; FUESS; MORAES, 2021). A escolha do substrato complementar, portanto, deve ser balizada no sentido de contribuir para o ajuste do balanço entre carbono e nutrientes e de condições como pH e alcalinidade da vinhaça (SIQUEIRA *et al.*, 2022). Desse modo, a implantação da codigestão pode otimizar o processo de digestão anaeróbia da vinhaça e torná-lo menos dependente de etapas de pré-tratamento e adição de substâncias externas, como alcalinizante e solução nutricional, resultando em um tratamento menos oneroso e complexo (ALBANEZ *et al.*, 2018; SILLERO; SOLERA; PEREZ, 2022).

Estudos sugerem a aplicação de subprodutos provenientes de diversos setores agroindustriais como cossustratos adequados para viabilizar o tratamento anaeróbio da vinhaça, como, por exemplo, resíduos da bovinocultura (MORAES *et al.*, 2015), suinocultura (MENG *et al.*, 2020), avicultura (MARIN-BATISTA *et al.*, 2016), produção de café (PINTO *et al.*, 2018), soja (SYAICHURROZI *et al.*, 2016), arroz (MENG *et al.*, 2020), laticínios (LOVATO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019) e biodiesel (BORGES *et al.*, 2021). Além da redução de impactos ambientais negativos, o processamento anaeróbio de dois ou mais subprodutos da agropecuária pode contribuir para a produção de efluente e biossólidos com elevado potencial de fertilização do solo, fomentando, portanto, a bioeconomia circular no setor agroindustrial (LOVATO *et al.*, 2019; PAN *et al.*, 2021).

Apesar da recente expansão de estudos relatando experiências de codigestão anaeróbia de vinhaça, ainda há a necessidade do desenvolvimento de experimentos que busquem selecionar substratos complementares alternativos e mensurar os efeitos de sua aplicação, aumentando assim as possibilidades de mitigação de impactos ambientais negativos e recuperação de recursos pela indústria sucroalcooleira. Diante desse contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar o desempenho da codigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar e efluente proveniente de uma planta de tratamento anaeróbio anexada à uma indústria de laticínios (mistura 1:1 v/v) em um reator do tipo *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) em escala piloto, operando durante 91 dias sob condições mesofílicas, mediante análise de remoção de



poluentes e produtividade de CH<sub>4</sub>. A aplicação de efluente secundário anaeróbio oriundo do setor de laticínios como substrato complementar junto à vinhaça se justifica pelo fato de esse resíduo biodigerido apresentar em sua composição, além de compostos que beneficiam a degradação anaeróbia – e.g., proteínas e sais mineirais (SHRIVASTAVA *et al.*, 2022) –, concentrações reduzidas de matéria orgânica e pH e alcalinidade corrigidos devido ao tratamento previamente aplicado, diminuindo assim a carga orgânica da mistura final e os custos adicionais com alcalinizantes. Ademais, poucos trabalhos publicados monitoraram a dinâmica da comunidade microbiana de sistemas anaeróbios promovendo a codigestão de vinhaça (BARROS *et al.*, 2017; VOLPI *et al.*, 2021). Em vista disso, o presente estudo visa demonstrar, complementarmente, a evolução periódica da microbiota presente no lodo do reator UASB avaliado, da inoculação do sistema ao fim da operação, tanto em termos de identificação de microrganismos através de sequenciamento de nova geração (NGS) quanto por execução de ensaios de atividade metanogênica específica (AME). Paralelamente, foi realizada a caracterização do perfil de sólidos no interior do sistema a partir de amostragens de lodo extraído em distintas alturas do reator UASB, avaliando o seu potencial de aplicação como fertilizante agrícola com base nos teores de sólidos, matéria orgânica oxidável e nutrientes.

A presente dissertação de mestrado encontra-se dividida em duas partes. A primeira refere-se a apresentação desta introdução geral, dos objetivos gerais e específicos, além do referencial teórico, que foi estruturado em: (i) origem e problemática ambiental da vinhaça de cana-de-açúcar e suas principais propriedades físicas, químicas e biológicas; (ii) definição da técnica de digestão anaeróbia e a microbiota envolvida em cada etapa do processo, incluindo subtópicos como: condições ideais para que a biodegradação ocorra de maneira estável, principais configurações de sistemas anaeróbios e possíveis estratégias operacionais para otimizar a digestão, e conceitos relacionados à ensaios de AME de lodos anaeróbios. Finalmente, discute-se a (iii) aplicação da técnica de digestão anaeróbia ao tratamento da vinhaça, assim como a codigestão com outros resíduos, baseando-se em estudos recentes e/ou relevantes publicados sobre o tema. Por sua vez, a segunda e última parte desta dissertação consiste em dois manuscritos originados a partir dos experimentos realizados na presente pesquisa, apresentando os respectivos conteúdos: (i) artigo sobre o teste de AME que visou selecionar, dentre quatro amostras de lodos extraídos de distintos sistemas anaeróbios, o inóculo do reator UASB em escala piloto avaliado na presente pesquisa, com base em seu potencial metanogênico; (ii) artigo relatando o experimento central desta dissertação, o qual relata o desempenho da codigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar e efluente secundário da

indústria de laticínios (mistura 1:1 v/v), com foco na análise de remoção de poluentes dos cossustratos, produtividade de CH<sub>4</sub> e evolução dos bio sólidos com base na caracterização da microbiota, potencial metanogênico e propriedades físicas e químicas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a codigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar e efluente secundário da indústria de laticínios em um reator do tipo UASB em escala piloto.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Selecionar o inóculo para o reator UASB em escala piloto com base em seu potencial metanogênico;
- Mensurar a tratabilidade anaeróbia do substrato a partir da análise de remoção de poluentes;
- Quantificar o volume de CH<sub>4</sub> produzido e, desse modo, calcular a produtividade do sistema;
- Mensurar a qualidade do biogás produzido quanto ao teor de compostos presentes em sua composição;
- Avaliar a evolução da comunidade microbiana anaeróbia, desde a inoculação até o final da operação, em termos de identificação de microrganismos por NGS;
- Determinar, através de ensaios de AME, o potencial metanogênico da biomassa anaeróbia presente no lodo do sistema, da inoculação ao final da operação;
- Avaliar o perfil de sólidos no interior do sistema a partir de amostragens de lodo extraído em distintas alturas do reator UASB, da inoculação ao final da operação.

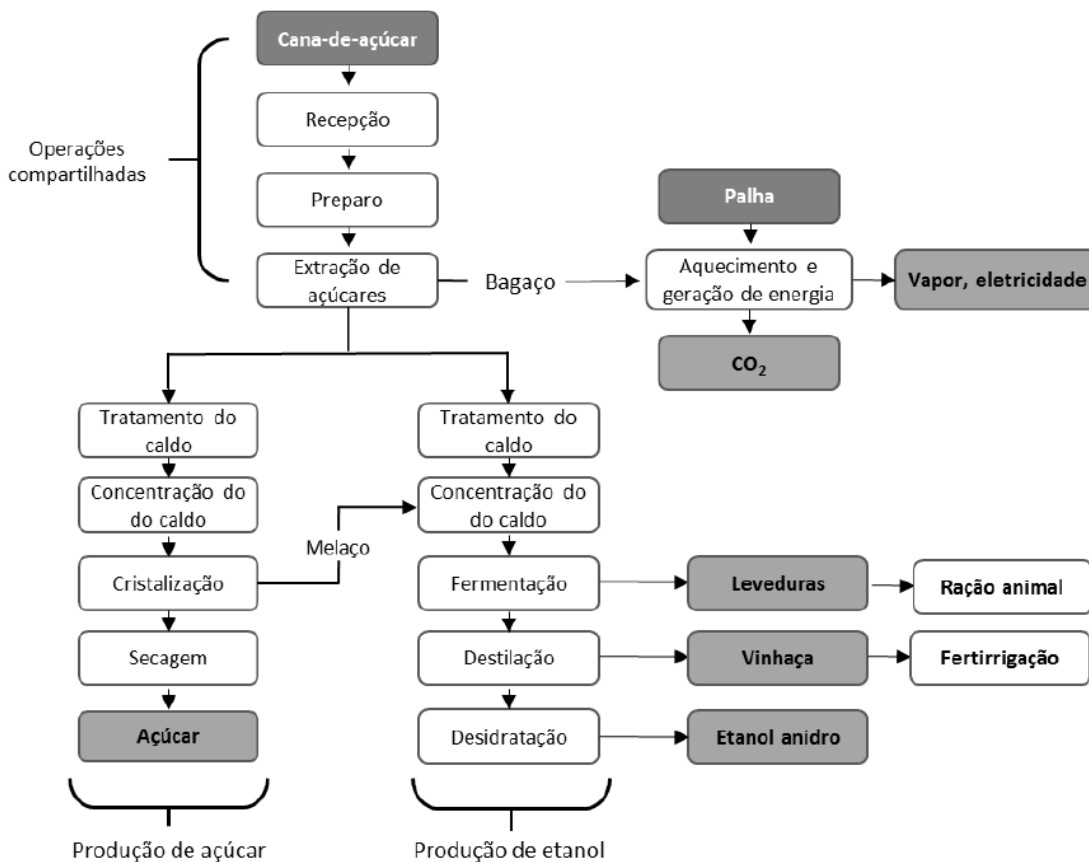
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Indústria sucroalcooleira no Brasil e geração de vinhaça

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de etanol a partir do processamento de cana-de-açúcar, com a geração de um volume de aproximadamente 30 bilhões de litros na safra de 2020/2021 (CONAB, 2021). De acordo com Nogueira e Capaz (2015), no país, a maior parte do etanol é produzida em usinas sucroalcooleiras, que utilizam um processo integrado de fabricação de açúcar e etanol em uma mesma planta industrial.

Segundo Poveda (2019), em uma indústria sucroalcooleira convencional, a cana-de-açúcar, ao chegar na usina, é lavada e preparada para a moagem, onde ocorre a extração do caldo. Esse caldo pode ser destinado tanto para a fabricação de açúcar (em que é gerado o melaço, após tratamento e cristalização do caldo) quanto etanol. Na produção de etanol, após filtração, o caldo é fermentado por leveduras do gênero *Saccharomyces*, gerando o vinho. Além do caldo, pode ser usado como substrato das leveduras o melaço produzido na fabricação de açúcar, ou ainda um misto de caldo e melaço, sendo estas soluções açucaradas conhecidas como mostos. O vinho, após separação das leveduras, geralmente por centrifugação, é encaminhado às colunas de destilação, onde é produzido etanol hidratado, que pode passar por um processo de desidratação gerando o etanol anidro. A água residuária produzida na etapa de destilação é conhecida como vinhaça, sendo produzida na proporção de 10–15 litros para cada litro de etanol fabricado (UNICA, 2019). Na Figura 1 é apresentado um esquema simplificado das etapas de produção convencional de etanol de cana-de-açúcar.

Figura 1 – Esquema simplificado da produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Santana (2016).

A vinhaça possui propriedades físicas e químicas variadas, dependendo de fatores como a natureza da matéria-prima, o tipo de sistema utilizado na fermentação e na destilação, a composição do mosto e a qualidade do vinho (DE GODOI *et al.*, 2019). De maneira geral, apresenta elevados teores de matéria orgânica e, conseqüentemente, altos índices de demanda química de oxigênio (DQO), baixo potencial hidrogeniônico (pH), elevada corrosividade e acidez, altas temperaturas ao sair dos destiladores, altas concentrações de potássio e nitrato, além da presença de nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio e sulfatos (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011; PARSAAE; KIANI; KARIMI, 2019). Na Tabela 1 são apresentadas faixas de valores típicos de características físicas e químicas da vinhaça de cana-de-açúcar.

Tabela 1 – Variáveis físicas, químicas e bioquímicas típicas da vinhaça de cana-de-açúcar.

Variável	Valor	Referência
DQO bruta (mgDQO L <sup>-1</sup> )	27.500 – 299.250	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
DQO solúvel (mgDQO L <sup>-1</sup> )	14.517 – 55.167	Santos <i>et al.</i> (2019)
DBO (mgDBO L <sup>-1</sup> )	5.046 – 47.636	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Sólidos totais (mgST L <sup>-1</sup> )	14.570 – 81.500	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Sólidos voláteis totais (mgSTV L <sup>-1</sup> )	9.340 – 22.000	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Sólidos suspensos totais (mgSST L <sup>-1</sup> )	1.880 – 46.390	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Sólidos suspensos voláteis (mgSSV L <sup>-1</sup> )	1.620 – 15.860	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Fenóis (mg L <sup>-1</sup> )	450 – 469	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Sulfatos (mgSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> )	14 – 6.400	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Fósforo total (mgP L <sup>-1</sup> )	1 – 190	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Ortofosfatos (mgPO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup> )	102,00 – 161,92	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Relação C/N	~20	Johnson, Ali e Kumar (2019)
Nitrogênio Total Kjeldahl (mgN L <sup>-1</sup> )	40 – 4.004	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Nitrogênio amoniacal (mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N.L <sup>-1</sup> )	24,18 – 45,00	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Nitrato (mgNO <sub>3</sub> -N L <sup>-1</sup> )	441,00 – 648,36	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
pH	3,25 – 4,97	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Ácidos orgânicos voláteis (mgHAc L <sup>-1</sup> )	433 – 5.882	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Siqueira, Damiano e Silva (2013)
Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	0 – 295	Del Nery <i>et al.</i> (2018) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Cálcio (mgCa L <sup>-1</sup> )	8 – 5.180	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Ferro (mgFe L <sup>-1</sup> )	12,8 – 2.792	España-Gamboa <i>et al.</i> (2011) – Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Magnésio (mgMg L <sup>-1</sup> )	16 – 1.529	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Sódio (mgNa L <sup>-1</sup> )	50 – 3.820	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Potássio (mgK L <sup>-1</sup> )	40 – 7.830	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Carboidratos (mg L <sup>-1</sup> )	3.933 – 4.733	Santos <i>et al.</i> (2019)
Proteínas (mg L <sup>-1</sup> )	2.750 – 6.894	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Lipídios (mg L <sup>-1</sup> )	250 – 6.894	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Densidade (kg L <sup>-1</sup> )	1,031	Prasad e Shih (2016)
Viscosidade (Pa.s)	0,00138	Prasad e Shih (2016)
Condutividade elétrica (µS cm <sup>-1</sup> )	8.294 – 15.110	Parsaee, Kiani e Karimi (2019)
Ponto de ebulição (°C)	100,25	Prasad e Shih (2016)
Calor específico (cal (g °C) <sup>-1</sup> )	0,934	Prasad e Shih (2016)
Calor latente (cal g <sup>-1</sup> )	3,39	Prasad e Shih (2016)

Fonte: Do autor (2022).

Tais características tornam a vinhaça uma alta resíduoária com alto poder poluente, sendo que o descarte de sua forma *in natura*, pode causar diversos danos ao meio ambiente. Em corpos hídricos receptores, pode resultar no enriquecimento de nutrientes e, conseqüentemente, desencadear ou potencializar a eutrofização e a depleção dos níveis de oxigênio dissolvido devido às altas concentrações de nutrientes e carga orgânica (BATTISTI *et al.*, 2019). No solo, pode levar à salinização e à lixiviação de potássio e nitrato, além de provocar problemas estruturais e contaminação das águas subterrâneas (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Além dos impactos negativos na água e no solo, seu armazenamento, transporte e aplicação no solo podem resultar na emissão de metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), gases de efeito estufa e de alto impacto ambiental (OLIVEIRA *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2017).

Segundo Bonini (2012), após a proibição do despejo de vinhaça diretamente em cursos d'água pelo Decreto-Lei nº 303/1967 (BRASIL, 1967), esta água resíduoária passou a ser descartada em locais próximos às destilarias, conhecidos como “áreas de sacrifício”, os quais tornavam-se praticamente inutilizáveis para o plantio devido aos efeitos da salinização do solo. Em 1975, com o surgimento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que estimulava a produção de etanol no território brasileiro, houve uma expansão da indústria sucroalcooleira no Brasil, com maior incentivo à implementação de técnicas mais adequadas de manejo da água resíduoária, resultando na aplicação da vinhaça nos próprios cultivos da cana-de-açúcar.

Ainda hoje, a principal aplicação da vinhaça é na fertirrigação de canaviais, sendo sua dosagem máxima determinada em função do seu teor de óxido de potássio (K<sub>2</sub>O), em conjunto com propriedades do solo como capacidade de troca catiônica (CTC) e concentração de potássio, de acordo com a Norma Técnica P4.231 do Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2015) e a Deliberação Normativa COPAM nº 164 do Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2011). Em contrapartida, essa prática reduz os custos com utilização de fertilizantes químicos na cultura, além de minimizar os impactos ambientais negativos decorrentes do descarte da vinhaça *in natura*. Porém não havendo controle da aplicação na lavoura, a longo prazo, pode ocorrer a salinização do solo e, conseqüentemente, queda na produtividade da cultura, além de contaminação das águas subterrâneas (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013).

Atualmente, não há no Brasil regulamentação quanto ao tratamento prévio a ser aplicado à vinhaça. A legislação abrange apenas no que diz respeito à sua disposição no solo agrícola, conforme Norma Técnica e Deliberação Normativa supracitadas (SÃO PAULO, 2015; MINAS GERAIS, 2011), válidas apenas para os estados de São Paulo e Minas Gerais; além disso,

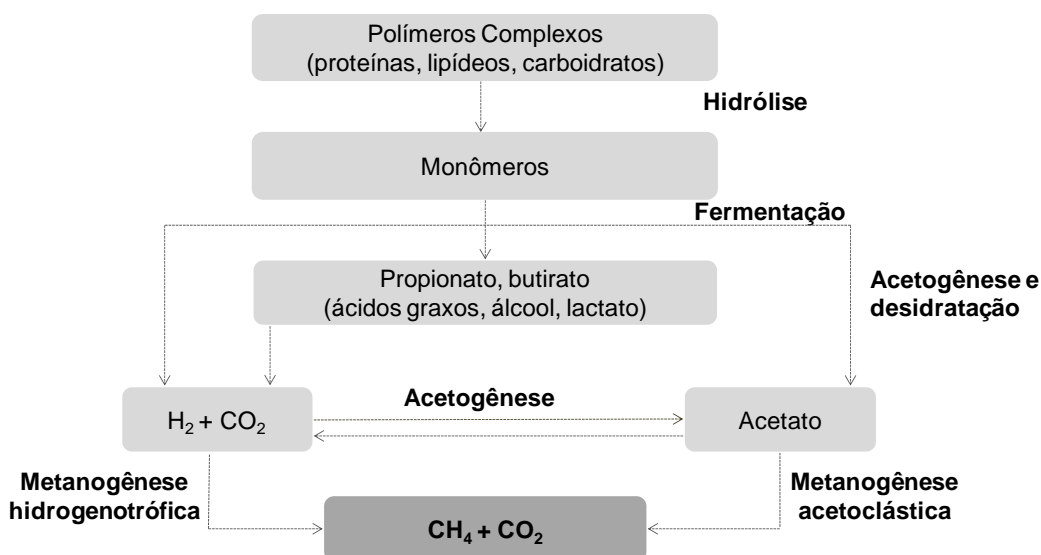
estabelece, pela resolução CONAMA n° 503 de 2021, critérios e procedimentos para o reúso em sistemas de fertirrigação de águas residuárias industriais (BRASIL, 2021). Dessa forma, justifica-se o incentivo a pesquisas que possam validar, desenvolver ou aprimorar técnicas ou mecanismos para tratar a vinhaça, visando reduzir os prejuízos causados ao meio ambiente e, ao mesmo tempo, enriquecer embasamentos teóricos e práticos para incentivar a aplicação de futuras políticas públicas ambientais. Nessa perspectiva, uma das alternativas para o tratamento da vinhaça é a digestão anaeróbia, a qual é descrita a seguir.

### 3.2 Digestão anaeróbia

#### 3.2.1 Descrição e vantagens do processo e geração de biogás

A digestão anaeróbia é definida como um conjunto de reações em que ocorre a degradação de matéria orgânica biodegradável por microrganismos na ausência de oxigênio (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019). Durante esse processo ocorre a conversão de matéria orgânica complexa em  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  e água, principais componentes do biogás (APARICIO *et al.*, 2020). Na Figura 2 é apresentado um esquema das rotas do processo de digestão anaeróbia da matéria orgânica e da produção de  $\text{CH}_4$ .

Figura 2 – Rotas da digestão anaeróbia da matéria orgânica biodegradável.



Fonte: Adaptado de Chernicharo (2016), p. 40.

Conforme esquematizado na Figura 2, a digestão anaeróbia é composta pelas seguintes etapas (CHERNICHARO, 2016):

1 – Hidrólise: primeira fase da digestão anaeróbia, em que polímeros complexos, como carboidratos, proteínas e lipídeos, são hidrolisados por coenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas, transformando-os em moléculas mais simples, que são produtos solúveis conhecidos como monômeros, os quais podem atravessar a parede celular das bactérias fermentativas acidogênicas, que realizam a etapa seguinte do processo;

2 – Acidogênese: monômeros obtidos na etapa anterior, como açúcares, aminoácidos e peptídeos, são fermentados por bactérias fermentativas acidogênicas a ácidos orgânicos voláteis (AOVs) (tais como acetato, propionato e butirato), álcoois, cetonas, CO<sub>2</sub> e gás hidrogênio (H<sub>2</sub>), além de material celular;

3 – Acetogênese: fase em que bactérias acetogênicas realizam a oxidação de compostos orgânicos intermediários provenientes da acidogênese, como propionato e butirato, em substratos apropriados para os microrganismos metanogênicos, tais como acetato, hidrogênio e CO<sub>2</sub>;

4 – Metanogênese: etapa final da digestão anaeróbia, que é efetuada por microrganismos metanogênicos pertencentes ao domínio *Archaea*. Esses microrganismos se subdividem em dois grupos fisiológicos: o grupo denominado metanogênicas acetoclásticas produz CH<sub>4</sub> a partir do acetato como fonte de carbono e energia; e o segundo grupo, conhecido como metanogênicas hidrogenotróficas, formam CH<sub>4</sub> utilizando CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e H<sub>2</sub> como fonte de energia.

A digestão anaeróbia é uma técnica amplamente aplicada ao tratamento de águas residuárias urbanas e industriais. Os sistemas de tratamento compostos por biorreatores anaeróbios apresentam reduzidos custos de implementação e operação, baixo consumo energético e menor geração de sólidos (lodo). As maiores desvantagens, contudo, são relacionadas à baixa remoção de nutrientes e patógenos; às menores eficiências de remoção de DQO se comparado à um sistema de tratamento aeróbio; e à maior instabilidade do sistema devido a choques de carga (CHERNICHARO, 2016; KHANAL *et al.*, 2017).

Ao final do processo de tratamento anaeróbio é gerado, além do efluente tratado, o biogás, que é um gás misto cuja composição volumétrica é dada principalmente por CH<sub>4</sub> (55 a 70% v/v), CO<sub>2</sub> (30 a 45% v/v) e pequenas quantidades de H<sub>2</sub>S (0,11 a 0,39% v/v), água, O<sub>2</sub>, gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), H<sub>2</sub>, e traços de hidrocarbonetos, podendo sua composição variar dependendo do tipo de substrato utilizado (HARUN *et al.*, 2010; SOUZA, 2010).



Como uma fonte energética renovável, o CH<sub>4</sub> pode ser usado na geração de calor e eletricidade por meio da conversão de sua energia química em energia térmica e elétrica (ICLEI, 2010; ZABED *et al.*, 2020). Entretanto, antes de seu aproveitamento, o biogás *in natura* deve passar por um processo de purificação. Segundo Ryckebosch, Drouillon e Vervaeren (2011), H<sub>2</sub>S deve ser removido do biogás, em um processo conhecido por dessulfurização, devido ao seu alto potencial de corrosão dos tanques de armazenamento e motores de combustão interna. Essa operação pode ser realizada por diferentes métodos, como adsorção, precipitação química ou técnicas biológicas (MUÑOZ *et al.*, 2015). Outra etapa de tratamento do biogás é a desumidificação, em que o teor de água presente no biogás é reduzido. Esse processo é baseado geralmente em dois métodos: métodos físicos, sendo a separação física de água condensada a técnica mais simples; e métodos químicos, como secagem química, considerados mais complexos e onerosos por envolver a adição de compostos como óxidos de magnésio ou alumínio ou dióxido de silício (HAGEN *et al.*, 2001; GALANTE *et al.*, 2012).

Em relação à remoção de CO<sub>2</sub> do biogás, processo conhecido como *biogas upgrading*, diversos métodos podem ser utilizados, como adsorção por variação de pressão – do inglês *Pressure Swing Adsorption* (PSA) –, separação por membranas, esfoliação em solventes, como citado por Muñoz *et al.* (2015), ou ainda captação fotossintética de CO<sub>2</sub> em fotobiorreatores para cultivo de microalgas (MEIER *et al.*, 2015). Segundo Klein, Bonomi e Maciel Filho (2018), esses processos visam aumentar a concentração de CH<sub>4</sub> no biogás (aproximadamente 95% v/v) e potencializar seu poder de combustão (WEILAND, 2010).

A produção teórica de CH<sub>4</sub> produzido durante a biodigestão anaeróbia de uma água residuária em um sistema de tratamento anaeróbio (ou reator anaeróbio) pode ser estimada pela Equação 1 (modificada de Chernicharo (2016)), cujo valor depende do fator de correção calculado pela Equação 2:

$$Q_{CH_4} = S_0 \cdot Q \cdot (E_{DQO} - Y) / F \quad (1)$$

$$F = P \cdot K / (R \cdot (T + 273)) \quad (2)$$

onde,

$Q_{CH_4}$  = produção volumétrica de CH<sub>4</sub> (m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>);

$S_0$  = concentração de DQO na água residuária (kgDQO m<sup>-3</sup>);

$Q$  = vazão volumétrica da água residuária (m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>);

$E_{DQO}$  = eficiência na remoção de DQO do substrato;

Y = coeficiente de produção de sólidos no sistema, em termos de DQO (0,11-0,23 gDQO do lodo do reator por gDQO da água residuária afluyente ao sistema);

F = fator de correção para a temperatura operacional do reator anaeróbio;

P = pressão atmosférica (1 atm);

K = DQO correspondente a 1 mol de CH<sub>4</sub> (64 gDQO mol<sup>-1</sup>);

R = constante universal dos gases (0,08206 atm L mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>);

T = temperatura operacional do reator (°C).

Outra possível estimativa teórica da produção de CH<sub>4</sub> é dada pela relação 0,35 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub> kgDQO<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup>, considerando as condições normais de temperatura e pressão (0 °C e 1 atm) (TCHOBANOGLOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Durante o processo de digestão anaeróbia, o potencial redutor contido na matéria orgânica biodegradável afluyente é transferido para o CH<sub>4</sub>, desse modo parte da DQO do substrato é convertida a CH<sub>4</sub> (DQO<sub>CH<sub>4</sub></sub>) (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). Entretanto, a produção teórica de CH<sub>4</sub> não representa a produção obtida na prática, pois perdas de CH<sub>4</sub> podem ocorrer devido à dissolução do gás no líquido efluente ao reator anaeróbio, ou pelo desprendimento desse gás para a atmosfera (SOUZA; CHERNICHARO; AQUINO, 2011; LOBATO; CHERNICHARO; SOUZA, 2012; CHERNICHARO *et al.*, 2015).

A estimativa do potencial energético do biogás gerado a partir do tratamento anaeróbio de uma ou mais águas residuárias pode ser calculada a partir da Equação 3 (MORAES *et al.*, 2014):

$$P = (PCI_b / f_v) \cdot (E_{DQO} \cdot Q \cdot S_0) \cdot \Omega_{CH_4} \quad (3)$$

onde,

P = potencial energético do biogás (kJ d<sup>-1</sup>);

PCI<sub>b</sub> = poder calorífico inferior do biogás (21,5 x 10<sup>3</sup> kJ Nm<sup>-3</sup> (CTBE, 2012));

f<sub>v</sub> = fração volumétrica de CH<sub>4</sub> no biogás;

E<sub>DQO</sub> = eficiência na remoção de DQO do substrato;

Q = vazão volumétrica da água residuária (m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>);

S<sub>0</sub> = concentração de DQO na água residuária (kgDQO m<sup>-3</sup>);

Ω<sub>CH<sub>4</sub></sub> = produção de CH<sub>4</sub> por DQO removida (0,29 Nm<sup>3</sup>CH<sub>4</sub> kgDQO<sub>rem</sub><sup>-1</sup>).

Diante desse contexto, a digestão anaeróbia se mostra uma tecnologia de valorização das águas residuárias, pois possibilita a recuperação energética pela geração de biogás e a

minimização de impactos ambientais negativos pela remoção de poluentes. Portanto, deve ter seu uso incentivado e explorado para o tratamento de águas residuárias, contribuindo dessa maneira para a economia biocircular (FAGERSTRÖM *et al.*, 2018).

### 3.2.2 Microbiologia do processo

Nos sistemas de tratamento anaeróbio, a maior parte da matéria orgânica biodegradável presente no substrato é convertida em biogás (50-70%), uma pequena parcela em biomassa microbiana (5-15%) – que passa a constituir o lodo excedente do biorreator –, e o material não convertido sai do sistema como matéria orgânica não degradada (10-30%) (CHERNICHARO, 2016). Com relação à microbiota presente na biomassa cultivada no interior dos biorreatores anaeróbios, os principais gêneros de microrganismos que atuam em cada uma das quatro etapas principais da digestão anaeróbia são (SIKORA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019):

1 – Hidrólise: *Clostridium*, *Micrococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Eubacterium*;

2 – Acidogênese: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus* e *Escherichia*;

3 – Acetogênese: *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas*;

4 – Metanogênese: arqueias metanogênicas acetoclásticas: *Methanosarcina* e *Methanosaeta*; arqueias metanogênicas hidrogenotróficas: *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum*.

Durante as etapas do processo de digestão anaeróbia, o produto final da degradação de um grupo de microrganismos pode ser substrato para outro grupo, havendo interligação e dependência entre as etapas, conforme discutido no item 3.2.1. Portanto, é necessário prevalecer condições ambientais apropriadas dentro do digestor anaeróbio para que ocorra a degradação de matéria orgânica complexa e obtenção do biogás como produto final (JAIBIBA; VIGNESH; HARIHARAN, 2020). As características ambientais adequadas para os microrganismos de cada etapa da digestão anaeróbia serão discutidas a seguir.

A taxa de hidrólise depende de fatores do meio como temperatura, pH, concentração de íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), concentração de AOVs, além de propriedades do substrato, tais como granulometria, porosidade, composição, tempo de residência celular e biodegradabilidade

(MENZEL; NEUBAUER; JUNNE, 2020). O desempenho dessa etapa tem efeitos diretos nas subsequentes etapas do processo anaeróbio.

A produção e acumulação de AOVs, resultados da etapa de acidogênese por ação das bactérias fermentativas, podem causar uma queda no pH do meio, afetando o rendimento de CH<sub>4</sub> (KUGLARZ; MROWIEC; BOHDZIEWICZ, 2011). No entanto, a degradação de aminoácidos a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante essa etapa fornece alcalinidade para a estabilidade do reator anaeróbio (DEL NERY *et al.*, 2007). As bactérias acidogênicas são estritamente anaeróbias, sendo inibidas em ambientes com presença de oxigênio e nitrato (RAMOS-SUÁREZ; ARROYO; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2015). Além disso, têm como característica um rápido crescimento em função de um baixo tempo de duplicação (aproximadamente 30 minutos) (RAMOS-SUÁREZ; ARROYO; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2015). As bactérias fermentativas, tanto hidrolíticas quanto acidogênicas, são as primeiras a atuar na etapa sequencial de degradação do substrato, e são as que mais se beneficiam energeticamente (CHERNICHARO, 2016).

Segundo Chernicharo (2016), a formação de acetato resulta na produção de grande quantidade de H<sub>2</sub> pelas bactérias acetogênicas, sendo o excesso desse gás dissolvido é responsável pelo decaimento do pH do meio aquoso, que pode causar a inibição da etapa de acetogênese. Por isso, o único requisito para essa etapa é uma baixa pressão parcial de H<sub>2</sub> (< 10<sup>-4</sup> atm), que pode ser alcançada com o auxílio de microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos e bactérias redutoras de sulfato, organismos que utilizam H<sub>2</sub> em seus metabolismos, diminuindo assim a concentração desse composto no meio (APPELS *et al.*, 2008; SIKORA *et al.*, 2017; AZIZ *et al.*, 2019). De acordo com Morita *et al.* (2011), o balanço de produção e consumo de H<sub>2</sub> por dois consórcios de microrganismos é conhecido por transferência de hidrogênio entre espécies. As bactérias responsáveis por essa etapa são denominadas sintróficas, pois a existência delas depende da atividade de microrganismos consumidores de hidrogênio (SIKORA *et al.*, 2017). O tempo de duplicação das bactérias acetogênicas varia entre 1,5 e 4,0 dias (RAMOS-SUÁREZ; ARROYO; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2015).

Durante a metanogênese, última etapa da digestão anaeróbia, as arqueias metanogênicas acetoclásticas são responsáveis pela maior parte da produção de CH<sub>4</sub> (72%) (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003). Porém, de acordo com Aziz *et al.* (2019), esses microrganismos geralmente têm uma taxa de crescimento menor se comparada às arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. Por isso, é recomendado que se utilize um lodo

anaeróbio com alto tempo de residência celular (também conhecido como idade do lodo) em reatores anaeróbios. Além disso, a maior taxa de crescimento das arqueias hidrogenotróficas permite a produção de pressão parcial de H<sub>2</sub> suficiente para as bactérias acetogênicas da etapa anterior, mantendo assim a estabilidade do reator (MUN, 2012). As arqueias metanogênicas, em geral, possuem alta sensibilidade a variações de pH, temperatura, presença de oxigênio e altas concentrações de amônia livre (NH<sub>3</sub>), H<sub>2</sub>S e AOVs (GERARDI, 2003). A taxa de crescimento varia entre os dois grupos: as metanogênicas hidrogenotróficas possuem um tempo de duplicação de 4 a 12 horas, enquanto que as metanogênicas acetoclásticas possuem um crescimento mais lento, da ordem de 2 a 3 dias para duplicação (VAN LIER; MAHMOUD; ZEEMAN, 2008; RAMOS-SUÁREZ; ARROYO; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2015).

De acordo com Thauer *et al.* (2008), os organismos metanogênicos dependem dos produtos das fases anteriores da digestão anaeróbia para obtenção de substrato, podendo ser afetados significativamente pela atividade das bactérias fermentativas e acetogênicas. Caso a concentração de H<sub>2</sub> se eleve no meio devido ao excesso de substrato fermentável, por exemplo, ou devido a inibição de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas causada pela queda do pH ou presença de compostos tóxicos, a reação de acetogênese não ocorre, levando à acumulação de AOVs e, conseqüentemente, à geração de maus odores. Isso pode causar redução do pH no reator e inibir ainda mais o desempenho das arqueias metanogênicas, resultando no “azedamento” do sistema anaeróbio, cessando por completo a metanogênese e retardando a fermentação na acidogênese (THAUER *et al.*, 2008).

Diante do exposto, torna-se evidente que a abundância e diversidade microbiana tem papel fundamental na manutenção do processo de digestão anaeróbia. Em complemento, o desempenho da atividade de microrganismos anaeróbios sob diferentes condições ambientais ou em resposta a diferentes tipos de distúrbios pode ser utilizado como indicador da qualidade desse processo (LAMBAIS *et al.*, 2005, BATISTA, 2015).

### **3.2.2.1 Técnicas moleculares para análise microbiológica de amostras ambientais**

O desempenho do processo de digestão anaeróbia está intimamente associado ao lodo anaeróbio, que, em boa parte, é constituído de biomassa microbiana (2-20%), sendo, portanto, considerado o foco de diversas pesquisas e fundamental para o monitoramento da eficiência do processamento anaeróbio em sistemas de tratamento de águas residuárias (AISSE *et al.*, 1999; BATISTA, 2015).

Segundo Siniscalchi (2015), o campo do estudo da ecologia microbiana evoluiu com o desenvolvimento de métodos que conseguem recuperar e analisar os ácidos nucleicos a partir de amostras ambientais, tais como a biomassa de lodos anaeróbios. Um grande número de ferramentas moleculares tem sido desenvolvido e utilizado para o estudo dos microrganismos anaeróbios, incluindo técnicas de sequenciamento de nova geração como Pirosequenciamento e *MiSeq/Illumina*, que recuperam um grande número de sequências das amostras, podendo ser utilizado nesses estudos moleculares o gene RNAr 16S (SINISCALCHI, 2015). A seguir serão descritas essas duas técnicas de análise molecular:

a) Pirosequenciamento (Plataforma *Roche 454 FLX*): método que realiza o sequenciamento baseado na detecção do pirofosfato durante a síntese de DNA (RONAGHI, 2001; MARGULIES *et al.*, 2005). A leitura das sequências é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se iniciam com a liberação de pirofosfato, proveniente da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido a trifosfato de adenosina (ATP), pela enzima ATP sulfurilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz que é capturado por uma câmera acoplada ao sistema (RONAGHI, 2001). Para o estudo de comunidades microbianas, é necessária a realização de uma *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com iniciadores de interesse, no qual um dos iniciadores é marcado com um *barcode*, que corresponde a uma sequência de aproximadamente 10 nucleotídeos, específica para cada amostra, que permitirá a identificação da origem das sequências amplificadas (SINISCALCHI, 2015);

b) Plataforma de sequenciamento *MiSeq/Illumina*: o método de sequenciamento químico da plataforma *MiSeq* (empresa *Illumina*) é denominado sequenciamento por síntese. No lugar de se colocar o DNA em um gel, o sequenciamento por síntese requer que o DNA seja colocado em uma superfície dentro de uma célula de fluxo (SINISCALCHI, 2015). O instrumento *MiSeq* adiciona as bases e adquire a imagem de cada ciclo, sendo que cada ciclo consiste na adição e na leitura de cada base. Os pontos coloridos para cada ciclo formam os grupos que são compostos de sequências curtas, ou seja, pequenas regiões do fragmento de DNA amplificado (LOMAN *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012). Os instrumentos da *Illumina* são os mais utilizados no mercado devido ao seu custo-benefício e à alta precisão de sequenciamento (JÜNEMANN *et al.*, 2017).

Na Tabela 2 são apresentados dados da literatura acerca dos principais grupos de microrganismos encontrados em lodos de reatores anaeróbios tratando diferentes águas residuárias.

Tabela 2 – Revisão da literatura sobre os principais grupos de microrganismos, em termos de filo, ordem e gênero, encontrados em biomassas provenientes de reatores anaeróbios tratando diferentes águas residuárias.

Sistema / Água residuária	Técnica de análise molecular	Grupo microbiano	Filo *	Ordem *	Gênero *	Referência
UASB (piloto) – vinhaça de cana-de-açúcar	PCR/DGGE	Bactérias	Proteobacteria Firmicutes	Bacillales Clostridiales Syntrophobacterales	–	Espanña-Gamboa <i>et al.</i> (2012)
		Arqueias	Euryarchaeota	Methanobacteriales Methanosarcinales	–	
UASB (piloto) – vinhaça de cana-de-açúcar	Pirossequenciamento	Bactérias	Verrucomicrobia (36,1%) Firmicutes (12,4%) Thermotogae (11,9%) Synergistetes (6,7%) Chloroflexi (1,2%)	Clostridiales Lactobacillales	–	Martínez, Romero e Perotti (2014)
		Arqueias	Euryarchaeota (17,3%) Chrenarcheota (1,5%)	Methanosarcinales (5,67%) Thermoplasmatales (5,38%) Methanobacteriales (4,58%) Methanomicrobiales (0,3%)	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanosarcina</i>	
AFBR (piloto) – vinhaça de cana-de-açúcar	<i>Hiseq/Illumina</i>	Bactérias	Bacteroidetes (62% **) Firmicutes (38% **)	Bacteroidales (62% **)	<i>Megasphaera</i> (28% **) <i>Prevotella</i> (~7% **) <i>Clostridium</i>	dos Reis <i>et al.</i> (2015)
		Arqueias	Euryarchaeota (~99% **)	Methanobacteriales (~99% **)	<i>Methanobacterium</i> (98% **) <i>Methanosphaera</i> (1% **)	
Reator híbrido (UASB + filtro anaeróbio) (piloto) – vinhaça de cana-de-açúcar	<i>Miseq/Illumina</i>	Bactérias	Firmicutes (~44%) Spirochaetes (~13%) Synergistetes (~9%) Proteobacteria (~6%) Chloroflexi (~3%) Bacteroidetes (~2%)	–	–	Dias <i>et al.</i> (2016)
		Arqueias	Euryarchaeota (~8%)	–	–	

(continua)

UASB – esgoto sanitário	Pirosequenciamento	Bactérias	Synergistetes (53%) Firmicutes (~6%) Proteobacteria (~2%) Planctomycetes (~1%) Bacteroidetes (~1%) Chloroflexi (~1%)	Synergistales (53%) Clostridiales (~6%) Planctomycetales (~1%) Bacteroidales (~1%) Sphaerobacterales (~1%) Rhizobiales (~1%) Burkholderiales (~1%)	<i>Aminomonas</i> (23%) <i>Aminobacterium</i> (18%) <i>Synergistes</i> (6%) <i>Cloacibacillus</i> (1%)	Siniscalchi <i>et al.</i> (2016)
		Arqueias	Euryarchaeota (~8%)	Methanobacteriales (8%) Methanosarcinales (<0,2%)	<i>Methanobacterium</i> (~8%) <i>Methanosaeta</i> (~0,2%) <i>Methanobrevibacter</i> (<0,2%) <i>Methanospirillum</i> (<0,2%)	
UASB (piloto) – efluente de lavanderia	<i>Hiseq/Illumina</i>	Bactérias	Proteobacteria (22,3%) Chloroflexi (4,5%) Firmicutes (3,3%) Actinobacteria (1,5%) Bacteroidetes (1,3%) Chlorobi (0,8%)	Syntrophobacteriales (9,0%) Desulfuromonadales (5,0%) Chloroflexales (3,5%) Synergistales (2,7%) Clostridiales (2,2%) Desulfovibrionales (2,1%) Burkholderiales (1,4%) Rhizobiales (1,2%) Desulfobacteriales (1,2%) Pseudomonadales (1,2%) Bacillales (1,1%) Bacteroidales (1,0%)	<i>Syntrophobacter</i> (5,1%) <i>Syntrophus</i> (3,9%) <i>Geobacter</i> (3,2%) <i>Clostridium</i> (2,2%) <i>Desulfovibrio</i> (2,1%) <i>Pelobacter</i> (1,8%) <i>Chloroflexus</i> (1,8%) <i>Roseiflexus</i> (1,7%) <i>Thermanaerovibrio</i> (1,5%) <i>Pseudomonas</i> (1,2%) <i>Dethiosulfovibrio</i> (1,2%) <i>Desulfatibacillum</i> (1,2%) <i>Bacillus</i> (1,1%) <i>Bacteroides</i> (1,0%) <i>Herpetosiphon</i> (1,0%)	Delforno <i>et al.</i> (2017)
		Arqueias	Euryarchaeota (8,5%)	Methanomicrobiales (2,8%) Methanosarcinales (2,4%) Methanobacteriales (2,0%) Methanosarcinaceae (1,7%)	<i>Methanoregula</i> (2,8%) <i>Methanosaeta</i> (2,4%) <i>Methanosarcina</i> (1,7%) <i>Methanotermobacter</i> (1,6%)	

(continua)



UASB (piloto) sob condições termofílicas – vinhaça de cana-de-açúcar + torta de filtro (40 g L <sup>-1</sup> vinhaça) (codigestão)	<i>Ion Torrent</i>	Bactérias	Thermotogae (58,0%**) Firmicutes (14,7%**) Bacteroidetes (3,5%**) Nitrospirae (3,5%**) Synergistetes (3,1%**) Atribacteria (2,4%**) Planctomycetes (0,3%**) Protobacteria (0,1%**) Tenericutes (0,1%**)	Thermotogales Bacteroidales	<i>Fervidobacterium</i> (12,0%**) <i>Petrimonas</i>	Barros <i>et al.</i> (2017)
		Arqueias	Euryarchaeota (96,0%**) Chrenarcheota (4,0%**)	Methanobacteriales Methanosarcinales Methanomicrobiales	<i>Methanothermobacter</i> (~80,5%**) <i>Methanoculleus</i> <i>Methanosarcina</i>	
UASB (piloto) – efluente do processamento de amido de batata	<i>Miseq/Illumina</i>	Bactérias	Firmicutes (34,01%) Chloroflexi (17,35%) Proteobacteria (15,36%) Synergistetes (~12%) Bacteroidetes (~10%) Cloacimonetes (~3%)	Clostridiales (17,71%) Anaerolineales (16,64%) Synergistales (9,01%) Bacteroidales (6,25%) Pseudomonadales (~5%)	<i>Levilinea</i> (12,03%) <i>Candidatus Cloacamonas</i> (10,50%) <i>Sporonaerobacter</i> (~5%) <i>Pseudomonas</i> (~2%)	Antwi <i>et al.</i> (2017)
		Arqueias	Euryarchaeota (~10%)	Methanosarcinales (9,41%) Methanobacteriales (<1%)	<i>Methanosaeta</i> (9,99%)	
UASB – esgoto sanitário de campus universitário	<i>Miseq/Illumina</i>	Bactérias	Chloroflexi (35,26%) Proteobacteria (31,25%) Firmicutes (12,58%) Caldiserica (8,18%) Actinobacteria (2,66%) Synergistetes (1,39%) Acidobacteria (1,33%) Bacteroidetes (1,33%)	Anaerolineales (35,18%) Pseudomonadales (25,54%) Clostridiales (11,61%) Caldisericales (8,18%) Nitrosococcales (2,07%) Bacteroidales (1,28%) Aminicenantales (1,12%) Syntrophobacteriales (1,07%) Rhizobiales (0,34%) Corynebacteriales (0,18%) Caulobacteriales (0,08%) Flavobacteriales (0,03%) Sphingobacteriales (0,02%)	<i>Pseudomonas</i> (25,54%) <i>Caldisericum</i> (8,17%) <i>Clostridium sensu stricto 1</i> (4,29%) <i>Clostridium sensu stricto 13</i> (2,75%) <i>Rombotsia</i> (2,46%) <i>Leptolinea</i> (3,06%) <i>Longilinea</i> (0,34%) <i>Brevundimonas</i> (0,07%)	Paez (2019)
		Arqueias	Euryarchaeota (4,77%)	Methanobacteriales (3,98%) Methanosarcinales (0,14%)	<i>Methanobacterium</i> (3,90%) <i>Methanosaeta</i> (0,12%)	

(continua)

UASB – vinhaça de cana-de-açúcar	<i>Ion Torrent</i>	Bactérias	Chloroflexi (~35%) Firmicutes (~12%) Synergistetes (~8%) Proteobacteria (~7%) Acidobacteria (~5%) Aegiribacteria (~5%) Verrucomicrobia (~5%) Patescibacteria (~2%) Thermotogae (~1%) Planctomycetes (~1%) Kiritimatiellaeota (~1%) Latescibacteria (<1%) Armatimonadetes (<1%)	–	–	Callejas <i>et al.</i> (2021)
		Arqueias	Euryarchaeota (~6%)	–	–	
Fermentador (bancada) – vinhaça de cana-de-açúcar	<i>Ion Torrent</i>	Bactérias	Bacteroidetes (27%) Firmicutes (19%) Proteobacteria (10%) Chloroflexi Thermotogae	Clostridiales Pseudomonadales Bacteroidales Clostridia Desulfuromonadales	<i>Candidatus cloacimonas</i> (11,20%) <i>Clostridium</i> (9,77%) <i>Acinetobacter</i> (5,23%) <i>Bacteroides</i> (3,14%) <i>Syntrophomonas</i> (1,66%) <i>Kosmotoga</i> (1,39%) <i>Geobacter</i> (0,15%)	Itchenko <i>et al.</i> (2021)
		Arqueias	Euryarchaeota (24%)	Methanosarcinales (~18%) Methanobacteriales (~3%) Methanomassiliicoccales (<1%)	<i>Methanosaeta</i> (17,94%) <i>Methanobacterium</i> (2,67%) <i>Methanomassiliicoccus</i> (0,69%)	
s-CSTR (piloto) sob condições termofílicas – vinhaça de cana-de-açúcar, torta de filtro e licor detoxificado (codigestão)	<i>Miseq/Illumina</i>	Bactérias	Firmicutes (~53% **) Tenericutes (~1% **) Thermotogae (~26% **)	Petrotogales Clostridiales Thermoanaerobacterales	<i>Defluviitoga</i> (~35% **) <i>Hydrogenispora</i> (~9% **) <i>Ruminiclostridium</i> (~3% **) <i>Syntrophaceticus</i> (~0,75% **) <i>Tepidanaerobacter</i> (~0,5% **)	Volpi <i>et al.</i> (2021)
		Arqueias	Euryarchaeota (~100% **)	Methanomicrobiales (~90% **) Methanobacteriales (~10% **)	<i>Methanoculleus</i> (~90% **) <i>Methanothermobacter</i> (~10% **)	

(conclusão)

\* = Abundância relativa (%) a todos os microrganismos detectados (inclui arqueias e bactérias); \*\* = Abundância relativa (%) a cada grupo de microrganismo (arqueias ou bactérias); AFBR = *anaerobic fluidized-bed reactor*; DGGE = *denaturing gradient gel electrophoresis*; PCR = *polymerase chain reaction*; s-CSTR = *semi-continuous stirred tank reactor*; UASB = *upflow anaerobic sludge blanket*.

Fonte: Do autor (2022).

### **3.2.3 Características do substrato que influenciam no processo**

Segundo Cioabla *et al.* (2012), o sucesso da digestão anaeróbia depende de três grupos de fatores que, em sua maioria, são passíveis de controle: (1) os relativos às características do substrato (que serão tratados nesse item); (2) os relacionados às configurações do reator; e (3) os relativos à forma de digestão, sendo que esses dois últimos fatores serão discutidos no item 3.2.4.

Em complemento, a produção de biogás é influenciada pela composição bioquímica e biodegradabilidade do substrato; além disso, fatores como pH, alcalinidade, temperatura, nutrientes, sólidos e tamanho das partículas, compostos tóxicos, entre outros, causam alterações significativas na estabilidade do processo de digestão anaeróbia (ZABED *et al.*, 2020), conforme descrito a seguir.

#### **3.2.3.1 pH, alcalinidade e acidez**

As variações no pH do meio impactam de maneira significativa os microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, podendo afetar suas estruturas e, conseqüentemente, modificar seu funcionamento original, além de causar aumento na toxicidade do substrato e desequilíbrio no processo (MEYSTRE, 2007; SALOMON, 2007).

Segundo Zhang (2005, 2009), os microrganismos hidrolíticos possuem uma alta capacidade de resistência às flutuações ambientais e toxinas presentes no substrato, podendo atuar numa ampla faixa de pH (entre 4,0 e 11,0); entretanto, a faixa ótima se encontra no intervalo de 6,0-8,0. As condições de pH do meio, diferentemente da etapa de hidrólise, impactam significativamente a acidogênese, sendo que a formação de AOVs é inibida em valores de pH menores que 4,0, e o intervalo de 5,5 a 6,5 é considerado a faixa ótima (STRONACH; RUDD; LESTER, 2012; MAO *et al.*, 2015). O acúmulo de ácidos produzidos nessa etapa pode ocasionar queda do pH, desequilibrando todo o processo (PEREIRA; CAMPOS; MOTERANI, 2009). Nesse sentido, a acidez de um sistema anaeróbio se deve principalmente a presença, além de AOVs, de CO<sub>2</sub>, álcoois e H<sub>2</sub>S na fase líquida (PEREIRA; CAMPOS; MOTTERAN, 2013).

Por outro lado, a alcalinidade é uma medida relacionada à capacidade de neutralizar ácidos em função da presença de ácidos e bases no meio. Assim, expressa a capacidade de tamponamento e a resistência à acidificação. De acordo com Jenkins, Morgan e Sawyer (1983) e Ripley, Boyle e Converse (1986), a alcalinidade total de um sistema anaeróbio é composta por dois tipos de bases: alcalinidade parcial (AP) e intermediária (AI), sendo que a primeira se

deve à presença de ânions de ácidos fracos, praticamente equivalendo-se (~80%) à alcalinidade bicarbonato; enquanto a segunda é devida à presença de ânions de AOVs, correspondendo à alcalinidade de ácidos voláteis. Entretanto, a capacidade de tamponamento da AI ocorre em pH entre 3,75 e 5,75, tendo, portanto, baixa relevância na digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2016). Por essa razão, a concentração de AP deve ser superior à de AI em um sistema anaeróbio, recomendando-se razões AI/AP inferiores à 0,3 para manter a estabilidade do processo (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986; CHERNICHARO, 2016). Outra relação que pode indicar distúrbios operacionais em reatores anaeróbios é a razão entre teores de AOVs e alcalinidade total (AOV/AT), devendo ser preferencialmente mantida abaixo de 0,4 (LI *et al.*, 2014; ISSAH; KABERA, 2021). Todavia, devido às variações de cada tipo de água residuária, sistemas anaeróbios com razões acima das indicadas podem apresentar estabilidade no tratamento (PEREIRA; CAMPOS; MOTERANI, 2009).

Em relação às bactérias acetogênicas, essas têm melhor ação em meio ácido, com pH entre 6,0 e 6,2. Em contrapartida, o metabolismo das arqueias metanogênicas é inibido em pH menor que 6,2; enquanto que em pH acima de 7,8 a inibição pode ocorrer pela liberação de NH<sub>3</sub> (GERARDI, 2003; RAMOS-SUÁREZ; ARROYO; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2015). A faixa ótima de pH se encontra entre 6,8 e 7,2 (MUN, 2012), ou seja, em ambientes com valores de pH próximos à neutralidade. Ademais, de acordo com Chernicharo (2016), o fato de as bactérias acidogênicas possuírem maior tolerância à diminuição do pH do que as arqueias metanogênicas pode impactar diretamente na estabilidade do processo de digestão anaeróbia. Em um meio com baixo valor de pH, a produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas pode continuar livremente apesar da inibição da produção de CH<sub>4</sub>, o que conseqüentemente causa o azedamento do reator anaeróbio, conforme detalhado no item 3.2.2 (THAUER *et al.*, 2008; CHERNICHARO, 2016).

Como observado, para cada grupo de microrganismos existe uma faixa ótima de pH visando a máxima eficiência na biodegradação do substrato e a produção final do biogás. Entretanto, considerando um único reator anaeróbio responsável por todas as etapas do processo, conhecido por reator de estágio único (ao qual será descrito posteriormente no item 3.2.4), o pH ideal se encontra entre 6,5 e 7,5 (CAMPOS *et al.*, 2006; HADDAD; FAWAZ, 2013; RINCÓN-MEJÍA; HERAS, 2017). A alcalinidade bicarbonato recomendada, por sua vez, é de 2.500 a 5.000 mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, representando concentrações suficientes para se obter um tamponamento adequado de sistemas anaeróbios (TAUSEEF; ABBASI; ABBASI, 2013). Em

contrapartida, concentrações de AOVs acima de 2.000 mgHAc L<sup>-1</sup> podem causar inibição da microbiota metanogênica (GRADY JUNIOR *et al.*, 2011).

### 3.2.3.2 Temperatura

Os microrganismos, segundo Pinheiro e Polizeli (2021), não possuem meios de controlar sua temperatura interna e, dessa forma, a temperatura no interior da célula é determinada pelo ambiente externo, ou seja, pela temperatura do meio em que estão inseridos. De acordo com Van *et al.* (2020), além de ser um importante fator de seleção dos grupos microbianos presentes no interior de um reator anaeróbio e impactar na taxa de digestão, a temperatura também influencia no estado do substrato, como a solubilidade, a taxa metabólica e o equilíbrio iônico.

Os organismos responsáveis pela digestão anaeróbia podem ser classificados de acordo com as condições dessa variável, sendo: (1) psicrófilos, que vivem sob temperaturas entre 4 e 15 °C; (2) mesófilos, vivendo entre 20 e 40 °C; e (3) termófilos, sob o intervalo de temperaturas entre 45 e 70 °C (EL-MASHAD *et al.*, 2004). Em cada uma dessas faixas existem as temperaturas mínima e máxima, que definem os limites nos quais o crescimento microbiano é possível; e uma temperatura ótima, na qual o crescimento é máximo (CHERNICHARO, 2016). De acordo com Hubert *et al.* (2019), os níveis ótimos de temperatura associados à digestão anaeróbia ocorrem entre: 30 a 35 °C, para a faixa mesofílica; e entre 50 a 55 °C, para a faixa termofílica.

Geralmente, o aumento da temperatura do meio causa um aumento nas taxas de reação de maneira significativa. Condições termofílicas incrementam a geração de biogás devido ao aumento na eficiência da etapa de hidrólise enzimática e na taxa de crescimento de microrganismos metanogênicos, assim, o tempo de detenção hidráulica pode ser reduzido (GONZALEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2015). Kiani, Parsaee e Mahdavifar (2021), em estudo sobre o processamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar, evidenciaram uma produção de CH<sub>4</sub> até 44,4% superior sob condições termofílicas em relação às faixas mesofílicas de operação.

Entretanto, os organismos mesófilos são mais resistentes às mudanças ambientais; nesse contexto, a operação de um reator anaeróbio submetido às condições termofílicas requer técnicas operacionais mais complexas para o funcionamento adequado (CHERNICHARO, 2016). Um exemplo desse requisito de maior complexidade está na oscilação máxima de temperatura suportada pelos microrganismos do processo, sendo inferior a 1 C° por dia para termófilos; e para mesófilos, 2 a 3 C° d<sup>-1</sup> (GERARDI, 2003).

### 3.2.3.3 Nutrientes

A quantidade de nutrientes necessários à comunidade microbiana da digestão anaeróbia é estabelecida a partir da concentração desses mesmos nutrientes nas células desses microrganismos, sendo sua falta ou excesso fatores limitantes ao crescimento microbiano, impactando diretamente na eficiência do tratamento anaeróbio (GABARDO, 2016).

As principais formas disponíveis de nitrogênio para os microrganismos são o nitrogênio amoniacal e o nitrogênio orgânico, sendo que as formas oxidadas (nitrito e nitrato), em condições anaeróbias, não se encontram disponíveis devido à redução desses compostos a  $N_2$  e a subsequente liberação na atmosfera. Em relação às fontes disponíveis de fósforo, a maioria dos microrganismos é capaz de utilizar o elemento na forma de ortofosfatos inorgânicos (ZOPPAS *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2019).

A literatura sugere diferentes relações ótimas entre o conteúdo de nitrogênio total (N), fósforo total (P) e matéria orgânica presente no substrato. Para Souza (1984), o substrato deve conter concentrações de fósforo disponível ( $P_{disp}$ ) e nitrogênio amoniacal ( $N-NH_4^+$ ) que satisfaçam as seguintes razões quanto ao seu conteúdo de carbono orgânico (C):  $C/P_{disp} \leq 150$  e  $C/N-NH_4^+ \leq 30$ . Por outro lado, outro método de análise é pela relação DQO/N/P, cujo valor ideal, de acordo com Annachhatre (1996), é de 300/5/1 durante a fase de partida do reator anaeróbio. Para a fase operacional, 500/5/1 é um valor suficiente para atender aos requisitos macronutricionais dos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia (SPEECE, 1996). Lettinga, Hulshof Pol e Zeeman (1996) por outro lado, recomendam relações que variam em função do coeficiente de produção celular, sendo: DQO/N/P e C/N/P de 1000/5/1 e 330/5/1, respectivamente, para biomassas com coeficiente de produção celular de aproximadamente  $0,05 \text{ gSSV gDQO}^{-1}$ ; e DQO/N/P de 350/5/1 e C/N/P de 130/5/1 para biomassas com elevado coeficiente de produção ( $0,15 \text{ gSSV gDQO}^{-1}$ ).

Para propiciar uma adequada relação entre nutrientes e material orgânico, pode-se também realizar a codigestão, que consiste na mistura de duas ou mais águas residuárias com características complementares. Esta é uma técnica que pode contribuir na suplementação nutricional e na adição de material orgânico com maior potencial de biodegradabilidade, propiciando uma adequação no balanceamento da relação C/N/P presente no líquido resultante da mistura que, por consequência, será mais eficientemente degradado em um reator anaeróbio devido a otimização do processo de digestão (LOPES; LEITE; PRASAD, 2004; NARTKER *et al.*, 2014). Borges *et al.* (2021), por exemplo, estudaram a codigestão entre vinhaça de cana-de-

açúcar e glicerina bidestilada em ensaios de biodegradabilidade anaeróbia, reportando aumento de até 39% na produção de CH<sub>4</sub> se comparado à monodigestão de vinhaça.

Além do nitrogênio e do fósforo como representantes dos macronutrientes necessários ao processo, o enxofre, potássio, sódio, cálcio e magnésio também são considerados essenciais. As faixas de concentração consideradas ideais à digestão anaeróbia são: potássio (200-400 mg L<sup>-1</sup>); sódio e cálcio (100-200 mg L<sup>-1</sup>); e magnésio (75-150 mg L<sup>-1</sup>) (ZUPANČIČ; GRILC, 2012). A concentração ideal de enxofre, por outro lado, deve ser igual ou levemente inferior à de fósforo (MALINA; POHLAND, 1992). As principais fontes de enxofre para os microrganismos são os sulfetos, como H<sub>2</sub>S e íon sulfídrico (HS<sup>-</sup>), que são necessários para a síntese de proteínas, embora alguns organismos possam utilizar cisteína como fonte desse nutriente (CHERNICHARO, 2016).

Em relação aos micronutrientes, esses são considerados estimulantes ao processo de biodigestão anaeróbia, atuando em importantes atividades enzimáticas (SALOMON, 2007): zinco (Zn), ferro (Fe), cobre (Cu), cobalto (Co), níquel (Ni) e selênio (Se) são exemplos de micronutrientes essenciais ao processo (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2010). Janke *et al.* (2016), por exemplo, investigaram a adição de ureia e elementos-traço em vinhaça de cana-de-açúcar submetida à tratamento anaeróbio em reator UASB de escala laboratorial, elevando a taxa de produção de CH<sub>4</sub> em 79% após a adição da solução nutricional.

A maior parte das águas residuárias possui quantidades suficientes de nutrientes requeridas para o crescimento dos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, sendo considerado frequentemente apenas a concentração de nitrogênio e de fósforo como base para a avaliação nutricional da água residuária. Entretanto, dependendo das características do substrato, a suplementação mineral se faz necessária, pois a presença de concentrações adequadas de macro e micronutrientes é essencial para que o processo ocorra de maneira estável e equilibrada (SPEECE; PARKIN, 1987).

Os esgotos sanitários, por exemplo, geralmente apresentam concentrações de N, P e outros nutrientes em valores suficientes para o crescimento de microrganismos, não havendo limitações nutricionais para a realização da digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2016). Por outro lado, as águas residuárias industriais, dada a variedade e especificidade de sua composição, podem requerer suplementação nutricional para que o processo de degradação seja otimizado em um reator anaeróbio (CHERNICHARO, 2016). Águas residuárias agroindustriais como a vinhaça de cana-de-açúcar, por exemplo, geralmente possuem concentrações de matéria orgânica e nutrientes inadequadas para o processamento anaeróbio, evidenciando a necessidade

de suplementação nutricional ou outras estratégias que adequem o balanceamento entre carbono e nutrientes (BARROS *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2022). Nesse aspecto, Barros, Duda e Oliveira (2016) avaliaram a relação DQO/N/P de vinhaça de cana-de-açúcar e obtiveram um valor de 725,8/7,58/1, não correspondendo à relação recomendada de 300-500/5/1 (ANNACHHATRE, 1996; SPEECE, 1996). Paralelamente, Janke *et al.* (2016) mensuraram relações C/N/P de 307,7/20,7/1 e 83,6/7,5/1 para duas amostras de vinhaça de cana-de-açúcar, cujos valores estão em desacordo com a recomendação de 130-330/5/1 (LETTINGA; HULSHOF POL; ZEEMAN, 1996).

#### 3.2.3.4 Concentração e granulometria de sólidos

A presença de grandes quantidades de materiais sólidos no substrato pode dificultar a hidrólise desses compostos, proporcionando elevação no tempo de detenção hidráulica do sistema anaeróbio devido a maior resistência à solubilização completa da matéria orgânica (ELLACURIAGA *et al.*, 2021). González-Fernandéz *et al.* (2012), ao trabalharem com substrato particulado, citam que a fase de hidrólise determina o sucesso da produção de CH<sub>4</sub> e, dessa forma, em substratos facilmente hidrolisáveis, a metanogênese é considerada a fase limitante.

De acordo com Halalsheh *et al.* (2011), quanto maior a área superficial das partículas sólidas biodegradáveis em suspensão no substrato, mais eficiente é o contato entre o microrganismo e a matéria orgânica, conduzindo a um aumento considerável na eficiência da digestão anaeróbia. Nesse sentido, existem diversos métodos físicos de pré-tratamento visando o aumento da biodegradabilidade anaeróbia de substratos a partir da redução da granulometria e do aumento de área superficial de partículas sólidas da água residuária (CESARO; BELGIORNO, 2014). Esses métodos são divididos em: métodos mecânicos, com a utilização, por exemplo, de moinho de bolas (PENGYU *et al.*, 2017; AMIN *et al.*, 2017); métodos térmicos (KUO; CHENG, 2007); irradiação por micro-ondas (MARIN; KENNEDY; ESKICIOGLU, 2010); e ultrassom (YU *et al.*, 2009). Em reatores anaeróbios, as partículas sólidas são removidas do efluente após passarem por processos como adsorção, sedimentação ou adesão ao leito do lodo (ELMITWALLI *et al.*, 2001).

Em contrapartida, ainda que a biodegradabilidade do material sólido seja um importante aspecto a ser considerado na remoção de matéria orgânica e na produtividade de CH<sub>4</sub>, pesquisas mostram que a adição de sólidos inertes em biorreatores anaeróbios pode propiciar maior disponibilidade de área superficial aos microrganismos e auxiliar na formação de biofilme sobre



essas superfícies e, por consequência, aumentar o tempo de retenção dos sólidos do sistema, o que pode elevar a eficiência do tratamento anaeróbio e reduzir o período de adaptação (ou *start-up*) (ARIF; LIAQUAT; ADIL, 2018; BAEK; KIM; LOGAN, 2021).

### 3.2.3.5 Compostos tóxicos

Dependendo da concentração em que se encontra, uma substância pode ser benéfica ou tóxica aos organismos. Segundo Chen *et al.* (2014), qualquer composto presente em concentrações acima das suportadas pelos microrganismos em um reator anaeróbio pode ser considerado tóxico. Entretanto, essa toxicidade pode ser evitada por mecanismos como a formação de complexos insolúveis, precipitação, utilização de complexos antagônicos e adaptação pelos microrganismos (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008). Alguns compostos que podem ser frequentemente citados como causadores de toxicidade em reatores anaeróbios são:

a) Sulfetos: a degradação, em reatores anaeróbios, de proteínas presentes no substrato e a redução de sulfatos e outros compostos orgânicos contendo enxofre resultam em sulfetos, principalmente  $H_2S$  (forma não dissociada e mais tóxica) e  $HS^-$  (forma dissociada e menos tóxica) (YAN *et al.*, 2018). O  $H_2S$  pode estar presente na forma gasosa, que é removida da água residuária após o tratamento, ou dissolvida na fase líquida, sendo que quanto maior a produção de  $CH_4$  pelo reator em função do aumento de DQO no líquido afluente, maior a quantidade de  $H_2S$  produzido na forma gasosa e, conseqüentemente, maior a sua incorporação ao biogás (CHERNICHARO, 2016). Segundo o mesmo autor, uma relação  $DQO/SO_4^{2-}$  (DQO por íon sulfato) maior que 10 é considerada ideal para que não ocorra toxicidade por  $H_2S$  dissolvido, sendo que concentrações acima de  $200 \text{ mgH}_2\text{S L}^{-1}$  passam a ser inibidoras do processo de digestão anaeróbia. A vinhaça de cana-de-açúcar é, geralmente, uma água residuária rica em sulfatos devido à adição de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) em algumas etapas da fabricação de etanol – com o objetivo de prevenir a contaminação por microrganismos e a floculação de leveduras –, além da aplicação de melaço ao caldo de cana-de-açúcar para produção do mosto em algumas biorrefinarias (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017). A relação  $DQO/SO_4^{2-}$  da vinhaça pode variar de 9,0 a 93,9, dependendo da concentração de melaço no mosto e da utilização de  $H_2SO_4$  durante o processo de fabricação do etanol de cana-de-açúcar (SILVA *et al.*, 2020);

b) Compostos fenólicos: em relação aos substratos que contenham em sua composição química compostos fenólicos, a inibição dos microrganismos anaeróbios ocorre em concentrações acima de  $700 \text{ mg L}^{-1}$  (NEUFELD; MACK; STRAKEY, 1980). Além disso, de acordo com os mesmos

autores, a digestão anaeróbia de fenóis é efetiva em lodos com tempo de residência celular superior a 40 dias. Uma estratégia para evitar a inibição causada pela presença dos fenóis é a aclimação do inóculo ao substrato (GONÇALVES *et al.*, 2012). A concentração de fenóis na vinhaça de cana-de-açúcar pode variar dependendo de fatores como o tipo de mosto utilizado durante a fabricação de etanol, a eficiência das etapas de fermentação do caldo e destilação do vinho e o tempo de maturação da cana-de-açúcar (PAZ-PINO; BARBA-HO; MARRIAGA-CABRALES, 2014). A faixa média de concentração de compostos fenólicos fica em torno de 450-469 mg L<sup>-1</sup> nessa água residuária (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019), o que está abaixo da concentração inibidora para a digestão anaeróbia (700 mg L<sup>-1</sup>, segundo Neufeld, Mack e Strakey (1980)); entretanto, estratégias operacionais (por exemplo, recirculação do efluente e codigestão) podem ser aplicadas ao biorreator no sentido de diminuir a concentração de fenóis e, assim, otimizar o processamento anaeróbio da vinhaça;

c) Sais: outra possível fonte de toxicidade está associada à concentração de sais no substrato, sendo associada à valência do íon positivo (cátion) da substância (SOARES; FEIDEN; TAVARES, 2017). Zupančič e Grilc (2012) relatam as seguintes concentrações de sais que causam, respectivamente, inibição moderada e severa da microbiota anaeróbia: sódio (Na<sup>+</sup>) (3.500-5.500 e 16.000 mg L<sup>-1</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) (3.500-4.500 e 12.000 mg L<sup>-1</sup>), cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (2.500-4.500 e 8.000 mg L<sup>-1</sup>) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>) (1.000-1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>). Em comparação, as concentrações de sais na vinhaça de cana-de-açúcar podem chegar a 3.820, 7.830, 5.180 e 1.529 mg L<sup>-1</sup> de, respectivamente, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019). Logo, a vinhaça pode provocar inibição moderada dos microrganismos dependendo da concentração de sais e, desse modo, impactar negativamente o desempenho da digestão anaeróbia. Novamente, a aplicação de estratégias operacionais como as citadas no item 3.2.3.5.b podem beneficiar a efetividade do tratamento;

d) Nitrogênio amoniacal: NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, resultantes da hidrólise de águas residuárias ricas em proteínas e ureia, geralmente são benéficas a um reator anaeróbio por servirem como fonte nutricional para os microrganismos e como tampão para as variações de pH no sistema (CHERNICHARO, 2016). Entretanto, concentrações acima de 150 e 3.000 mg L<sup>-1</sup> de, respectivamente, NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, são tóxicas à comunidade metanogênica (CHERNICHARO, 2016). A vinhaça de cana-de-açúcar geralmente apresenta concentrações de nitrogênio amoniacal inferiores – até 45 mg L<sup>-1</sup>, de acordo com Parsaee, Kiani e Karimi (2019);

e) Oxigênio: O<sub>2</sub> é considerado um composto tóxico, mesmo em baixas concentrações, às bactérias fermentativas acidogênicas e às arqueias metanogênicas, por serem estritamente anaeróbias (GERARDI, 2003; RAMOS-SUÁREZ; ARROYO; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2015);

f) Outras substâncias: os elementos Zn, Cu, Cd e Fe possuem limites de concentração de 163, 170, 180 e 2.600 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para que ocorra inibição do processo de digestão anaeróbia (LAWRENCE; McCARTY, 1965). Outras toxinas inorgânicas altamente tóxicas à microbiota anaeróbia são: cromo (Cr) e cromatos, mercúrio (Hg), arsênio (As) e cianeto (XU; ZHENG, 2021). Todos os compostos citados se apresentam geralmente em concentrações consideravelmente inferiores na vinhaça de cana-de-açúcar (MORAN-SALAZAR *et al.*, 2016). No que diz respeito ao controle da toxicidade por metais pesados em águas residuárias, um dos métodos mais eficazes é a adição de quantidade suficientes de sulfetos ou carbonatos para que ocorra a precipitação dos compostos metálicos formados, sendo essa uma alternativa adequada a ser adotada no tratamento anaeróbio de águas residuárias industriais ricas em metais pesados (POHL, 2020).

### 3.2.4 Configurações de sistemas anaeróbios

No tratamento anaeróbio busca-se, por meio de biorreatores, acelerar as reações de digestão anaeróbia do substrato, a partir do estabelecimento de condições favoráveis para o crescimento e manutenção de biomassa ativa no reator (CAMPOS; SALÉH; CARMO, 2005; SARKER *et al.*, 2019). Segundo Pereira, Campos e Moterani (2009), é necessário garantir, através do projeto do reator e suas condições operacionais, uma grande quantidade de microrganismos ativos atuando no interior do reator, visando um contato intenso entre a biomassa e o substrato a ser degradado. Portanto, os reatores anaeróbios são ambientes onde os fatores de crescimento, como os citados no item 3.2.3, e as condições de operação são controlados de modo a permitir que uma ou mais etapas da digestão anaeróbia ocorram (GERARDI, 2003; CHERNICHARO, 2016).

Os reatores anaeróbios, em geral, apresentam vantagens como um baixo custo de implantação e de operação, não demandando a instalação de equipamentos sofisticados; e um consumo energético reduzido, sendo que os gastos com energia elétrica se devem apenas ao bombeamento hidráulico da água residuária, além dos principais benefícios do tratamento anaeróbio, que são a redução do potencial poluidor das águas residuárias e a produção de

biogás. As desvantagens, em contrapartida, incluem a possibilidade de emissão de maus odores, a baixa capacidade do sistema em tolerar cargas tóxicas, um elevado intervalo de tempo para a partida do sistema, que varia de 4 a 6 meses sem a utilização de inóculo, podendo ser reduzido para 2 a 3 semanas ao utilizar pequenas quantidades de biomassa ativa providas de outros sistemas de tratamento anaeróbio. Além disso, pode haver uma necessidade de pós-tratamento após a passagem por esses sistemas, dependendo da destinação dada ao efluente tratado (GHANGREKAR; BEHERA, 2014; CHERNICHARO, 2016).

De acordo com Chernicharo (2016) e Van Dinh *et al.* (2020), o projeto de um reator anaeróbio e suas condições operacionais são caracterizadas por dois parâmetros: o tempo de detenção hidráulica (TDH) e a carga orgânica volumétrica (COV). O TDH é definido como o tempo médio em que o substrato é mantido no reator, sendo quantificado pela Equação 4. A COV é definida como a quantidade (ou massa) de matéria orgânica aplicada diariamente ao reator, por unidade de volume do mesmo, expressa pela Equação 5. Outro parâmetro utilizado no projeto de reatores anaeróbios é a carga hidráulica volumétrica (CHV), que é obtida pelo inverso do valor do TDH, conforme Equação 6.

$$TDH = V / Q \quad (4)$$

$$COV = S_0 / TDH \quad (5)$$

$$CHV = 1 / TDH = Q / V \quad (6)$$

onde,

TDH = tempo de detenção hidráulica (d);

V = volume total do reator (m<sup>3</sup>);

Q = vazão volumétrica (m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>);

COV = carga orgânica volumétrica (kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>);

S<sub>0</sub> = concentração de DQO do substrato afluente (kgDQO m<sup>-3</sup>);

CHV = carga hidráulica volumétrica (m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>).

Os sistemas anaeróbios podem ser classificados quanto à capacidade de retenção de biomassa ativa em dois grupos: sistemas de alta taxa e sistemas convencionais. Os sistemas de alta taxa se caracterizam pela capacidade de reter grandes quantidades de biomassa com elevada atividade, mesmo com a aplicação de um TDH reduzido e, conseqüentemente, uma CHV elevada, permitindo assim manter um maior tempo de retenção celular. Como resultado, é viabilizada a utilização de um volume menor de reator (sistema compacto) e,

consequentemente, uma menor área de instalação se comparado aos sistemas anaeróbios convencionais. Esses fatores possibilitam o tratamento de águas residuárias com maiores concentrações de matéria orgânica e a aplicação de elevadas COVs. Ademais, os sistemas de alta taxa permitem a manutenção de um elevado grau de estabilização do lodo excedente e uma boa desidratabilidade dessa biomassa. Paralelamente, sistemas convencionais devem ser operados com uma baixa COV, uma vez que não dispõem de mecanismos que permitem a retenção de grandes quantidades de biomassa com elevada atividade, necessitando, por consequência, de grandes volumes de capacidade para que a biodegradação anaeróbia seja viabilizada (GHANGREKAR; BEHERA, 2014; CHERNICHARO, 2016).

Além da classificação quanto à capacidade de retenção de biomassa, existem dois tipos de configuração relativos ao crescimento e sustentação da biomassa ativa em sistemas anaeróbios. São eles: crescimento aderido e crescimento disperso. No crescimento aderido, a biomassa cresce em torno de um meio suporte, formando um biofilme. Esse meio suporte pode ser um meio sólido natural (pedras, solo, areia) ou artificial (plástico, borracha), ou ainda ser constituído pela própria biomassa aglomerada, formando grânulos. Por sua vez, no crescimento disperso ocorre o desenvolvimento da biomassa de forma livre e dispersa no líquido, sem a presença de uma estrutura de sustentação e formação de biofilme (VON SPERLING, 2014; GHANGREKAR; BEHERA, 2014).

A seguir, será descrita uma configuração de biorreator amplamente utilizada para o tratamento anaeróbio de águas residuárias (item 3.2.4.1) e, posteriormente, será abordado um tópico sobre as possíveis modificações estratégicas visando otimizar a digestão anaeróbia em biorreatores (item 3.2.4.2).

#### **3.2.4.1 Reator UASB**

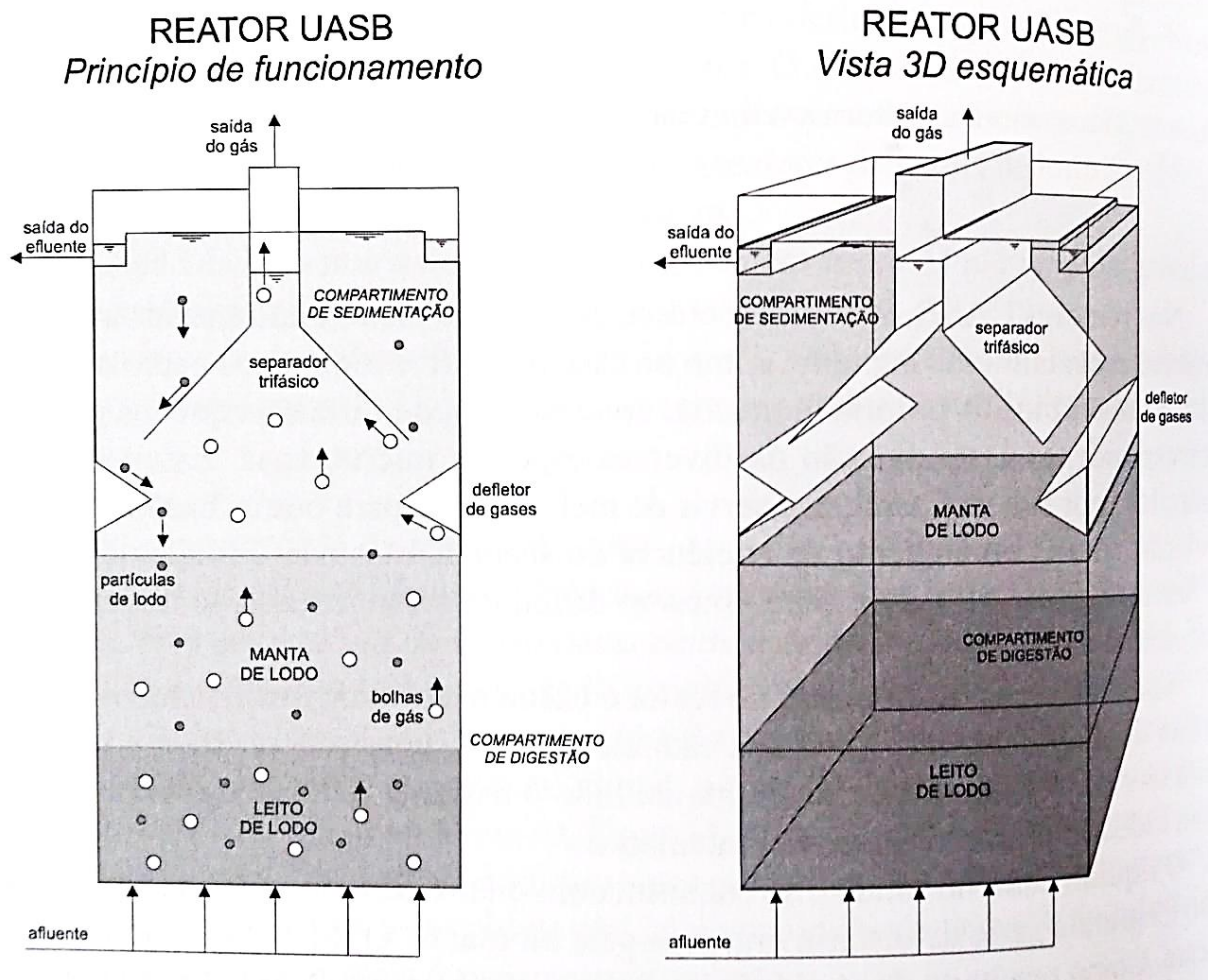
O reator do tipo *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), também conhecido no Brasil como Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA) ou Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (RAFAMAL), foi desenvolvido no final dos anos 1970 nos Países Baixos, a partir de uma modificação de um digestor anaeróbio de alta taxa (LETTINGA *et al.*, 1980). O funcionamento desse reator, segundo von Sperling (2014), se dá pelo crescimento disperso de biomassa com elevada atividade no meio. A concentração dessa biomassa é bastante alta, por isso a denominação manta de lodo. Além disso, a alta concentração de lodo faz com que o volume requerido pelo reator UASB seja bastante reduzido em comparação aos outros tipos de tratamento. O perfil de sólidos no interior do reator varia de muito denso e granular,

sendo que essas partículas formam o leito de lodo no fundo do reator por sedimentação, até uma biomassa menos densa e dispersa, mais próxima ao topo do reator, que compõe a manta de lodo (CHERNICHARO, 2016).

De acordo com von Sperling (2014), o líquido a ser tratado entra pela parte inferior do reator, mantendo um fluxo ascendente, ocorrendo assim o contato do líquido com a manta de lodo e a consequente adsorção de grande parte da matéria orgânica pela biomassa. Pela atividade anaeróbia, ocorre a degradação da matéria orgânica do substrato e, conseqüentemente, a formação de bolhas de biogás, que também apresentam um fluxo ascendente. A mistura do lodo no interior do reator é realizada geralmente pela velocidade ascendente da água residuária e do biogás. O líquido digerido deixa o sistema através de um decantador interno localizado na parte superior do reator (AZIZ *et al.*, 2019).

Com o objetivo de reter a biomassa no sistema, impedindo sua saída do sistema junto ao efluente, é instalado acima da manta de lodo um separador trifásico, que permite o acúmulo e coleta de biogás e a separação e retorno dos sólidos (biomassa) à câmara de digestão. Esse dispositivo possibilita, além das funções supracitadas, que o tempo de retenção celular se mantenha elevado, reduzindo consideravelmente o TDH, que varia entre 6 e 10 horas no caso de tratamento de esgoto sanitário (VON SPERLING, 2014). Na Figura 3, os componentes principais de um biorreator anaeróbio do tipo UASB são esquematizados.

Figura 3 – Esquema representativo de um reator UASB e seus componentes principais.



Fonte: von Sperling (2014), p. 312.

A utilização desse biorreator no tratamento de águas residuárias domésticas ou industriais apresenta vantagens como: é um sistema compacto, apresentando baixa demanda de área; possui uma satisfatória eficiência na remoção de DQO e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (entre 65 e 75%); permite a coleta e armazenamento de biogás; pode ser reiniciado rapidamente, mesmo após longos períodos de paralisação; e é adequado para o tratamento tanto de águas residuárias industriais, ao qual foi inicialmente concebido, quanto de águas residuárias de baixa concentração, como esgotos domésticos. Apesar dos benefícios, o reator UASB apresenta inabilidade de operar no tratamento de águas residuárias com elevadas concentrações de partículas suspensas e coloidais específicas, como celulose, proteínas e gorduras (CHERNICHARO, 2016; AZIZ *et al.*, 2019).

Para o tratamento de esgoto sanitário, a CHV de um reator UASB não deve ultrapassar o valor de  $5,0 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , o equivalente a um TDH de 4,8 horas. Valores maiores de CHV (ou

menores de TDH) podem trazer prejuízos ao funcionamento do sistema. A perda de biomassa do sistema por arraste do lodo com o efluente, a redução da idade do lodo e, conseqüentemente, redução do grau de estabilização de sólidos, além da possibilidade de falha no sistema, fatores que ocorrem devido ao tempo de crescimento da biomassa poder ser menor que a idade do lodo, são alguns exemplos de prejuízos causados por valores excessivos de CHV (CHERNICHARO, 2016).

Ademais, a COV recomendada para reatores anaeróbios de alta taxa é de 1,6-4,8 kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (RITTMANN; McCARTY, 2012), podendo variar dependendo do tipo de substrato e configurações do reator (ZABED *et al.*, 2020). Entretanto, segundo Chernicharo (2016), no caso de águas residuárias industriais com elevadas concentrações de matéria orgânica, há relatos na literatura de reatores UASB funcionando com êxito com a aplicação de COVs na ordem de 45 kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Del Nery *et al.* (2018), tratando vinhaça de cana-de-açúcar sob condições mesofílicas (22 °C) e variando a COV entre 0,5 e 32,4 kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, relataram uma produção máxima de CH<sub>4</sub> em COV de 32,27 kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, por meio de tratamento em reator UASB em escala piloto e aplicando recirculação ao efluente tratado, atingindo eficiências de remoção de DQO de até 87,5%.

É importante ressaltar que o uso de reator UASB para o tratamento de esgotos domésticos requer adaptações em relação às suas configurações. O dimensionamento, nesse caso, é feito pelo critério de CHV, e não pela COV. Isso porque velocidades ascendentes excessivas nos compartimentos de digestão e decantação resultam na perda de biomassa do sistema, reduzindo a estabilidade do processo. Por conseqüência, a altura do reator deve ser reduzida e sua área transversal aumentada, garantindo assim velocidades ascendentes dentro da faixa média adequada (0,5 a 0,7 m h<sup>-1</sup>) (CHERNICHARO, 2016).

#### **3.2.4.2 Modificações operacionais de sistemas anaeróbios**

Existem diversas estratégias operacionais visando melhorias de desempenho em um reator anaeróbio. Alguns exemplos são: condições termofílicas de operação (SCHULTZ; PINHEIRO; SILVA, 2018), digestão multiestágio (FU *et al.*, 2017) e recirculação do efluente (LUKITAWESA *et al.*, 2018), os quais serão descritos a seguir:

a) Condições termofílicas:



Conforme explicado no item 3.2.3.2, a elevação da temperatura no interior dos reatores anaeróbios para a faixa termofílica (entre 45 e 70 °C) promove um aumento nas taxas de reação de hidrólise e metanogênese, melhorando a performance do tratamento e, conseqüentemente, a produção de CH<sub>4</sub> (GONZALEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2015).

Entretanto, de acordo com Chernicharo (2016), os microrganismos termofílicos são mais sensíveis às variações de temperatura, o que pode acarretar falha no processo em casos de alterações ambientais. Outro ponto a ser destacado é que, sob condições de altas temperaturas, a baixa viscosidade do lodo pode resultar em agregados menos estáveis, dificultando a separação entre a interface sólido-líquido durante o tratamento, (VAN LIER; REBAC, LETTINGA, 1997). Além disso, há um maior consumo de energia elétrica pelo sistema de tratamento devido a utilização de resistor para o aquecimento e a manutenção da temperatura do meio líquido em faixas termofílicas.

Demais detalhes sobre a aplicação de condições termofílicas como estratégia de otimização do processo de digestão anaeróbia estão descritos no item 3.2.3.2;

#### b) Digestão multiestágio:

Em um tratamento anaeróbio comum, apenas um reator é responsável por todas as etapas do processo de digestão anaeróbia. Entretanto, como cada etapa possui diferentes condições ambientais ótimas de funcionamento, conforme detalhado no item 3.2.3, a separação física das etapas em mais de um reator, técnica conhecida como digestão multiestágio, pode otimizar o processo e elevar a performance de tratamento (VAN DINH *et al.*, 2020).

Os sistemas multiestágios podem ser de dois ou três estágios. Um sistema de dois estágios é composto por dois reatores individuais, em que o primeiro é responsável pelas etapas de hidrólise e acidogênese, e o segundo pela acetogênese e metanogênese. De modo mais complexo, um sistema de três estágios, segundo os mesmos autores, é composto por três reatores, onde o primeiro realiza hidrólise completa e inicia a acidogênese, o segundo finaliza a acidogênese e inicia a acetogênese, e o último completa a acetogênese e realiza a metanogênese. Apesar da complexidade, um sistema de mais de dois estágios, embora otimize o processo de digestão do substrato, não se mostra mais eficiente no tratamento e na produção de CH<sub>4</sub>, podendo ser mais indicado para obtenção de outros subprodutos de interesse oriundos da digestão, como AOVs para produção de bioplásticos, por exemplo (ATAZOY *et al.*, 2018; VAN DINH *et al.*, 2020).

Ferraz Júnior *et al.* (2016) compararam a digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) de estágio único paralelamente a um sistema anaeróbio de dois estágios composto por reator UASB seguido de AFBR (*Anaerobic Fluidized-Bed Reactor*), com ambos os sistemas submetidos às mesmas condições operacionais, sendo evidenciadas elevações de 25,9% da produção de CH<sub>4</sub> e 30,0% do teor desse composto no biogás para o sistema de dois estágios, apesar de a remoção de DQO não ter variado significativamente entre os dois sistemas analisados. Além disso, considerando uma mesma eficiência de remoção de DQO, reatores de dois estágios podem reduzir o TDH do sistema em até 50% se comparado a um reator de estágio único operando nas mesmas condições (DIAMANTIS; AIVASIDIS, 2007);

c) Recirculação do efluente:

Essa técnica consiste em realimentar o sistema de tratamento com a própria água residuária efluente a esse sistema, ocorrendo uma mistura do líquido afluente (água residuária bruta) com o líquido efluente (água residuária tratada). No caso de sistemas anaeróbios, o líquido que realimenta o sistema já se encontra parcialmente digerido, pois foi submetido ao processo de digestão anaeróbia ao menos uma vez. A taxa de recirculação indica a quantidade de vezes que o efluente é recirculado. Por exemplo, uma taxa de recirculação de 2:1 indica que o efluente retornou ao sistema duas vezes, para então ter sua destinação final após o tratamento.

O objetivo dessa técnica é realizar a diluição de uma água residuária bruta (afluente) com a mesma após tratamento (efluente), reduzindo assim a concentração de poluentes do líquido afluente que podem inibir o processo anaeróbio. Além disso, a técnica promove um aumento na velocidade ascendente da água residuária e uma maior mistura no interior do reator, favorecendo o transporte de massa entre os sólidos presentes na água residuária e o lodo e, com isso, o contato entre o microrganismo e o substrato, o que melhora a eficiência do sistema e contribui para a liberação de CH<sub>4</sub>. Outra vantagem da recirculação do efluente é a possibilidade de formação de lodo granular, que é mais denso, apresentando elevada capacidade de sedimentação e maior eficiência no tratamento anaeróbio (ALVES, 2015; DEL NERY *et al.*, 2018).

Del Nery *et al.* (2018) aplicaram uma taxa de recirculação de 3:1 em vinhaça submetida a tratamento anaeróbio em reator UASB, objetivando uma diminuição da quantidade de composto alcalino a ser adicionado à vinhaça bruta, composto esse necessário para manter o pH da vinhaça adequado à digestão anaeróbia. Com o mesmo objetivo, Lukitawesa *et al.* (2018)

compararam dois sistemas tratando água residuária cítrica: um reator UASB de dois estágios com recirculação do efluente e outro com a mesma configuração, porém sem recirculação. A recirculação visava a elevação do pH do afluente antes de sua injeção no sistema. Ao final do experimento, constataram uma redução nos STVs e alterações na concentração de AOVs no sistema com recirculação, o que contribuiu para um aumento na eficiência do sistema e na produção de CH<sub>4</sub>.

De modo a verificar o impacto desses e de outros procedimentos operacionais na atividade da biomassa microbiana cultivada no interior dos biorreatores, métodos *ex-situ* podem ser realizados em laboratório, tal qual o teste descrito a seguir.

### **3.2.5 Atividade metanogênica específica**

Segundo Chernicharo (2016), o sucesso de qualquer processo anaeróbio, principalmente em reatores de alta taxa, depende fundamentalmente da manutenção de uma biomassa adaptada e com elevada atividade microbiana, além de ser resistente à choques de cargas. Tendo isso em vista, faz-se necessário o monitoramento da atividade microbiana dentro de um reator anaeróbio, principalmente das arqueias metanogênicas, cujo resultado está ligado diretamente à eficiência do tratamento provido pelo sistema (SINGH *et al.*, 2019).

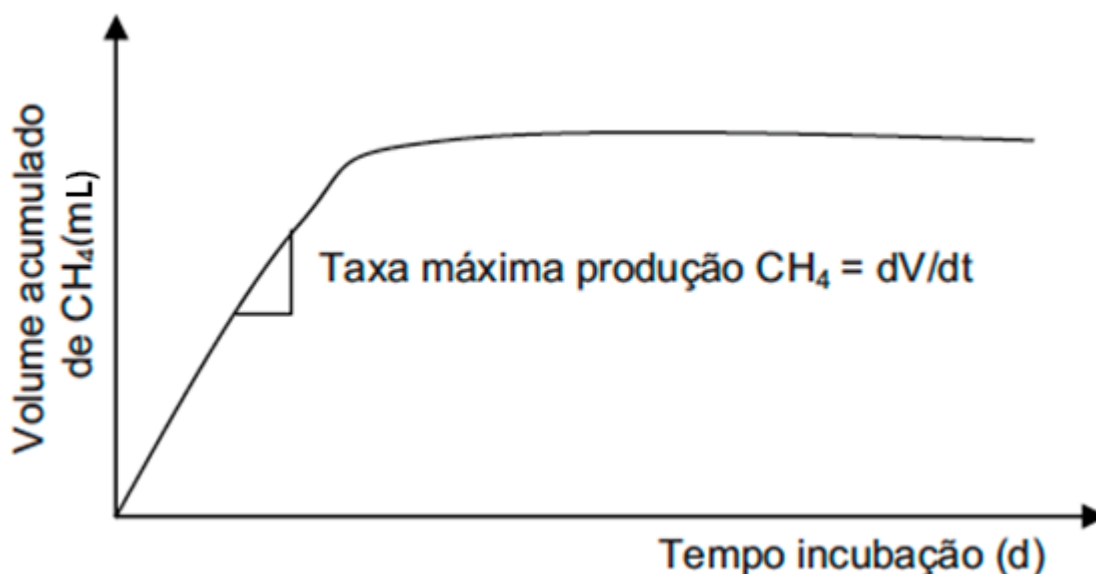
A Atividade Metanogênica Específica (AME) determina a capacidade máxima de produção de CH<sub>4</sub> de uma determinada biomassa anaeróbia, e é mensurada por meio de teste realizado em laboratório sob condições controladas, no sentido de viabilizar a máxima atividade bioquímica para conversão da matéria orgânica biodegradável a biogás mediante a utilização de substratos específicos e onde a disponibilidade destes não seja um fator limitante (AQUINO *et al.*, 2007; HUSSAIN; DUBEY, 2013). Desse modo, o teste de AME tem sido frequentemente empregado no monitoramento do desempenho de reatores anaeróbios e na avaliação do potencial da microbiota contida em seu interior de recuperar a energia química presente em substratos orgânicos na forma de CH<sub>4</sub>, permitindo o seu posterior reaproveitamento (BARROS *et al.*, 2010).

De acordo com Aquino *et al.* (2007) e Veluchamy e Kalamdhad (2017), além de ser utilizado como análise de rotina de lodos anaeróbios, o teste de AME possui outras aplicações, tais como: avaliação do comportamento da biomassa sob o efeito de compostos inibidores; determinação da toxicidade relativa de compostos presentes em águas residuárias; estabelecimento do grau de biodegradabilidade de substratos; monitoramento das mudanças de

atividade do lodo pela acumulação de materiais inertes; determinação da COV máxima a ser aplicada no sistema, ou ainda a massa mínima de lodo a ser mantida no reator para desempenho satisfatório do tratamento; e avaliação dos parâmetros cinéticos do reator.

Na prática, o teste de AME relaciona uma determinada quantidade de biomassa e de substrato, sob condições controladas, à uma produção de CH<sub>4</sub> ao longo de um período de tempo específico, sendo seu valor calculado a partir da razão entre a taxa de produtividade máxima de CH<sub>4</sub> – extraída do gráfico temporal de produção acumulada de CH<sub>4</sub>, ilustrado na Figura 4 – e a quantidade de biomassa. Obtêm-se, assim, um valor em mL de CH<sub>4</sub> por grama de sólidos totais voláteis (STV) ou sólidos suspensos voláteis (SSV) por dia, que deve ser convertido em g de DQO removida na forma de CH<sub>4</sub> por grama de STV ou SSV por dia (CAMPOS, 1999; BARROS *et al.*, 2010; CHERNICHARO, 2016). Portanto, o ensaio mede a velocidade da fase metanogênica e, associado à quantificação da biomassa, fornece o potencial metanogênico máximo de um reator operando supostamente sob condições ideais (ABREU; ARAÚJO, 2011).

Figura 4 – Determinação gráfica da taxa máxima de produção de CH<sub>4</sub>.



Fonte: Chernicharo (2016), p. 115.

As funções sigmoidais são modelos não lineares comumente utilizados para descrever a produção cumulativa de CH<sub>4</sub> na avaliação da AME de lodos anaeróbios. Essas funções não apresentam extremos (máximos e mínimos relativos), porém possuem ponto de inflexão, que é o ponto onde ocorre a taxa máxima de variação da função. Os principais modelos de regressão não-linear de funções sigmoidais estão descritos na Tabela 3. Os modelos Logístico e de Gompertz são modelos de curvas sigmoidais com três parâmetros, enquanto que Richards,

Morgan-Mercer-Flodin (MMF), Weibull e Boltzmann são modelos com quatro parâmetros (UEDA, 2003; FLORENTINO; BISCARO; PASSOS, 2010). Florentino, Biscaro e Passos (2010) avaliaram a aplicação de cada modelo sigmoidal citado acima para ajuste de dados em ensaio de AME, observando que os modelos com quatro parâmetros produziram menor soma residual dos quadrados que os modelos com três parâmetros, sendo que o modelo de Boltzmann apresentou melhor adaptação aos dados do experimento. Entretanto, é necessário pontuar que os resultados de adaptação de modelos de regressão não-linear podem variar a depender dos dados observados, não havendo um modelo ideal para todos os ensaios de AME.

Tabela 3 – Principais modelos de funções sigmoidais de crescimento e suas propriedades.

Modelo	Expressão matemática (f(t), t ≥ 0)	Restrições para os parâmetros	Derivada (f'(t))	Coordenadas do ponto de inflexão (t,f(t))
Logístico	$\frac{\alpha}{1 + \beta e^{-\gamma t}}$	$\alpha, \gamma > 0$ $\beta > 1$	$\frac{\alpha \beta \gamma e^{-\gamma t}}{(1 + \beta e^{-\gamma t})^2}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \beta$ $f(t) = \frac{\alpha}{2}$
Gompertz	$\alpha e^{-\beta e^{-\gamma t}}$	$\alpha, \gamma > 0$ $\beta > 1$	$\alpha \beta \gamma e^{-\beta e^{-\gamma t}} e^{-\gamma t}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \beta$ $f(t) = \alpha e^{-1}$
Richards	$\frac{\alpha}{(1 + \beta e^{-\gamma t})^{\frac{1}{\delta}}}$	$\alpha, \gamma, \delta > 0$ $\beta > \alpha$	$\frac{\alpha \beta \gamma M^{\frac{1}{\delta}-1} e^{-\gamma t}}{\delta (M^{1/\delta})^2}$ $M = 1 + \beta e^{-\gamma t}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \frac{\beta}{\delta}$ $f(t) = \frac{\alpha}{(1 + \delta)^{1/\delta}}$
MMF	$\frac{\beta \gamma + \alpha t^\delta}{\gamma + t^\delta}$	$0 < \beta < \alpha$ $\gamma > 0$ $\delta > 1$	$\frac{\delta \alpha t^{\delta-1} L - N \delta^{1-\delta}}{L^2}$ $N = \beta \gamma + \alpha t^\delta$ $L = \gamma + t^\delta$	$t = \left( \frac{\gamma(\delta - 1)}{\delta + 1} \right)^{\frac{1}{\delta}}$ $f(t) = \frac{\alpha(\delta - 1) + \beta(\delta + 1)}{2\delta}$
Weibull	$\alpha - (\alpha - \beta) e^{-\gamma t^\delta}$	$0 < \beta < \alpha$ $\gamma > 0$ $\delta > 1$	$\gamma \delta (\alpha - \beta) e^{-\gamma t^\delta} t^{\delta-1}$	$t = \left( \frac{\delta - 1}{\gamma \delta} \right)^{\frac{1}{\delta}}$ $f(t) = \alpha - (\alpha - \beta) e^{\frac{1-\delta}{\delta}}$
Boltzmann	$\frac{\delta}{1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}} + \alpha$	$\alpha, \beta, \gamma > 0$ $\delta < 0$ $\alpha > -\frac{\delta}{1 + e^{-\frac{\beta}{\gamma}}}$	$\frac{-\delta e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}}{\gamma \left( 1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}} \right)^2}$	$t = \beta$ $f(t) = \frac{\delta}{2} + \alpha$

Fonte: Adaptado de Florentino, Biscaro e Passos (2010).

Para avaliar a AME do lodo anaeróbio, deve-se alimentar a biomassa com substratos que favoreçam condições satisfatórias a etapa de metanogênese, utilizando-se para isso uma mistura de AOVs, normalmente acetato, propionato e butirato. Assim, o teste verifica, além da atividade dos microrganismos metanogênicos, a capacidade sintrófica entre estes e os microrganismos acetogênicos, visto que as arqueias metanogênicas necessitam da boa atividade dos organismos produtores de acetato para geração de CH<sub>4</sub>. O ensaio de AME com acetato como substrato verifica apenas a atividade das arqueias metanogênicas acetoclásticas, enquanto a utilização de propionato ou formiato permite a quantificação também da via hidrogenotrófica, possibilitando a avaliação da etapa de metanogênese como um todo. A maior AME para a via hidrogenotrófica é atribuída ao fato de que o propionato ou formiato são transformados em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, que pode ser convertido em CH<sub>4</sub> pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, ou em acetato através de bactérias homoacetogênicas e, posteriormente, em CH<sub>4</sub> pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas (AQUINO *et al.*, 2007; LOZANO *et al.*, 2009; MONCADA; SILVA, 2016; PAEZ, 2019; TSAPEKOS; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2022).

Além do substrato, é importante a utilização de uma solução nutricional contendo macro e micronutrientes – visando adequar a relação entre nutrientes e matéria orgânica –, bem como alcalinidade e agente redutor (AQUINO *et al.*, 2007). De acordo com Aquino *et al.* (2007), a solução nutricional ideal a ser utilizada no teste de AME não é um consenso na literatura, uma vez que a quantidade de nutrientes presente na amostra de lodo varia dependendo do sistema de tratamento da qual é proveniente. Nesse sentido, alguns autores sugerem, para alguns tipos de lodo – por exemplo, de estações de tratamento de esgoto sanitário –, a não necessidade de utilização de solução nutricional devido a duração reduzida do teste e a presença de nutrientes na própria amostra de lodo avaliada (DOLFING; BLOEMEN, 1985; PENNA, 1994). Pesquisas que avaliaram a AME de lodos tratando vinhaça de cana-de-açúcar não especificaram a solução nutricional utilizada para o teste – citando somente as soluções de carbono e AOVs (VADLANI; RAMACHANDRAN, 2008; BROWN *et al.*, 2019).

Ademais, é preciso garantir durante o teste um contato suficiente entre a biomassa e o substrato, e que não haja limitação de transferência de massa entre o substrato e os nutrientes. Para atingir esse objetivo, comumente os frascos de reação são incubados sob agitação constante, havendo, porém, contradições na literatura sobre a influência da agitação no resultado do teste e o tipo de agitador a ser utilizado. Em relação à temperatura do teste, a maior parte dos estudos conduzem o experimento entre 30-35 °C (AQUINO *et al.*, 2007).

Existem diferentes métodos para a medição do biogás gerado no teste de AME, os quais podem ser classificados em métodos manométricos e volumétricos, detalhados a seguir (CHERNICHARO, 2016):

- a) Métodos manométricos: são baseados na medição da pressão exercida sobre um sensor, como manômetros e membranas transdutoras de pressão, acoplado ao frasco de reação. A pressão sobre o sensor pode ser exercida tanto pelo biogás quanto por somente CH<sub>4</sub>. Através de calibração, é possível correlacionar a pressão exercida com a quantidade de biogás ou CH<sub>4</sub> presente no interior do frasco. A vantagem desses métodos está na possibilidade de acoplar esses sistemas a microcomputadores, possibilitando o monitoramento instantâneo e a automação do processo, apesar dos altos custos de aquisição e manutenção dos equipamentos;
- b) Métodos volumétricos: são baseados na medição do volume de biogás ou CH<sub>4</sub> produzido no frasco de reação. Segundo Aquino *et al.* (2007), existem três metodologias que empregam os métodos volumétricos: medição da composição volumétrica do biogás, cujo gás amostrado é submetido à análise de sua composição por cromatografia gasosa; medição direta do volume de CH<sub>4</sub>, que pode ser feito diariamente com o auxílio de uma seringa esmerilhada (que não oferece resistência ao deslocamento), devendo o biogás ser lavado com solução de soda (por exemplo, hidróxido de sódio (NaOH) 15%) com o objetivo de absorver CO<sub>2</sub>, monitorando apenas o volume de CH<sub>4</sub>; e medição do volume e composição do biogás, que inclui as duas metodologias supracitadas, com exceção do uso de solução de soda para lavagem do biogás, sendo o volume de CH<sub>4</sub> calculado a partir da porcentagem desse composto no biogás, obtida pela análise de cromatografia gasosa.

De acordo com Chernicharo (2016), os valores usuais para AME de lodo tratando esgoto sanitário estão na faixa de 0,10 a 0,40 gDQO<sub>CH<sub>4</sub></sub> gSTV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Na Tabela 4 são sumarizados dados da literatura quanto à ensaios de AME de diferentes lodos anaeróbios provindos de biorreatores.

Tabela 4 – Dados disponíveis na literatura relativos à ensaios de AME de lodos provenientes de biorreatores anaeróbios tratando diferentes águas residuárias.

Biorreator / Inóculo	Substrato	Temperatura / Agitação	Método de medição	AME	Referência
UASB – esgoto sanitário	Acetato	30 °C sem agitação	Volumétrico – medição direta (NaOH 15%)	0,21 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Rocha <i>et al.</i> (2001)
UASB – vinhaça de cana-de-açúcar	Glicose e AOVs	35 °C com agitação	Manométrico	0,20 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Vadlani e Ramachandran (2008)
UASB ( <i>start-up</i> ) – esgoto sanitário	Acetato	30 °C com agitação	Volumétrico – medição direta (NaOH 15%)	0,017 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Barros <i>et al.</i> (2010)
UASB – água residuária contendo fenol	Acetato Benzoato	30-32 °C sem agitação	Volumétrico – medição direta (NaOH 15%)	0,21 – 0,40 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 0,28 – 0,47 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Hussain e Dubey (2013)
UASB – água residuária de indústria alimentícia	AOVs	33 °C com agitação	Volumétrico – medição direta (NaOH 15%)	0,17 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Schneiders <i>et al.</i> (2013)
UASB (piloto) – esgoto sanitário	Acetato	10-35 °C com agitação	Manométrico	0,24 – 0,27 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Zhang <i>et al.</i> (2018)
UASB (piloto) – esgoto sanitário	Acetato	35 °C sem agitação	Volumétrico – cromatografia gasosa	0,26 – 0,30 gDQO <sub>CH4</sub> gSTV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Cordeiro <i>et al.</i> (2018)
UASB – água residuária de cervejaria				0,33 – 0,36 gDQO <sub>CH4</sub> gSTV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	
UASB – água residuária de indústria de couro	Glicose	35 °C com agitação	Volumétrico – medição direta (NaOH 15%)	0,27 gDQO <sub>CH4</sub> gSTV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Longaretti <i>et al.</i> (2019)
UASB – água residuária de indústria de grãos				0,27 gDQO <sub>CH4</sub> gSTV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	
UASB – água residuária de indústria de laticínios				0,10 gDQO <sub>CH4</sub> gSTV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	
UASB – esgoto sanitário de campus universitário	Acetato	30-32 °C sem agitação	Volumétrico – medição direta (NaOH 15%)	0,055 gDQO <sub>CH4</sub> gSTV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Paez (2019)
UASB (bancada) – vinhaça de cana-de-açúcar	Acetato e formiato	–	–	0,34 gDQO <sub>CH4</sub> gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Brown <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Do autor (2022).



### 3.2.6 Digestão anaeróbia da vinhaça

De acordo com Santos *et al.* (2019), o processamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar tem sido destacado como uma abordagem eficaz na mitigação dos impactos ambientais negativos decorrentes de seu manejo inadequado e na recuperação de energia renovável pela produção de biogás.

Como exemplificado no item 3.2.4, existem diversos tipos de reatores utilizados no tratamento anaeróbio de águas residuárias. Porém, a maioria dos estudos apontam que reatores UASB são adequados ao tratamento da vinhaça devido ao notável custo-benefício promovido pela simplicidade do processo e pela elevada eficiência na redução da carga orgânica, além de permitir o aproveitamento energético do biogás, que é gerado com alta produtividade (SOUZA; FUZARO; POLEGATO, 1992; VLYSSIDES *et al.*, 2010; JANKE *et al.*, 2016; FERRAZ JÚNIOR *et al.*, 2016; DEL NERY *et al.*, 2018; POVEDA, 2019; MADALENO *et al.*, 2020). Na Tabela 5 é apresentado um compilado da literatura acerca da eficiência na remoção de DQO e produção de CH<sub>4</sub> em reatores anaeróbios de diferentes configurações tratando vinhaça, enquanto na Tabela 6 compila-se estudos sobre eficiências na redução de alguns compostos químicos durante o tratamento da vinhaça nesses sistemas.

Tabela 5 – Revisão da literatura acerca da eficiência na remoção de DQO e produção de CH<sub>4</sub> em reatores anaeróbios de diferentes configurações tratando vinhaça de cana-de-açúcar.

Biorreator	Condições operacionais			Desempenho			Referência	
	Pré-tratamento	Estratégia operacional	T (°C)	COV	E <sub>DQO</sub>	γ <sub>CH<sub>4</sub></sub>		% <sub>CH<sub>4</sub></sub>
UASB (lab.)	Diluição com água desmineralizada e adição de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	–	40	24,0	75,0	217	58,0	Sánchez, Córdoba e Siñeriz (1985)
UASB (75 m <sup>3</sup> )	Adição de NaOH, ureia e H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Condições termofílicas e recirculação do efluente	55 – 57	25,0 – 30,0	71,7	222	60,0	Souza, Fuzaro e Polegato (1992)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	–	35	18,8	44,0	300	53,0	Espinosa <i>et al.</i> (1995)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> e solução de micronutrientes (Fe, Ni, Co e Mo)	–	35	21,5	58,0	290	56,0	
UASB (lab.)	–	Condições termofílicas e recirculação do efluente	45	3,4	87,5	291	73,0	Vlyssides <i>et al.</i> (2010)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> e solução de nutrientes	–	30	17,0	69,0	263	84,0	España-Gamboa <i>et al.</i> (2012)
AFBR (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> ureia e NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Recirculação do efluente	30	19,8	70,0	295	–	Siqueira, Damiano e Silva (2013)
UASB (lab.)	Adição de NaOH, ureia e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Recirculação do efluente	20 – 30	5,0 – 7,5	77,0	185	53,0	
UASB (lab.)	–	Condições termofílicas	–	–	72,6	251	58,4	Ferraz Júnior <i>et al.</i> (2016)
AFBR-UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Condições termofílicas e recirculação do efluente	55	25,0	74,6	316	75,9	
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> ureia, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e solução de nutrientes	–	40	1,4 – 9,6	–	239	–	Janke <i>et al.</i> (2016)
ASTBR (lab.)	Adição de NaOH	Sistema de dois estágios e condições termofílicas	55	25,0	73,9	301	70,0	Fuess <i>et al.</i> (2017b)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Recirculação do efluente	22	32,3	87,5	299	68,8	Del Nery <i>et al.</i> (2018)
AnSBBR (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> e ureia	Condições termofílicas	55	6,5	84,6	263	73,0	Albuquerque <i>et al.</i> (2019)
UASB (lab.)	–	Condições termofílicas e recirculação do efluente	–	–	–	50	–	
UASB (lab.)	–	Sistema de dois estágios, condições termofílicas e recirculação do efluente	55	7,6 – 12,5	–	93	–	Santana Junior, Duda e Oliveira (2019)
UASB (lab.)	Adição de ureia e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sistema de dois estágios e recirculação do efluente	Condições mesofílicas	5,8 – 12,8	40,0	420	–	Madaleno <i>et al.</i> (2020)
UHRAR (60 m <sup>3</sup> )	Adição de solução de lima e solução de nutrientes	Sistema de dois estágios, condições termofílicas e recirculação do efluente	52	60,1 – 104,0	71,0	530	51,4	Hariastuti <i>et al.</i> (2021)
AFBR (lab.)	Adição de NaOH e NaHCO <sub>3</sub>	Sistema de dois estágios	30	8,0	85,0	270	86,0	Ramos <i>et al.</i> (2021)
AFBR (lab.)	–	Sistema de dois estágios e condições termofílicas	55	–	84,0	320	84,0	
SGBR (lab.)	Adição de NaOH	–	35	4,54	34,8	2.722	–	Kiani, Parsaee e Mahdaviyar (2021)
SGBR (lab.)	–	Condições termofílicas	55	–	39,0	2.768	–	

T = temperatura do reator; COV = carga orgânica volumétrica aplicada ao reator (kgDQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>); E<sub>DQO</sub> = eficiência na remoção de DQO da vinhaça (%); γ<sub>CH<sub>4</sub></sub> = produtividade de CH<sub>4</sub> por quantidade de DQO removida (mLCH<sub>4</sub> gDQO<sub>rem</sub><sup>-1</sup>); %<sub>CH<sub>4</sub></sub> = conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás produzido (%); lab. = escala laboratorial ou de bancada.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 6 – Revisão da literatura acerca da eficiência na remoção de sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV), AOV (ácidos orgânicos voláteis), nitrogênio total *Kjeldahl* (NTK) e amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), fósforo total (P), potássio total (K), fenóis e sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) em reatores anaeróbios de diferentes configurações tratando vinhaça de cana-de-açúcar.

Condições operacionais			Eficiência máxima de remoção (%)										Referência
Biorreator	Pré-tratamento	Estratégia operacional	T (°C)	SST	SSV	AOV	NTK	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P	K	Fenóis	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
UASB (75 m <sup>3</sup> )	Adição de NaOH, ureia e H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Condições termofílicas e recirculação do efluente	55 – 57	–	–	–	–	–	–	6,7	–	97,9	Souza, Fuzaro e Polegato (1992)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> e solução de micronutrientes	–	35	–	76,0	–	–	–	–	-5,6	–	87,8	Espinosa <i>et al.</i> (1995)
UASB (lab.)	–	Condições termofílicas e recirculação do efluente	45	–	–	–	56,8	-6,0	–	–	–	98,9	Vlyssides <i>et al.</i> (2010)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> e solução nutricional	–	30	–	–	54,2	15,8	–	20,4	–	–	100	España-Gamboa <i>et al.</i> (2012)
AFBR (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> , ureia e NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Recirculação do efluente	30	–	–	–	16,5	–	60,9	0,9	–	–	Siqueira, Damiano e Silva (2013)
UASB (lab.)	Adição de NaOH, ureia e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Recirculação do efluente	20 – 30	44,9	57,0	60,4	23,4	–	25,3	12,0	–	–	Barros, Duda e Oliveira (2016)
UASB (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Recirculação do efluente	22	55,2	62,2	85,7	36,5	4,4	52,9	17,0	–	92,9	Del Nery <i>et al.</i> (2018)
UASB (lab.)	Não especificado	–	Condições mesofílicas	–	–	–	–	–	–	-19,2	49,5	–	Reis <i>et al.</i> (2019)
AnSBBR (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> e ureia	Condições termofílicas	55	47,9	48,7	90,5	–	–	–	–	–	–	Albuquerque <i>et al.</i> (2019)
UASB (lab.)	–	Sistema de dois estágios, condições termofílicas e recirculação do efluente	55	–	–	–	37,0	–	56,0	–	–	–	Santana Junior, Duda e Oliveira (2019)
2S-AnMBR (lab.)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Sistema de dois estágios	22	–	–	–	–	–	–	2,7	–	44,5	Silva <i>et al.</i> (2020)
UASB (lab.)	Diluição com água potável	Condições termofílicas	55 65	– –	– –	– –	– –	– –	10,3 7,8	– –	11,0 5,5	24,4 18,7	Contreras-Contreras <i>et al.</i> (2020)
AFBR (lab.)	Adição de NaOH e NaHCO <sub>3</sub>	Sistema de dois estágios e condições termofílicas	55	–	–	–	–	–	–	–	–	100	Ramos <i>et al.</i> (2021)
SGBR (lab.)	Adição de NaOH	Condições termofílicas	55	–	41,4	–	–	–	–	–	–	–	Kiani, Parsaee e Mahdaviifar (2021)

Fonte: Do autor (2022).

Segundo Fu *et al.* (2017), a acidez da vinhaça é um dos principais parâmetros que pode causar instabilidade em reatores anaeróbios. Por isso, se faz necessário a correção do pH e da alcalinidade da água residuária *in natura* antes da alimentação do sistema, através da adição de composto alcalino e/ou pela recirculação do efluente (DEL NERY *et al.*, 2018; NAKASHIMA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020). Ademais, a alta concentração de substâncias facilmente hidrolisáveis nessa água residuária pode levar a uma acidificação do sistema devido a excessiva produção de AOVs durante a etapa de acidogênese, o que pode causar instabilidades ou até falha no processo de digestão anaeróbia, sendo recomendado o uso de reatores de dois estágios, prevenindo assim a inibição da microbiota metanogênica (YU *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2021).

Outros compostos presentes em altas concentrações na vinhaça podem inibir o processo de digestão anaeróbia, como sais ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), fenóis e sulfatos, sendo que a recirculação do efluente, novamente, pode se mostrar necessária pela diluição do líquido afluente e a conseqüente redução da concentração dessas substâncias (DEL NERY *et al.*, 2018; SANTANA JUNIOR; DUDA; OLIVEIRA, 2019; MADALENO *et al.*, 2020). Outra estratégia que pode otimizar o processo de digestão anaeróbia da vinhaça é a aplicação de condições termofílicas, a qual pode aumentar o desempenho da hidrólise enzimática e, por conseqüência, favorecer o crescimento de arqueias metanogênicas (KIANI; PARSAAE; MAHDAVIFAR, 2021).

Ao contrário da elevada redução da carga orgânica, a digestão anaeróbia promove, como observado na Tabela 6, uma baixa remoção de nutrientes como potássio, nitrogênio e fósforo – devido à baixa assimilação desses compostos pelos microrganismos responsáveis pelo processo –, o que favorece à aplicação da vinhaça digerida na fertirrigação de culturas ou no cultivo de microalgas (BONINI, 2012; MORAES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2015). A aplicação da técnica ao tratamento dessa água residuária pode levar ainda à diminuição da emissão de gases de efeito estufa, como  $\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2\text{O}$ , que são emitidos durante o armazenamento e transporte da vinhaça *in natura*, e também nos campos fertirrigados com a água residuária não tratada (MORAES *et al.*, 2017). Além disso, os processos anaeróbios contribuem para uma elevada remoção de sulfatos da vinhaça (Tabela 6), que são convertidos a sulfetos pelas bactérias redutoras de sulfato e, em menor quantidade, utilizados como fonte de nutrientes pelas arqueias metanogênicas (RYCKEBOSCH; DROUILLON; VERVAEREN, 2011; PARSAAE; KIANI; KARIMI, 2019). O  $\text{N-NH}_4^+$  é um composto com baixíssima remoção em sistemas anaeróbios, e como observado na Tabela 6, pode apresentar até eficiências negativas de remoção, explicado, segundo

Chernicharo (2016), pela hidrólise de proteínas presentes na vinhaça, que resulta na formação desses compostos, aumentando a concentração na água residuária biodigerida.

Como evidenciado na Tabela 5, a produção de CH<sub>4</sub> a partir da digestão anaeróbia da vinhaça tende a variar na literatura, e os principais motivos para isso são: condições do meio, como pH e temperatura, as quais influenciam diretamente nas etapas do processo anaeróbio; variações na composição da vinhaça, que dependem da matéria-prima e dos processos utilizados durante a produção de etanol pelas indústrias sucroalcooleiras; configurações do reator e estratégias operacionais; e a qualidade do lodo utilizado no tratamento anaeróbio, que contém a comunidade microbiana responsável pelo processo (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; SOUSA, 2019).

Há escassez de informações na literatura a respeito do tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios em escalas plenas (FUESS *et al.*, 2017a; HARIHASTUTI *et al.*, 2021), destacando-se os estudos de Souza, Fuzaro e Polegato (1992) e Harihastuti *et al.* (2021) pelos resultados satisfatórios em relação a produção de CH<sub>4</sub> e eficiências na remoção de matéria orgânica oxidável – valores apresentados na Tabela 5 – utilizando sistemas anaeróbios de grandes dimensões (75 e 60 m<sup>3</sup>, respectivamente). Em contrapartida, os biorreatores em escala laboratorial ou de bancada vêm apresentando, em sua maioria, desempenho superior na biodigestão anaeróbia da vinhaça, inclusive com maiores produções de CH<sub>4</sub> (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; SOUSA, 2019).

Diante de todo o contexto abordado nesse tópico, evidencia-se que há a necessidade de avaliação do desempenho do tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar utilizando diferentes configurações e estratégias operacionais, buscando, desse modo, otimizar o processo e torná-lo menos dependente de etapas de pré-tratamento e adição de substâncias externas, como alcalinizante e solução nutricional.

### **3.2.7 Codigestão anaeróbia da vinhaça**

Apesar dos benefícios do tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar, o processo de digestão pode ser afetado negativamente devido à presença de compostos inibidores e elevada concentração de matéria orgânica nessa água residuária (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; LOVATO *et al.*, 2019) – conforme relatado no item 3.2.6. Por essa razão, pode haver a necessidade de incorporação de estratégias operacionais com o objetivo de tornar

a vinhaça um substrato adequado aos microrganismos anaeróbios, o que pode reduzir a aplicabilidade e viabilidade do sistema de tratamento.

Nesse sentido, a codigestão anaeróbia se apresenta como uma solução interessante e economicamente viável para a adequabilidade da vinhaça ao processamento anaeróbio (ALBANEZ *et al.*, 2018). Conforme descrita no item 3.2.3.3, essa estratégia consiste na mistura de duas ou mais águas residuárias com características complementares visando favorecer a digestão anaeróbia. Portanto, a escolha do substrato complementar deve ser balizada no sentido de contribuir para o ajuste do balanço entre carbono e nutrientes e de condições como pH e alcalinidade da vinhaça (SIQUEIRA *et al.*, 2022). A seguir será apresentado um compilado da literatura científica com estudos que avaliaram o desempenho da codigestão de vinhaça (de cana-de-açúcar e outras matérias-primas) com diferentes resíduos, com foco na remoção de DQO e produtividade de CH<sub>4</sub> (Tabela 7) e nas eficiências de remoção de distintos poluentes (Tabela 8).

Tabela 7 – Revisão da literatura acerca da eficiência de remoção de DQO e produção de CH<sub>4</sub> durante a codigestão anaeróbia de vinhaça (de cana-de-açúcar e outras matérias-primas) e outros resíduos.

Biorreator	Condições operacionais				Desempenho				Referência	
	Cossustrato / proporção*	Pré-tratamento	Estratégia operacional	T (°C)	TDH (d)	COV	E <sub>DQO</sub>	γ <sub>CH<sub>4</sub></sub>		% <sub>CH<sub>4</sub></sub>
Reator em batelada (lab.)	Suspensão algal / 1:1 (v/v)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	–	30	–	–	54,7	500 mL gSSV <sup>-1</sup>	–	Formagini <i>et al.</i> (2014)
CSTR (lab.)	Esterco bovino (3%)	Diluição em água e adição de celulose e solução de nutrientes	–	37	33	2,0 kgSTV m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	–	550 mL gSTV <sup>-1</sup>	69,5	Moares <i>et al.</i> (2015)**
Reator em batelada (lab.)	Polpa de beterraba / 1:1 (w/w)	Adição de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	–	37	–	–	–	339 mL gSTV <sup>-1</sup>	60,0	Zieminski e Kowalska-Wentel (2015)**
	Polpa de beterraba (pré-tratada por hidrólise enzimática) / 1:1 (w/w)							425 mL gSTV <sup>-1</sup>	62,6	
Reator em batelada (lab.)	Esterco de galinha / 3:1 (STV)	–	–	37	–	–	–	650 mL gSTV <sup>-1</sup>	–	Marin-Batista <i>et al.</i> (2016)
Reator em batelada (lab.)	Água residuária de processamento de tofu / 20:80 (v/v)	Adição de NaOH	–	35	20	–	–	159 mL <sup>biogás</sup> gDQO <sup>-1</sup>	–	Syaichurrozi <i>et al.</i> (2016)
UASB (lab.)	Torta de filtro / 40 g L <sup>-1</sup> vinhaça	–	Sistema de dois estágios, condições termofílicas e recirculação do efluente	54 – 56	0,33	28 – 30 kgDQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	60,0	230 mL gDQO <sub>rem</sub> <sup>-1</sup>	79,0	Barros <i>et al.</i> (2017)
CSTR (lab.)	Lama prensada / 75:25 (DQO)	–	–	35	29,4	2,5 kgDQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	–	368 mL gSTV <sup>-1</sup>	61,2	González, Reyes e Romero (2017)
s-CSTR (lab.)	Resíduo alimentar / –	Adição de NaOH	Sistema de dois estágios	37	–	–	48,4	226 mL gSTV <sup>-1</sup>	72,7	Náthia-Neves <i>et al.</i> (2018)

(continua)

Reator não especificado (lab.)	Resíduo de café / –	–	Condições termofílicas	55	45	0,16 kgSTV m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	–	210 mL gSTV <sup>-1</sup>	~70,0	Pinto <i>et al.</i> (2018)
Reator em batelada (lab.)	Melaço / 3:2 (STV)	Adição de NaOH	–	Condições mesofílicas	30	0,34 kgSTV m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	91,6	385 mL gSTV <sup>-1</sup>	–	Nualsri e Sreelaor (2019)
AnSBBR (lab.)	Soro de queijo / 1:1 (m/v)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Recirculação do efluente	30	21	6,3 kgDQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	87,0	289 mL gDQO <sub>rem</sub> <sup>-1</sup>	79,7	Lovato <i>et al.</i> (2019)
AnSBBR (lab.)	Soro de queijo / 75:25 (m/v)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Recirculação do efluente	30	20	15,3 kgDQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	89,0	353 mL gDQO <sub>rem</sub> <sup>-1</sup>	72,0	Sousa <i>et al.</i> (2019)
AnSBBR (lab.)	Soro de queijo / 75:25 (DQO)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> ,	Condições termofílicas	55	–	25 kgDQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	72,0	343 mL gDQO <sub>rem</sub> <sup>-1</sup>	71,0	Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019)
Reator não especificado (lab.)	Esterco de galinha / 80:20 (STV)	–	–	35	20	4,25 kgSTV m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	–	418 mL gSTV <sup>-1</sup>	58,1	Borowski e Kucner (2019)**
	Lodo de esgoto / 40:60 (STV)							356 mL gSTV <sup>-1</sup>	69,8	
Reator em batelada (lab.)	Palha de arroz (3% STV)	Adição de solução tampão à base de acetato de sódio	–	35	–	–	–	307 mL gSTV <sup>-1</sup>	59,7	Meng <i>et al.</i> (2020)***
	Esterco suíno (3% STV)							350 mL gSTV <sup>-1</sup>	63,1	
Reator em batelada (lab.)	Glicerina bidestilada / 1:1 (DQO)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> , NaOH e solução nutricional	–	30	–	–	97,0	352 mL gDQO <sub>rem</sub> <sup>-1</sup>	–	Borges <i>et al.</i> (2021)
s-CSTR (lab.)	Torta de filtro e licor detoxificado / 70:20:10 (STV)	–	Condições termofílicas	55	14	4,2 kgSTV m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	83,1	233 mL gSTV <sup>-1</sup>	80,8	Volpi <i>et al.</i> (2021)
s-CSTR (lab.)	Lodo ativado / 1:2 (STV)	–	Condições termofílicas	55	12,5	1,7 kgSTV m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	–	307 mL gSTV <sup>-1</sup>	56,8	Tai e Tai (2021)

(conclusão)

\* = proporção ou taxa de mistura na seguinte ordem: vinhaça:cossubstrato; \*\* = vinhaça de beterrana; \*\*\* = vinhaça de fermentação alcoólica de celulose; T = temperatura do reator; TDH = tempo de detenção hidráulica; COV = carga orgânica volumétrica aplicada ao reator; E<sub>DQO</sub> = eficiência na remoção de DQO da mistura (%);  $\gamma_{CH_4}$  = produtividade de CH<sub>4</sub>; %<sub>CH<sub>4</sub></sub> = conteúdo de CH<sub>4</sub> no biogás produzido (%); lab. = escala laboratorial ou de bancada.

Fonte: Do autor (2022).



Tabela 8 – Revisão da literatura acerca da eficiência de remoção de sólidos, nutrientes e demais compostos durante a codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e outros resíduos.

Biorreator	Condições operacionais			Eficiência máxima de remoção (%)						Referência	
	Cossubstrato / proporção*	Pré-tratamento	Estratégia operacional	T (°C)	AOV	NTK	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P	K		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Reator em batelada (lab.)	Água residuária de processamento de tofu / 20:80 (v/v)	Adição de NaOH	–	35	–	37,6	–	–	–	–	Syaichurrozi <i>et al.</i> (2016)
UASB (lab.)	Torta de filtro / 40 g L <sup>-1</sup> vinhaça	–	Sistema de dois estágios, condições termofílicas e recirculação do efluente	54 – 56	–	25,0	-50,5	53,0	-26,7	–	Barros <i>et al.</i> (2017)
s-CSTR (lab.)	Resíduo alimentar / –	Adição de NaOH	Sistema de dois estágios	37	–	2,2	-5,5	–	–	–	Náthia-Neves <i>et al.</i> (2018)
AnSBBR (lab.)	Soro de queijo / 1:1 (m/v)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Recirculação do efluente	30	75,5	–	–	–	–	–	Lovato <i>et al.</i> (2019)
AnSBBR (lab.)	Soro de queijo / 75:25 (m/v)	Adição de NaHCO <sub>3</sub>	Recirculação do efluente	30	79,2	–	–	–	–	–	Sousa <i>et al.</i> (2019)
Reator em batelada (lab.)	Glicerina bidestilada / 1:1 (DQO)	Adição de NaHCO <sub>3</sub> , NaOH e solução nutricional	–	30	–	–	–	–	–	100	Borges <i>et al.</i> (2021)

\* = proporção ou taxa de mistura na seguinte ordem: vinhaça:cossubstrato; AOV = ácidos orgânicos voláteis; NTK = nitrogênio total *Kjeldahl*; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = nitrogênio amoniacal; P = fósforo total; K = potássio total; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = sulfatos; lab. = escala laboratorial ou de bancada.

Fonte: Do autor (2022).

A partir das Tabelas 7 e 8, pode-se notar que alguns estudos avaliaram a codigestão de vinhaças provenientes de outras matérias-primas além da cana-de-açúcar, como de beterraba (MOARES *et al.*, 2015; ZIEMINSKI; KOWALSKA-WENTEL, 2015; BOROWSKI; KUCNER, 2019) e de fermentação alcoólica de celulose (MENG *et al.*, 2020). Além disso, diversas pesquisas utilizaram resíduos do setor sucroalcooleiro como cossustratos para aumentar a biodegradabilidade anaeróbia da vinhaça, tais como melão (NUALSRI; SREELAKOR, 2019), torta de filtro (BARROS *et al.*, 2017), lama prensada (GONZÁLEZ; REYES; ROMERO, 2017), licor detoxificado (VOLPI *et al.*, 2021) e polpa de beterraba (ZIEMINSKI; KOWALSKA-WENTEL, 2015). Essa estratégia permite a exploração e o reaproveitamento de subprodutos gerados *in loco* – ou seja, sem a dependência de fontes externas –, o que aumenta a sustentabilidade da indústria sucroalcooleira e reduz os custos com o tratamento dos seus resíduos (SOUSA *et al.*, 2019).

Por outro lado, estudos sugerem a aplicação de subprodutos provenientes de outros setores agroindustriais como substratos complementares adequados para a codigestão da vinhaça, como, por exemplo, da bovinocultura (MORAES *et al.*, 2015), suinocultura (MENG *et al.*, 2020), avicultura (MARIN-BATISTA *et al.*, 2016), produção de café (PINTO *et al.*, 2018), soja (SYAICHURROZI *et al.*, 2016), arroz (MENG *et al.*, 2020) e biodiesel (BORGES *et al.*, 2021). Além da redução de impactos ambientais negativos, o processamento anaeróbio de dois ou mais resíduos agroindustriais pode contribuir para a produção de biossólidos com elevado potencial de fertilização do solo (LOVATO *et al.*, 2019).

O setor de laticínios, por exemplo, pode cooperar de forma relevante com o setor sucroalcooleiro por meio da provisão de substratos complementares para a biodigestão da vinhaça. Nesse sentido, o soro de queijo, também conhecido como *whey*, é uma água residuária que, apesar do seu potencial de reúso, é em grande parte descartada pelas indústrias de laticínios. Esse resíduo de elevada biodegradabilidade apresenta em sua composição altas concentrações de lactose, proteínas e sais minerais, características que podem suplementar deficiências existentes em substratos com menor potencial de degradação anaeróbia (LOVATO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019).

Além da recuperação de CH<sub>4</sub>, a codigestão de vinhaça e outros resíduos pode ser orientada para a produção de biohidrogênio por fermentação escura (ALBANEZ *et al.*, 2016, 2018; TENA; PEREZ; SOLERA, 2019; SILLERO; SOLERA; PEREZ, 2022). A fermentação escura é uma técnica que consiste na conversão biológica de substrato orgânico a H<sub>2</sub> e AOVs por bactérias fermentativas sem a necessidade de iluminação, onde o meio deve fornecer condições

ambientais favoráveis à acidogênese em detrimento da metanogênese – que é a etapa onde há consumo de H<sub>2</sub> pelas arqueias metanogênicas. Essa técnica permite a recuperação de biogás rico em H<sub>2</sub> e com menores concentrações de CH<sub>4</sub> (CIECIURA-WŁOCH; BOROWSKI, 2019; ALBINI *et al.*, 2019; SOŁOWSKI, 2022).

Pelos fatos apresentados, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de experimentos que busquem selecionar substratos orgânicos adequados e avaliar sua aplicação e efeitos na codigestão anaeróbia da vinhaça, visto que os estudos sobre o tema são relativamente recentes e escassos, havendo diversas lacunas ainda presentes na literatura.

Nesse contexto, é fundamental o apoio a pesquisas que busquem otimizar o processamento anaeróbio da vinhaça, permitindo, desse modo, incrementar a sua tratabilidade e a produção de biometano. A demonstração da efetividade dos processos de tratamento e as possibilidades de recuperação de recursos podem incentivar a adoção de estratégias de gestão de resíduos pelo setor sucroalcooleiro, reduzindo os seus passivos ambientais e tornando o processo produtivo mais sustentável e menos oneroso, o que contribui para a bioeconomia circular da agroindústria.

## REFERÊNCIAS

ABREU, E. F.; ARAÚJO, J. C. **Ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) para lodos anaeróbios. Procedimento Operacional Padrão**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2011. 27 p. Documento da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Ambiental. 2011.

AISSE, M. N. *et al.* Tratamento e destino final do lodo gerado em reatores anaeróbios. *In: VAN HANDEEL, A. C. (ed.). Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*, Rio de Janeiro: ABES, 1999. p. 271-299.

ALBANEZ, R. *et al.* Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an AnSBBR. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27-41, 2018. DOI: 10.1590/0104-6632.20180351s20150807

ALBANEZ, R. *et al.* Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 45, p. 20473-20484, 2016. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.08.145

ALBINI, E. *et al.* Energy recovery from bio-fuel production through two-stage anaerobic co-digestion process. **AIP Conference Proceedings**, v. 2191, n. 020004, 2019. DOI: 10.1063/1.5138737

ALBUQUERQUE, J. N. de *et al.* Thermophilic biomethane production by vinasse in an AnSBBR: start-up strategy and performance optimization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 717-731, 2019. DOI: 10.1590/0104-6632.20190362s20170611

ALBUQUERQUE, J. N.; RATUSZNE, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Biomethane production by thermophilic co-digestion of sugarcane vinasse and whey in an AnSBBR: Effects of composition, organic load, feed strategy and temperature. **Journal of Environmental Management**, v. 251, n. 109606, 2019. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.109606

ALVES, I. **Caracterização de grânulos de reator UASB empregado no processamento de vinhaça**. 2015. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.18.2015.tde-10082015-100837>. Acesso em: 03 abr. 2022.

- AMIN, F. R. *et al.* Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **AMB Express**, v. 7, n. 72, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0375-4
- ANNACHHATRE, A. P. Anaerobic treatment of industrial wastewaters. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 16, p. 161-166, 1996. DOI: 10.1016/0921-3449(95)00053-4
- ANTWI, P. *et al.* Functional bacterial and archaeal diversity revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing during potato starch processing wastewater treatment in an UASB. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 348-357, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.03.141
- APARICIO, E. *et al.* Biofuels production of third generation biorefinery from macroalgal biomass in the Mexican context: An overview. *In*: TORRES, M. D.; KRAAN, S.; DOMINGUEZ, H. (eds.). **Sustainable Seaweed Technologies**. Amsterdã: Elsevier, 2020. p. 393-446. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00015-9>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 755-781, 2008. DOI: 10.1016/j.peccs.2008.06.002
- AQUINO, S. F. *et al.* Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007. DOI: 10.1590/S1413-41522007000200010
- ARIF, S.; LIAQUAT, R.; ADIL, M. Applications of materials as additives in anaerobic digestion technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 354-366, 2018. DOI: 10.1016/j.rser.2018.08.039
- ATAZOY, M. *et al.* Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 773-786, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.07.042
- AZIZ, A. *et al.* Biological wastewater treatment (anaerobic-aerobic) technologies for safe discharge of treated slaughterhouse and meat processing wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 686, p. 681-708, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.295
- BAEK, G.; KIM, K. Y.; LOGAN, B. E. Impact of surface area and current generation of microbial electrolysis cell electrodes inserted into anaerobic digesters. **Chemical Engineering Journal**, v. 426, n. 131281, 2021. DOI: 10.1016/j.cej.2021.131281

BARROS, A. R. M. *et al.* Acompanhamento da partida de reator UASB através da atividade metanogênica específica – AME. *In: V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação – CONNEPI 2010, Anais de congresso*, Maceió, 2010.

BARROS, V. G. de *et al.* Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and Thermotogae bacteria. **Bioresource Technology**, v. 244, n. 1, p. 371-381, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.106

BARROS, V. G. de; DUDA, R. S.; OLIVEIRA, R. A. de. Biomethane production from vinasse in UASB reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 628-639, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.021

BATISTA, L. F. **Lodos gerados nas estações de tratamento de esgotos no distrito federal: um estudo de sua aptidão para o condicionamento, utilização e disposição final**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos), Universidade de Brasília, Brasília, 2015. Disponível em: [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/18139/1/2015\\_LucileneFerreiraBatista.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/18139/1/2015_LucileneFerreiraBatista.pdf). Acesso em: 03 abr. 2022.

BATTISTI, A. C. *et al.* Leachate and vinasse used in a biological process combined with Fenton's reaction: a green method for treatment of textile effluents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920181156

BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7>. Acesso em: 03 abr. 2022.

BORGES, A. do V. *et al.* Co-digesting sugarcane vinasse and distilled glycerol to enhance bioenergy generation in biofuel-producing plants. **Energy Conversion and Management**, v. 250, n. 114897, 2021. DOI: 10.1016/j.enconman.2021.114897

BOROWSKI, S.; KUCNER, M. The use of sugar beet pulp stillage for co-digestion with sewage sludge and poultry manure. **Waste Management & Research**, v. 37, n. 10, p. 1025-1032, 2019. DOI: 10.1177/0734242X19838610

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 503 de 14 de dezembro de 2021**. Define critérios e procedimentos para o reúso em sistemas de fertirrigação

de efluentes provenientes de indústrias de alimentos, bebidas, laticínios, frigoríficos e graxarias. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-conama-n-503-de-14-de-dezembro-de-2021-367783680>. Acesso em: 09 ago. 2022.

BRASIL. **Decreto-Lei nº 303, de 28 de fevereiro de 1967**. Cria o Conselho Nacional de Controle da Poluição Ambiental e dá outras providências. Brasília: Presidência da República – Casa Civil, 1967. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/1965-1988/Del0303.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/1965-1988/Del0303.htm). Acesso em: 01 jun. 2020.

BROWN, A. I. T. *et al.* Population changes of Eubacteria, sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in an anaerobic reactor processing ethanol distillery vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, n. e19180268, 2019. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180268

CALLEJAS, C. *et al.* Temporal analysis of the microbiota involved in the anaerobic degradation of sugarcane vinasse in a full-scale methanogenic UASB reactor. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021. DOI: 10.1007/s13399-021-01281-8

CAMPOS, C. M. M. *et al.* Development and operation of an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) treating liquid effluent from swine manure in laboratory scale. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 140-147, 2006. DOI: 10.1590/S1413-70542006000100020

CAMPOS, C. M. M.; SALÉH, B. B.; CARMO, F. R. Determination of kinetic parameters of a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) removing organic loading from swine manure effluents. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1045-1051, 2005. DOI: 10.1590/S1413-70542005000500020

CAMPOS, J. R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e dispersão controlada no solo**. Projeto PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, 1999. 464 p.

CESARO, A.; BELGIORNO, V. Pretreatment methods to improve anaerobic biodegradability of organic municipal solid waste fractions. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 24-37, 2014. DOI: 10.1016/j.cej.2013.11.055

CHAVES, M. G. de *et al.* Combined use of vinasse and nitrogen as fertilizers affects nitrification, ammonification, and denitrification by prokaryotes. **Frontiers in Soil Science**, v. 1, n. 746745, 2021. DOI: 10.3389/fsoil.2021.746745

- CHEN, J. L. *et al.* Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1523-1534, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.005
- CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044-4064, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.057
- CHERNICHARO, C. A. L. *et al.* Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 649-679, 2015. DOI: 10.1007/s11157-015-9377-3
- CHERNICHARO, C. A. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios**. 2. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA/UFMG, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016. 379 p.
- CHRISTOFOLETTI, C. A. *et al.* Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013. DOI: 10.1016/j.wasman.2013.09.005
- CIECIURA-WŁOCH, W.; BOROWSKI, S. Biohydrogen production from wastes of plant and animal origin via dark fermentation. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management**, v. 27, n. 2, p. 101-113, 2019. DOI: 10.3846/jeelm.2019.9806
- CIOABLA, A. E. *et al.* Comparative study on factors affecting anaerobic digestion of agricultural vegetal residues. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 5, n. 39, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-39
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, quarto levantamento, maio/2021**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- CONTRERAS-CONTRERAS, J. A. *et al.* Polyphenols from sugarcane vinasses, quantification, and removal using activated carbon after biochemical treatment in laboratory-scale thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 401, 2020. DOI: 10.1007/s11270-020-04733-5
- CORDEIRO, A. L. *et al.* Atividade Metanogênica Específica: Metodologias simplificada e automatizada para lodos de reatores anaeróbios. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 5, p. 661-665, 2018. DOI: 10.18378/rvads.v13i5.6282



CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. BONOMI, A. *et al.* **The Virtual Sugarcane Biorefinery (VSB) – 2011 Report**. Campinas: The Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), 2012. Disponível em: <http://lnbr.cnpem.br/wp-content/uploads/2014/07/vsb-report-2011.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2020.

DE GODOI, L. A. G. *et al.* Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 28, p. 29267-29282, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-06019-8

DEL NERY, V. *et al.* Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugarcane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411-417, 2018. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.10.002

DEL NERY, V. *et al.* Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 50, n. 1, p. 102-114, 2007. DOI: 10.1016/j.resconrec.2006.06.001

DELFORNO, T. P. *et al.* Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 587-588, p. 389-398, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.170

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. 550 p.

DIAMANTIS, V. I.; AIVASIDIS, A. Comparison of single- and two-stage UASB reactors used for anaerobic treatment of synthetic fruit wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 6-10, 2007. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.07.014

DIAS, M. F. *et al.* Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 58-66, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.007

DOLFING, J., BLOEMEN, G. B. M. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 1985. DOI: 10.1016/0167-7012(85)90002-8

DOS REIS, C. M. *et al.* Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498-8509, 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.04.136

- ELLACURIAGA, M. *et al.* High-solid anaerobic digestion: reviewing strategies for increasing reactor performance. **Environments**, v. 8, n. 8, p. 80, 2021. DOI: 10.3390/environments8080080
- EL-MASHAD, H. M. *et al.* Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 191-201, 2004. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.07.013
- ELMITWALLI, T. A. *et al.* Biodegradability and change of physical characteristics of particles during anaerobic digestion of domestic sewage. **Water Research**, v. 35, n. 5, p. 1311-1317, 2001. DOI: 10.1016/s0043-1354(00)00377-8
- ESPAÑA-GAMBOA, E. *et al.* Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011. DOI: 10.1177/0734242X10387313
- ESPAÑA-GAMBOA, E. I. *et al.* Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 82, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-82
- ESPINOSA, A. *et al.* Effect of trace metals on the anaerobic degradation of volatile fatty acids in molasses stillage. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 121-129, 1995. DOI: 10.2166/wst.1995.0473
- FAGERSTRÖM, A. *et al.* **The role of Anaerobic Digestion and Biogas in the Circular Economy**. Murphy, J.D. (ed.). Relatório – IEA Bioenergy 37, 2018. 24 p. Disponível em: [https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2018/08/anaerobic-digestion\\_web\\_END.pdf](https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2018/08/anaerobic-digestion_web_END.pdf). Acesso em: 22 jan. 2022.
- FERRAZ JUNIOR, A. D. N. *et al.* Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, n. 112045, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2021.112045
- FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. *et al.* Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252, 2016. DOI: 10.1016/j.renene.2015.11.064
- FLORENTINO, H. O.; BISCARO, A. F. V.; PASSOS, J. R. S. Funções sigmoidais aplicadas na determinação da Atividade Metanogênica Específica – AME. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 28, n. 1, p. 141-150, 2010. Disponível em:

[http://jaguar.fcav.unesp.br/RME/fasciculos/v28/v28\\_n1/A10\\_Helenice.pdf](http://jaguar.fcav.unesp.br/RME/fasciculos/v28/v28_n1/A10_Helenice.pdf). Acesso em: 03 abr. 2022.

FORMAGINI, E. L. *et al.* The use of microalgae and their culture medium for biogas production in an integrated cycle. **Water Science & Technology**, v. 69, n. 5, p. 941-946, 2014. DOI: 10.2166/wst.2013.803

FU, S. F. *et al.* Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 81-86, 2017. DOI: 10.1016/j.psep.2017.01.024

FUESS, L. T. *et al.* Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: How phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs?. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 209-220, 2017a. DOI: 10.1016/j.cherd.2017.01.023

FUESS, L. T. *et al.* Pros and cons of fertirrigation with in natura sugarcane vinasse: Do improvements in soil fertility offset environmental and bioenergy losses?. **Journal of Cleaner Production**, v. 319, n. 128684, 2021. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.128684

FUESS, L. T. *et al.* Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480-491, 2017b. DOI: 10.1016/j.apenergy.2016.12.071

GABARDO, R. A. **Influência da relação C:N:P no desempenho de reatores tipo UASB**. 2016. 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/1932>. Acesso em: 03 abr. 2022.

GALANTE, C. G. *et al.* **Methane from biogas: the process, cleaning and projects**. Trondheim: Norewegian University of Science and Technology, 2012. 52 p.

GERARDI, M. H. The microbiology of anaerobic digesters. *In: Wastewater Microbiology Series*. Nova Jérícia: Wiley-Interscience, 2003. 772 p.

GHANGREKAR, M. M.; BEHERA, M. Suspended Growth Treatment Processes. *In: AHUJA, S. (ed.). Comprehensive Water Quality and Purification*. Amsterdã: Elsevier, 2014. p. 74-89. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00087-6>. Acesso em: 29 jan. 2022.

- GONÇALVES, M. R. *et al.* Strategies for lipids and phenolics degradation in the anaerobic treatment of olive mill wastewater. **Water Research**, v. 46, n. 6, p. 1684-1692, 2012. DOI: 10.1016/j.watres.2011.12.046
- GONZÁLEZ, L. M. L.; REYES, I. P.; ROMERO, O. R. Anaerobic co-digestion of sugarcane press mud with vinasse on methane yield. **Waste Management**, v. 68, p. 139-145, 2017. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.07.016
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, v. 6, p 205-218, 2012. DOI: 10.1002/bbb.337
- GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; SIALVE, B.; MOLINUEVO-SALCES, B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 896-906, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.095
- GRADY JUNIOR, C. P. L. *et al.* **Biological Wastewater Treatment**. 3. ed. Londres: IWA Publishing, 2011. 1022 p.
- HADDAD, M.; FAWAZ, Z. Evaluation of microalgal alternative jet fuel using the AHP method with an emphasis on the environmental and economic criteria. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 3, p. 721-733, 2013. DOI: 10.1002/ep.11638
- HAGEN, M. *et al.* **Adding gas from the biomass to gas grid**. Relatório final – SGC 118, Swedish Gas Centre, Suécia, 2001. 144 p. Disponível em: <http://www.sgc.se/ckfinder/userfiles/files/SGC118.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2022.
- HALALSHEH, M. *et al.* Effect of increasing the surface area of primary sludge on anaerobic digestion at low temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 748-752, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.075
- HARIHASTUTI, N. *et al.* Full-scale application of up-flow high rate anaerobic reactor with substrate modification and effluent recirculation for sugarcane vinasse degradation and biogas generation. **Journal of Ecological Engineering**, v. 22, n. 4, p. 314-324, 2021. DOI: 10.12911/22998993/134036
- HARUN, R. *et al.* Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010. DOI: 10.1016/j.rser.2009.11.004

HUBERT, C. *et al.* Variation of the digester temperature in the annual cycle – using the digester as heat storage. **Water Practice and Technology**, v. 14, n. 2, p. 471-481, 2019. DOI: 10.2166/wpt.2019.030

HUSSAIN, A.; DUBEY, S. K. Specific methanogenic activity test for anaerobic treatment of phenolic wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, p. 7015-7025, 2013. DOI: 10.1080/19443994.2013.823116

ICLEI – Governos Locais pela Sustentabilidade – Brasil. **Manual para aproveitamento do biogás: volume dois, efluentes urbanos**. São Paulo: Escritórios de projetos no Brasil, 2010. 77 p. Disponível em: [http://e-lib.iclei.org/wp-content/uploads/2018/10/Manual\\_para\\_aproveitamento\\_de\\_biog%C3%A1s.pdf](http://e-lib.iclei.org/wp-content/uploads/2018/10/Manual_para_aproveitamento_de_biog%C3%A1s.pdf). Acesso em: 01 jun. 2020.

ILTCHENCO, J. *et al.* Microbiota profile in mesophilic biodigestion of sugarcane vinasse in batch reactors. **Water Science & Technology**, v. 84, n. 8, p. 2028-2039, 2021. DOI: 10.2166/wst.2021.375

ISSAH, A.; KABERA, T. Impact of volatile fatty acids to alkalinity ratio and volatile solids on biogas production under thermophilic conditions. **Waste Management & Research**, v. 39, n. 6, p. 871-878, 2021. DOI: 10.1177/0734242X20957395

JAIBIBA, P.; VIGNESH, S. N.; HARIHARAN, S. Working principle of typical bioreactors. *In*: SINGH, L.; YOUSUF, A.; MAHAPATRA, D. M. (eds.). **Bioreactors**. Amsterdã: Elsevier, 2020. p. 145-173. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00010-3>. Acesso em: 22 jan. 2022.

JANKE, L. *et al.* Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 10-20, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.110

JENKINS, S. R.; MORGAN, J. M.; SAWYER, C. L. measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. **Water Pollution Control Federation**, v. 55, n. 5, p. 448-453, 1983. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25041903>. Acesso em: 26 fev. 2022.

JOHNSON, I.; ALI, M. A. S.; KUMAR, M. Cyanobacteria/Microalgae for Distillery Wastewater Treatment - Past, Present and the Future. *In*: SHAH, M. P.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (eds.). **Microbial Wastewater Treatment**. Amsterdã: Elsevier, 2019. p. 195-236.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816809-7.00010-5>. Acesso em: 20 jan. 2022.

JÜNEMANN, S. *et al.* Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. **Journal of Biotechnology**, v. 261, p. 10-23, 2017. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.08.012

KHANAL, S. K. *et al.* Anaerobic Bioreactors/Digesters: Design and Development. *In: LEE, D. J. et al. (eds.). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdã: Elsevier, 2017. p. 261-279. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63665-2.00010-2>. Acesso em: 28 jan. 2022.

KIANI, M. K. D.; PARSAAE, M.; MAHDAVIFAR, Z. Biogas production from sugarcane vinasse at mesophilic and thermophilic temperatures by static granular bed reactor (SGBR). **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 48, n. 101569, 2021. DOI: 10.1016/j.seta.2021.101569

KIYUNA, L. S. M.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 103-112, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.028

KLEIN, B.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 1376-1392, 2018. DOI: 10.1016/j.rser.2017.04.063

KUGLARZ, M.; MROWIEC, B.; BOHDZIEWICZ, J. **Influence of kitchen biowaste addition on the effectiveness of animal manure digestion in continuous condition**. Research and application of new technologies in wastewater treatment and municipal solid waste disposal in Ukraine, Sweden and Poland, 2011. Disponível em: [http://www.energiomiljo.org/kth/Polishproject/rep17/Kuglarz\\_Mrowiec.pdf](http://www.energiomiljo.org/kth/Polishproject/rep17/Kuglarz_Mrowiec.pdf). Acesso em: 22 jan. 2022.

KUO, W; CHENG, K. Use of respirometer in evaluation of process and toxicity of thermophilic anaerobic digestion for treating kitchen waste. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1805-1811, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.06.016

LAMBAIS, J. *et al.* Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. *In: Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa: SBCS, 2005. p. 43-84.

- LAWRENCE, A. W.; McCARTY, P. L. The role of sulfide in preventing heavy metal toxicity in anaerobic treatment. **Water Pollution Control Federation**, v. 37, n. 3, p. 392-406, 1965. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25035257>. Acesso em: 03 abr. 2022.
- LETTINGA, G. *et al.* Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 22, n. 4, p. 699-734, 1980. DOI: 10.1002/bit.260220402
- LETTINGA, G.; HULSHOF POL, L. W.; ZEEMAN, G. **Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment.** Lectures Notes. Wageningen Agricultural University, jan. 1996.
- LI, Y. *et al.* Anaerobic co-digestion of chicken manure and corn stover in batch and continuously stirred tank reactor (CSTR). **Bioresource Technology**, v. 156, p. 342-347, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.054
- LOBATO, L. C. S.; CHERNICHARO, C. A. L.; SOUZA, C. L. Estimates of methane loss and energy recovery potential in anaerobic reactors treating domestic wastewater. **Water Science & Technology**, v. 66, n. 12, p. 2745-2753, 2012. DOI: 10.2166/wst.2012.514
- LOMAN, N. J. *et al.* Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 434-439, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2198
- LONGARETTI, G. *et al.* Estudo da atividade metanogênica específica de diferentes lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, n. 6, p. 1139-1146, 2019. DOI: 10.1590/S1413-41522019140730
- LOPES, T. S. A. *et al.* Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella sp.* **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 25-36, 2015.
- LOPES, W. S.; LEITE, V. D.; PRASAD, S. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 261-266, 2004. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.01.006
- LOVATO, G. *et al.* Methane production by co-digesting vinasse and whey in an ANsBBR: effect of mixture ratio and feed strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, p. 28-46, 2019. DOI: 10.1007/s12010-018-2802-7

- LOZANO, C. J. S. *et al.* Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704-711, 2009. DOI: 10.1016/j.wasman.2008.06.021.
- LUKITAWESA *et al.* Effect of effluent recirculation on biogas production using two-stage anaerobic digestion of citrus waste. **Molecules**, v. 23, p. 3380, 2018. DOI: 10.3390/molecules23123380
- LUO, C. *et al.* Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030087
- MADALENO, L. L. *et al.* The recycling of biodigested vinasse in an upflow anaerobic sludge blanket reactor is a feasible approach for the conservation of freshwater in the biofuel ethanol industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 262, n. 121196, 2020. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.121196
- MALINA, J. F.; POHLAND, F. G. **Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes**. 6. ed. Lancaster: Technomic Pub, 1992. 214 p.
- MAO, C. *et al.* Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540-555, 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.02.032
- MARGULIES, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 15, p. 376-380, 2005. DOI: 10.1038/nature03959
- MARIN, J.; KENNEDY, K. J.; ESKICIOGLU, C. Effect of microwave irradiation on anaerobic degradability of model kitchen waste. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1772-1779, 2010. DOI: 10.1016/j.wasman.2010.01.033
- MARIN-BATISTA, J. *et al.* Anaerobic co-digestion of vinasse and chicken manure: alternative for Colombian agrowaste management. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 18, n. 2, p. 6-12, 2016. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.53853
- MARTÍNEZ, M. A.; ROMERO, H.; PEROTTI, N. I. Two amplicon sequencing strategies revealed different facets of the prokaryotic community associated with the anaerobic treatment of vinasses from ethanol distilleries. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 388-392, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.030



- MEIER, L. *et al.* Photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. **Biomass and Bioenergy**, v. 73, p. 102-109, 2015. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.10.032
- MENG, L. *et al.* Enhancement of bioenergy recovery from agricultural wastes through recycling of cellulosic alcoholic fermentation vinasse for anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 311, n. 123511, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123511
- MENZEL, T.; NEUBAUER, P.; JUNNE, S. Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. **Energies**, v. 13, n. 21, p. 5555, 2020. DOI: 10.3390/en13215555
- MEYSTRE, J. A. **Partida de um reator UASB, em escala piloto, para tratamento de efluente doméstico: estudo de caso para a região da Serra da Mantiqueira.** 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Energia) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2007. Disponível em: <http://repositorio.unifei.edu.br/xmlui/handle/123456789/1747>. Acesso em: 03 abr. 2022.
- MINAS GERAIS. Conselho Estadual de Política Ambiental – COPAM. **Deliberação Normativa COPAM nº 164 de 30/03/2011.** Estabelece normas complementares para usinas de açúcar e destilarias de álcool, referentes ao armazenamento e aplicação de vinhaça e águas residuárias no solo agrícola. Minas Gerais: COPAM, 2011.
- MONCADA, M. S. A.; SILVA, M. Q. Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. **Revista Ion**, v. 29, n. 1, p. 117-123, 2016. DOI: 10.18273/revion.v29n1-2016010
- MORAES, B. S. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense?. **Applied Energy**, v. 113, p. 825-835, 2014. DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.07.018
- MORAES, B. S. *et al.* Biogas production within the bioethanol production chain: Use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 227-234, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.089
- MORAES, B. S. *et al.* Reduction in greenhouse gas emissions from vinasse through anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 189, p. 21-30, 2017. DOI: 10.1016/j.apenergy.2016.12.009
- MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.01.023

MORAN-SALAZAR, R. G. *et al.* Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1007, 2016. DOI: 10.1186/s40064-016-2410-3

MORITA, M. *et al.* Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. **MBio**, v. 2, n. 4, 2011. DOI: 10.1128/mBio.00159-11

MUN, Y. W. **Production of methane from palm oil mill effluent by using Ultrasonicated Membrane Anaerobic System (UMAS)**. 2012. 26 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universiti Malaysia Pahang, Pahang (Malásia), 2012. Disponível em: [http://umpir.ump.edu.my/id/eprint/3610/1/CD6369\\_YAP\\_WAI\\_MUN.pdf](http://umpir.ump.edu.my/id/eprint/3610/1/CD6369_YAP_WAI_MUN.pdf). Acesso em: 01 jun. 2020.

MUÑOZ, R. *et al.* A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 727-759, 2015. DOI: 10.1007/s11157-015-9379-1

NAKASHIMA, R. N.; OLIVEIRA JUNIOR, S. de. Comparative exergy assessment of vinasse disposal alternatives: Concentration, anaerobic digestion and fertirrigation. **Renewable Energy**, v. 17, p. 1969-1978, 2020. DOI: 10.1016/j.renene.2019.09.124

NARTKER, S. *et al.* Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. **Bioresource Technology**, v. 34, n. 12, p. 2567-2571, 2014. DOI: 10.1016/j.wasman.2014.08.017

NASCIMENTO, L. **Trade of balance in agribusiness sees \$87.76 bi surplus in 2020**. Agência Brasil, EBC, Brasília. 2021. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/en/economia/noticia/2021-01/trade-balance-agribusiness-sees-1305-bi-surplus-2020>. Acesso em: 11 jul. 2022

NÁTHIA-NEVES, G. *et al.* Start-up phase of a two-stage anaerobic co-digestion process: hydrogen and methane production from food waste and vinasse from ethanol industry. **Biofuel Research Journal**, v. 18, p. 813-820, 2018. DOI: 10.18331/BRJ2018.5.2.5

NEUFELD, R. D.; MACK, J. D.; STRAKEY, J. P. Anaerobic Phenol Biokinetics. **Water Pollution Control Federation**, v. 52, n. 9, p. 2367-2377, 1980. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25040887>. Acesso em: 03 abr. 2022.

NOGUEIRA, L. A. H.; CAPAZ, R. S. Ethanol from Sugarcane in Brazil: Economic Perspectives. *In*: PANDEY, A.; HÖFER, R.; TAHERZADEH, M.; NAMPOOTHIRI, K. M.; LARROCHE, C. (eds.). **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. Amsterdã:

Elsevier, 2015. p. 237–246. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00006-9>. Acesso em: 20 jan. 2022.

NUALSRI, C.; SREELA-OR, C. Methane production by a co-digestion of vinasse with molasses and the kinetic studies. **Life Sciences and Environment Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2019. Disponível em: <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/psru/article/view/115649>. Acesso em: 03 abr. 2022.

OLIVEIRA, B. G. de *et al.* Greenhouse gas emissions from sugarcane vinasse transportation by open channel: a case study in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 94, p. 102-107, 2015. DOI: 10.1016/j.jclepro.2015.02.025

PAEZ, S. **Estudo da atividade metanogênica específica e microbiota de lodo proveniente de um reator UASB instalado na ETE-UFLA tratando esgoto sanitário**. 2019. 86 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado profissional em Tecnologia e Inovações Ambientais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/38516>. Acesso em: 03 abr. 2022.

PAN, S. *et al.* Anaerobic co-digestion of agricultural wastes toward circular bioeconomy. **iScience**, v. 24, n. 7, p. 102704, 2021. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102704

PARSAEE, M.; KIANI, M. K. D.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 117-125, 2019. DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.01.034

PAZ-PINO, O. L.; BARBA-HO, L. E.; MARRIAGA-CABRALES, N. Vinasse treatment by coupling of electro-dissolution, hetero-coagulation and anaerobic digestion. **DYNA**, v. 81, n. 187, p. 102-107, 2014. DOI: 10.15446/dyna.v81n187.38922

PENGYU, D. *et al.* Comparison of dry and wet milling pre-treatment methods for improving the anaerobic digestion performance of the Pennisetum hybrid. **RSC Advances**, v. 7, p. 12610-12619, 2017. DOI: 10.1039/C6RA27822A

PENNA, J. A. **Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica**. 1994. 229 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.18.2019.tde-30042019-154335>. Acesso em: 03 abr. 2022.

PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de

suinocultura. **Revista Ambiente & Água**, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009. DOI: 10.4136/ambiente.109

PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTTERAN, F. Physicochemical study of pH, alkalinity and total acidity in a system composed of Anaerobic Baffled Reactor in series with Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor in the treatment of pig farming wastewater. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 3, p. 477-483, 2013. DOI: 10.4025/actascitechnol.v35i3.14069

PINHEIRO, V. E.; POLIZELI, M. L. T. M. Environmental parameters affecting the anaerobic microbial community. *In*: SHAH, M. P.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (eds.). **Wastewater Treatment Reactors**. Amsterdã: Elsevier, 2021. p. 219-252. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823991-9.00025-3>. Acesso em: 24 jan. 2022.

PINTO, M. P. M. *et al.* Co-digestion of coffee residues and sugarcane vinasse for biohythane generation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 146-155, 2018. DOI: 10.1016/j.jece.2017.11.064

POHL, A. Removal of Heavy Metal Ions from Water and Wastewaters by Sulfur-Containing Precipitation Agents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 503, 2020. DOI: 10.1007/s11270-020-04863-w

POVEDA, M. M. R. **Integração do biogás de vinhaça na matriz energética de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo**. 2019. 203 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.105.2019.tde-26082019-115248>. Acesso em: 03 abr. 2022.

PRASAD, M. N. V.; SHIH, K. **Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention**. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 2016. 750 p.

RAMOS, L. R. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, n. 128066, 2021. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.128066

RAMOS-SUÁREZ, J.; ARROYO, N. C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. The role of anaerobic digestion in algal biorefineries: Clean energy production, organic waste treatment, and nutrient loop closure. *In*: SINGH, B.; BAUDDH, K.; BUX, F. (eds.). **Algae and**

**environmental sustainability**, p. 53-76. Springer, Nova Déli, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2641-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2641-3_5). Acesso em: 22 jan. 2022.

REIS, C. E. R. *et al.* Vinasse treatment within the sugarcane-ethanol industry using ozone combined with anaerobic and aerobic microbial processes. **Environments**, v. 6, n. 1, p. 5-17, 2019. DOI: 10.3390/environments6010005

RINCÓN-MEJÍA, E.; HERAS, A. de las. **Sustainable Energy Technologies**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2017. 399 p.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 58, p. 406-411, 1986. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/25042933>. Acesso em: 26 fev. 2022.

RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. Nova Iorque: McGraw-Hill Education, 2012. 768 p.

ROCHA, M. A. G. *et al.* Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de lodos de esgotos doméstico e industriais. *In*: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Anais de Congresso**, João Pessoa, 2001.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, v. 11, p. 3-11, 2001. DOI: 10.1101/gr.11.1.3

RYCKEBOSCH, E.; DROUILLON, M.; VERVAEREN, H. Techniques for transformation of biogas to biomethane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1633-1645, 2011. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.02.033

SALOMON, K. R. **Avaliação técnico-econômica e ambiental da utilização do biogás proveniente da biodigestão da vinhaça em tecnologias para geração de eletricidade**. 2007. 219 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Engenharia Mecânica, Itajubá, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unifei.edu.br/jspui/handle/123456789/1721>. Acesso em: 03 abr. 2022.

SÁNCHEZ, F.; CÓRDOBA, P.; SIÑERIZ, F. Use of the UASB reactor for the anaerobic treatment of stillage from sugar cane molasses. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 27, p. 1710-1716, 1985. DOI: 10.1002/bit.260271212

SANTANA JUNIOR, A. E.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. de. Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in two-stage anaerobic reactors. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, n. 117577, 2019. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.07.052

SANTANA, H. **Isolamento, seleção e caracterização de microalgas com alta produtividade de biomassa em meio de cultivo a base de vinhaça e CO<sub>2</sub>**. 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144602/1/DissertacaoMestrado-Hugo-Santana-Felix-2016.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2022.

SANTOS, P. S. *et al.* Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems?. A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, n. 118005, 2019. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118005

SÃO PAULO. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. **Norma Técnica CETESB – P4.231 de fevereiro de 2015**. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 15 p. São Paulo: CETESB, 2015. Disponível em: [https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/P4.231\\_Vinha%C3%A7a\\_-Crit%C3%A9rios-e-procedimentos-para-aplica%C3%A7%C3%A3o-no-solo-agr%C3%ADcola-3%C2%AA-Ed-2%C2%AA-VERS%C3%83O.pdf](https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/P4.231_Vinha%C3%A7a_-Crit%C3%A9rios-e-procedimentos-para-aplica%C3%A7%C3%A3o-no-solo-agr%C3%ADcola-3%C2%AA-Ed-2%C2%AA-VERS%C3%83O.pdf). Acesso em: 01 jun. 2020.

SARKER, S. *et al.* A review of the role of critical parameters in the design and operation of biogas production plants. **Applied Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1915, 2019. DOI: 10.3390/app9091915

SCHNEIDERS, D. *et al.* Atividade metanogênica específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. **Ambi-Água**, v. 8, n. 2, p. 135-145, 2013. DOI: 10.4136/ambi-agua.1098

SCHULTZ, J; PINHEIRO, A; SILVA, J. D. da. Tratabilidade do lodo biológico têxtil e produção de biogás em reator UASB em diferentes temperaturas. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 1, p. 151-158, 2018. DOI: 10.1590/S1413-41522018145106

SHRIVASTAVA, V. *et al.* Wastewater in the food industry: Treatment technologies and reuse potential. **Chemosphere**, v. 293, p. 133553, 2022. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.133553

- SIKORA, A. *et al.* Anaerobic Digestion: I. A Common Process Ensuring Energy Flow and the Circulation of Matter in Ecosystems. II. A Tool for the Production of Gaseous Biofuels. *In*: JOZALA, A. (ed.). **Fermentation Processes**. Londres: IntechOpen, 2017. p. 393-446. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/64645>. Acesso em: 22 jan. 2022.
- SILLERO, L.; SOLERO, R.; PEREZ, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge, wine vinasse and poultry manure for bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 6, p. 3667-3678, 2022. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2021.11.032
- SILVA, A. F. R. *et al.* Influence of COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio on vinasse treatment performance by two-stage anaerobic membrane bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 259, n. 110034, 2020. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.110034
- SILVA, A. F. R. *et al.* Resource recovery from sugarcane vinasse by anaerobic digestion – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 295, n. 113137, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113137
- SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007. DOI: 10.1590/S1415-43662007000100014
- SINGH, S. *et al.* Acetotrophic Activity Facilitates Methanogenesis from LCFA at Low Temperatures: Screening from Mesophilic Inocula. **Archaea**, v. 2019, p. 1-16, 2019. DOI: 10.1155/2019/1751783
- SINISCALCHI, L. A. B. **Enriquecimento de micro-organismos metanotróficos e avaliação do potencial de oxidação anaeróbia de metano a partir de lodo de reator UASB**. 2015. 199 p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-A3QEE7>. Acesso em: 03 abr. 2022.
- SINISCALCHI, L. A. B. *et al.* Enriquecimento de microrganismos metanotróficos a partir de lodo de reator UASB tratando esgotos domésticos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 21, p. 109-122, 2016. DOI: 10.1590/S1413-41520201600100138732
- SIQUEIRA, J. C. *et al.* Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 155, n. 111904, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111904

- SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, p. 1707-1716, 2013. DOI: 10.1080/10934529.2013.815535
- SOARES, C. M. T.; FEIDEN, A.; TAVARES, S. G. Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás. **Revista Nativa**, v. 5, p. 509-514, 2017. DOI: 10.31413/nativa.v5i7.5155
- SOŁOWSKI, G. Analysis of biogas component production during anaerobic digestion of sour cabbage in microaeration conditions under different pH conditions. **Biomass**, v. 2, n. 1, p. 14-26, 2022. DOI: 10.3390/biomass2010002
- SOUSA, S. P. *et al.* Improvement of sugarcane stillage (vinasse) anaerobic digestion with cheese whey as its co-substrate: achieving high methane productivity and yield. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, p. 987-1006, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-03056-4
- SOUSA, S. P. **Produção de metano em AnSBBR pela codigestão de vinhaça e soro**. 2019. 165 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.18.2019.tde-22052019-163228>. Acesso em: 03 abr. 2022.
- SOUZA M. E., FUZARO G., POLEGATO A. R. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. **Water Science & Technology**, v. 25, p. 213-222, 1992. DOI: 10.2166/wst.1992.0153
- SOUZA, C. L. **Estudo das rotas de formação, transporte e consumo dos gases metano e sulfeto de hidrogênio resultantes do tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB**. 2010. 127 p. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/ENGD-89WQAC>. Acesso em: 03 abr. 2022.
- SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; AQUINO, S. F. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. **Water Science & Technology**, v. 64, n. 11, p. 2259-2264, 2011. DOI: 10.2166/wst.2011.695



SOUZA, M. E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. **Revista DAE**, v. 44, n. 137, p. 88-94, 1984. Disponível em: <http://revistadae.com.br/site/artigo/1173-Fatores-que-influenciam-a-digestao-anaerobia>. Acesso em: 03 abr. 2022.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Nashville: Archae Press, 1996. 394 p.

SPEECE, R.; PARKIN, G. Nutrient requirements for anaerobic digestion. *In: **Biotechnological Advances in Processing Municipal Wastes for Fuels and Chemicals***. Nova Jérсия: Noyes Data Corp., 1987. p. 195-221.

STRONACH, S. M.; RUDD, T.; LESTER, J. N. Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment. *In: AIBA, S. et al. **Biotechnology monographs***. Berlim: Springer Science and Business Media, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-71215-9>. Acesso em: 03 abr. 2022.

SYAICHURROZI, I. *et al.* Biogas production from co-digestion vinasse waste and tofu-processing wastewater and kinetics. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 6, n. 3, p. 1057-1070, 2016. DOI: 10.20508/ijrer.v6i3.4150.g6888

TAI, M.; TAI, Y. Taking advantage of waste heat resource from vinasses for anaerobic co-digestion of waste activated sludge under the thermophilic condition: energy balance and kinetic analysis. **ACS Omega**, v. 6, n. 18, p. 11832-11839, 2021. DOI: 10.1021/acsomega.0c05980

TAUSEEF, S. M.; ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Energy recovery from wastewaters with high-rate anaerobic digesters. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 704-741, 2013. DOI: 10.1016/j.rser.2012.11.056

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4 ed. Boston: Metcalf & Eddy, Inc., 2003. 25 p.

TENA, M.; PEREZ, M.; SOLERA, R. Effects of several inocula on the biochemical hydrogen potential of sludge-vinasse co-digestion. **Fuel**, v. 258, n. 116180, 2019. DOI: 10.1016/j.fuel.2019.116180

THAUER, R. K. *et al.* Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 579-591, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1931

TSAPEKOS, P.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. H<sub>2</sub> competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea during biomethanation from a combined experimental-modelling approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 2, p. 107281, 2022. DOI: 10.1016/j.jece.2022.107281

UEDA, C. M. **Modelos não lineares com diferentes estruturas de covariância em curvas de crescimento: uma aplicação no estudo da severidade da doença Late blight**. 2003. 112 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/85646>. Acesso em: 03 abr. 2022.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Vinhaça: biofertilizante e energia sustentável**. 05 set. 2019. Disponível em: <https://www.unica.com.br/noticias/vinhaca-biofertilizante-e-energia-sustentavel>. Acesso em: 18 nov. 2019.

VADLANI, P. V.; RAMACHANDRAN, K. B. Evaluation of UASB reactor performance during start-up operation using synthetic mixed-acid waste. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8231-8236, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.03.011

VAN HAANDEL, A.; MARAIS, G. **O comportamento do sistema de lodo ativado: teoria e aplicações para projetos e operação**. 1 ed. Campina Grande: Epgraf, 1999. 472 p.

VAN LIER, J. B.; MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G. Anaerobic wastewater treatment. *In*: HENZE, M. *et al.* **Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design**. Londres: IWA Publishing, 2008. p. 415-456. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/9781789060362>. Acesso em: 03 abr. 2022.

VAN LIER, J. B.; REBAC, S.; LETTINGA, G. High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 10, p. 199-206, 1997. DOI: 10.1016/S0273-1223(97)00202-3

VAN DINH, P. *et al.* A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: Configurations, operating parameters, and current trends. **Environmental Engineering Research**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2020. DOI: 10.4491/eer.2018.334

VELUCHAMY, C.; KALAMDHAD, A. S. Biochemical methane potential test for pulp and paper mill sludge with different food / microorganisms ratios and its kinetics. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 197-204, 2017. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.01.005

- VLYSSIDES, A. *et al.* Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 12, p. 2899-2904, 2010. DOI: 10.2166/wst.2010.647
- VOLPI, M. P. C. *et al.* Operational and biochemical aspects of co-digestion (co-AD) from sugarcane vinasse, filter cake, and deacetylation liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 8969-8987, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11635-x
- VOLPI, M. P. C.; FUESS, L. T.; MORAES, B. S. Anaerobic co-digestion of residues in 1G2G sugarcane biorefineries for enhanced electricity and biomethane production. **Bioresource Technology**, v. 330, n. 124999, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.124999
- VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos: Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. 4 ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2014. 470 p.
- WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 849-860, 2010. DOI: 10.1007/s00253-009-2246-7
- XU, S.; ZHENG, Q. Analysis the influencing factors of toxic substances toxicity threshold on biological wastewater treatment. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 859, n. 012080, 2021. DOI: 10.1088/1755-1315/859/1/012080
- YAN, L. *et al.* Hydrogen sulfide formation control and microbial competition in batch anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater sludge: Effect of initial sludge pH. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 67-74, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.03.011
- YU, B. *et al.* Methane-rich biogas production from waste-activated sludge with the addition of ferric chloride under a thermophilic anaerobic digestion system. **RSC Advances**, v. 5, n. 48, p. 38538-38546, 2015. DOI: 10.1039/C5RA02362A
- YU, G. *et al.* Enzyme extraction by ultrasound from sludge flocs. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 2, p. 204-210, 2009. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62252-4
- ZABED, H. M. *et al.* Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, n. 109503, 2020. DOI: 10.1016/j.rser.2019.109503
- ZHANG, B. *et al.* The influence of pH on hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. **Environmental Technology**, v. 26, n. 3, p. 329-340, 2005. DOI: 10.1080/09593332608618563

- ZHANG, L. *et al.* Anaerobic treatment of raw domestic wastewater in a UASB-digester at 10 °C and microbial community dynamics. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 2088-2097, 2018. DOI: 10.1016/j.cej.2017.11.073
- ZHANG, P.; CHEN, Y.; ZHOU, Q. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. **Water Research**, v. 43, n. 15, p. 3735-3742, 2009. DOI: 10.1016/j.watres.2009.05.036
- ZHANG, Q. *et al.* High variations of methanogenic microorganisms drive full-scale anaerobic digestion process. **Environment International**, v. 126, p. 543-551, 2019. DOI: 10.1016/j.envint.2019.03.005
- ZHENG, L. *et al.* Roles of phosphorus sources in microbial community assembly for the removal of organic matters and ammonia in activated sludge. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1023, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01023
- ZIEMINSKI, K.; KOWALSKA-WENTEL, M. Effect of enzymatic pretreatment on anaerobic co-digestion of sugar beet pulp silage and vinasse. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 274-280, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.035
- ZOPPAS, F. M. *et al.* Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29-42, 2016. DOI: 10.1590/S1413-41520201600100134682
- ZUPANČIČ, G. D.; GRILC, V. Anaerobic Treatment and Biogas Production from Organic Waste. In: KUMAR, S. (ed.). **Management of Organic Waste**. Londres: IntechOpen, 2012. p. 1-28. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/32756>. Acesso em: 25 jan. 2022.

# PRODUTO CIENTÍFICO GERADO: Artigo de revisão publicado em periódico internacional

Periódico científico: *Renewable & Sustainable Energy Reviews* / ISSN: 1364-0321

Fator de Impacto: 16,799 (JCR 2021)

DOI: 10.1016/j.rser.2021.111904

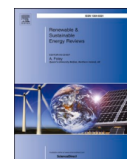
Renewable and Sustainable Energy Reviews 155 (2022) 111904



Contents lists available at ScienceDirect

## Renewable and Sustainable Energy Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rser](http://www.elsevier.com/locate/rser)



### Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations

J.C. Siqueira<sup>a,\*</sup>, M.Q. Braga<sup>a</sup>, M.S. Ázara<sup>a</sup>, K.J. Garcia<sup>a</sup>, S.N.M. Alencar<sup>a</sup>, T.S. Ramos<sup>a</sup>, L.A. B. Siniscalchi<sup>a</sup>, P.P. Assemany<sup>a</sup>, A.V. Ensinas<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Engineering, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras), MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Engineering, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras), MG, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
biorefinery  
biogas  
algal biomass  
sugar-ethanol mill  
energy balance  
cogeneration

#### ABSTRACT

Resource recovery from agro-industrial wastes in the sugar-ethanol industry is a strategy under wide development. Besides promoting sustainability of the biorefinery plant and mitigating its negative environmental impacts, this strategy may also economically benefit the agro-industry by commercializing recovered added-value resources. In this regard, the sector commonly exploits by-products such as biofuels and biomaterials. This study proposes to build a critical review of a hypothetical integrated biogas plant combined with vinasse treatment and microalgae cultivation annexed within a sugar-ethanol mill. It addresses an innovative approach by proposing a sustainability-oriented plant (in terms of energy and resources) that combines different processes individually discussed in the literature. This strategy contributes to maintaining a closed-loop in the sugar-ethanol industrial plant. The primary data on algal cultivation in a mixotrophic medium (pretreated vinasse) and biogas generation from the anaerobic co-digestion of vinasse and algal biomass are listed. It then focuses on implementing resource recovery techniques aiming at achieving biorefinery sustainability, viz., valorizing nutrients from the biosolids as biofertilizers and disposing of treated vinasse for fertigation of sugarcane crops. In addition, biogas purification may generate biomethane (as a source of heat and electrical energy) and promote supplementary carbon for microalgae cultivation. Lastly, the proposed plant's viability is demonstrated by calculating the system's energy balance and net energy ratio (NER), whose results are  $+14.49 \text{ MJ.m}^{-3} \text{ vinasse}$  and 2.0, respectively.

#### 1. Introduction

Brazil is the world's largest sugarcane producer, responsible for generating income and jobs, moving, in 2017, more than R\$72 million [1] – in Brazilian national currency or approximately US\$14 million. The sugar-ethanol industry is proving to be prosperous in its march towards environmental sustainability since sugarcane ethanol is a biofuel obtained from a renewable source, not presenting the adverse effects of fossil fuels on the atmospheric carbon balance [2]. The transformation process of sugarcane into ethanol results in the production of vinasse, a nutrient-rich by-product with a high load of organic matter and acidity, which implies its potential for environmental pollution [3]. Vinasse is usually employed in the fertigation of sugarcane crops and treated through soil destination [4,5]. However, studies evaluate its treatment via anaerobic digestion (AD) [6,7] and microalgae cultivation [8,9] as more suitable alternatives from technical and environmental perspectives.

Microalgae are photosynthetic microorganisms considered as promising feedstocks for various economic and environmental purposes [10]. Algae biomass may generate high value-added (e.g., pharmaceuticals and chemicals for human nutrition) and low value-added products (e.g., third-generation biofuels) [11,12]. While producing biomass, microalgae fix carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) for the cell's vital activities, making them a target for environmental initiatives [13,14]. The literature reports several culture media for microalgae production, especially agro-industrial wastewater with high nutrient content [15,16]. The cultivation in vinasse presents advantages such as the alternative treatment of this wastewater which has high polluting potential for soil and groundwater [17], and its use as a mixotrophic culture medium [18]. Therefore, algal cultivation may perform as a tertiary treatment level of vinasse by reason of the simultaneous removal of organic carbon, nitrogen, and phosphorus [19].

However, before becoming a suitable algal culture medium, the raw vinasse needs to be treated beforehand in order to decrease the acidity, organic load, and concentration of suspended solids and toxic substances

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [julianocuri2015@gmail.com](mailto:julianocuri2015@gmail.com) (J.C. Siqueira), [paula.assemany@ufla.br](mailto:paula.assemany@ufla.br) (P.P. Assemany).

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111904>

Received 27 May 2021; Received in revised form 11 October 2021; Accepted 8 November 2021

Available online 19 November 2021

1364-0321/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1 – SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY OF ANAEROBIC SLUDGES FROM DIFFERENT WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS

#### ABSTRACT

Anaerobic technology in wastewater treatment is widespread in Brazil, benefiting from the country's favorable climatic conditions and operational simplicity of the technique. For a stable and effective operation, it is essential to maintain a high microbial activity within these systems. In this regard, this study aimed to analyze the specific methanogenic activity (SMA) of sludge samples from four anaerobic treatment systems in order to select the biomass with higher methanogenic potential for subsequent inoculation in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. For this purpose, a bench-scale test was performed, also allowing to monitor the operational performance of the sampled anaerobic systems, which were: i) a septic tank from a kennel; ii) a prototype-scale UASB reactor for swine wastewater treatment; and two full-scale UASB reactors from wastewater treatment plants (WWTP) treating iii) university and iv) domestic sewage. Daily  $\text{CH}_4$  yield was determined in the assay through a straightforward and low-cost method (viz., direct volumetric measurement), by washing the biogas with NaOH 15% over 30 days. At the end of the test, the SMA of the prototype UASB sludge was the highest ( $0.045 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gTVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) among those from the other samples; however, it was verified higher cumulative  $\text{CH}_4$  yield by the university WWTP UASB sludge ( $100.1 \text{ mL}_{\text{CH}_4}$ ) than that of the prototype UASB sludge sample ( $57.7 \text{ mL}_{\text{CH}_4}$ ). Furthermore, the latter sample enabled higher  $\text{CH}_4$  production in a more extended log phase period, despite not presenting the highest SMA among the analyzed samples. The reported results therefore indicate that the WWTP UASB sample is the most suitable sludge to be used as inoculum for the lab-scale UASB reactor, possibly allowing higher substrate degradation efficiency and biogas yield.

**KEYWORDS:** Methane; Anaerobic digestion; Bioenergy; Biogas; UASB reactor; Biomass

#### HIGHLIGHTS

- Specific methanogenic activity (SMA) tests can monitor anaerobic systems' performance;
- The direct volumetric measurement is a low-cost and simple tool for SMA assay;
- University WWTP UASB sludge proved to be the most suitable sample for inoculation.

## 1 INTRODUCTION

Anaerobic technology in wastewater treatment is widespread in Brazil, benefiting from the country's favorable climatic conditions and operational simplicity of the technique (VON SPERLING, 2016). In anaerobic reactors occurs the process known as anaerobic digestion, which is the degradation of complex organic matter by microorganisms in the absence of oxygen, producing the biofuel known as biogas, composed mainly of methane (CH<sub>4</sub>), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), water, and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) (APARICIO *et al.*, 2020). The CH<sub>4</sub> content in biogas could be used for energy purposes, e.g., by generating useful heat and electricity in cogeneration engines (CAPOSCIUTTI *et al.*, 2020). Therefore, anaerobic digestion is a treatment technique that allows resource recovery from wastewater, thus favoring environmental sustainability and circular bioeconomy (FAGERSTRÖM *et al.*, 2018). Although the simplicity, the success of an anaerobic system depends fundamentally on maintaining an adapted biomass with high microbial activity inside it (CHERNICHARO, 2016; AHMED; BUEZO; SAADY, 2019). Hence, monitoring the microbial activity within an anaerobic reactor is necessary, especially of the methanogenic archaea, whose result is directly related to CH<sub>4</sub> yield and, consequently, the overall system's treatment efficiency (SINGH *et al.*, 2019).

Specific methanogenic activity (SMA) assay determines the maximum CH<sub>4</sub> yield capacity of anaerobic biomasses through a laboratory test performed under controlled conditions. The goal is to enable the maximum biochemical activity to convert biodegradable organic matter to biogas using specific substrates whose availability is not limiting (AQUINO *et al.*, 2007; HUSSAIN; DUBEY, 2013). Besides its use as a routine analysis, the SMA test has other applications, among which: evaluation of biomass behavior under inhibitory compounds; establishing the substrate biodegradability's degree; monitoring changes in sludge activity by inert material accumulation; determining the maximum organic loading rate (OLR) to be applied to bioreactors and the minimum mass of sludge to be maintained within them; assessing the systems' kinetic parameters (BARROS *et al.*, 2010; VELUCHAMY; KALAMDHAD, 2017).

For SMA assays, the sampled biomass should be conditioned in reaction flasks and fed with substrates that favor suitable conditions for the methanogenesis step by using a mixture of volatile fatty acids (VFA), e.g., acetate, propionate, butyrate, and formate (XU *et al.*, 2018; KURTH; OP DEN CAMP; WELTE, 2020). Therefore, the test also verifies the syntrophic capacity between methanogenic and acetogenic microorganisms since archaea depend on the proper activity of acetate-producing organisms for CH<sub>4</sub> generation (DYKSMA; JANSEN;

GALLERT, 2020). Besides the substrate, it is essential to apply a nutrient solution containing macro- and micronutrients, alkalinity, and a reducing agent, in order to achieve an appropriate nutrient-to-organic matter ratio. Furthermore, the contact between biomass and substrate must be provided to enhance the mass transfer throughout the test (AQUINO *et al.*, 2007). After adding proper amounts of biomass and substrate and maintaining favorable conditions for the experiment, the SMA test will promote CH<sub>4</sub> yield over a specific period. After the test data collection, the SMA result will be equivalent to the ratio between the maximum CH<sub>4</sub> productivity rate – taken from a time chart of cumulative CH<sub>4</sub> yield – and the biomass amount. Thus, the assay measures the velocity of the methanogenic phase and, associated with biomass quantification, provides the maximum methanogenic potential of a reactor operating under ideal conditions (ABREU; ARAÚJO, 2011). According to Chernicharo (2016), the typical SMA values for anaerobic sludges treating sewage are within 0.10 to 0.40 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

The techniques for measuring the biogas generated in the SMA test are classified into manometric and volumetric methods (CHERNICHARO, 2016). The manometric methods measure the pressure exerted by the biogas or CH<sub>4</sub> through a calibrated sensor that converts this value to gas volume. The advantage is in coupling these systems to computers, enabling instantaneous monitoring and process automation, despite the high costs of acquiring and maintaining the equipment. On the other hand, volumetric methods are low-cost techniques based on storing the produced volume of biogas or CH<sub>4</sub>, then estimating it through the liquid displacement method. According to Aquino *et al.* (2007), the biogas should be washed with caustic soda solution (e.g., NaOH 15%) for direct volumetric measurement to absorb CO<sub>2</sub> and measure only the CH<sub>4</sub> yielded. Due to the operational simplicity, small wastewater treatment plants (WWTPs) and laboratories without extensive infrastructure might implement volumetric methods for assessing the methanogenic potential of sludge samples. In that regard, we aimed to analyze and compare the SMA of anaerobic sludge samples through the direct volumetric method in order to select the biomass with higher methanogenic capacity for subsequent inoculation in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. Moreover, the SMA test allowed us to monitor the operational performance of different anaerobic treatment systems.

## 2 MATERIAL AND METHODS

We evaluated the SMA of four biomasses from different anaerobic treatment systems: i) sludge from a septic tank installed within the Parque Francisco de Assis kennel, Lavras, Minas Gerais, Brazil; ii) sludge from a prototype-scale UASB reactor treating swine wastewater;



sludges from two full-scale UASB reactors installed at different WWTPs: (iii) one treating university sewage from the Federal University of Lavras (UFLA WWTP), Brazil; (iv) and the other treating domestic sewage from the municipality of Lavras (Ribeirão Vermelho WWTP – Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA)). We perform the samplings by collecting the sludge closest to the bottom of these treatment units. This region concentrates larger granulometry solids, so higher SMA values are expected (JIJAI *et al.*, 2014).

The direct volumetric measurement methodology described by Aquino *et al.* (2007) was performed for SMA assays, using only acetate as a carbon and energy source and total volatile solids (TVS) for quantification of biomass concentration, as proposed by Abreu and Araújo (2011). About 1 L of sludge was collected on each anaerobic system and kept under refrigeration at 4 °C. For the SMA test, 110 mL flasks were used in triplicate for each sample. The usable volume for cultivation was 100 mL, resulting from mixing the sludge, substrate, and nutrient solution. The remaining space (10 mL) was reserved to keep the internal atmosphere free (i.e., headspace), thus enabling biogas to accumulate inside the flasks. 2 g L<sup>-1</sup> of acetate and 4.34 gTVS L<sup>-1</sup> of sludge were added to each reactor flask, based on a food-to-microorganism (F/M) ratio of 0.5 gCOD gTVS<sup>-1</sup> (ABREU; ARAÚJO, 2011). The samples' TVS and total solids (TS) concentrations were measured according to APHA, AWWA, and WEF (2012). Then, the flasks' usable volume was completed with macro- and micronutrient stock solution (Table 1), plus 0.2 g of yeast extract as an additional vitamin source (SOUTO *et al.*, 2010; CHERNICHARO, 2016).

Table 1 – Concentrations of the substances used in the preparation of the macro- and micronutrient stock solution.

Macronutrients		Micronutrients	
Substance	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Substance	Concentration (g L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.50	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.50	ZnCl <sub>2</sub>	0.05
NH <sub>4</sub> Cl	5.00	CuCl	0.17
Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O	0.50	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00	HCl (≈ 12 mol L <sup>-1</sup> )	1.00 mL L <sup>-1</sup>
Agarose	15.00	–	–

Source: From the author (2022).

Once filled with substrate, sludge, and nutrient solution, the reactor flasks were sealed with rubber bungs and aluminum seals, and the oxygen inside them was expelled by washing

the atmosphere by applying 1 psi of inert gas (N<sub>2</sub>) for 2 minutes. Subsequently, the flasks were sealed with silicone and incubated in a bacteriological oven at 30 ± 2 °C.

The CH<sub>4</sub> produced in each flask was monitored daily over 30 days (February 21<sup>st</sup> to March 21<sup>st</sup>, 2020) by washing the biogas with NaOH 15% and measuring the displaced liquid using a volumetric beaker. The cumulative CH<sub>4</sub> volume data for each sludge sample were processed using the R 3.6.3 programming language (<https://cran.r-project.org>) (R CORE TEAM, 2020), and the Logistic and Gompertz sigmoidal models were fitted to the observed data, allowing comparison among the curves generated for each assessed biomass. Finally, the cumulative CH<sub>4</sub> volumes (in mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>) obtained for the sludge samples were converted to gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> from a stoichiometric conversion factor ( $F = 394 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \text{ gCOD}_{\text{CH}_4}^{-1}$ ), considering a temperature of 30 °C and pressure of 1 atm. Figure 1 shows the experimental setup used for performing the CH<sub>4</sub> measurements. At the end of the experiment, the analysis of the SMA results allowed us to choose the biomass for inoculation in a lab-scale UASB. The TVS/TS ratio, cumulative CH<sub>4</sub> yield, and SMA of the evaluated sludge samples were considered for the inoculum selection.

Figure 1 – Experimental apparatus used for measuring the CH<sub>4</sub> volume produced inside the reactor flasks.



Source: From the author (2022).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

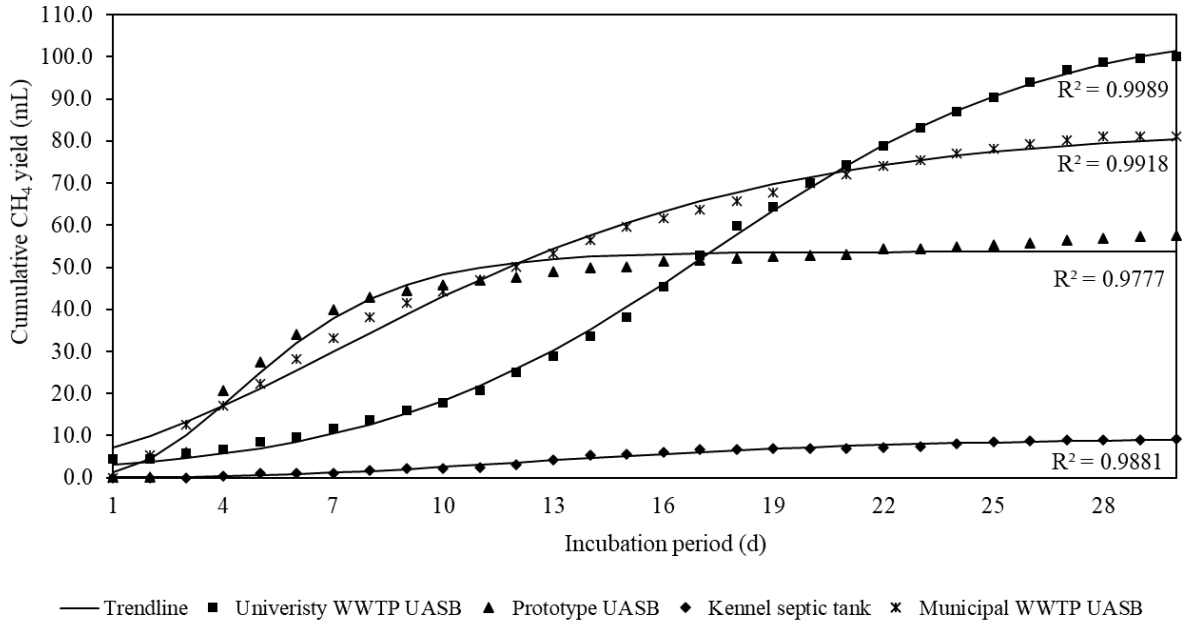
Table 2 presents the SMA, cumulative CH<sub>4</sub> yield, and solid content results for each tested anaerobic sludge sample. On the other hand, Figure 2 shows the scatter plots and curves fitted to the Logistic or Gompertz models (only the model with the best fit appears on it) of the accumulated CH<sub>4</sub> volume produced over one month for each SMA assay. All model coefficients were significant at 0.001 probability (p-value).

Table 2 – SMA of the analyzed anaerobic sludge samples and their respective values of TVS, TVS/TS ratio, and cumulative CH<sub>4</sub> yield.

<b>Sludge sample</b>	<b>TVS (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>TVS/TS</b>	<b>Cumulative CH<sub>4</sub> yield (mL)</b>	<b>SMA (gCOD<sub>CH4</sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>
Kennel septic tank	47.3	0.45	9.1	0.007
Prototype UASB	30.8	0.42	57.7	0.045
Municipal WWTP UASB	31.6	0.70	81.1	0.025
University WWTP UASB	49.7	0.36	100.1	0.034

Source: From the author (2022).

Figure 2 – Cumulative daily CH<sub>4</sub> yield data over 30 days of SMA testing for the analyzed biomass samples. The sigmoidal models applied to the observed data are Logistic (sludge from the kennel septic tank) and Gompertz (sludges from the other three evaluated systems).



Source: From the author (2022).

The SMA of the prototype-scale UASB sludge sample was the highest (0.045 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) among the analyzed biomasses; however, its curve's inflection point occurred earlier (approximately on the 4<sup>th</sup> day) compared to that from the university WWTP UASB sludge – taking place 17 days after the beginning of the test, according to Figure 2. This maximum rate anticipation indicates that the prototype UASB reactor sludge had a faster adaptation (or lag phase) to the environment. Likewise, the prototype-scale system presented a shorter exponential phase (or log phase) over one week (from day 3 to day 9). On the other hand, the log phase corresponds to the highest methanogenesis activity period, enabling extracts the maximum CH<sub>4</sub> production rate through the higher curve slope; therefore, it allows the SMA calculation by implication.

Meanwhile, the lag and log phases were longer for the university WWTP UASB biomass, occurring up to the 8<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> day, respectively – Figure 2. The university's full-scale reactor sludge presented an SMA of 0.034 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and an inflection point on the 17<sup>th</sup> day. Hence, the higher CH<sub>4</sub> yield phase occurred over a wider time interval for this sample. These facts explain the higher cumulative CH<sub>4</sub> volume for the university WWTP UASB sludge (100.1 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>) than for the prototype UASB reactor sludge sample (57.7 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>), as shown in Table 2.

Moreover, the sigmoidal curve was better adapted to the university WWTP system biomass data, with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.9989, against 0.9777 for the prototype reactor.

The SMA values obtained for the samples mentioned above from UASB reactors of different scales are similar to some literature results. Alves *et al.* (2005) recorded, for swine wastewater bioreactor sludge, an SMA of  $0.0331 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gTVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , employing the same method used in this study; whereas Almeida *et al.* (2011) reported, for UASB reactor sludge treating dairy wastewater, an SMA of  $0.040 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gTVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Barros *et al.* (2010), who extracted sludge during the start-up phase of a UASB reactor treating sewage, obtained an SMA of  $0.017 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  by submitting the biomass to the same test conditions as in this study. Nevertheless, according to Chernicharo (2016), anaerobic sludge used for sewage treatment often has SMA values between 0.1 and  $0.4 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gTVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . The result obtained in the present study is still below those generally presented in the literature. Using acetate as substrate, here are the SMA of sludge from UASB reactors treating sewage and the respective test conditions:  $0.21 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Rocha *et al.* (2001) – direct volumetric measurement,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  without stirring);  $0.24\text{--}0.27 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Zhang *et al.* (2018) – manometric method,  $10\text{--}35 \text{ }^\circ\text{C}$  with stirring);  $0.26\text{--}0.30 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gTVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Cordeiro *et al.* (2018) – volumetric method with gas chromatography,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  without stirring).

In a previous study, Paez (2019) obtained an SMA of  $0.055 \text{ gCOD}_{\text{CH}_4} \text{ gTVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  for the university WWTP UASB sludge under the same experimental conditions as those applied in the present study. The UFLA WWTP is responsible for treating university sewage, a highly diversified wastewater in its composition. Depending on the origin of the wastewater that feeds the station, this may contain organic solvents, toxic reagents, inorganic substances, acid and alkaline solutions, and pathogenic organisms. These are compounds commonly found in the various sectors and laboratories at the university, and they could compromise the station's anaerobic treatment efficiency, resulting in sludge with low methanogenic activity (BERTOLINO; CARVALHO; AQUINO, 2008). Furthermore, Alves, Cammarota, and França (2005) evaluated the anaerobic activity inhibition by substances present in wastewater produced by research laboratories and concluded that sodium, mercury, chromium, phenol, and sulfate were responsible for the most significant effects on the SMA inhibition percentage. Also, according to Tchobanoglous *et al.* (2003) and Kougias *et al.* (2016), the hydrolysis of lipid-rich wastewater (i.e., containing substances commonly found in laboratories) may result in the accumulation of VFA inside anaerobic reactors, most significantly negatively impacting acetoclastic methanogenic archaea – which are responsible for over 70% of  $\text{CH}_4$  yield. As the

SMA test performed for the present study used only sodium acetate as a substrate source, the probable inhibition of acetoclastic organisms occurring in the university WWTP UASB sludge may have reduced the anaerobic digestion performance during the experiment.

Besides, the SMA assay with acetate as substrate verifies only the acetoclastic methanogenic archaea activity. In contrast, propionate or formate quantifies the hydrogenotrophic pathway and enables the evaluation of the methanogenesis step as a whole. The higher SMA for the hydrogenotrophic pathway is attributed to the fact that the biodegradation of propionate or formate originates hydrogen gas (H<sub>2</sub>) and CO<sub>2</sub>, which may be converted into CH<sub>4</sub> by hydrogenotrophic methanogenic archaea or acetate by homoacetogenic bacteria. Subsequently, acetate could form CH<sub>4</sub> throughout acetoclastic methanogenic archaea. It is worth noting that the literature generally reports SMA values employing the volatile suspended solids (VSS) to estimate the amount of biomass. Nonetheless, this study employed the TVS concentration as a basis for calculations – according to the methodology described by Abreu and Araújo (2011) –, which may underestimate the SMA final result (LOZANO *et al.*, 2009; MONCADA; SILVA, 2016; PAEZ, 2019; TSAPEKOS; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2022).

Concerning the other samples tested, the municipal WWTP UASB sludge showed an SMA of 0.025 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and a cumulative CH<sub>4</sub> yield of 81.1 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>, as reported in Table 2. The difference in the SMA value of this sample to that from the university WWTP UASB reactor (0.034 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) can be explained by the nature of the wastewater to which the latter anaerobic biomass is subjected. Since university sewage presents adverse physical and chemical characteristics for anaerobic microorganisms – as mentioned earlier –, the microbiota may present a higher resistance to inhibitory compounds, which could positively impact its adaptability and, consequently, its methanogenic potential when exposed to favorable growth conditions (which are guaranteed during the SMA assay) (CZATZKOWSKA *et al.*, 2020). On the other hand, the outstanding feature of the municipal WWTP sludge was the high volatile and total solids ratio (TVS/TS) ratio (0.70 – the highest among all samples evaluated). This ratio suggests high microbial biomass concentration and biodegradability potential (KARNCHANAWONG; UPARAWANNA, 2007; CHERNICHARO, 2016).

Regarding the sludge obtained from the kennel septic tank, this sludge presented the lowest values for both SMA and accumulated CH<sub>4</sub> yield (0.007 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and 9.1 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>, respectively) (Table 2). These results are also lower than those reported in the literature for this anaerobic system. Moussavi *et al.* (2010) achieved an SMA of 0.072 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gVSS<sup>-1</sup>

$d^{-1}$  when analyzing sludge from a pilot-scale septic tank treating sewage and using acetate as substrate. The higher result than the present study may have been caused by employing the VSS instead of TVS concentration to calculate SMA. In addition, kennel wastewater has a different composition compared to sewage. We noted animal hair in the reactor's bottom biomass when sampling the kennel septic tank sludge. These solid materials may have negatively affected the anaerobic microbiota activity of the system.

#### **4 CONCLUSIONS**

This study evaluated the SMA of four sludges from different treatment systems through a straightforward and low-cost method (direct volumetric measurement), which may be applied to laboratories and WWTPs without robust infrastructure for monitoring anaerobic bioreactors in terms of sludge quality, treatment potential, and biogas productivity. Nevertheless, the experiment presented SMA results below those generally reported in the literature, possibly because the TVS rather than VSS concentration was employed to calculate the methanogenic potential of the samples.

Despite this, it was still possible to compare and select the most promising inoculum among the sludge samples evaluated. The university WWTP UASB reactor sample presented a higher cumulative  $CH_4$  yield in a more extended log phase, despite not presenting the highest SMA among the assessed samples. Furthermore, this sample may have a higher capacity for adaptability to adverse conditions of some wastewater since the system from which it derives treats university sewage – which contains inhibiting substances for anaerobic microbiota. Therefore, we concluded that it is the most suitable biomass to be used as inoculum for the lab-scale UASB reactor, possibly allowing faster adaptation during the system start-up and higher substrate degradation efficiency and biogas yield.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Federal University of Lavras (UFLA), Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), and Parque Francisco de Assis kennel for kindly providing samples for this experiment. The author J. C. de Siqueira also wishes to thankfully acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Finance Code 001].

## REFERENCES

- ABREU, E. F.; ARAÚJO, J. C. **Ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) para lodos anaeróbios. Procedimento Operacional Padrão**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2011. 27 p. Documento da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Ambiental. 2011.
- AHMED, A. M. S.; BUEZO, K. A.; SAADY, N. M. C. Adapting anaerobic consortium to pure and complex lignocellulose substrates at low temperature: kinetics evaluation. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 8, p. 99-110, 2019. DOI: 10.1007/s40093-018-0238-2
- ALMEIDA, M. T. *et al.* Comparação entre atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios tratando efluentes de conservas vegetais, laticínios e parbolização do arroz. XX Congresso de Iniciação Científica da UFPel, **Conference proceedings**, Pelotas, 2011. Available at: [https://www2.ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/CA/CA\\_00248.pdf](https://www2.ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/CA/CA_00248.pdf). Accessed: 28 Mar. 2021.
- ALVES, L. C., CAMMAROTA, M. C., FRANÇA, F. P. Inibição de lodo biológico anaeróbio por constituintes de efluente de laboratório de controle de poluição. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 236-242, 2005. DOI: 10.1590/S1413-41522005000300008
- ALVES, R. G. C. M. *et al.* Digestores anaeróbios para tratamento de dejetos suínos – avaliação de partida para diferentes configurações de reatores. XXIII Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Conference proceedings**, Campo Grande, 2005.
- APARICIO, E. *et al.* Biofuels production of third generation biorefinery from macroalgal biomass in the Mexican context: An overview. *In*: TORRES, M. D.; KRAAN, S.; DOMINGUEZ, H. (eds.). **Sustainable Seaweed Technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 393-446. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00015-9>. Accessed: 20 Jan. 2022.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 2012. 1496 p.
- AQUINO, S. F. *et al.* Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007. DOI: 10.1590/S1413-41522007000200010



BARROS, A. R. M. *et al.* Acompanhamento da partida de reator UASB através da atividade metanogênica específica – AME. *In: V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação – CONNEPI, Conference proceedings, Maceió, 2010.* Available at: <http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/859/607>.

Accessed: 28 Mar. 2021.

BERTOLINO, S. M.; CARVALHO, C. F.; AQUINO, S. F. Caracterização e biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos esgotos produzidos em campus universitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 271-277, 2008. DOI: 10.1590/S1413-41522008000300005

CAPOSCIUTTI, G. *et al.* Biogas from Anaerobic Digestion: Power Generation or Biomethane Production?. **Energies**, v. 13, n. 3, p. 743, 2020. DOI: 10.3390/en13030743

CHERNICHARO, C. A. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios**. 2. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA/UFMG, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016. 379 p.

CORDEIRO, A. L. *et al.* Atividade Metanogênica Específica: Metodologias simplificada e automatizada para lodos de reatores anaeróbios. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 5, p. 661-665, 2018. DOI: 10.18378/rvads.v13i5.6282

CZATZKOWSKA, M. *et al.* Inhibitors of the methane fermentation process with particular emphasis on the microbiological aspect: A review. **Energy Science & Engineering**, v. 8, p. 1880-1897, 2020. DOI: 10.1002/ese3.609

DYKSMA, S.; JANSEN, L.; GALLERT, C. Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste. **Microbiome**, v. 8, n. 105, 2020. DOI: 10.1186/s40168-020-00862-5

FAGERSTRÖM, A. *et al.* **The role of Anaerobic Digestion and Biogas in the Circular Economy**. Murphy, J.D. (ed.). Report – IEA Bioenergy 37, 2018. 24 p. Available at: [https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2018/08/anaerobic-digestion\\_web\\_END.pdf](https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2018/08/anaerobic-digestion_web_END.pdf). Accessed: 22 Jan. 2022.

HUSSAIN, A.; DUBEY, S. K. Specific methanogenic activity test for anaerobic treatment of phenolic wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, p. 7015-7025, 2013. DOI: 10.1080/19443994.2013.823116

JIJAI, S. *et al.* Specific Methanogenic Activities (SMA) and Biogas Production of Different Granules Size and Substrates. The 1<sup>st</sup> Environment and Natural Resources International Conference, **Conference proceedings**, Bangkok, 2014. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/316062752\\_Specific\\_Methanogenic\\_Activities\\_SMA\\_and\\_Biogas\\_Production\\_of\\_Different\\_Granules](https://www.researchgate.net/publication/316062752_Specific_Methanogenic_Activities_SMA_and_Biogas_Production_of_Different_Granules) (2014). Accessed: 28 Mar. 2021.

KARNCHANAWONG, S.; UPARAWANNA, S. Performance of single-phase complete-mix anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Asian Journal on Energy and Environment**, v. 8, n. 4, p. 627-634, 2007. Available at: <https://www.thaiscience.info/journals/Article/AJEE/10262472.pdf>. Accessed: 06 Feb. 2022.

KOUGIAS, P. G. *et al.* Dynamic functional characterization and phylogenetic changes due to Long Chain Fatty Acids pulses in biogas reactors. **Scientific Reports**, n. 28810, 2016. DOI: 10.1038/srep28810

KURTH, J. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; WELTE, C. U. Several ways one goal – methanogenesis from unconventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6839-6854, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10724-7

LOZANO, C. J. S. *et al.* Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704-711, 2009. DOI: 10.1016/j.wasman.2008.06.021

MONCADA, M. S. A.; SILVA, M. Q. Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. **Revista Ion**, v. 29, n. 1, p. 117-123, 2016. DOI: 10.18273/revion.v29n1-2016010

MOUSSAVI, G., KAZEMBEIGI, F., FARZADKIA, M. Performance of a pilot scale up-flow septic tank for on-site decentralized treatment of residential wastewater. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 88, n. 1, p. 47-52, 2010. DOI: 10.1016/j.psep.2009.10.001

PAEZ, S. **Estudo da atividade metanogênica específica e microbiota de lodo proveniente de um reator UASB instalado na ETE-UFLA tratando esgoto sanitário**. 2019. 86 p. Monograph (Professional Master's Degree in Environmental Technologies and Innovations) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019. Available at: <http://177.105.2.222/handle/1/38516> (2019). Accessed: 28 Mar. 2021

R CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing – R version 3.6.3. **Software**. 2020. Available at: <https://www.R-project.org>. Accessed: 28 Mar. 2021.

ROCHA, M. A. G. *et al.* Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de lodos de esgotos doméstico e industriais. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, **Conference proceedings**, João Pessoa, 2001. Available at: <https://docplayer.com.br/70658336-Ii-115-avaliacao-e-comparacao-entre-a-atividade-metanogenica-especifica-de-lodos-de-esgotos-domestico-e-industriais.html>. Accessed: 28 Mar. 2021.

SINGH, S. *et al.* Acetotrophic Activity Facilitates Methanogenesis from LCFA at Low Temperatures: Screening from Mesophilic Inocula. **Archaea**, v. 2019, p. 1-16, 2019. DOI: 10.1155/2019/1751783

SOUTO, T.F. *et al.* Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. **Biodegradation**, v. 21, p. 411-424, 2010. DOI: 10.1007/s10532-009-9311-x

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4 ed. Boston: Metcalf & Eddy, Inc., 2003. 25 p.

TSAPEKOS, P.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. H<sub>2</sub> competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea during biomethanation from a combined experimental-modelling approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 2, p. 107281, 2022. DOI: 10.1016/j.jece.2022.107281

VELUCHAMY, C.; KALAMDHAD, A. S. Biochemical methane potential test for pulp and paper mill sludge with different food / microorganisms ratios and its kinetics. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 197-204, 2017. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.01.005

VON SPERLING, M. **Urban Wastewater Treatment in Brazil**. Technical note – Inter-American Development Bank IDB-TN-970, 2016. 102 p. Available at: <https://publications.iadb.org/en/urban-wastewater-treatment-brazil>. Accessed: 06 Feb. 2022.

XU, S. *et al.* Differentiated stimulating effects of activated carbon on methanogenic degradation of acetate, propionate and butyrate. **Waste Management**, v. 76, p. 394-403, 2018. DOI: 10.1016/j.wasman.2018.03.037

ZHANG, L. *et al.* Anaerobic treatment of raw domestic wastewater in a UASB-digester at 10 °C and microbial community dynamics. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 2088-2097, 2018. DOI: 10.1016/j.cej.2017.11.073

## PRODUTO CIENTÍFICO GERADO: Resumo expandido publicado em anais de congresso internacional

Evento: *Virtual THESSALONIKI 2021 8<sup>th</sup> International Conference on Sustainable Solid Waste Management*, Thessaloniki, Grécia

Link da publicação:

[http://uest.ntua.gr/thessaloniki2021/pdfs/THESSALONIKI\\_2021\\_Siqueira\\_et\\_al.pdf](http://uest.ntua.gr/thessaloniki2021/pdfs/THESSALONIKI_2021_Siqueira_et_al.pdf)

### Specific Methanogenic Activity of anaerobic sludge from different wastewater treatment systems

J.C. Siqueira<sup>1</sup>, L.A.B. Siniscalchi<sup>2</sup>, P.P. Assemany<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Department of Environmental Engineering, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37.200-900, Brazil

Keywords: methane, anaerobic digestion, bioenergy.  
Presenting author email: [julianocuri2015@gmail.com](mailto:julianocuri2015@gmail.com)

Anaerobic technology in wastewater treatment is widespread in Brazil, being benefited by climate conditions, besides presenting advantages such as low cost, low solids production, and tolerance to high organic loads. In anaerobic systems occurs the process known as anaerobic digestion, which is the degradation of complex organic matter by microorganisms in the absence of oxygen, producing the biofuel known as biogas, composed mainly of methane (CH<sub>4</sub>), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), water and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). However, the monitoring of an adapted biomass with high microbial activity in anaerobic reactors is essential for ensuring the anaerobic process efficiency. Several methods have been proposed to evaluate the anaerobic microbial activity, based on the characterization of Specific Methanogenic Activity (SMA). SMA is defined as the maximum CH<sub>4</sub> production capacity by an anaerobic microbial community (or anaerobic sludge), where the conversion of organic substrates into CH<sub>4</sub> occurs in a controlled manner in laboratory, such as substrate addition and temperature control, in order to favor the metabolism of methanogenic archaea. We aimed to analyze SMA from different anaerobic samples to select the biomass with higher methanogenic capacity for subsequent inoculation in a pilot-scale UASB reactor, in addition to allowing the monitoring of the anaerobic treatment operational performance of different wastewater systems.

This study assessed the SMA of three biomasses from different anaerobic systems: i) a septic tank sludge from a kennel; ii) a prototype UASB reactor sludge for swine wastewater treatment; and iii) a real scale UASB reactor sludge from a wastewater treatment plant (WWTP) treating university sewage. The experiment was performed to evaluate the maximum capacity of the three sludges, under anaerobic conditions and in laboratory-scale bioreactors, in converting organic substrates to CH<sub>4</sub>. After the sampling in each system, the concentration of total volatile solids (TVS) was measured according to APHA (2012), to obtain the volume of sludge to be added to 100 mL flasks, using a substrate/microorganism ratio of 0.5 gCOD/gTVS. The experiment was performed in triplicate. The flasks were sealed with rubber bung and aluminum sealing, maintaining anaerobic atmosphere after the expulsion of oxygen by N<sub>2</sub> and incubated at 30±2 °C. Sodium acetate was used as a substrate in combination with macro and micronutrient solutions. The volume of CH<sub>4</sub> daily produced was directly measured through CH<sub>4</sub> volume measurement (Aquino *et al*, 2007) by washing biogas with NaOH 15%. After 30 consecutive days, accumulated CH<sub>4</sub> volume data was processed in programming language R 3.6.3 for SMA determination. For each anaerobic sludge, a sigmoidal model was adjusted to the observed data (Figure 1). Logistic and Gompertz models were used for comparison and all model coefficients were significant at 0.001 probability. SMA values obtained in mL<sub>CH<sub>4</sub></sub> were converted to gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> using stoichiometric conversion factor ( $F = 394 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{gCOD}_{\text{CH}_4})^{-1}$ ), considering temperature of 30 °C and pressure of 1 atm).

Table 1 presents SMA values obtained for each anaerobic sludge sample, in addition to the TVS values and TVS/TS ratio (Total Solids). The SMA of the prototype UASB sludge sample was the highest (0.045 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub>·(gTVS day)<sup>-1</sup>) among the analyzed sludge samples; however, the inflection point of the curve (Figure 1b) occurred previously (4<sup>th</sup> day) if compared with that of WWTP UASB sludge. This demonstrates that prototype UASB biomass had faster adaptation (or lag phase) to the environment. Likewise, it presented a shorter exponential phase (or log phase), occurring in approximately 6 days (from the 3<sup>rd</sup> to the 9<sup>th</sup> day). This is the phase that occurs the largest methanogenesis activity, allowing to obtain the maximum CH<sub>4</sub> production rate through the higher curve slope. On the other hand, the lag and log phases were longer for WWTP UASB biomass (Figure 1c), which were respectively up to the 8<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days, with a SMA of 0.034 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub>·(gTVS day)<sup>-1</sup> and an inflection point occurring on the 17<sup>th</sup> day. Thus, the phase of higher CH<sub>4</sub> yield occurred in a wider time interval for this sample. These facts explain the higher CH<sub>4</sub> accumulated volume during the test period by the WWTP UASB sludge (100.1 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>) compared to that of the prototype UASB sludge sample (57.7 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>). Furthermore, the curve was better adapted to the data of the WWTP UASB sludge ( $R^2 = 0.9989$ ) in relation to those of the prototype UASB sludge ( $R^2 = 0.9777$ ). SMA values obtained for these two sludge samples from different-scales UASB reactors were according to some results found in the literature. Alves *et al* (2005) recorded, for swine wastewater biodigester sludge, a SMA of 0.0331 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub>·(gTVS day)<sup>-1</sup>, using the same method used in this study, whereas Almeida *et al* (2011) reported, for UASB reactor sludge treating dairy wastewater, a SMA of 0.040 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub>·(gTVS day)<sup>-1</sup>. In a previous study carried out by Paez (2019), the value of 0.055 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub>·(gTVS day)<sup>-1</sup> was obtained for the same WWTP UASB sludge used in this study. For domestic sewage, the usual values are in the range of 0.1 to 0.4

## **ARTIGO 2 – CO-DIGESTING SUGARCANE VINASSE WITH DAIRY SECONDARY EFFLUENT IN A UASB REACTOR: ANALYSIS OF ANAEROBIC TREATABILITY, METHANOGENIC POTENTIAL, AND MICROBIAL DYNAMICS**

### **ABSTRACT**

Anaerobic digestion is an environmentally sustainable alternative for resource recovery from agro-industrial organic by-products, e.g., sugarcane vinasse. Nevertheless, the high organic load, acidity, and toxic compound levels in raw vinasse may inhibit the biodegradation process. In this context, the present study evaluated co-digestion as a strategy to enable the vinasse anaerobic processing, employing secondary effluent from the dairy industry as a co-substrate. The experiment was conducted over 91 days in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor (16 L) operating under mesophilic conditions (26 °C on average) and with an average organic loading rate of 1.6 kgCOD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. The average pollutant removals were: total chemical oxygen demand (69%), acidity (29%), volatile (51%) and total (48%) suspended solids, ammoniacal (6%) and total *Kjeldahl* (42%) nitrogen, total phosphorus (19%), phenols (51%), and sulfates (25%). Moreover, the average and maximum methane productivities were 221 and 308 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>, respectively. Furthermore, next-generation sequencing (NGS) analyses and specific methanogenic activity (SMA) assays of periodically sampled biosolids revealed the growth and maintenance of methanogenic archaea throughout the system operation, which indicates a gradual microbial adaptation to the substrate along with the treatment stability. Therefore, the proposed experiment may reflect possible economic benefits for the agro-industrial sector by implementing a similar but full-scale treatment plant.

**KEYWORDS:** Agro-industrial wastewater; High-rate anaerobic reactor; Biogas; Anaerobic microorganisms; Next-generation sequencing; Biological treatment

### **HIGHLIGHTS**

- The proposed co-digestion reached maximum CH<sub>4</sub> productivity of 308 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>;
- There was a predominance of hydrogenotrophic methanogens by the end of the operation;
- SMA assays coupled with NGS can provide interrelated data regarding the microbiota;
- The fertilizing potential of the effluent and biosolids was evaluated.

## 1 INTRODUCTION

Brazil is a prominent global biofuel producer, standing out in sugarcane-based ethanol production in biorefineries. The sugar-ethanol industry turnover in the country was around US\$10 billion in 2022, establishing itself as the fourth most impactful agro-industrial sector in the Brazilian trade balance (NASCIMENTO, 2021). During the ethanol manufacturing process, the fermented sugarcane juice distillation generates vinasse, a wastewater with a high nutritional content produced at an average rate of 10–15 L per liter of ethanol and commonly used for the fertigation of sugarcane fields (UNICA, 2019; FUESS *et al.*, 2021). Nevertheless, besides the high concentration of nutrients, e.g., nitrogen, phosphorus, and potassium, vinasse also contains high levels of organic matter, acidity, salts, and compounds such as phenols and sulfates, which gives it great potential for environmental damage when inadequately disposed on soil (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019; FERRAZ JUNIOR *et al.*, 2022).

Among the strategies for reducing the polluting potential of vinasse is its treatment via anaerobic digestion, a technique that consists of the biological degradation of complex organic matter in the absence of oxygen and its conversion to CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, and water, the major biogas components (APARICIO *et al.*, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2022). Thus, in addition to reducing the contaminating potential of vinasse, the anaerobic treatment also allows its energy recovery through CH<sub>4</sub> production (SILVA *et al.*, 2021). However, because of its adverse physical and chemical properties to the anaerobic microbiota cultivation and establishment – i.e., the presence of toxic substances, low pH, and inadequate carbon-to-nutrient ratio – the *in natura* vinasse may inhibit the metabolism of microorganisms and cease the biodigestion process (RAMOS *et al.*, 2021; CHAVES *et al.*, 2021). Therefore, it is necessary to incorporate operational strategies in order to turn vinasse into a substrate suitable for anaerobic microorganisms, which can reduce the treatment plant's applicability and feasibility (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; FUESS *et al.*, 2017a).

In this regard, anaerobic co-digestion is an attractive and technically feasible solution for vinasse anaerobic processing suitability (ALBANEZ *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2019). This strategy consists of mixing two or more organic wastes with complementary characteristics to increase the final substrate's anaerobic biodegradability and establish a favorable environment for developing an adequately adapted microbial biomass (VOLPI; FUESS; MORAES, 2021). Hence, the implementation of co-digestion might optimize the vinasse anaerobic digestion process and make it less dependent on pre-treatment steps and external substances' addition,

such as alkalizing and nutritional solutions, resulting in less costly and complex treatment (ALBANEZ *et al.*, 2018; SILLERO; SOLERA; PEREZ, 2022).

Some studies suggest the application of by-products from various agro-industrial sectors as suitable co-substrates to enable the vinasse anaerobic treatment, e.g., residues from cattle (MORAES *et al.*, 2015), pig (MENG *et al.*, 2020), and poultry farming (MARIN-BATISTA *et al.*, 2016); and coffee (PINTO *et al.*, 2018), soybean (SYAICHURROZI *et al.*, 2016), rice (MENG *et al.*, 2020), and biodiesel production (BORGES *et al.*, 2021). In addition to reducing negative environmental impacts, the anaerobic processing of two or more agricultural by-products may also contribute to the production of effluent and biosolids with high soil fertilizing potential, thereby fostering the circular bioeconomy in the agro-industrial sector (LOVATO *et al.*, 2019; PAN *et al.*, 2021). The dairy industry, for instance, can cooperate in a relevant way with the sugar-ethanol sector through the provision of co-substrates since its wastewater has high concentrations of lactose, proteins, and mineral salts, characteristics that can supplement existing deficiencies in substrates with lower anaerobic degradation potential, such as vinasse (LOVATO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019; BELLA; RAO, 2021).

Although the recent expansion of studies reporting vinasse anaerobic co-digestion experiments, there remains the need to develop research towards selecting alternative complementary substrates and measuring their application's effects, thereby increasing the possibilities of mitigating adverse environmental impacts and resource recovery by the sugar-ethanol industry. In this perspective, the present study aims to evaluate the performance of anaerobic co-digestion of sugarcane vinasse and effluent from an anaerobic treatment plant attached to a dairy industry (mixture 1:1 v/v) in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, operating for 91 days under mesophilic conditions, by analyzing the removal of pollutants and CH<sub>4</sub> productivity. The application of secondary anaerobic effluent from the dairy industry as a co-substrate combined with vinasse corresponds to a novel experimental approach once publications only report the use of raw wastewater from this agro-industrial sector (LOVATO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ALBUQUERQUE; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2019). This operational strategy is supported because the biodigested dairy waste presents in its composition, besides compounds that benefit the anaerobic degradation, reduced organic matter content and adjusted pH and alkalinity due to the previously applied treatment, thus decreasing the final mixture's organic load and additional alkalizing costs. Moreover, few published studies have monitored the microbial community dynamics of

anaerobic systems promoting vinasse co-digestion (BARROS *et al.*, 2017; VOLPI *et al.*, 2021). Given this, the present study also aims to demonstrate the periodic evolution of the microbiota present in the UASB reactor's biosolids, identifying microorganisms through next-generation sequencing (NGS) and performing specific methanogenic activity (SMA) assays. In parallel, the system solids' profile was characterized by sampling biosolids extracted at different heights of the bioreactor, assessing its potential application as a bio-based agricultural fertilizer.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Characteristics of the co-substrates and inoculum**

The substrates submitted to anaerobic co-digestion are (i) the sugarcane vinasse and (ii) the dairy industry's secondary anaerobic effluent. The vinasse was collected at the output of the Cachaça Bocaina artisanal cachaça distillery (with a liquor production capacity of 35,000 L yr<sup>-1</sup>), Lavras, Minas Gerais, Brazil, during the sugarcane harvesting and processing period (June 2021). The samples were stored in 20-30 L plastic containers and kept under refrigeration at -16 °C. Identical sampling and preservation procedures were applied to the effluent from the dairy industry's anaerobic treatment plant, whose responsible company will not be identified following a confidentiality request. The treatment plant of the selected dairy industry receives approximately 300 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> of industrial wastewater. It is composed of a preliminary treatment with oil removal, pH and alkalinity adjustment, followed by a primary stage with suspended solids removal and a secondary stage comprising a settling pond, biodigester, and anaerobic pond (*viz.*, the effluent sampling point), sequentially. The main physical and chemical properties of the substrates mentioned above are shown in Table 1.



Table 1 – Physical and chemical variable content of collected samples of sugarcane vinasse and dairy industry's secondary effluent.

Physical and chemical variables	Sugarcane vinasse	Dairy effluent
pH	3.67	8.41
Partial alkalinity (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	0	1,245.00
Intermediate alkalinity (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	0	175.00
Total alkalinity (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	0	1,420.00
Acidity (mgHAc L <sup>-1</sup> )	1,332.00	60.00
TSS (mg L <sup>-1</sup> )	1,220.50	178.75
VSS (mg L <sup>-1</sup> )	1,033.50	102.50
COD <sub>t</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	17,772.00	173.25
TKN (mg L <sup>-1</sup> )	35.03	67.14
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	4.38	46.70
P <sub>t</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	1.55	41.66
K <sub>t</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	314.73	211.48
Phenols (mg L <sup>-1</sup> )	447.48	1.97
Sulfates (mg L <sup>-1</sup> )	40.93	32.59

TSS and VSS = total and volatile suspended solids, respectively; COD<sub>t</sub> = total chemical oxygen demand; TKN = total *Kjeldahl* nitrogen; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = ammonia nitrogen; P<sub>t</sub> = total phosphorus; K<sub>t</sub> = total potassium.

Source: From the author (2022).

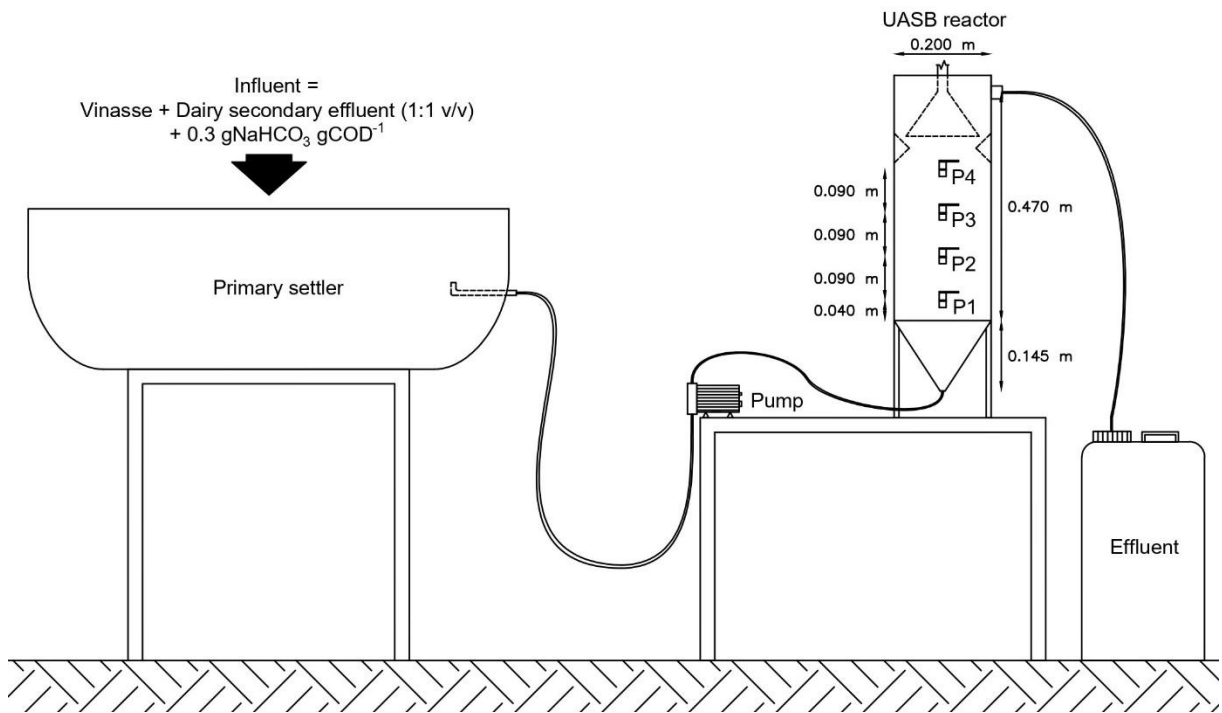
For inoculation of the anaerobic system evaluated in this study, sludge was extracted from a full-scale UASB reactor (1,350 m<sup>3</sup>) installed at the Ribeirão Vermelho wastewater treatment plant (WWTP), owned by the Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA) and treating approximately 3,000 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> of sewage from the municipality of Lavras, Minas Gerais, Brazil. From the total sample (5 L), a sufficient volume (0.2 L) was reserved at 4 °C for further inoculum characterization until starting the laboratory tests. Meanwhile, the remaining sampled volume was forwarded for introduction into the anaerobic system at room temperature – the inoculation procedure is described in Section 2.2. After evaluation of the solids concentration of the inoculum, a volatile and total solids (TVS/TS) ratio of 0.70 was found, suggesting high microbial biomass content and methanogenic potential, recommended features for an anaerobic system inoculation process (KARNCHANAWONG; UPARAWANNA, 2007; CHERNICHARO, 2016). The further analytical tests of the inoculum are detailed in Section 2.4.

## 2.2 Experimental set-up and system start-up and operation

The experimental apparatus consisted sequentially of (i) a primary sedimentation tank with a usable capacity of 45 L intended to store the substrate and reduce the suspended solids

influent content; (ii) a peristaltic metering pump (model Gamma/L GALA 1601 NPB, *ProMinent*<sup>®</sup>); (iii) a lab-scale high-rate anaerobic reactor UASB-type, manufactured in acrylic material, with a usable volume of 16 L (0.62 m of usable height and 0.20 m of internal diameter, with a tapered base); (iv) a storage reservoir (30 L) for the liquid effluent. Figure 1 shows the experimental lab-scale treatment plant components.

Figure 1 – Lab-scale experimental apparatus for the proposed treatment. P1, P2, P3, and P4 represent the anaerobic system biosolids' sampling points.



Source: From the author (2022).

The inoculation and start-up procedures were based on the methodology proposed by Chernicharo (2016). Firstly, 4.8 L of inoculum sludge was manually introduced into the UASB reactor, equivalent to 30% of the system's usable capacity, as reported in the study carried out by Barros, Duda, and Oliveira (2016). Then, after 24 h of standby, the system was fed daily with 2 L of a mixture of co-substrates (1:1 v/v) after adjusting alkalinity and pH by adding sodium bicarbonate – 0.3 gNaHCO<sub>3</sub> gCOD<sup>-1</sup> (DEL NERY *et al.*, 2018). Both proportions of co-substrates and alkalizing agent were kept fixed at either start-up and operation phases of the system. The system remained on standby after filling the UASB reactor's usable volume with the substrate and inoculum, and the generated biogas was monitored daily via the water displacement method. Concurrently, the following variables of the liquid supernatant were analyzed every three days: pH, temperature, dissolved oxygen (DO), and redox potential using

a multisensor probe (model HI98196, *HANNA*<sup>®</sup>); total chemical oxygen demand ( $\text{COD}_t$ ) concentration by the colorimetric method (5220B), according to APHA, AWWA, and WEF (2012); and alkalinity and acidity levels, according to Ripley, Boyle, and Converse (1986) and DiLallo and Albertson (1961), respectively. When a stabilization of the supernatant  $\text{COD}_t$  content and a biogas yield sharp drop were simultaneously verified, continuous pumping of the substrate was started. The interval between the start of the inoculation process and the end of the system's stationary state corresponded to the start-up period, which occurred in 19 days.

After start-up, the anaerobic treatment system operated for 91 running days under a constant inflow of  $3.6 \text{ L d}^{-1}$ , hydraulic retention time (HRT) of 4.44 d, average organic loading rate (OLR) of  $1.6 \text{ kgCOD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , and mesophilic conditions ( $26 \text{ }^\circ\text{C}$  on average). From sampling in the tap P4 twice a week, the anaerobic digestion process stability was monitored by measuring the physical and chemical conditions of the liquid medium contained within the UASB reactor (pH, temperature, DO, and redox potential) through the multisensor probe previously mentioned.

### **2.3 Evaluation of the substrate anaerobic treatability and biogas quantitative and qualitative analyses**

Table 2 mentions the analytical methodologies used for measuring distinct physical and chemical variables of influent and effluent liquid samples collected weekly from the UASB reactor. The effluent sample corresponds to the liquid stored in the final reservoir of the system – see Figure 1. These laboratory analyses aimed to monitor the anaerobic treatment performance regarding removing pollutants from the substrate.

Table 2 – Analytical equipment/methodologies for measuring the physical and chemical variables of influent and effluent liquid samples collected weekly from the anaerobic system.

Variable	Analytical method/equipment	Reference
pH	Multi-sensor probe (model HI98196, HANNA®)	–
Partial, intermediate, and total alkalinity	Ripley's method	Ripley, Boyle, and Converse (1986)
Acidity – VFA	Direct titration	DiLallo and Albertson (1961)
TSS	Gravimetric method	2540D
VSS		2540E
COD <sub>t</sub>	Colorimetric method (5220B)	APHA, AWWA, and WEF (2012)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Titrimetric method (4500-NH <sub>3</sub> .C)	
K <sub>t</sub>	Flame photometric method (3500-K.B)	
Sulfates	Turbidimetric method (4500-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .E)	Nogueira and Souza (2005)
TKN	Micro-Kjeldahl method	
P <sub>t</sub>	Modified ascorbic acid method (4500-P.E)	APHA, AWWA, and WEF (2012) adapted by Matos (2012)
Phenols	Spectrophotometric method – Folin-Denis reagent	AOAC (2019)

VFA = volatile fatty acids; TSS and VSS = total and volatile suspended solids, respectively; COD<sub>t</sub> = total chemical oxygen demand; TKN = total Kjeldahl nitrogen; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = ammonia nitrogen; P<sub>t</sub> = total phosphorus; K<sub>t</sub> = total potassium.

Source: From the author (2022).

The quantification of the CH<sub>4</sub> volume produced daily by the co-digestion was done via the direct volumetric method, described in Aquino *et al.* (2007), based on adaptations in the gas chamber outlet of the UASB reactor's three-phase separator. The measurement apparatus components connected sequentially by silicone tubes of 3.0 mm diameter were: (i) a sealed vessel containing 15% NaOH solution for washing the biogas with the alkaline solution replaced monthly; (ii) a vessel containing drinking water; (iii) a graduated cylinder for measuring the displaced water volume that corresponded to the daily CH<sub>4</sub> volumetric yield. Based on the measured data, daily CH<sub>4</sub> productivities were calculated considering the amount of COD removed weekly (mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>). For comparison, theoretical CH<sub>4</sub> yields were estimated (Equation 1), whose results depend on the correction factor calculated from Equation 2 (CHERNICHARO, 2016):

$$Q_{CH_4} = S_0 \cdot Q \cdot (E_{CODt} - Y) / F \quad (1)$$

$$F = P \cdot K / (R \cdot (T + 273)) \quad (2)$$

where:  $Q_{\text{CH}_4}$  =  $\text{CH}_4$  volume output ( $\text{m}^3\text{CH}_4 \text{d}^{-1}$ );  $S_0$  = influent  $\text{COD}_t$  concentration ( $\text{kgCOD}_t \text{m}^{-3}$ );  $Q$  = substrate inflow ( $\text{m}^3 \text{d}^{-1}$ );  $E_{\text{COD}_t}$  =  $\text{COD}_t$  removal efficiency;  $Y$  = system biosolids' yield coefficient ( $0,11\text{-}0,23 \text{ gCOD}_{t,\text{biosolids}} \text{ gCOD}_{t,\text{substrate}}^{-1}$ );  $F$  = correction factor;  $P$  = atmospheric pressure (1 atm);  $K$  =  $\text{COD}_t$  corresponding to 1 mol  $\text{CH}_4$  ( $64 \text{ gCOD}_t \text{mol}^{-1}$ );  $R$  = universal gas constant ( $0,08206 \text{ atm L mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ );  $T$  = reactor operating temperature ( $^\circ\text{C}$ ).

Furthermore, three-way and gas blocking valves were installed sequentially at the three-phase separator outlet according to the biogas flow sense in order to verify the generated biogas composition in terms of  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , and  $\text{H}_2\text{S}$  contents. Every two weeks, the gas blocking valve was closed – which prevented the biogas output quantification in the apparatus earlier mentioned – and then a 500 mL bag for gas sampling was connected to the three-way valve, thus storing a portion of the generated biogas. Subsequently, the bag content was characterized using a portable biogas analyzer (model Gasboard-3200Plus, *Hubei Cubic-Ruiyi Instrument Co., Ltd*). It is important to note that the quantitative and qualitative biogas analyses started on the 31<sup>st</sup> day of the system operation due to a malfunction in the quantification apparatus and a delay in obtaining the portable biogas analyzer.

#### **2.4 Evaluation of the biosolids in the system and microbiota characterization**

To evaluate the periodic evolution of the anaerobic system microbial community, a portion of the inoculum sludge was reserved, and three samples of enriched biomass were extracted from the UASB reactor throughout its operation (viz., 'Month 1', 'Month 2', and 'Month 3' samples, corresponding to the operating days 31, 61, and 91, respectively). The enriched samples were collected equally by mixing the biosolids in a 1:1 v/v ratio from P1 and P2 (Figure 1). Then, all the sampled biomasses were analyzed for microorganism identification through sequencing by synthesis and quantification of methanogenic potential through SMA assays.

Regarding the metagenomics, sufficient portions (25 mL) of the collected samples were kept frozen at  $-16 \text{ }^\circ\text{C}$  until the end of the system operation and then transported in dry ice heading to the biotechnology company Neoprospecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, for DNA extraction and identification, along with the taxonomic classification of bacteria and archaea through high-throughput sequencing (Next-Generation Sequencing – NGS). The preparation of the libraries followed a proprietary protocol of the

company. Amplification was performed employing primers for the V3-V4 region of the 16S rRNA gene – 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (WANG; QIAN, 2009; CAPORASO *et al.*, 2012). Then, the libraries were sequenced by the MiSeq Sequencing System equipment (*Illumina Inc.*, USA), and the resulting sequences were analyzed using the Sentinel pipeline (COCK *et al.*, 2009; ANDREWS, 2010; MASELLA *et al.*, 2012). Taxonomic identifications were then performed with the algorithm *BLASTn* v.2.6.0+ (ALTSCHUL *et al.*, 1990), using the genetic database *SILVA* ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)) as a reference, thus allowing to verify the relative abundance of the analyzed samples in terms of phylum, order, and genus. Afterwards, diversity- $\alpha$  indices (viz., Shannon index and Pielou's evenness) of the samples were calculated using the *R* 3.6.3 programming language (<https://cran.r-project.org>) (R CORE TEAM, 2020).

On the other hand, SMA assays were conducted following the methodology proposed by Abreu and Araújo (2011). The methanogenic potential of each biosolids sample was evaluated through the individual application of acetate and formate as organic substrate sources, which allowed the verification of both methanogenic pathways, i.e., acetoclastic and hydrogenotrophic (LOZANO *et al.*, 2009; MONCADA; SILVA, 2016). After characterization for total volatile solids (TVS) content (2540G – APHA, AWWA, and WEF (2012)), the sludge samples were added to 110 mL flasks containing 2 mL of sodium acetate solution (139.0 g L<sup>-1</sup>) or 4 mL of sodium formate solution (230.5 g L<sup>-1</sup>) – in triplicate for each substrate, totaling six reactor flasks per assay. The required volumes of biosolids per flask were calculated to ensure a food-to-microorganism ratio of 0.5 gCOD gTVS<sup>-1</sup>, which resulted in 0.434 gTVS (sludge) and 0.217 gCOD (substrate) per flask. After that, a usable volume of 100 mL in each flask was filled with a macro- and micronutrient stock solution (Table 3) combined with 0.2 g of yeast extract, reserving 10 mL of headspace for biogas accumulation. After N<sub>2</sub> insertion (5 min at 1 psi) to maintain an anaerobic environment, the flasks were sealed with rubber bungs and silicone adhesive and subsequently incubated at 30±2 °C without mechanical agitation. For 30 consecutive days, the CH<sub>4</sub> yield of each flask was monitored daily by the direct measurement method (AQUINO *et al.*, 2007) using a 15% NaOH solution. At the end of each test, the observed accumulated CH<sub>4</sub> yield data were processed in the *R* 3.6.3 programming language (<https://cran.r-project.org>) (R CORE TEAM, 2020) by applying sigmoidal fitting models (Logistic or Gompertz – both with a significance of 0.001). The SMA results expressed in mLCH<sub>4</sub> were converted to gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> using the ratio of 394 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup> (30 °C and 1 atm).

Table 3 – Concentrations of substances in the macro- and micronutrient stock solution.

Macronutrients		Micronutrients	
Substance	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Substance	Concentration (g L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.50	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.50	ZnCl <sub>2</sub>	0.05
NH <sub>4</sub> Cl	5.00	CuCl	0.17
Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O	0.50	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00	HCl (≈ 12 mol L <sup>-1</sup> )	1.00 mL L <sup>-1</sup>
Agarose	15.00	–	–

Source: From the author (2022).

Concomitant to the monthly samplings for microbiota-related analyses, biosolids' aliquots were collected from different heights of the UASB reactor (viz., P1, P2, P3, and P4 – Figure 1), determining their physical and chemical characterization based on the solids (TS and TVS (2540G)) and oxidizable organic matter (COD<sub>t</sub> (5220B)) contents, according to APHA, AWWA, and WEF (2012); and nutrients such as nitrogen (TKN) (NOGUEIRA; SOUZA, 2005) and phosphorus (Pt (4500-P. E)) (APHA, AWWA, and WEF (2012) adapted by Matos (2012)). The data of oxidizable organic matter and nutrient concentration in mg L<sup>-1</sup> were converted to dry mass basis (mg kg<sup>-1</sup>), considering the total solids (TS) concentration of the collected biosolids.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Anaerobic treatment efficiency

Table A1 (see Appendices) reports the weekly characterization results of physical and chemical influent and effluent samples from the anaerobic treatment system. In turn, Table 4 shows the arithmetic averages and standard deviations of the data presented in Table A1, as well as the average and maximum pollutant removal efficiencies.

Table 4 – Descriptive statistics of weekly physical and chemical data of inflow and outflow samples from the lab-scale UASB reactor and its pollutant removal efficiency.

Physical and chemical variables	Inlet	Outlet	Removal efficiency (%)	
			Medium	Maximum
pH	7.85 (0.42)	8.31 (0.20)	–	–
Partial alkalinity (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	3,046.92 (785.42)	4,594.62 (767.47)	–	–
Intermediate alkalinity (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	2,287.31 (460.08)	1,520.38 (241.58)	–	–
Total alkalinity (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	5,334.23 (434.71)	6,115.00 (656.69)	–	–
Acidity – VFA (mgHAc L <sup>-1</sup> )	5,202.00 (1,141.88)	3,591.00 (666.46)	29 (17)	53
TSS (mg L <sup>-1</sup> )	651.15 (220.41)	350.68 (52.18) *	48 (16) *	69
VSS (mg L <sup>-1</sup> )	537.31 (192.44)	268.41 (47.71) *	51 (17) *	75
COD <sub>t</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	7,215.07 (1,834.00)	2,318.51 (1,014.45)	69 (8)	81
TKN (mg L <sup>-1</sup> )	30.65 (9.08)	18.84 (5.93) *	42 (14) *	73
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	2.64 (1.78)	2.92 (2.26) *	6 (55) *	100
P <sub>t</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	18.13 (5.88)	15.33 (5.06) *	19 (20) *	69
K <sub>t</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	339.49 (32.03)	356.40 (18.66) *	0 (5) *	4
Phenols (mg L <sup>-1</sup> )	110.55 (35.44)	53.59 (19.99)	51 (16)	77
Sulfates (mg L <sup>-1</sup> )	80.60 (33.85)	57.53 (21.26)	25 (23)	67

\* = Results from the first two weeks were excluded from the analysis, as sludge was detected leaking from the UASB reactor into the effluent. Results displayed as: arithmetic mean (standard deviation). VFA = volatile fatty acids; TSS and VSS = total and volatile suspended solids, respectively; COD<sub>t</sub> = total chemical oxygen demand; TKN = total *Kjeldahl* nitrogen; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = ammonia nitrogen; P<sub>t</sub> = total phosphorus; K<sub>t</sub> = total potassium.

Source: From the author (2022).

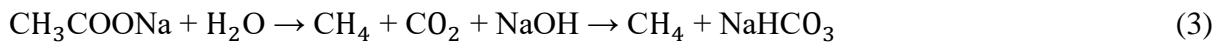
In the following subsections, the anaerobic treatment efficiency as a function of the CH<sub>4</sub> productivity and physical and chemical properties of inlet and outlet liquid samples from the system will be discussed.

### 3.1.1 pH and alkalinity and acidity removal

Figure 2 presents the pH, alkalinity, and acidity variations between inlet and outlet samples from the anaerobic system throughout the co-digestion operation. Although the average influent pH (7.85) exceeded the optimal range for the anaerobic digestion (6.5-7.5) (RINCÓN-MEJÍA; HERAS, 2017), the process occurred stably throughout the experiment, as can be seen in Section 3.1.2. On the other hand, the effluent presented an increase in its average pH (Figure 2a), reaching values of up to 8.70. This rise may be associated with the partial alkalinity (PA) elevation (Figure 2b) and acidity reduction (Figure 2c), both induced by the anaerobic treatment.



The hydrolysis of mineral salt-rich ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) substrates and proteins, such as the co-substrates used in the present study, generates volatile fatty acids (VFA) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) that can be biochemically converted into sodium and ammonium bicarbonates (see Equations 3 and 4), respectively, within anaerobic reactors, thereby increasing the medium's PA content (PEREIRA; CAMPOS; MOTTERAN, 2013; CHERNICHARO, 2016). The bicarbonate alkalinity recommended for an adequate buffering is 2,500 to 5,000  $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  (TAUSEEF; ABBASI; ABBASI, 2013); therefore, there is an indication of stability in the evaluated anaerobic system since its average influent PA concentration was 3,046.92  $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ .



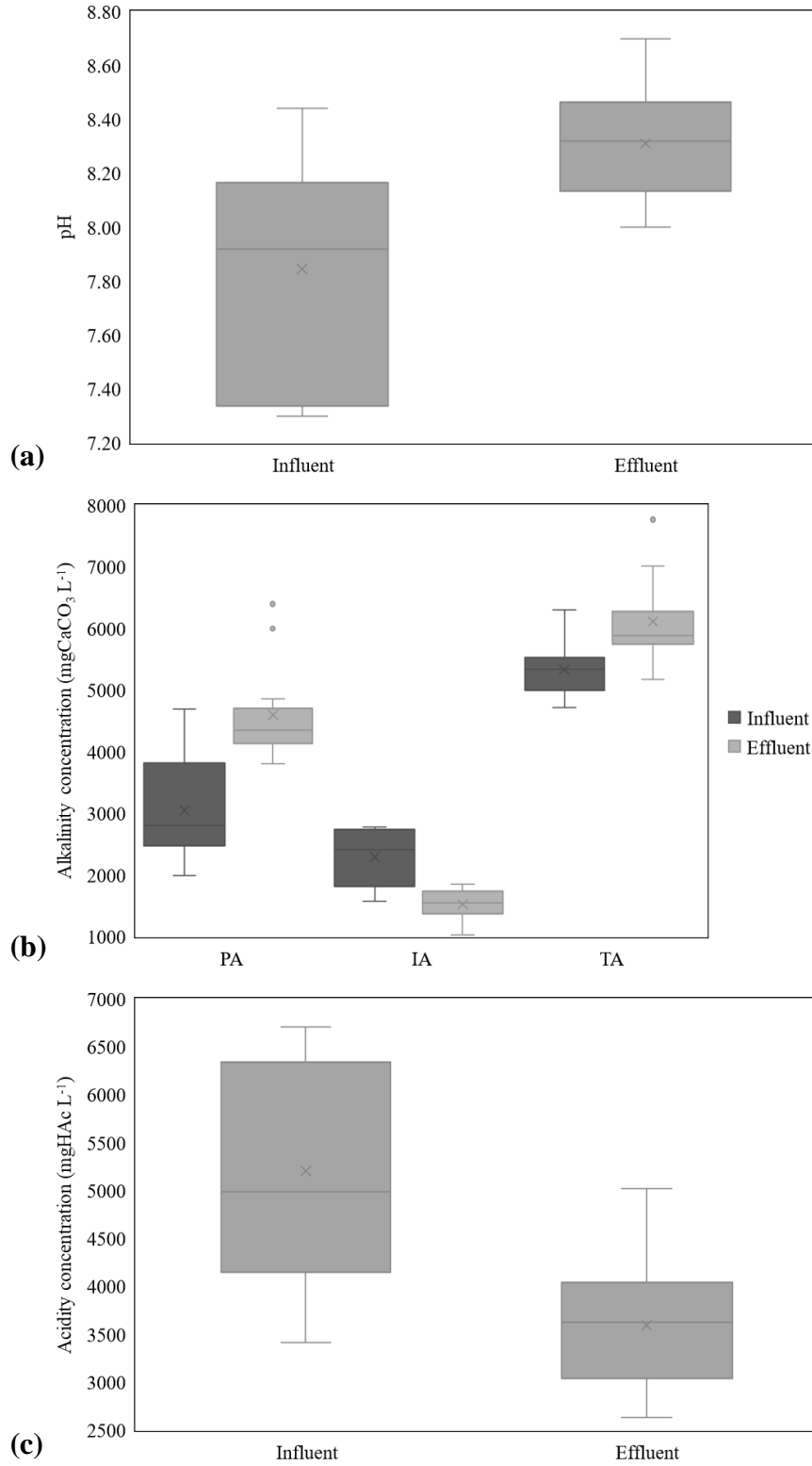
At the same time, there was a decrease in the substrate's intermediate alkalinity (IA) after the anaerobic treatment (Figure 2b) due to the consumption of intermediate VFA, e.g., propionate and butyrate, by acetogenic bacteria; and acetate by methanogenic archaea, which consequently reduced the medium's acidity (Figure 2c) and increased the pH of the effluent samples (Figure 2a) (CHERNICHARO, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017). From this perspective, the average and maximum acidity removals reported in the present study were 29% and 53%, respectively. Lovato *et al.* (2019), for instance, obtained VFA removals of up to 75.5% by evaluating the co-digestion performance of sugarcane vinasse and cheese whey (1:1 m/v mixture) in a lab-scale anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) equipped with effluent recirculation and operating under mesophilic conditions, 21-day HRT and with alkalizing addition. The prolonged system's HRT coupled with effluent recirculation can explain the high acidity removal efficiency since this technique can decrease the VFA influent load and supplement the substrate with a buffered medium. In contrast, España-Gamboa *et al.* (2012) achieved a VFA content reduction of 54.2% after treating alkalinity-corrected sugarcane vinasse in a UASB reactor, similar to the maximum removal reported in the present study.

Furthermore, it is suggested that VFA concentrations above 2,000  $\text{mgHAc L}^{-1}$  may inhibit the methanogenic microbiota (TEZEL; TANDUKAR; PAVLOSTATHIS, 2011; GRADY JUNIOR *et al.*, 2011). However, although the present system exhibited an average inflow acidity load of 5,202.00  $\text{mgHAc L}^{-1}$ , it demonstrated stability in the anaerobic digestion process, a fact corroborated by the relations between acidity and alkalinity levels. The average IA/PA ratios of the collected influent and effluent samples were 0.83 (standard deviation (SD) of 0.33)

and 0.34 (0.08), respectively. The lower effluent ratio justifies the simultaneous increase, together with PA elevation, of total alkalinity (TA) at the system outlet (Figure 2b). On the other hand, the respective average ratios between VFA and TA concentrations (VFA/TA) for the UASB reactor's inlet and outlet were 0.99 (0.26) and 0.59 (0.13). Despite the ratios calculated in the present study being above the values recommended in the literature – 0.3 for IA/PA and 0.4 for VFA/TA (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986; LI *et al.*, 2014; ISSAH; KABERA, 2021) –, the assessed anaerobic system presented sufficient buffering capacity for the treatment process stabilization, which is evidenced by the reduction of the average ratios between influent and effluent samples. In this regard, Pereira, Campos, and Moterani (2009) pointed out that, given the wastewater diversity, even anaerobic reactors with ratios above those indicated may ensure enough buffering potential for the maintenance of the biodegradation process.

Besides indicating the operational stability of the anaerobic system, the reduced acidity generated a more suitable effluent to be applied in the fertigation of crops (e.g., sugarcane) since the disposal of wastewater with high VFA content may reduce the pH of the soil and increase its acidity in the long term, thus impairing agricultural productivity. On the other hand, due to its remaining acidity level, applying controlled effluent doses can inhibit the reproduction of phytopathogenic organisms in crops, such as fungi (e.g., *Athelia rolfsii*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*) and nematodes (e.g., *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*) (PEDROSA *et al.*, 2005; SAMANIEGO G.; PEDROZA-SANDOVAL, 2013; SWILLING *et al.*, 2021; FUESS *et al.*, 2021).

Figure 2 – Variation of (a) pH; (b) partial (PA), intermediate (AI), and total alkalinity (TA); and (c) acidity (VFA-based content) between influent and effluent samples collected during the operational phase of the anaerobic system.



Source: From the author (2022).

### 3.1.2 Organic matter removal and CH<sub>4</sub> productivity

Figure 3 displays the reduction of COD<sub>t</sub> levels between inlet and outlet samples from the anaerobic treatment plant, whereas Figure 4 reports the temporal variation of the system's CH<sub>4</sub> yield and productivity along with their respective theoretical estimates calculated from Equations 1 and 2. The excessive application of organic material in agricultural fields may reduce the dissolved oxygen levels of the water content of soil, which may impair its structure due to negative impacts on the microbiological community (FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017). Based on this premise, the COD<sub>t</sub> content reduced 69% on average (SD = 8%) throughout the anaerobic treatment assessed in this study, reaching a maximum efficiency of 81%, therefore providing a greater environmental safety of the effluent for its further application as a biofertilizer.

Moreover, the anaerobic co-digestion promoted a satisfactory conversion of COD<sub>t</sub> into CH<sub>4</sub> because of the proper UASB reactor operation, which explains the efficient minimization of the effluent's organic load (Figure 3). The average daily CH<sub>4</sub> output was 3.70 L, peaking at 4.88 L. Similarly, the system provided average and maximum productivities of 221 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup> (SD = 44 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>) and 308 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>, respectively. It can be noted in Figure 4 that, despite the observed CH<sub>4</sub> yield and productivity curves having presented similar behavior overall, their respective maximum points occurred at different times (day 36 for yield and day 54 for productivity). A possible explanation for this event is the desynchrony between COD<sub>t</sub> removal (weekly) and CH<sub>4</sub> yield (daily) measurements, resulting in under- or overestimated productivities. In addition, the presence of non-biodegradable organic material in the substrate and its subsequent incorporation into the system's biosolids (data not shown), which consequently reduces the CH<sub>4</sub> output even though COD<sub>t</sub> removal occurs, are facts that can also clarify inconsistencies between theoretical and observed results.

Furthermore, regarding the quality of biogas produced during the co-digestion operation, the arithmetic average volume contents of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> were 66.47% (SD = 1.76%) and 11.43% (1.47%), respectively. These results suggest adequate stability of the anaerobic system and satisfactory levels of energy recovery from the substrate organic content. Concerning the CO<sub>2</sub> concentration in biogas, there was no significant difference in its temporal variability among the samples collected throughout the system operation. The gradual accumulation of this compound in biogas may indicate operational disturbances in anaerobic reactors once the amount of CO<sub>2</sub> in gaseous form is proportional to its dissolved concentration in the liquid phase,

whose accumulation can acidify the medium (CERON-CHAFLA *et al.*, 2020; SINGH; MÜLLER; SCHNÜRER, 2021).

Table 5 compiles recent studies that have analyzed the performance of anaerobic systems treating sugarcane vinasse with or without the addition of co-substrates, focusing on data related to the COD<sub>t</sub> removal as well as CH<sub>4</sub> productivity and its content in biogas. Overall, the average and maximum results presented in the present section are similar to those reported in the scientific literature (Table 5). Higher performances may be justified by operational strategies incorporated into anaerobic reactors, i.e., thermophilic conditions, effluent recirculation, and two-stage system. Moreover, the compositional variability of the co-substrates (and the sugarcane vinasse itself), besides applying different OLRs and pretreatment strategies such as adding nutrient solution and alkalinizing compound, can lead to treatability and CH<sub>4</sub> productivity that diverge from those achieved in the present study (DEL NERY *et al.*, 2018; NAKASHIMA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020; RAMOS *et al.*, 2021; KIANI; PARSAEE; MAHDAVIFAR, 2021).

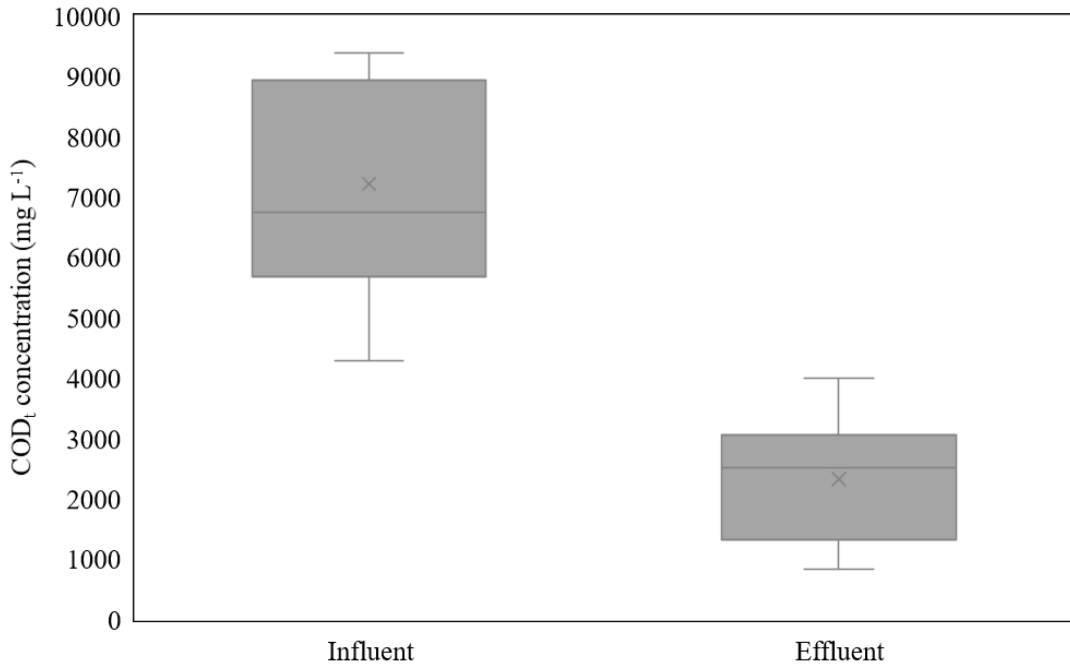
Table 5 – Performance of anaerobic systems promoting mono- and co-digestion of sugarcane vinasse under different operational conditions.

Operational conditions			Maximum performance					Reference
System (scale)	Co-substrate / proportion*	Strategy	T	OLR	E <sub>COD</sub>	$\gamma_{CH_4}$	% <sub>CH<sub>4</sub></sub>	
UASB (lab-scale)	–	R	20 – 30	5.0 – 7.5	77.0	185	53.0	Barros, Duda, and Oliveira (2016)
UASB (lab-scale)	–	–	55	25.0	72.6	251	58.4	Ferraz Júnior <i>et al.</i> (2016)
UASB (lab-scale)	–	–	40	1.4 – 9.6	–	239	–	Janke <i>et al.</i> (2016)
ASTBR (lab-scale)	–	2	55	25.0	73.9	301	70.0	Fuess <i>et al.</i> (2017b)
UASB (lab.)	–	R	22	32.3	87.5	299	68.8	Del Nery <i>et al.</i> (2018)
AnSBBR (lab-scale)	–	–	55	6.5	84.6	263	73.0	Albuquerque <i>et al.</i> (2019)
AFBR (lab-scale)	–	2	30	8.0	85.0	270	86.0	Ramos <i>et al.</i> (2021)
UASB (lab-scale)	Dairy secondary effluent / 1:1 (v/v)	–	26	1.6	81.0	308	68.4	This study
UASB (lab-scale)	Filter cake / 40 g L <sup>-1</sup> vinasse	2 + R	54 – 56	28.0 – 30.0	60.0	230	79.0	Barros <i>et al.</i> (2017)
AnSBBR (lab-scale)	Cheese whey / 1:1 (m/v)	R	30	6.3	87.0	289	79.7	Lovato <i>et al.</i> (2019)
AnSBBR (lab-scale)	Cheese whey / 75:25 (m/v)	R	30	15.3	89.0	353	72.0	Sousa <i>et al.</i> (2019)
AnSBBR (lab-scale)	Cheese whey / 75:25 (COD)	–	55	25.0	72.0	343	71.0	Albuquerque, Ratusznei, and Rodrigues (2019)
Batch reactor (lab-scale)	Distilled glycerol / 1:1 (COD)	–	30	–	97.0	352	–	Borges <i>et al.</i> (2021)

\* = proportion or mixing ratio in the following order: vinasse:co-substrate; R = effluent recirculation; 2 = two-stage system; T = reactor temperature (°C); OLR = organic loading rate applied to the reactor (kgCOD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>); E<sub>COD</sub> = substrate COD<sub>i</sub> removal efficiency (%);  $\gamma_{CH_4}$  = CH<sub>4</sub> productivity (mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>); %<sub>CH<sub>4</sub></sub> = CH<sub>4</sub> content in the biogas (%); AnSBBR = anaerobic sequencing batch biofilm reactor; ASTBR = anaerobic structured-bed reactor; UASB = upflow anaerobic sludge blanket.

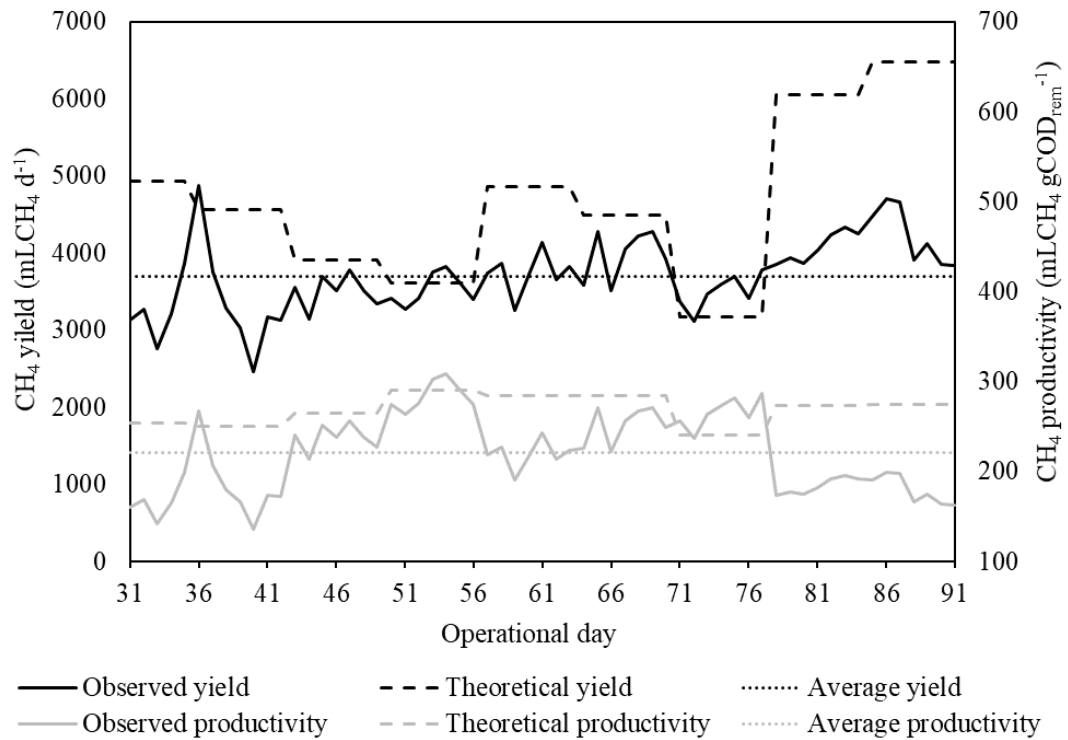
Source: From the author (2022).

Figure 3 – Variation of total chemical oxygen demand ( $COD_t$ ) contents between influent and effluent samples collected during the operational phase of the anaerobic system.



Source: From the author (2022).

Figure 4 – Daily  $CH_4$  yield and productivity of the anaerobic system and their respective average results and theoretical estimates.  $COD_{rem} = COD_t$  removed weekly.



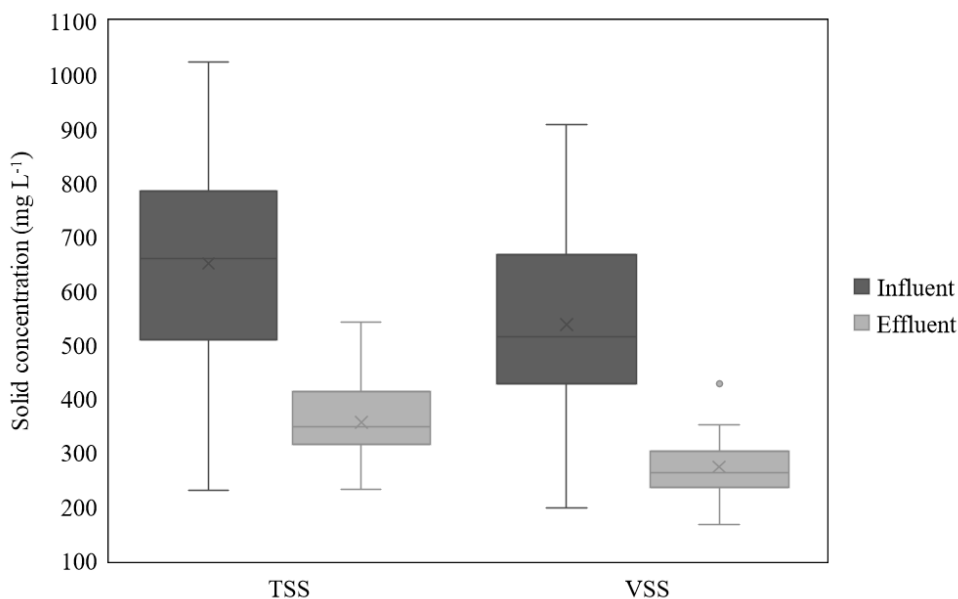
Source: From the author (2022).

### 3.1.3 Suspended solids removal

Suspended solids reduction by the anaerobic treatment (Figure 5) is mainly targeted when installing and operating effluent conduction and distribution systems for fertigation, whereas it can avoid clogging of irrigation equipment (SILVA *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2022). In addition, the application of wastewater containing high solids content may reduce soil permeability in the long term (ALAYU; LETA, 2021). In this context, the average removal efficiencies by the anaerobic system evaluated in this study were 48% (SD = 16%) for TSS and 51% (17%) for VSS, with respective maximum values of 69% and 75%. Moreover, the inflow and outflow samples from the UASB reactor presented ratios between the average contents of VSS and TSS (VSS/TSS) of approximately 80%, revealing a predominantly organic content in the substrate.

Removal efficiency results similar to those reported in the present section were obtained in studies that evaluated sugarcane vinasse anaerobic digestion. For example, Barros, Duda, and Oliveira (2016) and Del Nery *et al.* (2018) recorded reductions of 44.9% and 55.2% of TSS and 57.0 and 62.2% of VSS, respectively, by using lab-scale UASB reactors equipped with a recirculation system. However, no data was explicitly found on suspended solids removal regarding published works analyzing vinasse co-digestion.

Figure 5 – Variation of volatile (VSS) and total suspended solids (TSS) contents between influent and effluent samples collected during the operational phase of the anaerobic system, excluding data from the first two weeks of operation due to sludge leakage from the system.



Source: From the author (2022).



### 3.1.4 Nutrient removal

Wastewater treatment for further effluent reuse in agriculture should be designed focusing on low nutrient removal, an inherent characteristic of conventional anaerobic systems (MA *et al.*, 2018; DOYENI *et al.*, 2021; VAISH *et al.*, 2022). Toward this purpose, the analysis of nitrogen (Figure 6a), phosphorus (Figure 6b), and potassium (Figure 6c) contents, the main plant macronutrients, was fundamental for determining the fertilizing potential of the substrate evaluated in this study. As a result, the average nitrogen-phosphorus-potassium (NPK) ratio reduced from 25:15:275 in the influent to 15:12:275 in the effluent, considering the TKN, P<sub>t</sub>, and K<sub>t</sub> levels. Although this last ratio is insufficient facing the optimal NPK dose recommended for application in sugarcane crops – 281:140:275 kg ha<sup>-1</sup>, according to Kandhro *et al.* (2021) –, the experimental treatment plant provided the combined generation of stabilized biosolids (which are evaluated regarding their physical and chemical properties in Section 3.2.3) and the reduction of the demand for synthetic mineral fertilizers. In turn, taking into account the COD<sub>t</sub> content, the average COD-nitrogen-phosphorus ratio (COD:N:P) ranged from 398:1.7:1 (influent) to 151:1.2:1 (effluent), revealing the organic load mineralization and the nutrient content maintenance by the anaerobic treatment, which therefore increased the agricultural reuse capacity of the effluent (PIGOLI *et al.*, 2021).

Regarding the individual analysis of nutrient contents of inlet and outlet samples from the evaluated anaerobic system, the average TKN removal efficiency (Figure 6a) was 42% (SD = 14%), with a maximum of 73%. The average result is slightly higher than reductions reported in sugarcane vinasse co-digestion studies, such as by Syaichurrozi *et al.* (2016) (37.6% of TKN removal) and Barros *et al.* (2017) (30.0%), which used tofu processing wastewater and filter cake as co-substrates, respectively. Despite the nitrogen deficiency of the influent substrate in the present study (average COD:N:P = 398:1.7:1), the anaerobic digestion process occurred stably during the operational phase, even though the optimal ratio suggested by Annachhatre (1996) for anaerobic systems is 300-500:5:1.

In parallel to the TKN decrease, the UASB reactor's outlet sample showed an increase in the average N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration (+0.28 mg L<sup>-1</sup>) (Figure 6a); and the system had significant variability in removals of this compound throughout the operation, with an average efficiency of 6% (SD = 55%). As well as the alkalinity increment of the effluent (see Section 3.1.1), the elevation in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contents within anaerobic systems can be explained by the ammonification process due to the hydrolysis of proteins of the substrate, a phenomenon that has also been observed in experiments of sugarcane vinasse mono- (VLYSSIDES *et al.*, 2010) and co-

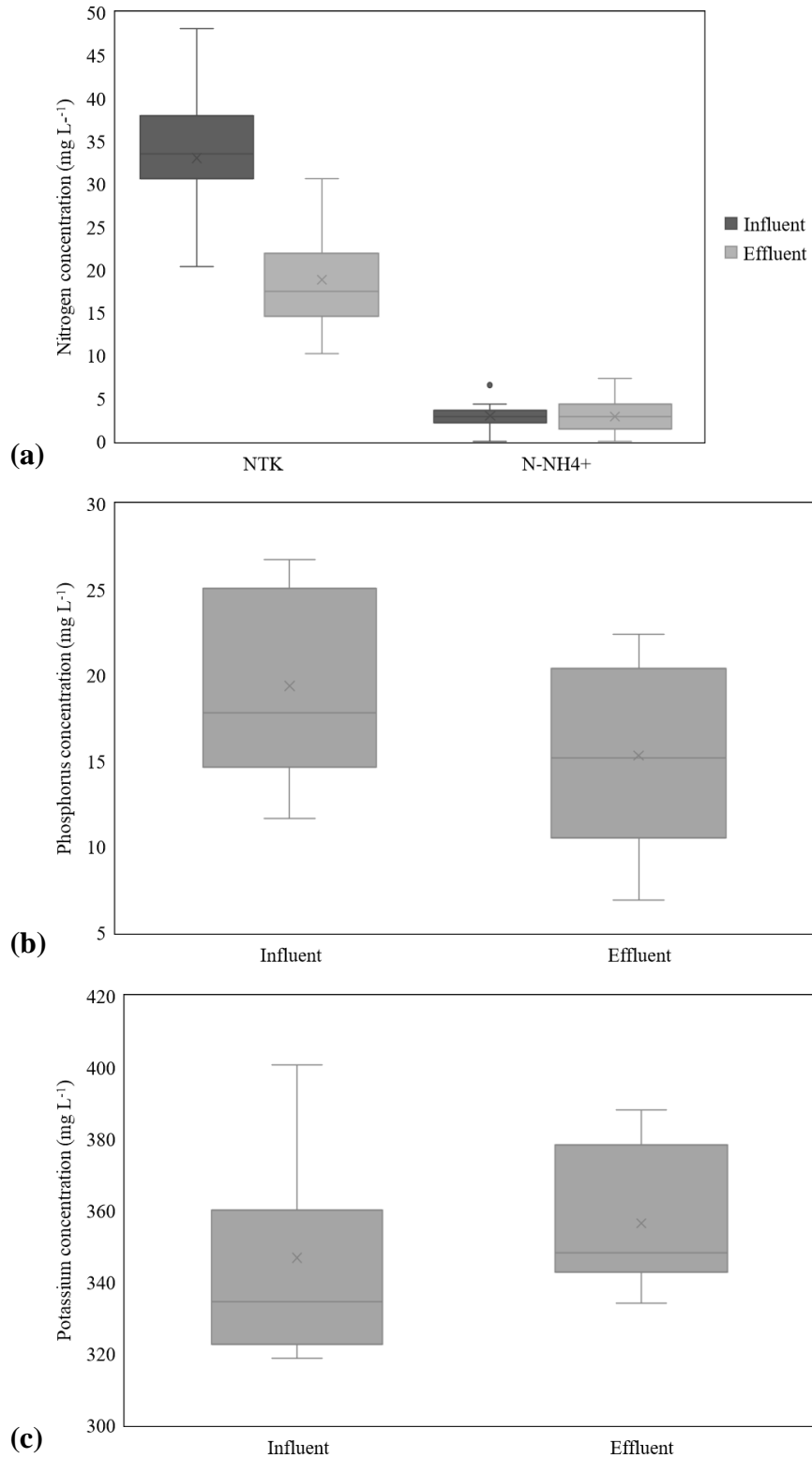
digestion (BARROS *et al.*, 2017; NÁTHIA-NEVES *et al.*, 2018). Consequently, in this study, the average N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:TKN ratio increased from 8.61% in the influent to 15.49% in the effluent, highlighting the decrease in the predominance of organic nitrogen (i.e., unavailable form) after the anaerobic processing. Furthermore, if not directly absorbed by plants after soil disposal, the N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content of the effluent is rapidly converted to nitrate, another compound that could be assimilated (SOGN *et al.*, 2018).

Simultaneously, the system promoted average and maximum P<sub>t</sub> reductions (Figure 6b) of 19% (SD = 20%) and 69%, respectively. Similar results were reported by España-Gamboa *et al.* (2012) and Barros, Duda, and Oliveira (2016), who respectively achieved phosphorus removals of 20.4% and 25.3% during the anaerobic treatment of sugarcane vinasse in a lab-scale UASB reactor. The addition of operational modifications to the UASB reactor, such as a two-stage system, effluent recirculation, and maintenance of thermophilic conditions, together with nutritional supplementation by the co-digestion technique, can lead to considerable reductions in vinasse P<sub>t</sub> concentrations (up to 73.0%), as reported by Barros *et al.* (2017).

On the other hand, the K<sub>t</sub> contents assessed in the present study (Figure 6c) had low or no reductions after the promoted treatment, as expected for conventional anaerobic systems (SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2016; BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016). The average removal efficiency was -3% (SD = 5%), with a maximum value of 4%. The average influent potassium concentration was 339.49 mg L<sup>-1</sup> (SD = 32.03 mg L<sup>-1</sup>), which is defined within the ideal nutritional range to develop microorganisms responsible for the anaerobic digestion process (200-400 mgK<sub>t</sub> L<sup>-1</sup>) (ZUPANČIČ; GRILC, 2012). The negative efficiencies, which were also recorded by Espinosa *et al.* (1995) and Barros *et al.* (2017), may be due to inconsistencies in the repetitions performed during the analytical measurement procedures, given that the inflow and outflow samples to the system exhibited K<sub>t</sub> levels relatively similar to each other in this study.

In summary, for a concise evaluation of the real fertilizing potential of the effluent generated by the proposed anaerobic treatment system, it is recommended for future research to determine the available nutrient content for crops (e.g., nitrate, phosphate, exchangeable potassium), which were not measured during the execution of this experiment.

Figure 6 – Variation of (a) total *Kjeldahl* nitrogen (TKN) and ammoniacal nitrogen (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), (b) total phosphorus (P<sub>t</sub>), and (c) total potassium (K<sub>t</sub>) contents between influent and effluent samples collected during the operational phase of the anaerobic system, excluding data from the first two weeks of operation due to sludge leakage from the system.



Source: From the author (2022).

### 3.1.5 Phenol and sulfate removal

Phenols and sulfates are recalcitrant organic compounds often present in high concentrations in sugarcane vinasse and may be toxic to the anaerobic microbiota, depending on the load applied to the treatment system. In terms of negative environmental impacts, the inadequate disposal of phenol-rich wastewater in agricultural soil can inhibit seed germination and reduce the soil microbial activity, impairing biogeochemical cycles working in terrestrial and aquatic spheres. Moreover, high sulfate levels in soils under anaerobic conditions can be reduced to sulfides, especially  $\text{H}_2\text{S}$ , a toxic and corrosive gas responsible for emanating foul odors. Given this context, biomasses adequately adapted to the presence of these compounds are essential for maintaining the anaerobic treatment stability and higher quality effluent output for use in fertigation, despite the adversities (ROBLES-GONZÁLEZ *et al.*, 2012; FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017; DE GODOI *et al.*, 2019a; DE GODOI *et al.*, 2019b).

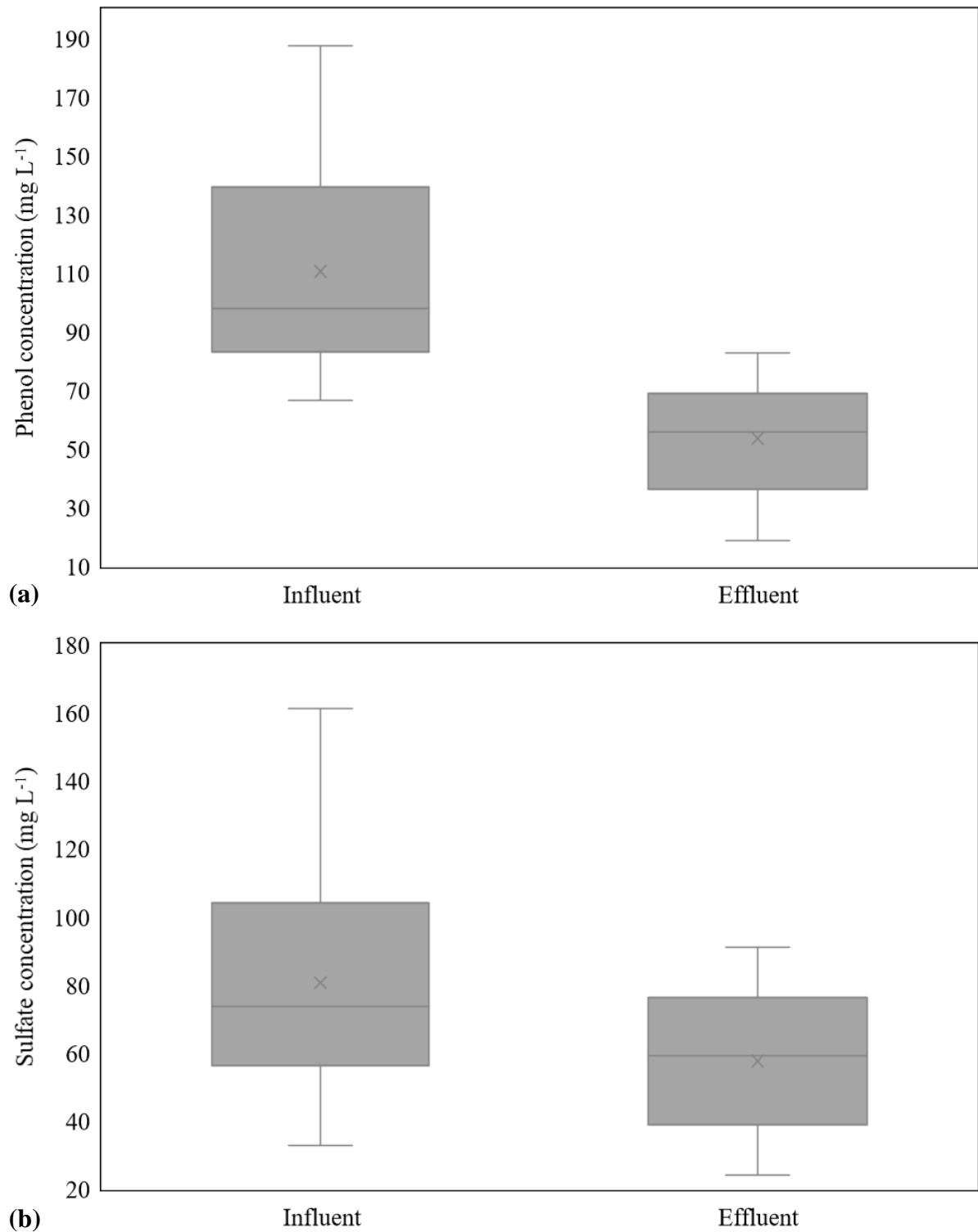
Phenolic compounds in vinasse, usually found between 450 and 469  $\text{mg L}^{-1}$ , originate from the lignocellulosic biomass processing in sugar-ethanol mills (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019; DE GODOI *et al.*, 2019b). In this study, the mixture of co-substrates resulted in an average influent phenol concentration of 110.55  $\text{mg L}^{-1}$  (SD = 35.44  $\text{mg L}^{-1}$ ), thus posing no toxicity risk to anaerobic microorganisms during the treatment, whose inhibition occurs above 700  $\text{mg L}^{-1}$ , according to Neufeld, Mack, and Strakey (1980). Under these conditions, the monitored anaerobic system promoted an average phenol removal (Figure 7a) of 51% (SD = 16%), peaking at 77%. For instance, Reis *et al.* (2019) characterized samples of raw and digested (in a lab-scale UASB reactor) vinasse provided by an industrial plant producing sugarcane ethanol. Similar to the present experiment, the treated sample presented a phenol concentration 49.5% lower than the *in natura* substrate. On the other hand, higher efficiencies (74 to 79%) were reported by Villa-Montoya, Ferro, and Oliveira (2017), who subjected coffee processing wastewater (an agro-industrial waste, as well as the co-substrates used in the present study) to treatment in a two-stage anaerobic system composed of lab-scale UASB reactors.

From another perspective, the anaerobic biodegradation of phenolic compounds may be related to the sulfate content in the substrate composition, as sulfate-reducing bacteria (SRB) can use aromatic organic compounds (e.g., phenols) as electron donors (DE GODOI *et al.*, 2019a). In this regard, in the present study, the average influent sulfate concentration was 80.60  $\text{mg L}^{-1}$  (SD = 33.85  $\text{mg L}^{-1}$ ), which results from a low content of these compounds in the collected sugarcane vinasse samples (see Table 1) compared to that commonly reported in the literature (669-3,298  $\text{mgSO}_4^{2-} \text{L}^{-1}$ , according to de Godoi *et al.* (2019b)). One hypothesis for

the reduced sulfate content is the lower applied dose of dilute sulfuric acid – which ensures the conversion of complex carbohydrates into fermentable monosaccharides during the sugarcane juice pretreatment step (ROQUE *et al.*, 2019) – by the cachaça industrial plant that provided the vinasse for conducting this experiment. Consequently, the average COD<sub>T</sub>-to-sulfate ratio (COD:SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) was higher than 10, thus favoring methanogenesis over sulfidogenesis in the assessed anaerobic system (JIMÉNEZ *et al.*, 2018; DE GODOI *et al.*, 2019b; OLIVEIRA *et al.*, 2021). As a result, the biogas produced during the operational phase showed an average volumetric H<sub>2</sub>S level of 53 ppm (SD = 40.52 ppm), also allowing for cost reduction regarding desulfurization procedures, as low concentrations of this compound were detected in biogas (FUESS *et al.*, 2018). Comparatively, the volumetric content of H<sub>2</sub>S in biogas yielded in vinasse anaerobic digestion experiments often ranges around 1% (FUESS *et al.*, 2018; PARSAAE; KIANI; KARIMI, 2019; SILVA NETO *et al.*, 2019).

As for analyzing the sulfate content decrease (Figure 7b), the proposed anaerobic treatment provided average and maximum efficiencies of 25% (SD = 23%) and 67%, respectively. Similar to the present investigation, Contreras-Contreras *et al.* (2020) achieved sulfate removal of 24.4% by operating a lab-scale UASB reactor, albeit under thermophilic conditions, to treat sugarcane vinasse. However, studies that contemplate vinasse mono- or co-digestion generally report substantial removals of these compounds and can reach 100% depending on the treatment system operational configuration (SOUZA; FUZARO; POLEGATO, 1992; ESPINOSA *et al.*, 1995; VLYSSIDES *et al.*, 2010; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2012; DEL NERY *et al.*, 2018; BROWN *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2021; BORGES *et al.*, 2021). The lower efficiencies reported in the present study can be explained by the low sulfate influent load, which may have provided unfavorable conditions for growing SRB in the UASB reactor's microbiota and a lower sulfate-to-H<sub>2</sub>S conversion rate, consequently (BROWN *et al.*, 2019).

Figure 7 – Variation of (a) phenol and (b) sulfate contents between influent and effluent samples collected during the operational phase of the anaerobic system.



Source: From the author (2022).

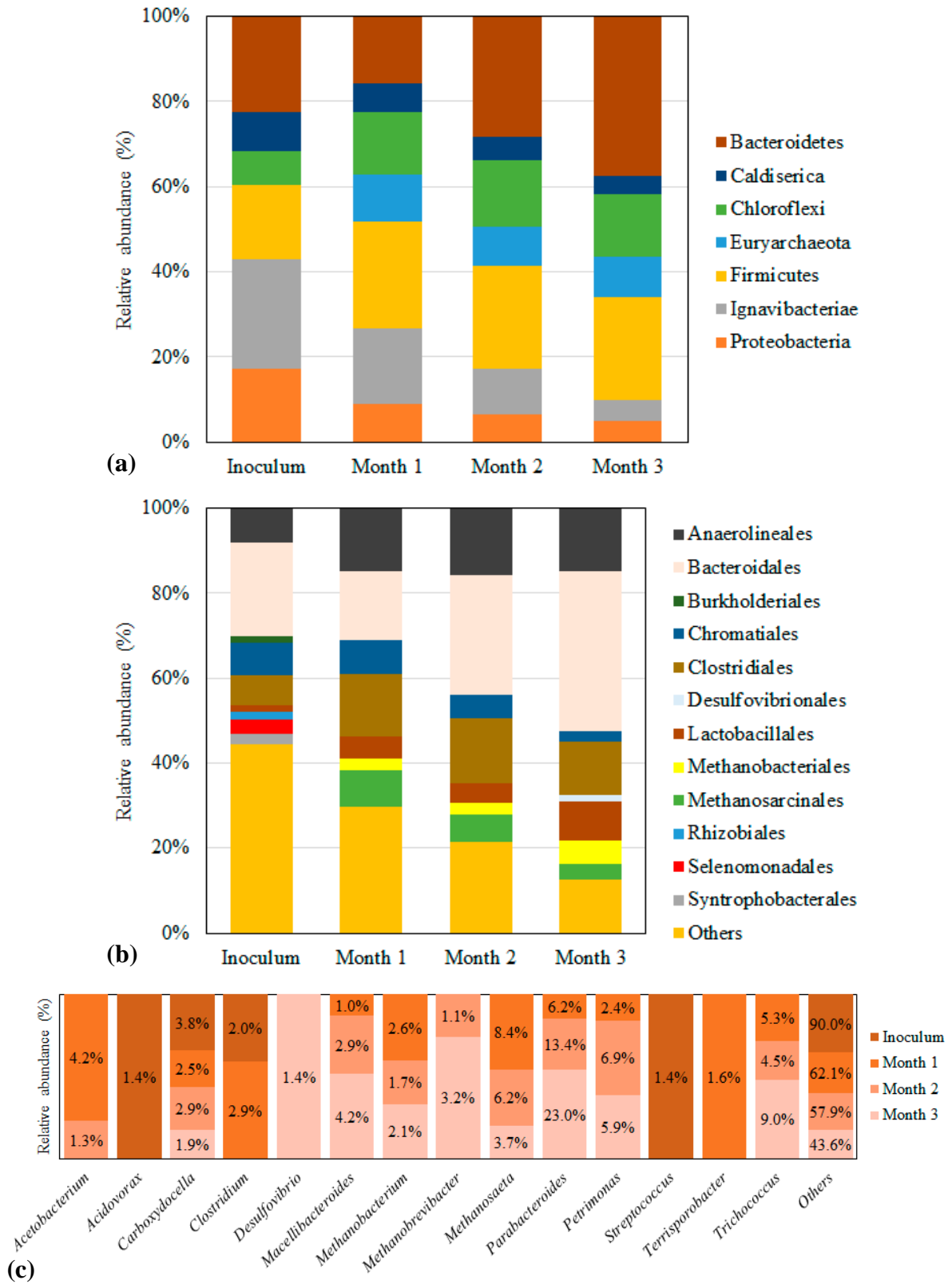
## 3.2 Evolution of the biosolids

In the following subsections, the periodic evolution of the microbial community acting within the UASB reactor will be examined throughout its operational phase, both in terms of microorganism identification through sequencing by synthesis (Section 3.2.1) and methanogenic potential from SMA assays (Section 3.2.2). Additionally, the temporal variation of physical and chemical properties of the system's solids profile (Section 3.2.3) will be discussed in order to assess its fertilizing potential.

### 3.2.1 Microbiota

Table 6 displays the diversity- $\alpha$  indices, and Figure 8 reports the relative microbial abundance of each biomass sampled monthly from the UASB reactor since its inoculation. Both graphical demonstrations originated from recovered sequence data of archaea and bacteria through NGS analysis, which is fully arranged in Table A2 (see Appendices). From the results in Table 6, it is possible to infer that, compared to the inoculum, the first month's sample presented an increase in the microbial diversity (Shannon index ( $H'$ ) = 2.9121) due to the reduction in the ecological dominance (Pielou's equability ( $J$ ) = 0.8005), despite decreasing the species richness (38 operational taxonomic units (OTUs)). In the following month, both indices decreased along with the richness increase, therefore indicating that rare species have grown in the system. Nevertheless, the equitability raised concomitantly with dropping OTUs at the end of the operation, which may reflect a greater species' selection and a balance in the anaerobic microbiota dynamics as a result of its acclimation to the substrate. Compared to the inoculum, the drop in the species richness and biodiversity of biomasses collected throughout the stable operational phase of anaerobic systems was also observed by Fontana *et al.* (2020), Ilchenco *et al.* (2021), and Volpi *et al.* (2021), when treating agro-industrial wastes (including sugarcane vinasse). This phenomenon results from microbial adaptation and selectivity facing adverse conditions (e.g., substrates containing inhibitor compounds and inadequate COD:N:P ratio).

Figure 8 – Relative microbial abundance ( $\geq 1\%$ ) in terms of (a) phylum, (b) order, and (c) genus of biomasses collected monthly from the evaluated anaerobic system.



Source: From the author (2022).



Table 6 – NGS data and diversity- $\alpha$  indices of biomasses collected monthly from the evaluated anaerobic system.

Samples	Sequences <sup>a</sup>	OTUs <sup>b</sup>	H'	J
Inoculum	4,648	55	2.8024	0.6993
Month 1	1,909	38	2.9121	0.8005
Month 2	3,165	45	2.8405	0.7462
Month 3	2,127	40	2.7761	0.7526

a = number of short-read sequences; b = number of operational taxonomic units (OTUs); H' = Shannon index; J = Pielou's evenness.

Source: From the author (2022).

### 3.2.1.1 Bacteroidetes, Firmicutes, and Chloroflexi

Overall, the analyzed biomasses exhibited a predominance of Bacteroidetes, Firmicutes, and Chloroflexi (Figure 8a), phyla that in association exert metabolic functions corresponding to the initial anaerobic digestion steps, i.e., hydrolysis, acidogenesis, and acetogenesis (CHOJNACKA *et al.*, 2015; SIKORA *et al.*, 2017). As a potential process stability indicator, a lower Firmicutes to Bacteroidetes (F/B) population ratio in biomass from anaerobic bioreactors should be aimed for (CHEN *et al.*, 2016; ILTCHENCO *et al.*, 2021). This is because Bacteroidetes have a greater ability to convert complex organic molecules into monomers than Firmicutes, especially in anaerobic systems with high OLR and VFA content (LIU *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2016). In this perspective, the F/B ratios in the present study were 0.77, 1.59, 0.85, and 0.64 for the inoculum and samples referring to the first, second, and third operational months, respectively, which probably reflects a gradual equilibrium of microbial dynamics acting in the evaluated anaerobic system. Despite the Bacteroidetes decrease in the first month since the inoculation (-6.4%), its relative abundance increased steadily until the end of the operation (+21.4%). In contrast, after the increase in the first month (+7.9% and +6.6%), bacteria belonging to the respective phyla Firmicutes and Chloroflexi maintained a stable relative abundance (SD = 0.71% and 0.55%, respectively) over the operational phase. Similarly, at least one of these three phyla (Bacteroidetes, Firmicutes, and Chloroflexi) were predominant in studies evaluating sugarcane vinasse mono- or co-digestion using bioreactors with different operational configurations (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2012; MARTÍNEZ; ROMERO; PEROTTI, 2014; DOS REIS *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017; CALLEJAS *et al.*, 2021; ILTCHENCO *et al.*, 2021; VOLPI *et al.*, 2021).

Regarding the hydrolytic and acidogenic fermentative bacteria of the phylum Bacteroidetes (Figure 8a), the genera identified in this study were, in decreasing order of average relative abundance, *Parabacteroides*, *Petrimonas*, and *Macellibacteroides* (Figure 8c), all belonging to the family Porphyromonadaceae (order Bacteroidales – Figure 8b). Members of these genera exhibit optimal growth at pH within 7.0-7.5, 8.0-9.0, and 6.5-7.5, respectively, encompassing the influent and effluent pH values observed in the present study (see Tables 4 and A1 – Appendices) (JABARI *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2017). Therefore, the substrate possibly presented favorable conditions for growing these microorganisms during the operational phase of the assessed anaerobic system (Figures 8a, 8b, and 8c). As for their metabolism, the bacteria of the phylum Bacteroidetes act in the carbohydrate and protein biodegradation, thus generating precursor byproducts of the acetogenesis and methanogenesis stages, such as acetate, propionate, succinate, butyrate, H<sub>2</sub>, and CO<sub>2</sub> (BARROS *et al.*, 2017; ILTCHENCO *et al.*, 2021; MERCADO; KOYAMA; NAKASAKI, 2022).

In turn, the phylum Chloroflexi (Figure 8a) was composed only of bacteria from the family Anaerolineaceae (order Anaerolineales – Figure 8b), once more specific taxa were not identified through the NGS. Although their functionality is not yet well defined in anaerobic communities, members of this phylum possess both hydrolytic and acidogenic fermentative capacities to degrade diverse carbohydrates such as glucose, fructose, xylose, sucrose, cellulose, and starch, as well as amino acids and peptides (SIKORA *et al.*, 2017; ANTWI *et al.*, 2017; NAKASAKI *et al.*, 2019; FINCKER *et al.*, 2020; MA; CHEN; NDEGWA, 2021; BOVIO-WINKLER; CABEZAS; ETCHEBEHERE, 2021). Moreover, they present filamentous growth, thereby contributing to a granular anaerobic sludge formation and sedimentation in bioreactors, which may increase the treatment performance as a whole (BOVIO-WINKLER; CABEZAS; ETCHEBEHERE, 2021).

In parallel, bacteria belonging to the phylum Firmicutes (Figure 8a) perform diverse metabolic functions, such as polysaccharide and protein hydrolysis, amino acid and monosaccharide acidogenic fermentation, and homoacetogenesis, processes that combined significantly impact methanogenic activity due to the potential to provide substrates in the medium, e.g., acetate, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and intermediate VFA (SOKOLOVA *et al.*, 2002; SIKORA *et al.*, 2017; STREPIS *et al.*, 2020; NTAGIA *et al.*, 2020; ILTCHENCO *et al.*, 2021; MA; CHEN; NDEGWA, 2021; YANG *et al.*, 2022a; YANG *et al.*, 2022b). In addition, some microorganisms of this phylum (*viz.*, species belonging to the genus *Streptococcus* and the

family Veillonellaceae) can assist in biofilm and granular sludge formation in anaerobic systems (HUNG *et al.*, 2007; SIKORA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2022b). In this study, the following genera classified as Firmicutes were detected (Figure 8c): *Carboxydocella*, *Acetobacterium*, *Clostridium*, and *Terrisporobacter* (belonging to the order Clostridiales, class Clostridia); *Trichococcus* and *Streptococcus* (order Lactobacillales, class Bacilli); and other unidentified ones from the family Veillonellaceae (order Selenomonadales, class Negativicutes).

Based on Figure 8c, it is possible to note that the genera *Acetobacterium*, *Clostridium*, and *Terrisporobacter* did not present significant relative abundance (< 1%) in the last operating month of the anaerobic system, despite the order Clostridiales was detected in the same period (Figure 8b). The NGS technique limitations related to identifying more specific taxa, such as certain genera (see the predominance of unidentified organisms – 'Others' – in Figure 8c), may explain these divergences between the obtained sequences (WINAND *et al.*, 2020). On the other hand, the sequencing was able to detect, at the end of the operation, a microbial growth of the order Lactobacillales (+4.5%) (Figure 8b), corresponding to the population increase of the genus *Trichococcus* (+4.5% – Figure 8c) in this same time interval. Furthermore, the family Veillonellaceae (order Selenomonadales – Figure 8b) and the genus *Streptococcus* (Figure 8c) were observed only in the inoculum sample. These and other microbial groups only in the biomass used for the UASB reactor's inoculation justify its higher richness than the other samples evaluated in this study, which presented fewer OTUs (Table 6).

### **3.2.1.2 Ignavibacteriae, Proteobacteria, and Caldiserica**

Unlike the phyla mentioned above, Ignavibacteriae, Proteobacteria, and Caldiserica (in decreasing order of average predominance, considering all the analyzed samples) exhibited a constant decline throughout the operation (Figure 8a). Compared to the inoculum, the following variations in relative abundance occurred at the end of the experimental period: Ignavibacteriae (-20.8%), Proteobacteria (-11.9%), and Caldiserica (-4.7%). The first phylum encompasses the class Ignavibacteria, which was detected in the evaluated samples (see Table A2 – Appendices) and represents a group of iron-reducing bacteria (IRB); while the last phylum includes the class Caldisericia, whose bacteria perform the reduction of sulfur compounds (including sulfates), and can therefore act as SRB (AHMED *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2019). The constant reduction in the relative abundance of these two bacterial groups may have been caused hypothetically by insufficient oxidized iron (not analyzed in the present study) and sulfur

contents (low influent sulfate concentration – see Table 4 and Section 3.1.5) in the co-substrates used in the present experiment.

On the other hand, the NGS detected more specific taxa for the phylum Proteobacteria (Figures 8b and 8c), which belong to the following classes:  $\alpha$ - (order Rhizobiales);  $\beta$ - (genus *Acidovorax*, order Burkholderiales);  $\gamma$ - (family Ectothiorhodospiraceae, order Chromatiales); and  $\delta$ -proteobacteria (family Syntrophaceae and genus *Desulfovibrio*, respectively of the orders Syntrophobacterales and Desulfovibrionales). The diverse metabolic functions of microorganisms belonging to this phylum include hydrolytic and acidogenic fermentation, nitrogen fixation, denitrification, acetogenesis, sulfidogenesis, and sulfide and thiosulfate oxidation (LI *et al.*, 2013; BERG *et al.*, 2014; SIKORA *et al.*, 2017; ST-PIERRE; WRIGHT, 2017; SPOSOB *et al.*, 2021; PASALARI *et al.*, 2021; JANNAT *et al.*, 2021). Interestingly, Proteobacteria, coexisting with three of the most abundant phyla identified in the present study (Bacteroidetes, Firmicutes, and Chloroflexi – see Section 3.2.1.1), can form a symbiotic community and act in the biodegradation of phenolic compounds (see Section 3.1.5) (CHEN *et al.*, 2017). In another perspective, as can be seen in Figure 8c, the development of *Desulfovibrio* (order Desulfovibrionales – Figure 8b) at the end of the operational phase may be related to a higher H<sub>2</sub>S proportion in biogas (+87 ppm), which occurred on the 76<sup>th</sup> operating day, compared to the immediately preceding measurement (61<sup>st</sup> day), which confirms the action of these bacteria in the system (KARNACHUK *et al.*, 2021). Moreover, except for this SRB group, all genera and orders of microorganisms classified as Proteobacteria (Figures 8b and 8c) were identified only in the inoculum sample, which reinforces its higher richness (Table 6) than the other analyzed biomasses. Similar to the phenomenon observed in the present study (Figure 8a), Iltchenco *et al.* (2021) and Callejas *et al.* (2021) also reported a gradual population reduction of this phylum during experiments conducting sugarcane vinasse anaerobic treatment under mesophilic conditions.

### 3.2.1.3 Euryarchaeota

Regarding the Archaea domain dynamics in the evaluated treatment system, the phylum Euryarchaeota had an average relative abundance of 9.81% (SD = 0.99%) in the first three months of the operational phase; however, the inoculum did not contain a significant population (< 1%) of this group (Figure 8a). The spontaneous cultivation of methanogenic microorganisms reveals an adequate acclimation of the anaerobic microbial consortium facing the environmental conditions provided by the substrate, thereby indicating an appropriate

metabolic interaction balancing resulting from interdependence relationships among bacteria and archaea in the medium (WOJCIESZAK *et al.*, 2017). Whereas there was a predominance of acetoclastic methanogenic archaea (genus *Methanosaeta*, order Methanosarcinales) in the first operating month, a scenario reversal occurred gradually in the last month, when the group with the highest relative abundance became hydrogenotrophic methanogens of the genera *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*, both belonging to the order Methanobacteriales (Figures 8b and 8c). These two archaea groups produce CH<sub>4</sub> through distinct metabolic pathways: acetoclastic methanogenesis occurs by converting acetate, a substrate used as a carbon and energy source, to CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>; while the hydrogenotrophic pathway consists of reducing CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub> using H<sub>2</sub> as an electron donor, being more energy-efficient than the acetoclastic process (SIKORA *et al.*, 2017; LACKNER *et al.*, 2018; STAMS; TEUSINK; SOUSA, 2019). *Methanosaeta* specialists, which operate in optimal temperature and pH ranges of 35-60 °C and 7.0-7.5, respectively, exclusively utilize acetate as an organic and energy source, unlike generalist acetoclasts that can also metabolize, for instance, methylamine (e.g., genus *Methanosarcina*). On the other hand, the hydrogenotrophs *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter* have greater metabolic flexibility by being able to utilize formate as substrate in addition to H<sub>2</sub>, with an optimal activity occurring at temperatures within 37-45 °C and pH 6.6-7.8 (LIU; WHITMAN, 2008; DEMIREL; SCHERER, 2008).

Several factors may have favored the growth of hydrogenotrophs over acetoclasts in this study. In this regard, microorganisms belonging to the order Methanobacteriales, unlike acetoclastic archaea, are endowed with biological mechanisms that favor their resistance and tolerance to extreme environmental conditions, e.g., high VFA concentrations, a circumstance reported in this study (see Table 4) (KOUGIAS *et al.*, 2016; VENKITESHWARAN *et al.*, 2017). Thus, replacing the predominance of acetoclastic archaea with hydrogenotrophic ones throughout the operation (Figures 8b and 8c) may have occurred in response to increasing the average influent VFA content in the last monitored month (+1,764.90 mg L<sup>-1</sup>, assuming the average observed in the first month as a reference – see Table A1 (Appendices)). Variations in physical and chemical properties of vinasse, commonly seen in sugarcane harvest periods, may explain this increase in the inflow acidity content (DE GODOI *et al.*, 2019b). Similar to the present study, the predominance of methanogenic archaea acting by the hydrogenotrophic pathway (e.g., *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanothermobacter* genera) is reported during the stable operational phase of sugarcane vinasse mono- or co-digestion experiments

(MARTÍNEZ; ROMERO; PEROTTI, 2014; DOS REIS *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017; VOLPI *et al.*, 2021).

The existence of bacteria capable of establishing syntrophic relationships with hydrogenotrophic methanogenic archaea is also a potential determining factor for higher CH<sub>4</sub> productivity via hydrogenotrophy in an anaerobic treatment system (EMBREE *et al.*, 2015). Given the surplus H<sub>2</sub> produced by fermentative bacteria belonging mainly to the orders Bacteroidales, Clostridiales, and Anaerolineales (Figure 8b), the coexistence of hydrogenotrophic organisms is essential to maintaining a low H<sub>2</sub> partial pressure in the anaerobic system, which prevents intoxication and inhibition of the microbial consortium (YAMADA *et al.*, 2006; YAMADA; SEKIGUCHI, 2009; SIKORA *et al.*, 2017). In addition to hydrogenotrophic archaea, H<sub>2</sub> consumption in mesophilic bioreactors also occurs by the role of SRB and homoacetogenic bacteria, albeit in smaller proportions (CHERNICHARO, 2016; TSAPEKOS; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2022). Although SRB compete for H<sub>2</sub> consumption with hydrogenotrophic archaea, in anaerobic systems with a low predominance of acetoclasts (as verified at the end of the experimental period of the present study), some strains of the genus *Desulfovibrio* (Figure 8c) may assimilate acetate and CO<sub>2</sub> for their anabolism, which therefore contributes to avoiding the acetate accumulation in the system and its consequent acidification (BADZIONG; DITTER; THAUER, 1979; EMBREE *et al.*, 2015; RABELO *et al.*, 2018). In contrast, homoacetogenic microorganisms propitiate the acetate formation based on the H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> metabolization, also increasing its concentration in the medium (TSAPEKOS; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2022). Meanwhile, the evaluated system did not show any instability signs due to VFA accumulation (see Section 3.1.1), thus indicating an efficient balance between acetate production and consumption (YUE *et al.*, 2021).

Besides the assimilation by SRB of the genus *Desulfovibrio*, the acetate balance may partially result from the action of microorganisms capable of performing syntrophic acetate oxidation (SAO), a process in which certain bacterial species (e.g., *Clostridium ultunense* and *Syntrophaceticus schinkii*) oxidize acetate and produce H<sub>2</sub>, formate, and CO<sub>2</sub> (step i), where the first two compounds are used as interspecies electron carriers (IECs) by H<sub>2</sub>-consuming microorganisms such as hydrogenotrophic methanogens and SRB (step ii) (TIMMERS *et al.*, 2018). Nonetheless, as yet, little is known about the physiology and ecology of microorganisms that act in the SAO initial stage (DYKSMA; JANSEN; GALLERT, 2020). Furthermore, the high COD:SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio exhibited in the present study (see details in Section 3.1.5) may have

benefited the maintenance of archaea of the genus *Methanobacterium* in the evaluated biomass (Figure 8c), given that these microorganisms can be inhibited as a result of competition with SRB for H<sub>2</sub> in sulfate-rich environments (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; DOS REIS *et al.*, 2015).

#### 3.2.1.4 Pathogens

In a parallel analysis, given the fertilizing potential of the generated biosolids (see Section 3.2.3), it is recommended to evaluate, in future studies, the pathogenicity of the microbiota contained in its composition before its application in agricultural fields. Although industrially post-processed crops (e.g., sugarcane) do not require such sanitary precautions as fresh crops, special attention should be given to agro-industry workers (e.g., from the sugar-ethanol industry) since the incorrect handling of contaminated sludge may damage collective health. In this context, in the present study, the inhibition of pathogenic organism groups was reported in the assessed enriched biomass samples (e.g., order Chromatiales – Figure 8b – belonging to the class  $\gamma$ -proteobacteria), which points to a greater health safety for further reuse of the biosolids in agriculture (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2012; LUO; ANGELIDAKI, 2014). However, in-depth microbiological analyses (e.g., helminths and protozoa) should be performed in order to determine the real pathogenic potential of anaerobic treatment sludge and estimate its probable epidemiological risks.

#### 3.2.2 Specific methanogenic activity

Table 7 presents the data from the SMA assays conducted throughout the present experiment, whose results are derived from the cumulative CH<sub>4</sub> yield graphs shown in Figure A1 (see Appendices). Overall, the methanogenic potentials of the collected biomass samples were below the data commonly reported in the literature. For instance, Vadlani and Ramachandran (2008) and Brown *et al.* (2019) reported SMAs of 0.20 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gVSS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (using a mixture of glucose and VFA as a substrate) and 0.34 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gVSS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (mixture of formate and acetate), respectively, for biomasses from anaerobic systems treating sugarcane vinasse. Longaretti *et al.* (2019) obtained an SMA of 0.10 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> after sampling biosolids from a UASB reactor annexed within a dairy industry. In turn, anaerobic sludge from sewage treatment plants (STP) generally has SMAs within 0.10 to 0.40 gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (CHERNICARO, 2016). Several factors may have negatively impacted the SMA results

observed in the present study. For example, unfavorable conditions of the UASB reactor's influent substrate (e.g., high VFA levels – see Table 4 and Section 3.1.1) or aspects related to the execution of in-lab analytical assays (e.g., inaccuracy inherent to the direct CH<sub>4</sub> measurement method, biogas leakage, measurement errors).

Table 7 – Specific methanogenic activity (SMA) of biomasses collected monthly from the evaluated anaerobic system.

Sample	Acetate			Formate		
	Cumulative CH <sub>4</sub> yield (mL)	SMA <sub>1</sub>	SMA <sub>2</sub>	Cumulative CH <sub>4</sub> yield (mL)	SMA <sub>1</sub>	SMA <sub>2</sub>
Inoculum	81.1	10.00	0.025	59.5	28.94	0.073
Month 1	35.1	5.00	0.013	20.7	15.66	0.040
Month 2	38.3	19.46	0.049	29.6	26.90	0.068
Month 3	83.2	20.12	0.051	35.1	22.90	0.058

TVS = total volatile solids; TVS/TS = volatile and total solids ratio; SMA<sub>1</sub> and SMA<sub>2</sub> = values of specific methanogenic activity in mLCH<sub>4</sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and gCOD<sub>CH<sub>4</sub></sub> gTVS<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectively.

Source: From the author (2022).

Despite the low results, the SMA assays evidenced the variation of anaerobic microbiota methanogenic potentials throughout the system operation (Table 7). In this regard, compared to the SMA results of the inoculum sample, there were significant reductions in the methanogenic activity of the biomass collected in the first month, specifically -48% (using acetate as a substrate source) and -45% (formate). These sharp drops verified during the initial experimental phase may be related to microbial consortium responses to adverse conditions of the influent applied to the UASB reactor. Afterwards, the SMAs increased throughout the operation for both substrates (viz., acetate and formate) due to a gradual microbial acclimation to the medium (viz., vinasse and dairy secondary effluent). Moreover, the observed cumulative CH<sub>4</sub> yields from the SMA tests tended to increase proportionally to the variation of methanogenic activity results, as can be seen in Table 7.

It is essential to highlight that the use of formate as a substrate in the SMA tests is because this compound, as well as H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, can be metabolized by part of the hydrogenotrophic archaea and later converted to CH<sub>4</sub>, thus allowing to measure the hydrogenotrophic methanogenic activity. At the same time, the application of acetate as a substrate source allows quantifying the CH<sub>4</sub> generated by acetoclastic methanogenic archaea. Nevertheless, it is necessary to point out that both acetate and formate can be converted into each other through reverse biochemical processes conducted by homoacetogenic bacteria (formate into acetate)



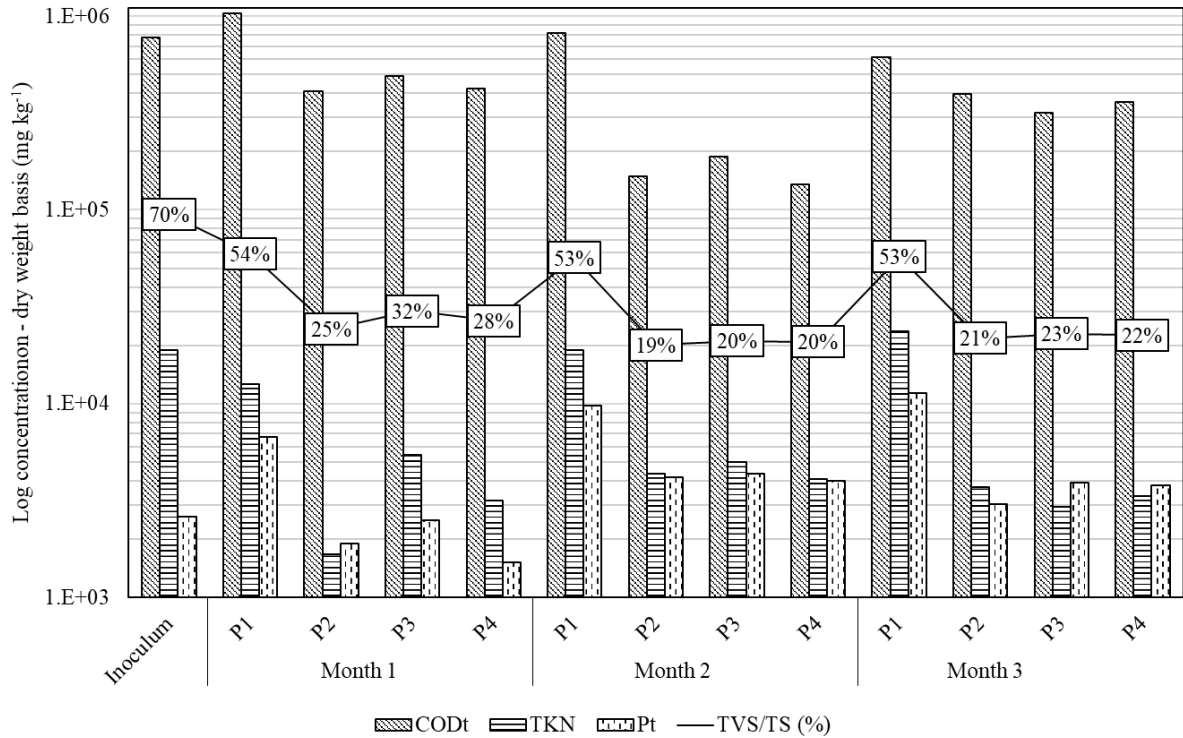
and SAO (acetate into formate), which may be present in the biomass, thus alternating the predominant methanogenic pathways. For this reason, additional analyses are sometimes necessary, given the narrow interpretation stemming from SMA tests. On the other hand, according to the analytical tools employed in this study, applying SMA assays combined with molecular biology techniques may generate a rich set of interrelated information, which provides a more accurate analysis of methanogenic processes acting in anaerobic communities (LOZANO *et al.*, 2009; CRABLE *et al.*, 2011; LINS *et al.*, 2012; MONCADA; SILVA, 2016; TIMMERS *et al.*, 2018; KURTH; OP DEN CAMP; WELTE, 2020; TSAPEKOS; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2022).

Based on the theoretical background and the SMA data listed in Table 7, the methanogenic hydrogenotrophic pathway was expected to be predominant in the third month once the sequencing analyses (Section 3.2.1) showed a predominance of hydrogenotrophic archaea (order Methanobacteriales – Figure 8b). However, the growth of bacteria of the genus *Desulfovibrio* (Figure 8c), which are sulfate-reducing organisms (i.e., SRB), indicates a possible competition for the same common substrate (H<sub>2</sub>) for hydrogenotrophic archaea, which could explain the reduction of the SMA via formate at the end of the experiment (Table 7). Furthermore, if active in the analyzed biomass samples, homoacetogenic bacteria and SAO (e.g., phylum Firmicutes' specific strains – Figure 8a) may also have affected the alternation of methanogenesis metabolic pathways (CHERNICHARO, 2016; TIMMERS *et al.*, 2018; TSAPEKOS; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2022).

### **3.2.3 Physical and chemical properties of the biosolids profile**

Surplus biosolids from UASB reactors are stable, nutrient-rich organic materials with a wide range of applications related to soil improvement, such as fertilizing agricultural fields and restoring degraded land (CHERNICHARO, 2016; KUMAR; CHOPRA; KUMAR, 2017; SILVA-LEAL; PÉREZ-VIDAL; TORRES-LOZADA, 2021). Therefore, their use in agriculture has advantages from both technical and economic perspectives (FRANCO *et al.*, 2010). In light of this, the physical and chemical characteristics of the biosolids generated by the anaerobic system monitored in the present study were evaluated (Figure 9).

Figure 9 – Temporal variation of the physical and chemical profile of biosolids extracted monthly from different sample points of the evaluated UASB reactor – P1, P2, P3, and P4, in increasing order of height.



COD<sub>t</sub> = total chemical oxygen demand; TKN = total *Kjeldahl* nitrogen; P<sub>t</sub> = total phosphorus; TVS/TS = volatile and total solids ratio.

Source: From the author (2022).

Given the extensive cell residence time typical of high-rate anaerobic systems, the biosolids produced in this study presented a high stabilization degree, evidenced by the maintenance of TVS/TS ratios lower than 65% (Figure 9) – which is the maximum value recommended to avoid attracting vectors in sludge to be disposed on soil, according to the Brazilian legislation (CHERNICHARO, 2016; CONAMA, 2020). Throughout the system operation, there was a constant reduction in COD<sub>t</sub> levels of point P1 due to the progressive organic content mineralization by microbial action, which minimized the biosolids' potential to pollute soil (BARROS *et al.*, 2017). After the inoculation, 1,035 gCOD<sub>t</sub> kg<sup>-1</sup> was recorded in P1; whereas a 41% lower level was observed at the end of the experiment. In parallel, fluctuations of physical and chemical properties (i.e., COD<sub>t</sub>, TKN, and P<sub>t</sub>) occurred in the UASB reactor's upper profile (viz., P2 to P4) over the experimental period. Occasionally and contrary to expectations, P2 presented lower concentrations than P3 and P4 samples, which can be explained by the mass transfer caused by the biogas bubbles formation in the digestion zone

(viz., P2 region), culminating in the suspension of sedimented solid particles to the settling zone (viz., P3 and P4) (AFRI; JING; YOUNAS, 2019). On the other hand, P1 aggregates more sedimentable solids because it is closer to the reactor's bottom, which justifies its high physical and chemical contents.

In turn, to analyze the biosolids' nutritional content regarding their further application to agricultural soil, monthly concentrations of a hypothetical mixture of P1 and P2 (1:1 v/v) were estimated since the disposal sludge collection usually occurs nearest to the bottom of anaerobic bioreactors. For the respective three operating months, the results were 7,121, 11,654, and 13,732 mgTKN kg<sup>-1</sup>; and 4,318, 6,973, and 7,191 mgP<sub>t</sub> kg<sup>-1</sup>. Therefore, there was an accumulation of nutrients throughout the system's operational phase. These estimated nitrogen and phosphorus contents correspond to the ranges often reported for biosolids, which are, in terms of dry mass basis, 1,000-210,000 mgTKN kg<sup>-1</sup> e 1,000-36,000 mgP<sub>t</sub> kg<sup>-1</sup> (TORRI; CORRÊA; RENELLA, 2017; SILVA-LEAL; PÉREZ-VIDAL; TORRES-LOZADA, 2021).

Furthermore, in order to evaluate the biosolids' fertilizing potential, it is necessary to verify their NPK dosage. Since the K<sub>t</sub> content of the sludge samples was not determined in this study, a concentration of 1,000 mgK<sub>t</sub> kg<sup>-1</sup> was adopted, given that anaerobic biosolids accumulate low potassium amounts due to the low removal efficiency of this compound by overall anaerobic treatment systems (CAVALCANTI *et al.*, 2015; TORRI; CORRÊA; RENELLA, 2017). Based on these data, the NPK doses estimated in the present study were 1,958:1,188:275, 3,205:1,918:275, and 3,776:1,978:275 for, respectively, the first, second, and third month of operation. Compared to the ideal dose for sugarcane crops (281:140:275 kg ha<sup>-1</sup>), for instance, it can be seen that the nitrogen and phosphorus contents extrapolated from those recommended (KANDHRO *et al.*, 2021). Thus, it is fundamental to outline strategies to correct the excess nutrient contents of the biosolids prior to their disposal in sugarcane fields, e.g., mixing them with the liquid effluent produced by the evaluated UASB reactor, whose average estimated NPK dose presented deficiency in TKN and P<sub>t</sub> (see Section 3.1.4). In summary, the combined application of biosolids and effluent from anaerobic treatment plants can reduce the consumption of synthetic mineral fertilizers, thus benefiting the circular bioeconomy in the agro-industry (e.g., the sugar-ethanol sector).

## 4 CONCLUSIONS

The proposed co-digestion proved to be an operationally straightforward and technically efficient treatment strategy. In a novel approach, applying secondary effluent from the dairy industry as a co-substrate for sugarcane vinasse ensured an effective pollutant removal combined with CH<sub>4</sub> productivities of up to 308 mLCH<sub>4</sub> gCOD<sub>rem</sub><sup>-1</sup>. Furthermore, based on the next-generation sequencing and specific methanogenic activity assays, a progressive acclimation of the anaerobic microbial community to the substrate was verified, indicating that the influent mixture to the lab-scale UASB reactor had lower levels of toxicity than those of the raw vinasse as well as sufficient alkalinity and organic matter-nutrient balance.

Moreover, the microbiological analyses identified an alternation of the predominant methanogenic pathway throughout the operation, initially indicating a greater relative abundance of acetoclastic archaea and, at the end of the experiment, the establishment of hydrogenotrophic archaea as the principal CH<sub>4</sub>-producing active group. Simultaneously, the anaerobic system induced the generation of effluent and biosolids, which combined may present a suitable fertilizing potential for crops, especially sugarcane. In summary, the experiment efficiently promoted the energy recovery from the co-substrates as well as the generation of biofertilizers, which can be translated into possible economic benefits for the agro-industrial sector by implementing a similar but full-scale treatment plant. However, it is essential to consider essential expenses, e.g., biogas upgrading, pumping, acquisition of alkalinizing substances, and transportation of the co-substrates to the sugar-ethanol mill, when analyzing the system's financial viability.

It is recommended, in future research, to conduct experiments that establish the vinasse anaerobic processing by adopting alternative operational strategies in bioreactors in order to evaluate their effects on the overall stability and effectiveness of the treatment process. In this context, demonstrating the feasibility of introducing treatment routes and their consequent resource recovery potential can encourage the implementation of waste management strategies by the sugar-ethanol sector, thereby reducing its environmental liabilities and turning the production process into a more sustainable and less costly one, which contributes to the circular bioeconomy of the agro-industry.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Cachaça Bocaina artisanal cachaçaria, Lavras-MG, Brazil, and Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA) for kindly providing samples for this experiment. The author J. C. de Siqueira also wishes to thankfully acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Finance Code 001].

## REFERENCES

ABREU, E. F.; ARAÚJO, J. C. **Ensaio de Atividade Metanogênica Específica (AME) para lodos anaeróbios. Procedimento Operacional Padrão**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2011. 27 p. Documento da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Ambiental. 2011.

AFRIDI, Z. U. R.; JING, W.; YOUNAS, H. Biogas production and fundamental mass transfer mechanism in anaerobic granular sludge. **Sustainability**, v. 11, p. 4443, 2019. DOI: 10.3390/su11164443

AHMED, M. *et al.* Continuous ferric iron-dosed anaerobic wastewater treatment: Treatment performance, sludge characteristics, and microbial composition. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, p. 103537, 2018. DOI: 10.1016/j.jece.2019.103537

ALAYU, E.; LETA, S. Evaluation of irrigation suitability potential of brewery effluent post treated in a pilot horizontal subsurface flow constructed wetland system: implications for sustainable urban agriculture. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07129, 2021. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07129

ALBANEZ, R. *et al.* Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an AnSBBR. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27-41, 2018. DOI: 10.1590/0104-6632.20180351s20150807

ALBUQUERQUE, J. N. de *et al.* Thermophilic biomethane production by vinasse in an AnSBBR: start-up strategy and performance optimization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 717-731, 2019. DOI: 10.1590/0104-6632.20190362s20170611

ALBUQUERQUE, J. N.; RATUSZNE, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Biomethane production by thermophilic co-digestion of sugarcane vinasse and whey in an AnSBBR: Effects of

composition, organic load, feed strategy and temperature. **Journal of Environmental Management**, v. 251, n. 109606, 2019. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.109606

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data – version 0.7.1. **Software**. 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed: 21 Feb. 2022.

ANNACHHATRE, A. P. Anaerobic treatment of industrial wastewaters. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 16, p. 161-166, 1996. DOI: 10.1016/0921-3449(95)00053-4

ANTWI, P. *et al.* Functional bacterial and archaeal diversity revealed by 16S rRNA gene pyrosequencing during potato starch processing wastewater treatment in an UASB. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 348-357, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.03.141

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21. ed. Washington: AOAC International, 2019.

APARICIO, E. *et al.* Biofuels production of third generation biorefinery from macroalgal biomass in the Mexican context: An overview. *In*: TORRES, M. D.; KRAAN, S.; DOMINGUEZ, H. (eds.). **Sustainable Seaweed Technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 393-446. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00015-9>. Accessed: 20 Jan. 2022.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: APHA/AWWA/WEF, 2012. 1496 p.

AQUINO, S. F. *et al.* Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, 2007. DOI: 10.1590/S1413-41522007000200010

BADZIONG, W.; DITTER, B.; THAUER, R. K. Acetate and carbon dioxide assimilation by *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg), growing on hydrogen and sulfate as sole energy source. **Archives of Microbiology**, v. 123, p. 301-305, 1979. DOI: 10.1007/BF00406665

BARROS, V. G. de *et al.* Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and

- Methanosarcina archaea and Thermotogae bacteria. **Bioresource Technology**, v. 244, n. 1, p. 371-381, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.106
- BARROS, V. G. de; DUDA, R. S.; OLIVEIRA, R. A. de. Biomethane production from vinasse in UASB reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 628-639, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.021
- BELLA, K.; RAO, P. V. Anaerobic digestion of dairy wastewater: effect of different parameters and co-digestion options—a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021. DOI: 10.1007/s13399-020-01247-2
- BERG, J. S. *et al.* Polysulfides as intermediates in the oxidation of sulfide to sulfate by *Beggiatoa* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 629-636, 2014. DOI: 10.1128/AEM.02852-13
- BORGES, A. do V. *et al.* Co-digesting sugarcane vinasse and distilled glycerol to enhance bioenergy generation in biofuel-producing plants. **Energy Conversion and Management**, v. 250, n. 114897, 2021. DOI: 10.1016/j.enconman.2021.114897
- BOVIO-WINKLER, P.; CABEZAS, A.; ETCHEBEHERE, C. Database mining to unravel the ecology of the phylum Chloroflexi in methanogenic full scale bioreactors. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 603234, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.603234
- BROWN, A. I. T. *et al.* Population changes of Eubacteria, sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in an anaerobic reactor processing ethanol distillery vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180268, 2019. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180268
- CALLEJAS, C. *et al.* Temporal analysis of the microbiota involved in the anaerobic degradation of sugarcane vinasse in a full-scale methanogenic UASB reactor. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021. DOI: 10.1007/s13399-021-01281-8
- CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1621-1624, 2012. DOI: 10.1038/ismej.2012.8
- CAVALCANTI, T. F. M. *et al.* Yield of castor bean fertilized with sewage sludge and potassium and magnesium sulphate. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 8, p. 773-779, 2015. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v19n8p773-779

- CERON-CHAFLA, P. *et al.* Direct and indirect effects of increased CO<sub>2</sub> partial pressure on the bioenergetics of syntrophic propionate and butyrate conversion. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 19, p. 12583-12592, 2020. DOI: 10.1021/acs.est.0c02022
- CHAVES, M. G. de *et al.* Combined use of vinasse and nitrogen as fertilizers affects nitrification, ammonification, and denitrification by prokaryotes. **Frontiers in Soil Science**, v. 1, n. 746745, 2021. DOI: 10.3389/fsoil.2021.746745
- CHEN, R. *et al.* Changes in degrading ability, populations and metabolism of microbes in activated sludge in the treatment of phenol wastewater. **RSC Advances**, v. 7, p. 52841-52851, 2017. DOI: 10.1039/C7RA09225C
- CHEN, S. *et al.* Linkages of Firmicutes and Bacteroidetes populations to methanogenic process performance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, 2016. DOI: 10.1007/s10295-016-1760-8
- CHERNICHARO, C. A. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios**. 2. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA/UFMG, Belo Horizonte: Editora UFMG, 2016. 379 p.
- CHOJNACKA, A. *et al.* Noteworthy facts about a methane-producing microbial community processing acidic effluent from sugar beet molasses fermentation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0128008, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0128008
- COCK, P. J. A *et al.* **Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics**. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422-1423, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp163
- CONAMA – National Environment Council. **Resolution No. 498**. Brasília: Ministry of the Environment, 2020. Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-498-de-19-de-agosto-de-2020-273467970>. Accessed: 02 Apr. 2022.
- CONTRERAS-CONTRERAS, J. A. *et al.* Polyphenols from sugarcane vinasses, quantification, and removal using activated carbon after biochemical treatment in laboratory-scale thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactors. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 401, 2020. DOI: 10.1007/s11270-020-04733-5
- CRABLE, B. R. *et al.* Formate formation and formate conversion in biological fuels production. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 532536, 2011. DOI: 10.4061/2011/532536



- DE GODOI, L. A. G. *et al.* Characterizing phenol-removing consortia under methanogenic and sulfate-reducing conditions: potential metabolic pathways. **Environmental Technology**, v. 40, n. 24, p. 3216-3226, 2019a. DOI: 10.1080/09593330.2018.1468491
- DE GODOI, L. A. G. *et al.* Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 29267-29282, 2019b. DOI: 10.1007/s11356-019-06019-8
- DEL NERY, V. *et al.* Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugarcane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411-417, 2018. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.10.002
- DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, p. 173-190, 2008. DOI: 10.1007/s11157-008-9131-1
- DIAS, M. F. *et al.* Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 58-66, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.007
- DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile acids by direct titration. **Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 356-365, 1961. Available at: <https://www.jstor.org/stable/25034391>. Accessed: 26 Feb. 2022.
- DOS REIS, C. M. *et al.* Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498-8509, 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.04.136
- DOYENI, M. O. *et al.* The effectiveness of digestate use for fertilization in an agricultural cropping system. **Plants (Basel)**, v. 10, n. 8, p. 1734, 2021. DOI: 10.3390/plants10081734
- DYKSMA, S.; JANSEN, L.; GALLERT, C. Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste. **Microbiome**, v. 8, n. 105, 2020. DOI: 10.1186/s40168-020-00862-5
- EMBREE, M. *et al.* Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 112, n. 50, p. 15040-15455, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1506034112

- ESPAÑA-GAMBOA, E. I. *et al.* Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 82, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-82
- ESPINOSA, A. *et al.* Effect of trace metals on the anaerobic degradation of volatile fatty acids in molasses stillage. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 121-129, 1995. DOI: 10.2166/wst.1995.0473
- FERRAZ JUNIOR, A. D. N. *et al.* Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, n. 112045, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2021.112045
- FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. *et al.* Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252, 2016. DOI: 10.1016/j.renene.2015.11.064
- FERREIRA, N. A. de L. *et al.* Avaliação das concentrações de metano gerado em um biorreator de bancada com base em parâmetros físico-químicos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 473-479, 2017. DOI: 10.1590/S1413-41522017145766
- FINCKER, M. *et al.* Metabolic strategies of marine subseafloor Chloroflexi inferred from genome reconstructions. **Environmental Microbiology**, v. 22, p. 3188-3204, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.15061
- FONTANA, A. *et al.* Dynamics of *Clostridium* genus and hard-cheese spoiling *Clostridium* species in anaerobic digesters treating agricultural biomass. **AMB Express**, v. 10, n. 102, 2020. DOI: 10.1186/s13568-020-01040-4
- FRANCO, A. *et al.* Sewage sludge as nitrogen and phosphorus source for cane-plant and first ratoon crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 553-561, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000200029
- FUESS, L. T. *et al.* Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: How phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs?. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 209-220, 2017a. DOI: 10.1016/j.cherd.2017.01.023
- FUESS, L. T. *et al.* Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and

environmental approach. **Renewable Energy**, v. 122, p. 674-687, 2018. DOI: 10.1016/j.renene.2018.02.003

FUESS, L. T. *et al.* Pros and cons of fertirrigation with in natura sugarcane vinasse: Do improvements in soil fertility offset environmental and bioenergy losses?. **Journal of Cleaner Production**, v. 319, n. 128684, 2021. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.128684

FUESS, L. T. *et al.* Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480-491, 2017b. DOI: 10.1016/j.apenergy.2016.12.071

FUESS, L. T.; RODRIGUES, I. J.; GARCIA, M. L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 52, n. 11, p. 1063-1072, 2017. DOI: 10.1080/10934529.2017.1338892

GRADY JUNIOR, C. P. L. *et al.* **Biological Wastewater Treatment**. 3. ed. London: IWA Publishing, 2011. 1022 p.

HUNG, C. *et al.* Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 693-701, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-0854-7

ILTCHENCO, J. *et al.* Microbiota profile in mesophilic biodigestion of sugarcane vinasse in batch reactors. **Water Science & Technology**, v. 84, n. 8, p. 2028-2039, 2021. DOI: 10.2166/wst.2021.375

ISSAH, A.; KABERA, T. Impact of volatile fatty acids to alkalinity ratio and volatile solids on biogas production under thermophilic conditions. **Waste Management & Research**, v. 39, n. 6, p. 871-878, 2021. DOI: 10.1177/0734242X20957395

JABARI, L. *et al.* *Macelibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 2522-2527, 2012. DOI: 10.1099/ij.s.0.032508-0

JANKE, L. *et al.* Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 10-20, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.110

- JANNAT, M. A. H. *et al.* Long-term enrichment of anaerobic propionate-oxidizing consortia: Syntrophic culture development and growth optimization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, n. 123230, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123230
- JIMÉNEZ, J. *et al.* Microbial community dynamics reflect reactor stability during the anaerobic digestion of a very high strength and sulfate-rich vinasse. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, p. 975-984, 2018. DOI: 10.1002/jctb.5449
- KANDHRO, M. N. *et al.* Impact of NPK fertilization on growth and yield of sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) under different planting methods. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 2, p. 346-355, 2021. DOI: 10.17582/journal.pjar/2021/34.2.346.355
- KARNACHUK, O. V. *et al.* Microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio* is an important source of hydrogen sulfide from a large swine finishing facility. **Scientific Reports**, v. 11, p. 10720, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-90256-w
- KARNCHANAWONG, S.; UPARAWANNA, S. Performance of single-phase complete-mix anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Asian Journal on Energy and Environment**, v. 8, n. 4, p. 627-634, 2007. Available at: <https://www.thaiscience.info/journals/Article/AJEE/10262472.pdf>. Accessed: 06 Feb. 2022.
- KIANI, M. K. D.; PARSAEE, M.; MAHDAVIFAR, Z. Biogas production from sugarcane vinasse at mesophilic and thermophilic temperatures by static granular bed reactor (SGBR). **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 48, n. 101569, 2021. DOI: 10.1016/j.seta.2021.101569
- KOUGIAS, P. G. *et al.* Dynamic functional characterization and phylogenetic changes due to Long Chain Fatty Acids pulses in biogas reactors. **Scientific Reports**, n. 28810, 2016. DOI: 10.1038/srep28810
- KUMAR, V.; CHOPRA, A. K.; KUMAR, A. A review on sewage sludge (Biosolids) a resource for sustainable agriculture. **Archives of Agriculture and Environmental Science**, v. 2, n. 4, p. 340-347, 2017. DOI: 10.26832/24566632.2017.020417
- KURTH, J. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; WELTE, C. U. Several ways one goal – methanogenesis from unconventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6839-6854, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10724-7

- LACKNER, N. *et al.* Hydrogenotrophic methanogenesis and autotrophic growth of *Methanosarcina thermophila*. **Archaea**, v. 2018, n. 4712608, 2018. DOI: 10.1155/2018/4712608
- LI, Y. *et al.* Anaerobic co-digestion of chicken manure and corn stover in batch and continuously stirred tank reactor (CSTR). **Bioresource Technology**, v. 156, p. 342-347, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.054
- LI, Z. *et al.* Long-term anaerobic mineralization of pentachlorophenol in a continuous-flow system using only lactate as an external nutrient. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 3, p. 1534-1541, 2013. DOI: 10.1021/es303784f
- LINS, P. *et al.* Methanogenic potential of formate in thermophilic anaerobic digestion. **Waste Management & Research**, v. 30, n. 10, p. 1031-1040, 2012. DOI: 10.1177/0734242X12445655
- LIU, F. H. *et al.* Bacterial and archaeal assemblages in sediments of a large shallow freshwater lake, Lake Taihu, as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 1022-1032, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.04069.x
- LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171-189, 2008. DOI: 10.1196/annals.1419.019
- LONGARETTI, G. *et al.* Estudo da atividade metanogênica específica de diferentes lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, n. 6, p. 1139-1146, 2019. DOI: 10.1590/S1413-41522019140730
- LOVATO, G. *et al.* Methane production by co-digesting vinasse and whey in an ANsBBR: effect of mixture ratio and feed strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, p. 28-46, 2019. DOI: 10.1007/s12010-018-2802-7
- LOZANO, C. J. S. *et al.* Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste treatment. **Waste Management**, v. 29, n. 2, p. 704-711, 2009. DOI: 10.1016/j.wasman.2008.06.021
- LUO, G.; ANGELIDAKI, I. Analysis of bacterial communities and bacterial pathogens in a biogas plant by the combination of ethidium monoazide, PCR and Ion Torrent sequencing. **Water Research**, v. 60, p. 156-163, 2014. DOI: 10.1016/j.watres.2014.04.047

- MA, G.; CHEN, Y.; NDEGWA, P. Association between methane yield and microbiota abundance in the anaerobic digestion process: A meta-regression. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 135, n. 110212, 2021. DOI: 10.1016/j.rser.2020.110212
- MA, H. *et al.* Nutrient recovery technologies integrated with energy recovery by waste biomass anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 520-531, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.08.114
- MARIN-BATISTA, J. *et al.* Anaerobic co-digestion of vinasse and chicken manure: alternative for Colombian agrowaste management. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 18, n. 2, p. 6-12, 2016. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.53853
- MARTINEZ, M. A. Discovery and ecogenomic context of a global *Caldiserica*-related phylum active in thawing permafrost, *Candidatus* Cryoserica phylum nov., *Ca.* Cryoserica class nov., *Ca.* Cryosericales ord. nov., *Ca.* Cryoseriaceae fam. nov., comprising the four species *Cryosericum septentrionale* gen. nov. sp. nov., *Ca.* *C. hinesii* sp. nov., *Ca.* *C. odellii* sp. nov., *Ca.* *C. terrychapinii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 54-66, 2019. DOI: 10.1016/j.syapm.2018.12.003
- MARTÍNEZ, M. A.; ROMERO, H.; PEROTTI, N. I. Two amplicon sequencing strategies revealed different facets of the prokaryotic community associated with the anaerobic treatment of vinasses from ethanol distilleries. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 388-392, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.030
- MASELLA, A. P. *et al.* PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 31, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-31
- MATOS, A. T de. **Qualidade do Meio Físico Ambiental – Práticas de Laboratório**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. 150 p.
- MENG, L. *et al.* Enhancement of bioenergy recovery from agricultural wastes through recycling of cellulosic alcoholic fermentation vinasse for anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 311, n. 123511, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123511
- MERCADO, J. V.; KOYAMA, M.; NAKASAKI, K. Short-term changes in the anaerobic digestion microbiome and biochemical pathways with changes in organic load. **Science of the Total Environment**, v. 813, n. 152585, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152585

- MONCADA, M. S. A.; SILVA, M. Q. Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. **Revista Ion**, v. 29, n. 1, p. 117-123, 2016. DOI: 10.18273/revion.v29n1-2016010
- MORAES, B. S. *et al.* Biogas production within the bioethanol production chain: Use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 227-234, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.089
- NAKASAKI, K. *et al.* Changes in the microbial community during the acclimation process of anaerobic digestion for treatment of synthetic lipid-rich wastewater. **Journal of Biotechnology**, v. 306, p. 32-37, 2019. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.09.003
- NAKASHIMA, R. N.; OLIVEIRA JUNIOR, S. de. Comparative exergy assessment of vinasse disposal alternatives: Concentration, anaerobic digestion and fertirrigation. **Renewable Energy**, v. 17, p. 1969-1978, 2020. DOI: 10.1016/j.renene.2019.09.124
- NASCIMENTO, L. **Trade of balance in agribusiness sees \$87.76 bi surplus in 2020**. Agência Brasil, EBC, Brasília. 2021. Available at: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/en/economia/noticia/2021-01/trade-balance-agribusiness-sees-1305-bi-surplus-2020>. Accessed: 11 Jul. 2022.
- NÁTHIA-NEVES, G. *et al.* Start-up phase of a two-stage anaerobic co-digestion process: hydrogen and methane production from food waste and vinasse from ethanol industry. **Biofuel Research Journal**, v. 18, p. 813-820, 2018. DOI: 10.18331/BRJ2018.5.2.5
- NEUFELD, R. D.; MACK, J. D.; STRAKEY, J. P. Anaerobic Phenol Biokinetics. **Water Pollution Control Federation**, v. 52, n. 9, p. 2367-2377, 1980. Available at: <https://www.jstor.org/stable/25040887>. Accessed: 13 Mar. 2022.
- NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.
- NTAGIA, E. *et al.* Homoacetogenesis and microbial community composition are shaped by pH and total sulfide concentration. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 1026-1038, 2020. DOI: 10.1111/1751-7915.13546
- OLIVEIRA, C. A. *et al.* Increasing salinity concentrations determine the long-term participation of methanogenesis and sulfidogenesis in the biodigestion of sulfate-rich wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 296, n. 113254, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113254

- PAN, S. *et al.* Anaerobic co-digestion of agricultural wastes toward circular bioeconomy. **iScience**, v. 24, n. 7, p. 102704, 2021. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102704
- PARSAEE, M.; KIANI, M. K. D.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 117-125, 2019. DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.01.034
- PASALARI, H. *et al.* Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: A systematic review. **Chemosphere**, v. 270, p. 128618, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128618
- PEDROSA, E. M. R. *et al.* Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 197-201, 2005. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v9nsupp197-201
- PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Revista Ambiente & Água**, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009. DOI: 10.4136/ambi-agua.109
- PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTTERAN, F. Physicochemical study of pH, alkalinity and total acidity in a system composed of Anaerobic Baffled Reactor in series with Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor in the treatment of pig farming wastewater. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 3, p. 477-483, 2013. DOI: 10.4025/actascitechnol.v35i3.14069
- PIGOLI, A. *et al.* Thermophilic anaerobic digestion as suitable bioprocess producing organic and chemical renewable fertilizers: A full-scale approach. **Waste Management**, v. 124, p. 356-367, 2021. DOI: 10.1016/j.wasman.2021.02.028
- PINTO, M. P. M. *et al.* Co-digestion of coffee residues and sugarcane vinasse for biohythane generation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 146-155, 2018. DOI: 10.1016/j.jece.2017.11.064
- R CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing – R version 3.6.3. **Software**. 2020. Available at: <https://www.R-project.org>. Accessed: 28 Mar. 2021.
- RABELO, C. A. B. S. *et al.* Bioconversion of cellulose into hydrogen, biogas and organic acids using microbial consortium from a pulp and paper mill wastewater treatment plant. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 169-175, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170157



- RAMOS, L. R. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, n. 128066, 2021. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.128066
- REIS, C. E. R. *et al.* Vinasse treatment within the sugarcane-ethanol industry using ozone combined with anaerobic and aerobic microbial processes. **Environments**, v. 6, n. 1, p. 5-17, 2019. DOI: 10.3390/environments6010005
- RINCÓN-MEJÍA, E.; HERAS, A. de las. **Sustainable Energy Technologies**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2017. 399 p.
- RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 58, p. 406-411, 1986. Available at: <http://www.jstor.org/stable/25042933>. Accessed: 19 Feb. 2022.
- ROBLES-GONZÁLEZ, V. *et al.* Treatment of mezcal vinasses: A review. **Journal of Biotechnology**, v. 157, p. 524-546, 2012. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.09.006
- RODRÍGUEZ, E. *et al.* Molecular analysis of the biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2181-2191, 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3529-3
- ROQUE, L. R. *et al.* Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v. 242, p. 775-787, 2019. DOI: 10.1016/j.fuel.2018.12.130
- SAMANIEGO G., J. A.; PEDROZA-SANDOVAL, A. Potential uses of volatile fatty acids in soil, water and air. **Terra Latinoamericana**, v. 31, n. 2, p. 155-163, 2013. Available at: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792013000300155](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792013000300155). Accessed: 06 Mar. 2022.
- SHI, K. *et al.* A review of the category, mechanism, and controlling methods of chemical clogging in drip irrigation system. **Agriculture**, v. 12, n. 202, 2022. DOI: 10.3390/agriculture12020202
- SIKORA, A. *et al.* Anaerobic Digestion: I. A Common Process Ensuring Energy Flow and the Circulation of Matter in Ecosystems. II. A Tool for the Production of Gaseous Biofuels. *In*: JOZALA, A. (ed.). **Fermentation Processes**. London: IntechOpen, 2017. p. 393-446. Available at: <https://doi.org/10.5772/64645>. Accessed: 22 Jan. 2022.

- SILLERO, L.; SOLERO, R.; PEREZ, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge, wine vinasse and poultry manure for bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 6, p. 3667-3678, 2022. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2021.11.032
- SILVA NETO, J. V. da *et al.* ADM1 approach to the performance optimisation and biogas H<sub>2</sub>S prediction of a large-scale anaerobic reactor fed on sugarcane vinasse. **Water Science & Technology**, v. 80, n. 9, p. 1774-1786, 2019. DOI: 10.2166/wst.2019.434
- SILVA, A. F. R. *et al.* Resource recovery from sugarcane vinasse by anaerobic digestion – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 295, n. 113137, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113137
- SILVA, P. F. da *et al.* Obstruction and uniformity in drip irrigation systems by applying treated wastewater. **Revista Ceres**, v. 64, n. 4, p. 344-350, 2017. DOI: 10.1590/0034-737X201764040002
- SILVA-LEAL, J. A.; PÉREZ-VIDAL, A.; TORRES-LOZADA, P. Effect of biosolids on the nitrogen and phosphorus contents of soil used for sugarcane cultivation. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. E06360, 2021. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06360
- SINGH, A.; MÜLLER, B.; SCHNÜRER, A. Profiling temporal dynamics of acetogenic communities in anaerobic digesters using next-generation sequencing and T-RFLP. **Scientific Reports**, v. 11, n. 13298, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-92658-2
- SIQUEIRA, J. C. *et al.* Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 155, n. 111904, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111904
- SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, p. 1707-1716, 2013. DOI: 10.1080/10934529.2013.815535
- SOGN, T. A. *et al.* Recycling of biogas digestates in plant production: NPK fertilizer value and risk of leaching. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 7, p. 49-58, 2018. DOI: 10.1007/s40093-017-0188-0
- SOKOLOVA, T. G. *et al.* Carboxydocella thermautotrophica gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, CO-utilizing thermophile from a Kamchatkan hot spring. **International Journal of**

**Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1961-1967, 2022. DOI: 10.1099/00207713-52-6-1961

SOUSA, S. P. *et al.* Improvement of sugarcane stillage (vinasse) anaerobic digestion with cheese whey as its co-substrate: achieving high methane productivity and yield. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, p. 987-1006, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-03056-4

SOUZA M. E., FUZARO G., POLEGATO A. R. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. **Water Science and Technology**, v. 25, p. 213-222, 1992. DOI: 10.2166/wst.1992.0153

SPOSOB, M. *et al.* Microbiome of seven full-scale anaerobic digestion plants in South Korea: Effect of feedstock and operational parameters. **Energies**, v. 14, n. 3, p. 665, 2021. DOI: 10.3390/en14030665

STAMS, A. J. M.; TEUSINK, B.; SOUSA, D. Z. Ecophysiology of Acetoclastic Methanogens. *In*: STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z. (eds.). **Biogenesis of Hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Cham: Springer, 2019. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_21). Accessed: 28 Mar. 2022.

ST-PIERRE, B.; WRIGHT, A. G. Implications from distinct sulfate-reducing bacteria populations between cattle manure and digestate in the elucidation of H<sub>2</sub>S production during anaerobic digestion of animal slurry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 5543-5556, 2017. DOI: 10.1007/s00253-017-8261-1

STREPIS, N. *et al.* Genome-guided analysis allows the identification of novel physiological traits in *Trichococcus* species. **BMC Genomics**, v. 21, n. 24, 2020. DOI: 10.1186/s12864-019-6410-x

SWILLING, K. J. *et al.* Mechanisms of Anaerobic Soil Disinfestation: Volatile Fatty Acids Reduce Viability of *Athelia (Sclerotium) rolfsii* Sclerotia in Acidic Soil Conditions and Have Limited Effects on Endemic *Trichoderma* spp. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, n. 747176. DOI: 10.3389/fsufs.2021.747176

SYAICHURROZI, I. *et al.* Biogas production from co-digestion vinasse waste and tofu-processing wastewater and kinetics. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 6, n. 3, p. 1057-1070, 2016. DOI: 10.20508/ijrer.v6i3.4150.g6888

- TAN, H. *et al.* Parabacteroides chartae sp. nov., an obligately anaerobic species from wastewater of a paper mill. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 2613-2617, 2012. DOI: 10.1099/ij.s.0.038000-0
- TAUSEEF, S. M.; ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Energy recovery from wastewaters with high-rate anaerobic digesters. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 704-741, 2013. DOI: 10.1016/j.rser.2012.11.056
- TEZEL, U.; TANDUKAR, M.; PAVLOSTATHIS, S. G. 6.35 - Anaerobic Biotreatment of Municipal Sewage Sludge. *In: Comprehensive Biotechnology*, 2. ed., Oxford: Pergamon, 2011. p. 447-461. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00329-9>. Accessed: 08 Mar. 2022.
- TIMMERS, P. H. A. Metabolism and occurrence of methanogenic and sulfate-reducing syntrophic acetate oxidizing communities in haloalkaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3039, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03039
- TORRI, S. I.; CORRÊA, R. S.; RENELLA, G. Biosolid application to agricultural land – a contribution to global phosphorus recycle: A review. **Pedosphere**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2017. DOI: 10.1016/S1002-0160(15)60106-0
- TSAPEKOS, P.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. H<sub>2</sub> competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea during biomethanation from a combined experimental-modelling approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 2, p. 107281, 2022. DOI: 10.1016/j.jece.2022.107281
- UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Vinhaça: biofertilizante e energia sustentável**. 2019. Available at: <https://www.unica.com.br/noticias/vinhaca-biofertilizante-e-energia-sustentavel>. Accessed: 12 Feb. 2022.
- VADLANI, P. V.; RAMACHANDRAN, K. B. Evaluation of UASB reactor performance during start-up operation using synthetic mixed-acid waste. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8231-8236, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.03.011
- VAISH, B. *et al.* Explicating the fertilizer potential of anaerobic digestate: Effect on soil nutrient profile and growth of *Solanum melongena* L. **Environmental Technology & Innovation**, In press, n. 102471, 2022. DOI: 10.1016/j.eti.2022.102471

- VENKITESHWARAN, K. *et al.* Correlating methane production to microbiota in anaerobic digesters fed synthetic wastewater. **Water Research**, v. 110, p. 161-169, 2017. DOI: 10.1016/j.watres.2016.12.010
- VILLA-MONTOYA, A. C.; FERRO, M. I. T.; OLIVEIRA, R.A. de. Removal of phenols and methane production with coffee processing wastewater supplemented with phosphorous. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, p. 61-74, 2017. DOI: 10.1007/s13762-016-1124-y
- VLYSSIDES, A. *et al.* Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 12, p. 2899-2904, 2010. DOI: 10.2166/wst.2010.647
- VOLPI, M. P. C. *et al.* Operational and biochemical aspects of co-digestion (co-AD) from sugarcane vinasse, filter cake, and deacetylation liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 8969-8987, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11635-x
- VOLPI, M. P. C.; FUESS, L. T.; MORAES, B. S. Anaerobic co-digestion of residues in 1G2G sugarcane biorefineries for enhanced electricity and biomethane production. **Bioresource Technology**, v. 330, n. 124999, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.124999
- WANG, Y.; QIAN, P. conservative fragments in bacterial 16s rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007401
- WINAND, R. *et al.* Targeting the 16S rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: Comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford Nanopore Technologies) generation sequencing technologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 298, 2020. DOI: 10.3390/ijms21010298
- WOJCIESZAK, M. *et al.* Adaptation of methanogenic inocula to anaerobic digestion of maize silage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1881, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01881
- YAMADA, T. *et al.* *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1331-1340, 2006. DOI: 10.1099/ijms.0.64169-0
- YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y. Cultivation of uncultured *Chloroflexi* subphyla: Significance and ecophysiology of formerly uncultured *Chloroflexi* 'Subphylum I' with natural and

biotechnological relevance. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 205-216, 2009. DOI: 10.1264/jsme2.ME09151S

YANG, B. *et al.* Determining the microbial source of methane production in anaerobic digestion systems through high-throughput sequencing technology. **Frontiers in Energy Research**, v. 9, n. 827969, 2022a. DOI: 10.3389/fenrg.2021.827969

YANG, H. *et al.* Role of microparticles in membrane fouling from acidogenesis to methanogenesis phases in an anaerobic baffled reactor. **Science of the Total Environment**, v. 806, n. 3, p. 150663, 2022b. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150663

YUE, Y. *et al.* The fate of anaerobic syntrophy in anaerobic digestion facing propionate and acetate accumulation. **Waste Management**, v. 124, p. 128-135, 2021. DOI: 10.1016/j.wasman.2021.01.038

ZUPANČIČ, G. D.; GRILC, V. Anaerobic Treatment and Biogas Production from Organic Waste. *In*: KUMAR, S. (ed.). **Management of Organic Waste**. London: IntechOpen, 2012. p. 1-28. Available at: <https://doi.org/10.5772/32756>. Accessed: 25 Jan. 2022.

## APPENDICES

Table A1 – Physical and chemical data of liquid samples influent and effluent to the lab-scale UASB reactor over 91-day operation of anaerobic co-digestion of sugarcane vinasse and dairy secondary effluent (1:1 v/v).

Operation days	Sample	pH	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )												
			Alkalinity			VFA	TSS	VSS	COD <sub>t</sub>	TKN	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P <sub>t</sub>	Phenols	K <sub>t</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
			Partial	Intermediate	Total										
1-7	Inlet	8.12	3900.00	1575.00	5475.00	3411.00	230.00	197.50	5757.61	17.51	1.46	8.80	80.07	286.76	116.00
	Outlet	8.28	4310.00	1375.00	5685.00	3213.00	232.50	187.50	1332.29	45.24	24.81	20.68	18.65	300.65	38.12
8-14	Inlet	8.38	4690.00	1610.00	6300.00	3951.00	397.50	295.00	4917.36	17.51	0.00	13.49	107.12	312.48	53.06
	Outlet	8.52	6400.00	1370.00	7770.00	3933.00	542.50	427.50	1287.48	21.89	4.38	16.66	58.66	313.14	23.95
15-21	Inlet	8.03	3890.00	2080.00	5970.00	4401.00	555.00	475.00	8916.95	20.43	2.92	17.78	187.70	350.72	32.64
	Outlet	8.14	4430.00	1850.00	6280.00	3915.00	250.00	167.50	3012.79	11.68	1.46	12.40	82.33	342.76	26.84
22-28	Inlet	7.30	2770.00	2590.00	5360.00	5643.00	1025.00	907.50	9387.49	37.95	0.00	22.55	136.99	328.91	73.63
	Outlet	8.36	3800.00	1380.00	5180.00	3816.00	347.50	225.00	3987.48	10.22	0.00	6.91	82.89	360.68	39.34
29-35	Inlet	7.30	2800.00	2220.00	5020.00	4986.00	712.50	532.50	8681.68	35.03	3.65	25.43	93.03	345.55	62.36
	Outlet	8.06	4560.00	1710.00	6270.00	2628.00	330.00	247.50	3617.77	17.51	4.38	16.85	72.18	378.38	58.55
36-42	Inlet	7.33	3160.00	1780.00	4940.00	4302.00	847.50	700.00	6295.37	30.65	4.38	23.19	69.37	318.63	54.58
	Outlet	8.13	6000.00	1020.00	7020.00	2925.00	357.50	302.50	2194.95	20.43	2.92	20.42	54.15	345.80	50.47
43-49	Inlet	8.13	3740.00	1850.00	5590.00	3987.00	660.00	510.00	4278.77	30.65	2.92	25.08	66.55	322.58	82.17
	Outlet	8.32	4860.00	1250.00	6110.00	3096.00	420.00	290.00	828.14	21.89	4.38	22.39	37.81	348.28	80.95
50-56	Inlet	7.92	2600.00	2740.00	5340.00	6363.00	632.50	515.00	6172.13	48.16	6.57	26.73	86.27	333.83	161.12
	Outlet	8.48	4530.00	1550.00	6080.00	2979.00	360.00	277.50	1433.12	30.65	7.30	21.96	34.43	345.95	91.16
57-63	Inlet	7.77	2850.00	2410.00	5260.00	4878.00	687.50	572.50	5611.97	33.57	3.65	17.83	98.11	321.82	110.52
	Outlet	8.45	4200.00	1660.00	5860.00	3627.00	422.50	305.00	1220.26	24.81	4.38	17.70	31.05	337.28	83.24
64-70	Inlet	7.34	1990.00	2730.00	4720.00	6057.00	565.00	465.00	6756.13	35.03	2.19	14.66	94.72	334.60	57.63
	Outlet	8.00	4070.00	1800.00	5870.00	5022.00	332.50	262.50	3100.80	21.89	4.38	15.19	40.63	334.11	59.92
71-77	Inlet	7.73	2360.00	2610.00	4970.00	6327.00	722.50	635.00	8941.73	32.11	2.92	15.08	144.88	360.22	67.69
	Outlet	8.36	4350.00	1440.00	5790.00	4158.00	330.00	262.50	2791.67	17.51	1.46	13.85	62.60	357.47	59.15
78-84	Inlet	8.44	2280.00	2780.00	5060.00	6705.00	967.50	790.00	9370.17	37.95	2.19	13.39	141.50	396.59	78.51
	Outlet	8.70	4280.00	1600.00	5880.00	4203.00	300.00	260.00	2829.63	16.05	1.46	10.52	55.84	381.56	71.65
85-91	Inlet	8.20	2580.00	2760.00	5340.00	6615.00	462.50	390.00	8708.53	21.89	1.46	11.66	130.79	400.72	97.87
	Outlet	8.25	3940.00	1760.00	5700.00	3168.00	407.50	352.50	2504.23	14.59	0.00	10.48	65.42	388.16	64.49

VFA = volatile fatty acids; TSS and VSS = total and volatile suspended solids, respectively; COD<sub>t</sub> = total chemical oxygen demand; TKN = total *Kjeldahl* nitrogen; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = ammonia nitrogen; P<sub>t</sub> = total phosphorus; K<sub>t</sub> = total potassium; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = sulfates.

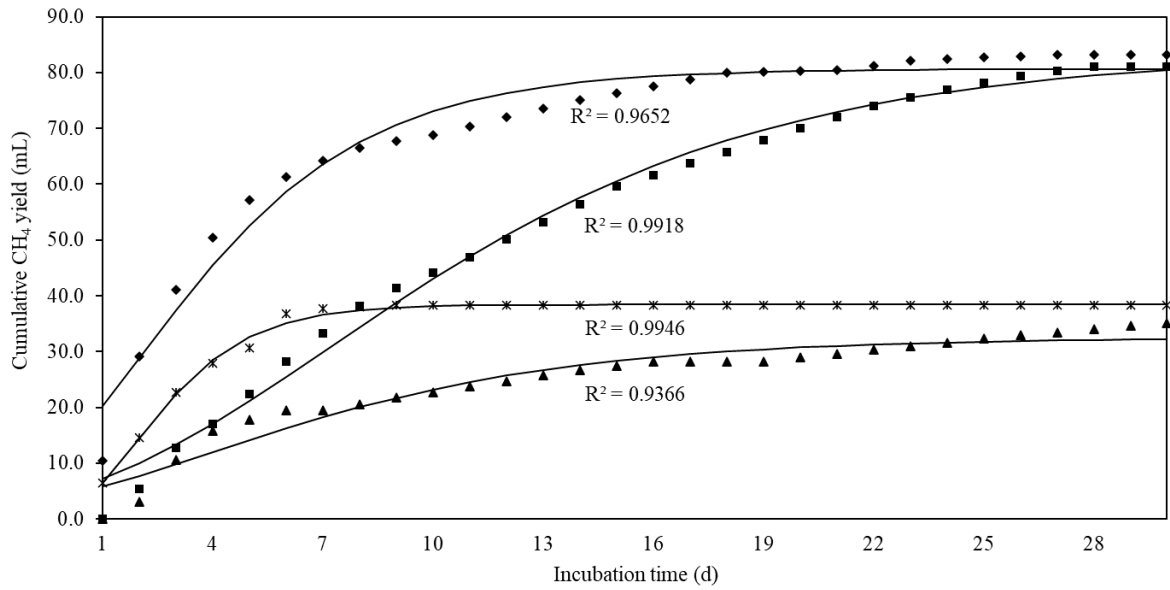
Table A2 – Taxonomic data from identification of bacteria and archaea using high-throughput sequencing within V3/V4 regions of the 16S rRNA gene.

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Total sequences per sp.	Number of sequences			
								Inoculum	Month 1	Month 2	Month 3
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Family XIX. Incertae Sedis	<i>Acetoanaerobium</i>	<i>Acetoanaerobium noterae</i>	13	0	3	5	5
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Acetobacterium</i>	<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	44	0	25	19	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Acetobacterium</i>	<i>Acetobacterium wieringae</i>	87	0	56	21	10
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax caeni</i>	5	5	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax delafeldii</i>	11	11	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax temperans</i>	50	50	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Afipia</i>	<i>Afipia genosp. 14</i>	7	7	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14	14	0	0	0
Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	5	5	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Altererythrobacter</i>	<i>Altererythrobacter marensis</i>	8	6	0	0	2
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Aminivibrio</i>	<i>Aminivibrio pyruvaticophilus</i>	29	0	3	16	10
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Anaerococcus</i>	<i>Anaerococcus burkiensis</i>	7	7	0	0	0
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	unidentified	<i>Anaerolineaceae bacterium</i>	1416	378	264	477	297
Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	<i>Arcobacter deFluvi</i>	7	0	0	7	0
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	unidentified	unidentified	<i>Bacteroidales bacterium</i>	589	442	57	67	23
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	7	7	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	6	5	1	0	0
Bacteria	Caldiserica	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Caldiserica bacterium</i>	437	211	69	106	51
Bacteria	Caldiserica	Caldisericia	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Caldisericia bacterium</i>	374	207	58	69	40
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales Family XVI. Incertae Sedis	<i>Carboxydocella</i>	<i>Carboxydocella thermotrophica</i>	355	175	47	92	41
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	6	0	0	3	3
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter sp.</i>	5	0	0	1	4
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Cloacibacterium</i>	<i>Cloacibacterium normanense</i>	6	6	0	0	0
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Cloacibacterium</i>	<i>Cloacibacterium rupense</i>	24	23	0	0	1
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Clostridia bacterium</i>	468	231	84	112	41
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	unidentified	<i>Clostridiaceae bacterium</i>	538	0	44	316	178
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	8	0	5	3	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium disporicum</i>	75	34	22	9	10
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	6	6	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium ruminantium</i>	98	55	29	7	7
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas denitrificans</i>	5	5	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	12	12	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio alcoholivorans</i>	8	0	0	0	8
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	31	3	5	2	21
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio intestinalis</i>	14	0	9	4	1
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	<i>Dialister invisus</i>	5	5	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	unidentified	<i>Ectothiorhodospiraceae bacterium</i>	719	348	152	166	53
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium aggregans</i>	6	0	3	3	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium moniliforme</i>	9	0	6	0	3
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	27	27	0	0	0
Bacteria	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium ulcerans</i>	6	0	0	1	5
Bacteria	Ignavibacteriae	Ignavibacteriia	unidentified	unidentified	unidentified	<i>Ignavibacteria bacterium</i>	1966	1188	338	338	102
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Intestinibacter</i>	<i>Intestinibacter bartlettii</i>	16	16	0	0	0
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	<i>Longilinea</i>	<i>Longilinea arvoryzae</i>	54	0	18	20	16
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides</i>	<i>Macellibacteroides fermentans</i>	206	3	20	93	90

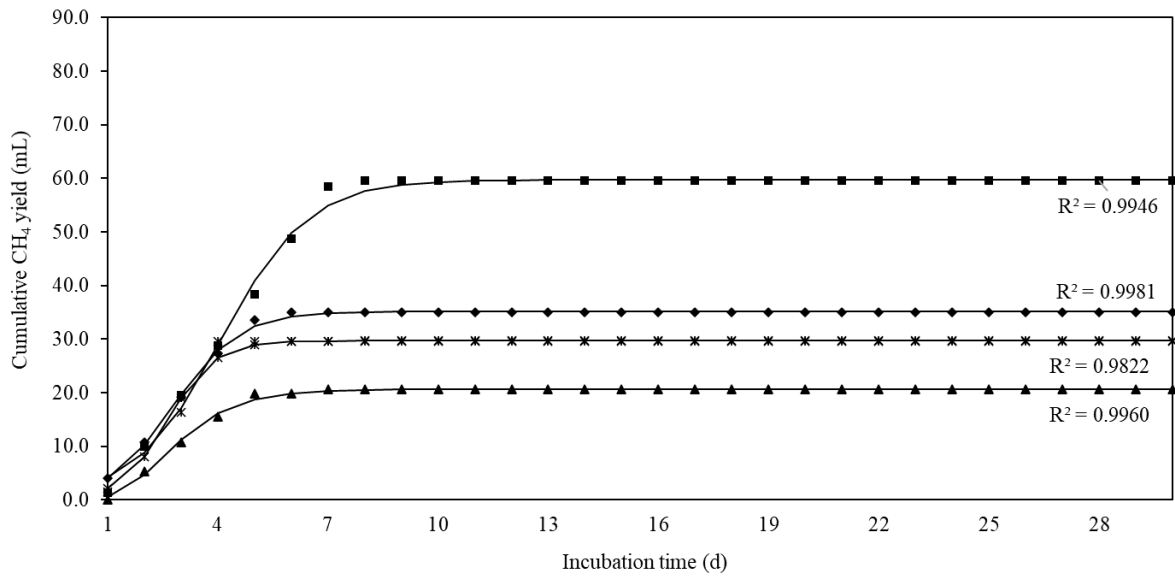


Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinilabiliaceae	unidentified	<i>Marinilabiliaceae bacterium</i>	238	104	38	56	40
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobacterium beijingense</i>	27	0	8	9	10
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>	19	4	3	5	7
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobacterium kanagiense</i>	105	0	38	39	28
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	105	0	0	36	69
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	<i>Methanocorpusculum sinense</i>	11	0	0	4	7
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosetaeaceae	<i>Methanoseta</i>	<i>Methanoseta concilii</i>	466	32	160	196	78
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	27	27	0	0	0
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Paludibacteraceae	unidentified	<i>Paludibacteraceae bacterium</i>	510	437	22	30	21
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides</i>	<i>Parabacteroides chartae</i>	1050	18	119	423	490
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus aminophilus</i>	32	32	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	8	8	0	0	0
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Petrimonas</i>	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	392	1	46	219	126
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>	<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	30	0	11	8	11
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Phenylobacterium</i>	<i>Phenylobacterium koreense</i>	15	13	0	2	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	<i>Pleomorphomonas</i>	<i>Pleomorphomonas koreensis</i>	20	20	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	<i>Pleomorphomonas</i>	<i>Pleomorphomonas oryzae</i>	12	10	1	1	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	<i>Pseudochrobactrum</i>	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	8	8	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	5	5	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	13	0	0	13	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Sarcina</i>	<i>Sarcina ventriculi</i>	18	13	5	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Shinella</i>	<i>Shinella zoogloeoides</i>	33	30	0	2	1
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Smithella</i>	<i>Smithella propionica</i>	20	0	0	6	14
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	48	48	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus minor</i>	17	17	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	unidentified	<i>Syntrophaceae bacterium</i>	107	107	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Terrisporobacter</i>	<i>Terrisporobacter glycolicus</i>	58	5	30	12	11
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Trichococcus</i>	<i>Trichococcus pasteurii</i>	436	0	101	143	192
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Turicibacter</i>	<i>Turicibacter sanguinis</i>	30	19	8	3	0
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Urburuella</i>	<i>Urburuella suis</i>	46	44	1	1	0
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	unidentified	<i>Veillonellaceae bacterium</i>	142	142	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	7	7	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Yokenella</i>	<i>Yokenella regensburgei</i>	5	5	0	0	0
<b>Total sequences per sample</b>							<b>11849</b>	<b>4648</b>	<b>1909</b>	<b>3165</b>	<b>2127</b>

Figure A1 – Cumulative daily CH<sub>4</sub> yield data over 30 days of SMA testing for the analyzed biomass samples employing (a) acetate and (b) formate as substrates.



(a) — Trendline    ■ Inoculum    ▲ Month 1    × Month 2    ◆ Month 3



(b) — Trendline    ■ Inoculum    ▲ Month 1    × Month 2    ◆ Month 3

# PRODUTO CIENTÍFICO GERADO: Artigo original publicado em periódico internacional

Periódico científico: *Bioresource Technology* / ISSN: 0960-8524

Fator de Impacto: 11,889 (JCR 2021)

DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127654

Bioresource Technology 361 (2022) 127654



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)



## Microbial dynamics and methanogenic potential of co-digestion of sugarcane vinasse and dairy secondary effluent in an upflow anaerobic sludge blanket reactor

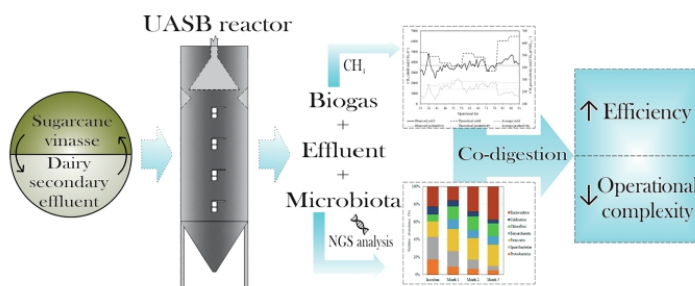
Juliano Curi de Siqueira<sup>\*</sup>, Paula Assemany, Luciene Alves Batista Siniscalchi

Department of Environmental Engineering, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras, UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brazil

### HIGHLIGHTS

- The proposed co-digestion reached maximum  $\text{CH}_4$  yield of 308  $\text{mLCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{rem}}^{-1}$ .
- Next-generation sequencing showed a predominance of hydrogenotrophic methanogens.
- The evaluated treatment system provided organic matter removals of up to 81%.
- Co-digestion can be a straightforward and efficient strategy for vinasse biodigestion.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Agro-industrial wastewater  
High-rate anaerobic reactor  
Biogas  
Anaerobic microorganisms  
Next-generation sequencing

### ABSTRACT

Co-digestion is a strategy that may prevent microbial inhibition during the anaerobic treatment of sugarcane vinasse, a substrate with highly biodegradable organic load, acidity, and toxic compound levels (e.g., sulfates, phenols). In this context, this study evaluated the microbial dynamics and methanogenic potential throughout the co-digestion of sugarcane vinasse and secondary effluent from the dairy industry in a mesophilic lab-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. Periodic next-generation sequencing (NGS) analyses revealed an increase in the relative abundance of the phylum Euryarchaeota (+8.6 % after inoculation), predominating hydrogenotrophic methanogens (*Methanobacterium* and *Methanobrevibacter*) at the end of the operation. Moreover, the average methane yield was 221  $\text{mLCH}_4 \text{ gCOD}_{\text{rem}}^{-1}$ , with 69 % of organic matter removal. These results evidenced a progressive acclimation of the anaerobic microbial community to the substrate and a stable operation. Therefore, the proposed experiment demonstrates energy advantages for the agro-industrial sector by implementing a similar but full-scale treatment plant.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail addresses: [julianocuri2015@gmail.com](mailto:julianocuri2015@gmail.com) (J.C. Siqueira), [paula.assemany@ufla.br](mailto:paula.assemany@ufla.br) (P. Assemany), [luciene.batista@ufla.br](mailto:luciene.batista@ufla.br) (L.A.B. Siniscalchi).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127654>

Received 30 May 2022; Received in revised form 14 July 2022; Accepted 15 July 2022

Available online 20 July 2022

0960-8524/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.