

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

AVALIAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO EM CONDIÇÃO
MESOFÍLICA: EFEITO DE CO-SUBSTRATO, TDH, E CONCENTRAÇÃO

Cristiane Marques dos Reis

São Carlos

2014

AVALIAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO EM CONDIÇÃO
MESOFÍLICA: EFEITO DE CO-SUBSTRATO, TDH, E CONCENTRAÇÃO

Cristiane Marques dos Reis

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R375av Reis, Cristiane Marques dos.
Avaliação da vinhaça de cana-de-açúcar para produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado em condição mesofílica : efeito de co-substrato, TDH, e concentração / Cristiane Marques dos Reis. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
141 f.

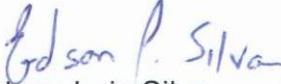
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Hidrogênio (Engenharia química). 2. Metano. 3. Vinhaça. 4. Etanol. 5. Metanol. I. Título.

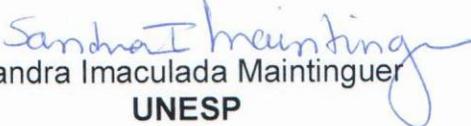
CDD: 661.08 (20^a)

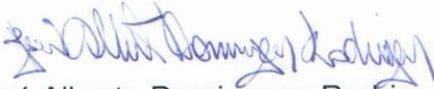
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE CRISTIANE MARQUES DOS REIS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 25 DE NOVEMBRO DE 2014.

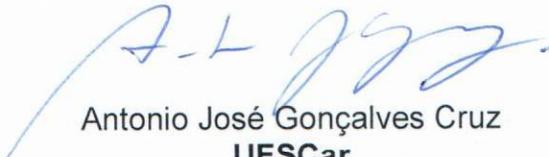
BANCA EXAMINADORA:


Edson Luiz Silva
(Orientador), UFSCar


Eduardo Cleto Pires
USP


Sandra Imaculada Maintinger
UNESP


José Alberto Domingues Rodrigues
EEM-IMT


Antonio José Gonçalves Cruz
UFSCar

Dedico aos meus pais Salustiana e Edvaldo por todo apoio e dedicação durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Independentemente de qualquer credo religioso e por mais que seja difícil essa conciliação racional entre ciência e espiritualidade, gostaria de externar o meu agradecimento ao Ser acima de nós e para o qual recorri nos momentos-chave de dificuldade durante esse Doutorado.

À minha família, em especial aos meus pais Salustiana e Edvaldo. Meus irmãos, Renato e Georgi e querido sobrinho Ronald.

Ao professor Dr. Edson Luiz Silva pela oportunidade de dar sequência a um projeto iniciado durante o mestrado e que foi finalizado durante essa pesquisa de Doutorado. Apesar de todas as dificuldades ao longo desses anos, obrigada pela orientação, paciência e ensinamentos. Muito obrigada!

À professora Dr. Maria Bernadete Varesche pelas contribuições durante a etapa de biologia molecular deste trabalho.

À Dra. Isabel Sakamoto pelo auxílio durante a fase de realização dos experimentos de biologia molecular bem como na discussão dos resultados obtidos.

Ao professor Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz pelas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao professor Dr. José Alberto Domingues Rodrigues pelas contribuições durante o exame de qualificação.

Às amigas do trabalho e da vida: Mariana Carosia, Samantha Santos, Paula Rosa, Janaína Ferreira, Livia Ottaviano, Morgana Bosio, Carolina Zampol e Aruana Barros. Muito obrigada, meninas. Cada uma de vocês contribuiu de forma essencial no rumo que este trabalho tomou. O dia a dia no laboratório não era fácil e só com essa turma boa para poder conciliar todos esses momentos difíceis.

Ao meu querido Rafael Cava Mori que tem sido base de apoio constante. Obrigado pelo apoio, carinho e, às vezes, palavra mais dura necessária.

Aos amigos de hoje e sempre: Rodrigo Belfort, Gracielle Moura, Fernanda Moraes, Karla Licona e Djolse Dantas.

Aos queridos amigos Homero Sena e Eduardo Mariano por me trazerem sempre a alegria inesperada. Fui menos presente do que gostaria, mas obrigada por tudo.

À Ana, minha psicóloga, que por tanto tempo conviveu com os dilemas e dificuldades desse caminho de doutorado e da vida. E quem me fez enxergar tudo sob um novo ângulo.

À Beatriz Coletti, minha *roommate*, obrigada pela boa convivência sempre junto com momentos de alegria ou até mesmo, terapia.

Aos técnicos da oficina mecânica Oscar e Adilson pela ajuda diária sem os quais muito da manutenção do experimento que foi realizado seria mais difícil.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Química que estavam juntos em apoio mútuo durante o mestrado e doutorado.

Ao LPB- Laboratório de Processos Biológicos- entre alunos e funcionários que tão bem me acolheram durante a realização de uma etapa do experimento no departamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química -PPGEQ-UFSCar pela realização e disponibilidade da estrutura para a realização do doutorado.

Aos funcionários da secretária da PPGEQ-UFSCar pela presteza em sempre ajudar.

Aos funcionários da limpeza do DEQ-UFSCar pela atenção em sempre nos ajudar quando necessitamos.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos de doutorado.

À FAPESP pelos recursos financeiros ao projeto de pesquisa no qual esse doutorado se insere.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 2	18
OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 3	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Hidrogênio como fonte de energia	19
3.2 Digestão Anaeróbia e produção acidogênica de H ₂	20
3.3 Enzimas envolvidas na produção biológica de hidrogênio	23
3.4 Rotas metabólicas	23
3.5 Bioreatores em produção de hidrogênio	28
3.6 Microrganismos em produção de hidrogênio	32
3.7 Fatores operacionais	36
3.7.1 pH	37
3.7.2 Temperatura	38
3.7.3 Inóculo	40
3.7.4 Tempo de detenção hidráulica	41
3.8 Substratos	42
3.8.1 Carboidratos puros	42
3.8.2 Compostos lignocelulósicos	43
3.8.3 Compostos domésticos e industriais	43
3.9 Vinhaça	44
3.9.1 Composição da vinhaça	45
3.9.2 Biodigestão anaeróbia de vinhaça	46
3.9.3 Produção biológica de hidrogênio a partir de vinhaça	48
3.10 Uso de co-substratos	55

3.11. Considerações finais.....	57
CAPÍTULO 4	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 Reator anaeróbio de leito fluidizado	59
4.2 Inóculo.....	60
4.3 Água residuária	60
4.5 Procedimento de partida.....	61
4.5 Métodos analíticos	63
4.5.1 Determinação de carboidratos redutores totais.....	64
4.5.2 Análises físico-químicas.....	64
4.5.3 Determinação de ácidos voláteis e álcoois	64
4.5.4 Análise da composição dos gases	64
4.5.5 Quantificação da produção de hidrogênio.....	65
4.6 Biologia molecular.....	65
4.6.1 Extração do DNA. PCR e DGGE	65
4.6.2 Clonagem e Sequenciamento do gene RNAr 16S	66
CAPÍTULO 5	67
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 Carboidratos redutores totais	67
5.2 Demanda química de oxigênio	71
5.3 Produção de biogás	74
5.3.1 Conteúdo de hidrogênio	74
5.3.2 Produção volumétrica de H ₂ e rendimento de H ₂	80
5.4 Metabólitos intermediários.....	89
5.5 Biologia molecular.....	98
5.5 Análise da diversidade microbiana	98
5.5.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	98
5.5.2 Caracterização microbiana	102
5.5.2.1 Domínio Bacteria	102
5.5.2.2 Domínio Archaea	110
CAPÍTULO 6	114
CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Esquema básico processo de digestão anaeróbia: hidrólise, acidogênese, metanogênese.	21
Figura 3. 2 Rotas metabólicas para a produção de hidrogênio. Retirado de HALLENBECK et al. (2012).	25
Figura 3. 3 Esquema básico do processo de produção de etanol e açúcar a partir de cana-de-açúcar.	45
Figura 4. 1 Fluxograma do procedimento experimental.....	58
Figura 4. 2 Esquema básico do reator anaeróbio de leito fluidizado.....	59
Figura 5. 1 Conversão de carboidratos redutores totais no R5 (5 g.L ⁻¹).....	68
Figura 5. 2 Conversão de carboidratos redutores totais no R10 (10 g.L ⁻¹).....	68
Figura 5. 3 Conversão de carboidratos redutores totais no R15 (15 g.L ⁻¹).....	71
Figura 5. 4 Demanda química de oxigênio no reator R5 (5 g.L ⁻¹).....	72
Figura 5. 5 Demanda química de oxigênio no reator R10 (10 g.L ⁻¹).....	72
Figura 5. 6 Demanda química de oxigênio no R15 (15 g.L ⁻¹).....	73
Figura 5. 7 Conteúdo de biogás nas fases operacionais no reator R5 (5 gDQO.L ⁻¹).....	74
Figura 5. 8 Conteúdo de biogás nas fases operacionais no reator R10 (10 gDQO.L ⁻¹).....	75
Figura 5. 9 Conteúdo de biogás no reator R15 (15 g.DQO.L ⁻¹) sob TDH de 8 h.....	79
Figura 5. 10 Produção volumétrica de H ₂ e rendimento de H ₂ no reator R5 (5 gDQO.L ⁻¹)....	80
Figura 5. 11 Produção volumétrica de H ₂ e rendimento de H ₂ no reator R10 (10 gDQO.L ⁻¹)	81
Figura 5. 12 Produção volumétrica de H ₂ e rendimento de H ₂ no reator R15 (15 gDQO.L ⁻¹) sob.....	83
Figura 5. 13 Metabólitos produzidos ao longo das etapas operacionais em valores percentuais molares no reator R5 (5 gDQO.L ⁻¹).....	89
Figura 5. 14 Metabólitos produzidos ao longo das etapas operacionais em valores percentuais molares no reator R10 (10 gDQO.L ⁻¹).....	92
Figura 5. 15 Metabólitos produzidos ao longo das etapas operacionais em valores percentuais molares no reator R15 (15 gDQO.L ⁻¹).....	94
Figura 5. 16 Coeficiente de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas ao reator R5 (5 gDQO.L ⁻¹) para o domínio Bacteria.....	99
Figura 5. 17 Coeficiente de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas ao reator R10 (10 gDQO.L-1) para o domínio Bacteria.....	100

Figura 5. 18 Coeficientes de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas no reator R5 (5 gDQO.L ⁻¹) para o domínio Archaea.....	101
Figura 5. 19 Coeficientes de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas no reator R10 (10 gDQO.L ⁻¹) para o domínio Archaea. OBS: R10 III – essa amostra não foi possível amplificar, provavelmente, as populações de arqueia presentes estavam abaixo do limite de detecção da técnica.	102
Figura 5. 20 Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com primers para Domínio Bacteria. Como outgroup foi empregada a Methanosarcina acetivorans	109
Figura 5. 21 Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com primers para Domínio Archaea. Como outgroup foi empregada a Prevotella sp. não-cultivada	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 4. 1 Principais características físico-químicas da vinhaça.....	60
Tabela 4. 2 Composição do meio nutritivo segundo DEL NERY (1987)	61
Tabela 4. 3 Etapas experimentais para os reatores R5(5gDQO.L ⁻¹) e R10(10g.DQO.L ⁻¹)	63
Tabela 4. 4 Etapas experimentais para o reator R15 (15gDQO.L ⁻¹)	63
Tabela 5. 1 Comparação da produção volumétrica de H ₂ e do rendimento de hidrogênio nos reatores R5 (5 g.DQO.L ⁻¹), R10 (5 g.DQO.L ⁻¹) e R15 (5 g.DQO.L ⁻¹).....	84
Tabela 5. 2 Trabalhos em produção de H ₂ a partir de resíduos de destilaria/açúcar nas condições ótimas para a geração de biogás.....	86
Tabela 5. 3. Concentração dos principais metabólitos produzidos no reator R5 (5 g.L ⁻¹).....	90
Tabela 5. 4 Concentração dos principais metabólitos produzidos no reator R10 (10g.L ⁻¹).....	93
Tabela 5.5 Comparação entre os produtos de fermentação dos microrganismos identificados no reator R5 (5gDQO.L ⁻¹).....	106
Tabela 5. 6 Resultado do sequenciamento genético do gene RNAr 16 s para o domínio Bacteria	108
Tabela 5. 7 Resultado do sequenciamento genético do gene RNAr 16 s para o domínio Archaea	112

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CSTR	Reator Contínuo de tanque agitado
DQO	Demanda Química de oxigênio
EGSB	Reator de leito granular expandido
EtOH	Etanol
HAc	Ácido Acético
HPr	Ácido Propiônico
HiVal	Ácido Isso-Valérico
HiBu	Ácido iso-butírico
HVal	Ácido Valérico
HBu	Ácido Butírico
HLa	Ácido Lático
HMal	Ácido málico
HSuc	Ácido Succínico
HY	Rendimento de Hidrogênio
LCA	Laboratório de Controle Ambiental
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MeOH	Metanol
RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado
PVH	Produção volumétrica de Hidrogênio
TCO	Taxa de Carregamento Orgânico
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo
V_{mf}	Velocidade mínima de fluidização
ρ	Densidade do fluido
ρ_s	Densidade da partícula

RESUMO

O presente estudo avaliou a produção de hidrogênio e metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leito fluidizado. Dois reatores de leito fluidizado preenchidos com argila expandida foram operados sob duas diferentes concentrações de substratos: R5 (5 gDQO.L⁻¹) e R10 (10 gDQO.L⁻¹). Durante a primeira etapa, a glicose foi utilizada como fonte de carbono principal. Em seguida, a vinhaça foi adicionada passando de 0% a 100% da fonte orgânica sob o tempo de detenção hidráulica de 6 h. Numa segunda etapa com 100 % de vinhaça, foi feita a redução do TDH para 4, 2 e 1 h. Um terceiro reator foi empregado com uma concentração maior R15 (15 gDQO.L⁻¹) na qual foi variado o substrato (100% glicose, 50% glicose/50 % vinhaça, 100 % vinhaça) sob o tempo de detenção hidráulica de 8 h. Todos os reatores foram operados em temperatura ambiente e foi utilizado lodo proveniente do tratamento de resíduos da suinocultura. Não foi observada produção de metano no reator R15, apenas H₂ e CO₂. A produção volumétrica e rendimento de hidrogênio atingiu um máximo de 0,01 L.h⁻¹.L⁻¹ e 0,10 mmolH₂.g⁻¹DQO_{adicionada} na fase de alimentação com vinhaça. Nos reatores R5 e R10 o biogás foi formado por H₂ e CO₂ quando ainda havia glicose como substrato. Metano foi formado quando a vinhaça se tornou o substrato principal. A melhor condição de operação se deu sob o TDH de 1 h, vinhaça 100 % a uma concentração de 5 gDQO.L⁻¹ quando foi obtida uma produção volumétrica de hidrogênio de 0,57 L.h⁻¹.L⁻¹. No que se refere ao rendimento, a melhor condição se deu sob o TDH de 6 h quando o afluente era constituído por vinhaça e glicose (3:1) e um rendimento de 3,07 mmolH₂.g⁻¹DQO_{adicionada}. A produção de metano em condições ácidas mostrou que as metanogênicas consumidoras de hidrogênio se adaptaram ao pH levemente ácido de 4,5. Os principais metabólitos produzidos foram etanol, ácido butírico, ácido propiônico e metanol. A caracterização microbiana revelou a presença de *Prevotella* e *Megasphaera* pertencentes ao domínio Bacteria e *Methanobacterium* e *Methanosphaera* pertencentes ao domínio Archaea.

Palavras-chave: Tempo de detenção hidráulica, etanol, metanol, efluente de destilaria, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Methanobacterium*, *Methanosphaera*.

ABSTRACT

This study evaluated the production of hydrogen and methane from sugarcane vinasse in anaerobic fluidized bed reactor. Two fluidized bed reactors filled with expanded clay were operated under two different concentrations: R5 (5 gCOD.L⁻¹) and R10 (10 g.CODL⁻¹). During the first stage, glucose was used as the primary carbon source. Along the first step vinasse was added from 0% to 100% of the organic source under HRT of 6 h. In a second step with 100% of sugarcane vinasse, HRT was reduced to 4, 2 and 1 h. In another reactor R15 (15 gCOD.L⁻¹) it was varied the substrate (100% glucose; 50 % glucose/ 50 % vinasse; 100 % vinasse) under HRT of 8 h. All reactors were operated in room temperature and a sludge from the treatment of swine wastewater was used. It was not observed methane production in R15. Hydrogen production rate and hydrogen yield reached, respectively: 0,01 L.h⁻¹.L⁻¹ e 0,10 mmolH₂.g⁻¹COD_{added}. In reactors R5 and R10, biogas was formed by H₂ and CO₂ when glucose was present in the feed. Methane was formed when vinasse became the main substrate. The best operating condition occurred under HRT of 1 h, vinasse 100% at a concentration of 5 gCOD. L⁻¹ with a hydrogen production rate of 0.57 L.h⁻¹L⁻¹. As regards the yield, the best condition was under HRT of 6 h when the affluent comprised vinasse and glucose (3:1) reaching an yield of 3.07 mmolH₂.g⁻¹COD_{added}. Methane production in acidic conditions showed that the methanogens have adapted to a slightly acidic pH of 4.5. The principal metabolites were ethanol, butyric acid, propionic acid and methanol. Microbial characterization revealed the presence of *Prevotella* and *Megasphaera* belonging to the domain Bacteria and *Methanobacterium* and *Methanosphaera* belonging to the Archaea domain.

Keywords: Hydraulic retention time, ethanol, methanol, distillery effluent, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Methanobacterium*, *Methanosphaera*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A chamada era moderna, após o período da Revolução Industrial em meados do século XVIII foi fortemente apoiada pela disponibilidade do uso da energia, principalmente do carvão. A aplicação de petróleo e gás natural como fonte energética veio a consolidar o uso de combustíveis fósseis como propulsores do desenvolvimento tecnológico advindo desde então. De certa forma, todos os avanços dos últimos dois séculos sejam de natureza comercial, política ou social, estão ligados às transformações e ao poder derivado dos combustíveis fósseis (RIFKIN, 2003).

Porém, devido ao uso desenfreado dessa fonte energética e ao crescimento populacional que traz consigo uma maior demanda de energia levou à diminuição das reservas energéticas de petróleo. Especialistas afirmam que dentro de 30 anos, essas reservas tendem a se esgotar, assim, fontes alternativas de energia têm sido desenvolvidas a fim de suprir as necessidades por novas fontes (RIFKIN, 2003). A energia solar, a hidráulica, a eólica, a geotérmica, a bioenergia (a partir da biomassa) são algumas das formas energéticas limpas e renováveis já empregadas. A energia a partir do hidrogênio é umas das novas fronteiras nesse ramo de pesquisa.

O hidrogênio é um elemento químico largamente empregado na indústria, tal como na hidrogenação, produzindo compostos de baixo peso molecular ou na saturação de compostos (óleos e gorduras), como combustível na indústria aeroespacial devido seu alto poder calorífico e ainda na remoção de sulfato em indústrias petrolíferas. A principal forma de produção de hidrogênio é a partir da reforma a vapor do gás natural. O gás natural reage com vapor na presença de um catalisador, gerando hidrogênio e dióxido de carbono como produtos. Porém, diante das questões já expostas no que se refere à diminuição das reservas de combustíveis fósseis, outros métodos têm sido empregados. A eletrólise da água é um deles, mas o principal empecilho é o alto gasto de energia elétrica o que também torna o processo atualmente inviável. Outra forma é a produção biológica de hidrogênio a partir da ação de bactérias produtoras de hidrogênio. Diante do advento da produção de energia a partir da biomassa, viu-se que é possível direcionar o processo para a produção de hidrogênio, tendo em vista que é uma etapa intermediária da digestão anaeróbia de matéria orgânica para a produção de metano. Esse processo apresenta a vantagem de utilizar águas residuárias como substrato orgânico.

Diversos substratos podem ser empregados para a produção biológica de hidrogênio, desde substratos simples como glicose e sacarose aos substratos complexos (resíduos industriais). Alguns resíduos industriais tem sido objeto de estudo para a produção biológica de hidrogênio: óleos vegetais (EROGLU et al., 2006; KOUTROLI et al., 2006; CHONG et al., 2009), resíduos da indústria de laticínios (YANG et al., 2006; MOHAN et al., 2007; MOHAN et al., 2008 a; XING et al., 2010), resíduos da indústria cervejeira (SHI et al., 2010), glicerina (ITO et al., 2005), resíduos da indústria sucroalcooleira (REN et al., 2006; MOHAN et al., 2008 b; VATSALA et al., 2008; BUITRON e CARVAJAL (2010); SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011). Este último resíduo, em especial, apresenta-se como um substrato promissor para processos fermentativos para geração de H₂.

No Brasil, a indústria da produção de álcool e açúcar é um importante setor da economia brasileira. Ela se caracteriza por ser setor de onde se aproveita quase todos os subprodutos gerados, seja bagaço, melaço, vinhaça, além dos produtos principais, álcool e açúcar (GOLDEMBERG et al., 2008). O país é líder mundial em produção e produtividade de açúcar a partir de cana-de-açúcar bem como de álcool. Em 2005, representava cerca de 2,35% do PIB brasileiro, equivalendo, portanto, a cerca de R\$ 40 bilhões.

A CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) em seu relatório sobre a safra 2012/2013 estima que a área destinada à produção de cana-de-açúcar seja de 8.893,0 mil hectares, sendo o estado de São Paulo responsável por pela maior produção com 51 % da área plantada. A estimativa é que a produção para a safra de 2013/2014 atinja 653,81 milhões de toneladas. Em torno de 50,73% do total é destinado a produção de açúcar e os 49,27% restantes são direcionados a produção de etanol e para o setor de bebidas. Somente na safra de 2012/2013 a produção de etanol fechou em 23,64 bilhões de litros. A produção de bioenergia a partir de resíduos da produção sucroalcooleira vem sendo feita a partir de bagaço de cana a qual é utilizada para alimentar as próprias caldeiras o que leva as indústrias do setor sucroalcooleiro a ser quase autossuficientes em fonte de energia (CORREA NETO et al., 2002). O uso de vinhaça tem sido normalmente direcionado para a irrigação de solos (fertilizante) e geração de metano.

Devido ao seu alto teor mineral, a vinhaça costuma ser utilizada como um fertilizante das produções de cana-de-açúcar. Entretanto, devido ao aumento da produção de etanol no país, a produção de vinhaça também sofreu aumento e, agregado a esse fator, limitações quanto ao despejo deste resíduo surgiram. Algumas medidas governamentais já foram feitas a fim de limitar o lançamento deste resíduo no solo. No estado de São Paulo, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) na Norma Técnica 4.231, de

março 2005 restringe o uso da vinhaça em fertirrigação com base no teor de potássio. Assim, novos direcionamentos devem ser tomados a fim de utilizar a vinhaça produzida como a biodigestão.

A biodigestão da vinhaça é um processo que permite tanto o tratamento deste resíduo antes de ser despejado, pois reduz a carga orgânica como também permite a geração de metano o qual pode ser utilizado para a produção de energia na própria planta industrial. Poucos trabalhos, porém, focam na recuperação de energia na forma de hidrogênio.

Em geral, a produção de metano e hidrogênio vem sendo realizada em processos em duplo-estágio, ou seja, com separação das fases acidogênicas e metanogênicas. A produção conjunta desses gases é vantajosa do ponto de vista de aproveitamento deste gás como combustível em motores a combustão de metano. A adição de hidrogênio ao gás metano utilizado como combustível em motores a combustão é mais eficiente que metano unicamente. Além disso, essa mistura metano e hidrogênio reduz a emissão de gases poluentes como CO, CO₂ e hidrocarbonetos não queimados (HC) (BAUER e FOREST, 2001).

Apesar da boa carga orgânica apresentada pela vinhaça, a presença de possíveis compostos inibitórios em resíduos provenientes de destilaria pode ser uma barreira ao processo de digestão anaeróbia. Assim, é aconselhável um período de adaptação a fim de propiciar um ambiente favorável ao consumo dos substratos complexos pelos microrganismos. Quando adicionado em pequenas quantidades, o meio microbiano pode se adaptar ao resíduo complexo ou aos compostos inibitórios (CAMARILLO e RÍNCON, 2012). Logo, o uso de um co-substrato simples pode melhorar a degradação microbiana das substâncias refratárias presentes em resíduos complexos como a vinhaça. Alguns autores (MOHAN et al., 2008 b; BUITRON e CARVAJAL, 2010; NASR et al., 2011) que empregaram resíduos de destilaria também iniciaram a operação de reatores acidogênicos através da adaptação ou condicionamento do reator à produção de hidrogênio com substratos simples como a glicose e a sacarose. Porém, ainda não foi feito um estudo empregando diferentes razões vinhaça/glicose para a produção de hidrogênio.

Boa parte dos estudos em produção de hidrogênio ainda tem focado no uso de substratos simples como glicose e sacarose, o que pensando em uma implantação futura desta técnica, pode inviabilizá-la. Assim, há a necessidade de buscar novas formas de substratos que já estejam prontamente disponíveis, como é o caso de resíduos industriais. Além disso, o conhecimento já adquirido nesta área pode não ser o mesmo quando em uso de substâncias complexas como a vinhaça. Levando em consideração a disponibilidade da vinhaça de cana-

de-açúcar e a lacuna existente na utilização de vinhaça para a produção de hidrogênio foi conduzido um estudo a fim de avaliar a produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leito fluidizado utilizando glicose como substrato de partida. Durante a primeira etapa, foi realizada a adaptação do reator com glicose e vinhaça foi adicionada gradativamente (0, 25, 75, 100 %). Numa etapa posterior, o reator foi alimentado unicamente com vinhaça (100 %) e foram realizadas variações no TDH (4, 2 e 1 h) a fim de verificar a melhor condição de operação do RALF para a produção de hidrogênio.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o comportamento da produção de hidrogênio a partir de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado sob diferentes concentrações de entrada.

2.2 Objetivos específicos

Durante a execução dos experimentos algumas condições serão verificadas, assim, como objetivos específicos tem-se:

- Avaliar o comportamento da produção de hidrogênio a partir do uso de co-substratos: glicose e vinhaça;
- Avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica na produção de biogás;
- Verificar a produção de ácidos orgânicos voláteis e álcoois para cada reator em função da adição de vinhaça ao sistema.
- Verificar a composição microbiana envolvida nos reatores diante da variação da composição glicose/vinhaça e diante da variação do tempo de detenção hidráulica

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hidrogênio como fonte de energia

Como já comentado, durante a etapa acidogênica da digestão anaeróbia há a formação de ácidos orgânicos e de hidrogênio. Sendo esse um dos enfoques deste trabalho. Assim, leva-se à pergunta: quais as vantagens pertinentes a esse material, hidrogênio, como fonte energética?

O hidrogênio é considerado o elemento químico mais abundante na Terra. Todavia, ele não está prontamente disponível na sua forma elementar como ocorre com os combustíveis fósseis. Ele tem atraído atenção como fonte energética devido ao seu alto poder calorífico (122 kJ.g^{-1}) e ao fato de produzir somente água quando em combustão (WICHER et al., 2013). Esse potencial calorífico do hidrogênio é maior que o apresentado pelo gás natural (57 kJ.g^{-1}) ou pela gasolina (43 kJ.g^{-1}).

Atualmente, o hidrogênio é produzido a partir de fontes fósseis (processo de reforma do gás natural) e a partir de eletrólise da água. Entretanto, são técnicas que ou não são ambientalmente favoráveis ou requerem um alto consumo de energia. A rota de produção biológica de hidrogênio vem como alternativa a essas questões. Existem três rotas comumente estudadas: a biofotólise, a fotofermentação e a fermentação (“*dark fermentation*”).

A biofotólise tem como vantagem o uso de água como fonte de hidrogênio. Na biofotólise da água pela ação de algas verdes ou cianobactérias há a quebra da molécula de água formando o íon hidrogênio. Pode ser pela via direta ou pela via indireta. Na via direta, as algas verdes capturam a energia proveniente da luz e convertem prontamente a água em hidrogênio e oxigênio. Através de mecanismos de doação-recepção de elétrons e algumas enzimas ocorre o processo. O íon hidrogênio formado é convertido em gás hidrogênio através da enzima hidrogenase. Um dos limitadores do processo é o oxigênio. Uma das principais algas verdes nesse processo é a *Clamydomonas reinhardtii* (DAS E VERIZOGLU, 2009). Durante a biofotólise indireta, ocorre a ação das cianobactérias, microrganismos fototróficos. O hidrogênio é produzido através da hidrogenase ou da nitrogenase. A diferença entre a via direta e a indireta é que neste último há a separação dos íons oxigênio e hidrogênio dentro das células de modo que não haja inibição da nitrogenase pelo oxigênio (HALLENBECK et al., 2009).

A fotofermentação é outro processo que também necessita da presença de luz. Neste caso, o substrato passa a ser a matéria orgânica a qual é sintetizada por bactérias fotossintéticas. Elas são conhecidas por serem microrganismos capazes de gerar um alto conteúdo de hidrogênio e por degradar um largo espectro de substratos (HALLENBECK et al., 2009). Apesar de atingirem boa conversão de substrato, ainda há uma baixa taxa de produção de hidrogênio, visando uma escala industrial. Outro fator importante é a necessidade de uma fonte de luz e a ineficiência que pode ocorrer com substratos com algum tipo de coloração, o que pode causar problemas de difusão da luz. As principais bactérias responsáveis são: *Rhodobacter sphaeroides* O.U001, *Rhodobacter capsulatus*, *R.sphaeroides*-RV, *Rhodobactersulfidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodospirillum rubrum* (ARGUN e KARGI, 2011).

Outro processo é a fermentação no escuro (“*dark fermentation*”). A fermentação no escuro consiste na degradação de substratos ricos em matéria orgânica em ácidos voláteis, hidrogênio e CO₂ pela ação de bactérias anaeróbias. Ela faz parte dos estágios iniciais da digestão anaeróbia que é um processo que tem a intenção de gerar metano, ácidos graxos e gás carbônico sob condições de ausência de oxigênio. Através da geração de metano na etapa final do processo de digestão é possível reduzir a carga orgânica do efluente, sendo por isso, um processo bastante utilizado no tratamento de resíduos agrícolas, industriais e domésticos.

3.2 Digestão Anaeróbia e produção acidogênica de H₂

A digestão anaeróbia pode ser dividida em três etapas principais: hidrólise, acidogênese e metanogênese. A Figura 3.1 apresenta um esquema do processo de degradação de matéria orgânica por digestão anaeróbia.

Durante a primeira fase, a matéria orgânica é degradada em moléculas menores que sejam mais facilmente assimiladas ou degradadas pelos microrganismos nas fases seguintes. Nesta fase há a ação de bactérias hidrolíticas.

Em seguida, na acidogênese, os produtos formados na fase de hidrólise são convertidos em ácidos orgânicos de baixa cadeia, em hidrogênio e em gás carbônico. Nesta fase, temos a ação dos microrganismos acidogênicos. É também nesta fase que há o enfoque da produção de hidrogênio por fermentação no escuro.

Na fase posterior, durante a metanogênese, os ácidos orgânicos e o hidrogênio são convertidos em metano. O metano pode ser produzido, principalmente, a partir de

hidrogênio e CO₂, através de ácido acético e através de metanol (DEMIREL E SCHERER, 2008).

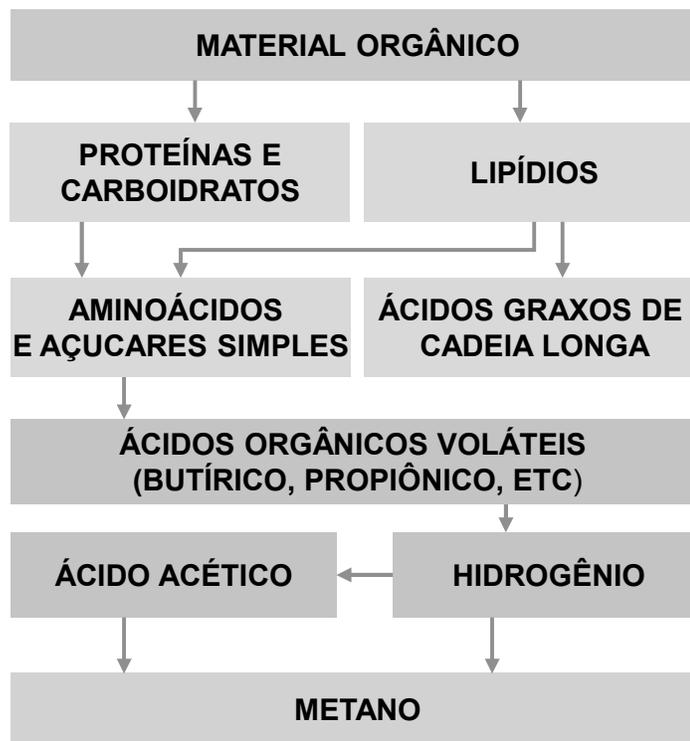
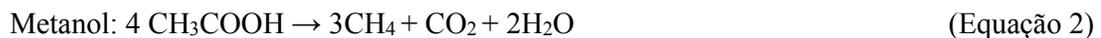


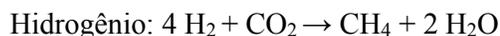
Figura 3.1 Esquema básico processo de digestão anaeróbia: hidrólise, acidogênese, metanogênese.

Alguns microrganismos têm preferência por determinado tipo de substrato, assim, são definidas algumas rotas de formação de metano em função dos compostos envolvidos na reação, assim, tem-se a via:

- Acetoclástica: a partir de ácido acético e metanol (microrganismos metanogênicos acetoclásticos ou acetotróficos)



- Hidrogenotrófica: a partir de H₂ (microrganismos consumidores de hidrogênio ou hidrogenotróficos).



(Equação 3)

Durante a via hidrogenotrófica, o hidrogênio participa da formação do metano como aceptor de elétrons, por essa razão, em processos biológicos de produção de hidrogênio, é importante controlar o processo de modo que essa situação de metanogênese não aconteça, caso contrário, há consumo de hidrogênio formado.

Uma das formas principais de controle da etapa metanogênica é através da manutenção do pH em condições ácidas tendo em vista que os microrganismos metanogênicos geralmente crescem entre o pH de 6 e 8. Ainda, pode ser realizado o tratamento do inóculo de modo a inativar os microrganismos produtores de metano. Esse pré-tratamento pode ser feito pela adição de um reagente químico específico ou pelo uso de altas temperaturas.

Os principais inibidores químicos utilizados são bromoetanossulfonato (BES), acetileno e clorofórmio (GUO et al., 2010).

O tratamento térmico tem se mostrado como uma forma efetiva de inativação das arqueias metanogênicas. Nessa condição, as bactérias formadoras de endósporos se resguardam da situação crítica enquanto que os microrganismos metanogênicos, os quais não possuem essa capacidade, são inibidos ou eliminados. Se os microrganismos consumidores de hidrogênio são eliminados, somente os microrganismos acidogênicos estarão presentes, de modo que o hidrogênio produzido não será imediatamente consumido pelas arqueias metanogênicas (VAN GINKEL et al., 2001). Porém, alguns microrganismos são mais tolerantes aos processos de tratamento existentes. OH et al. (2003) verificou que o tratamento térmico do lodo é efetivo na eliminação das metanogênicas hidrogenotróficas, porém, as metanogênicas homoacetanogênicas podem não ser totalmente inativadas, levando ao consumo do hidrogênio para a produção de ácido acético.

Outra forma de controle da fase metanogênica é através de manutenção de baixos tempos de detenção hidráulica nos reatores (< 8 h). A operação sob uma condição abaixo do tempo de crescimento desses microrganismos permite a lavagem das metanogênicas quando ainda não há a formação de biofilme (GUO et al., 2010).

3.3 Enzimas envolvidas na produção biológica de hidrogênio

Além de outros fatores, a produção de hidrogênio está relacionada ao modo de ativação das reações metabólicas. As enzimas atuam de forma preponderante nos processos biológicos de produção de hidrogênio. Dois grupos principais se destacam: a hidrogenase e a nitrogenase.

A reação $2H + 2e^- \rightarrow H_2$ é reversível e o seu direcionamento depende do potencial redox dos componentes que estão disponíveis para interagir com a hidrogenase (VIGNAIS E COLBEAU, 2004).

Um estudo sobre a hidrogenase é necessário a fim de entender o mecanismo de produção de hidrogênio, o metabolismo celular e assim, melhorar a produção de hidrogênio. As enzimas podem ser classificadas de acordo o metal ligado nos sítios ativos dessas enzimas: níquel-ferro (Ni-Fe-hidrogenase); ferro-ferro (Fe-Fe-hidrogenase) e somente ferro (Fe-hidrogenase).

A Ni-Fe- hidrogenase é o maior no grupo de hidrogenases. São consideradas menos sensíveis a presença de CO e O₂.

A Fe-Fe-hidrogenase são encontradas nas procarióticas como *Clostridia* e nos sulfato-redutores. Ao passo que a Ni-Fe-hidrogenase geralmente está envolvida no consumo de hidrogênio, as Fe-Fe-hidrogenase estão envolvidas na produção de hidrogênio.

A nitrogenase é outra categoria de enzimas importantes. Essa enzima está envolvida na fixação de N₂ e é essencial para a manutenção do ciclo de nitrogênio. Tanto arqueias quanto as bactérias podem conter essa enzima. Além disso, durante a fixação de nitrogênio, a nitrogenase é capaz de produzir hidrogênio.

3.4 Rotas metabólicas

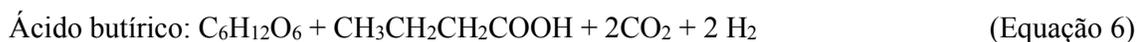
A depender da fonte orgânica utilizada pelos microrganismos durante o processo de produção de hidrogênio, diferentes rotas podem ser adotadas. Durante o processo de fermentação há a produção de hidrogênio e dióxido de carbono, podendo ainda haver traços de metano. Além desses produtos, há a formação de ácidos orgânicos e álcoois. A produção fermentativa de ácidos orgânicos e de álcoois indica a rota metabólica seguido pelo processo acidogênico.

A rota metabólica mais comum reportada e por se tratar do substrato orgânico mais simples utilizado é a via partir da degradação da glicose. Quando um mol de glicose é degradado para a formação de ácido acético tem-se a geração de quatro moles de hidrogênio e um mol de ácido acético (Equação 5). Temos assim a informação que o rendimento da produção de hidrogênio máximo é de 4 moles de hidrogênio para cada mol de ácido acético consumido.

A Figura 3.2 apresenta um esquema do processo de metabólico durante a produção de hidrogênio. Uma das primeiras etapas consiste na conversão da glicose em piruvato durante a glicólise. Nessa etapa há a liberação de ATP (adenosina trifosfato) e a redução de NAD^+ a NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo). O ATP e o NADH atuam como estoque de energia e como doador de elétrons para as etapas seguintes, respectivamente. O piruvato é então convertido a Acetil-CoA, ferredoxina e CO_2 . A ferredoxina pode, assim, ser oxidada pela enzima hidrogenase levando à formação de H_2 . O Acetil-CoA é um intermediário para a formação de etanol, butirato, butanol e acetona. O piruvato aparece como ponto central durante o processo de formação de hidrogênio. Duas enzimas são participantes nesse processo: a piruvato:formatolise em fermentações mistas pela ação dos microrganismos da espécie *Enterobacter* e a piruvato:ferredoxina oxiredutase em fermentações governadas pela espécie *Clostridium*.

Como se observa, diversos produtos podem ser gerados durante a etapa acidogênica para a formação de hidrogênio a partir de glicose. Os principais ou os que geram maior rendimento de hidrogênio são as vias de formação de acetato e butirato. Logo, a produção desses dois ácidos pelo sistema é um indicativo de boas condições para a produção de hidrogênio.

A seguir, estão apresentadas as equações de formação de hidrogênio pela via do ácido acético (Equação 5) e pela via do ácido butírico (Equação 6):



Uma relação entre a produção de ácido butírico e ácido acético é comumente empregada como indicativo da boa produção de hidrogênio. Uma razão maior que 2,6 é indício de uma produção de hidrogênio eficiente a partir de uma cultura mista (KIM et al., 2006a).

Além do ácido acético e do ácido butírico, outros metabólitos podem ser gerados. A produção de etanol em processos fermentativos para a produção de hidrogênio tem sido reportada e é atribuída, em geral, a mudança de condições acidogênicas para condições solventogênicas. Durante uma condição de solventogênese o reator passa a produzir álcoois e acetonas. Em processos de formação de hidrogênio, é interessante que o principal formado seja o ácido acético tendo em vista o melhor rendimento de H₂ a partir dessa rota. A rota tradicional de formação de etanol a partir de glicose é representada na equação 7.

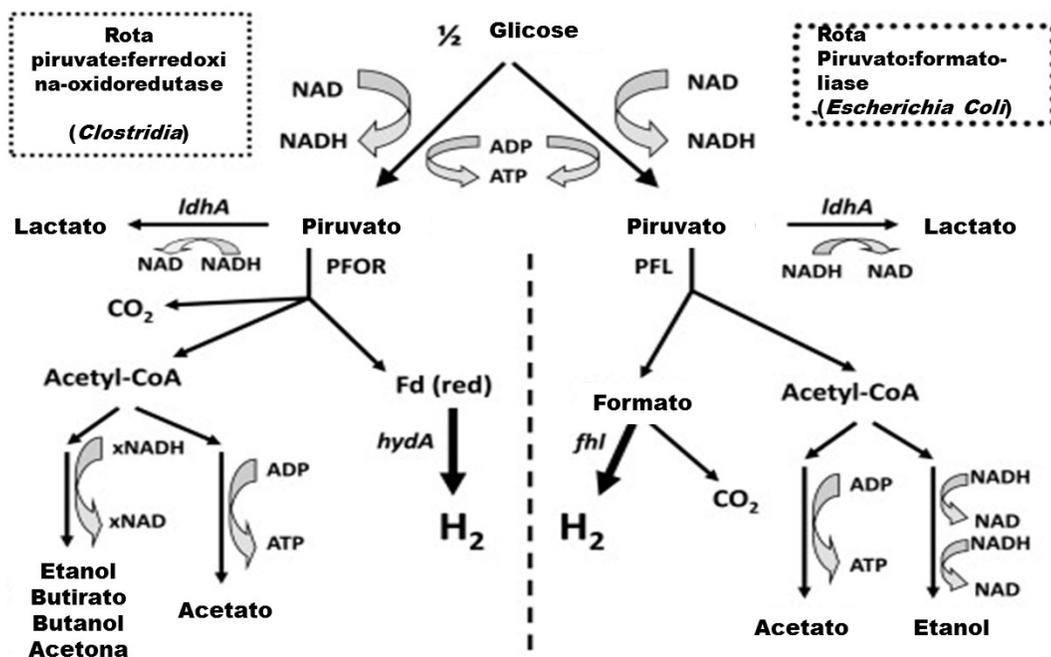
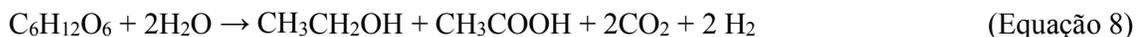


Figura 3. 2 Rotas metabólicas para a produção de hidrogênio. Retirado de HALLENBECK et al. (2012).

A rota de produção de etanol é desvantajosa ao processo de produção de hidrogênio. Apesar de não consumir nem gerar hidrogênio, essa via atua diminuindo o rendimento global do processo reativo visto que utiliza substrato orgânico que poderia ser direcionado para a geração de hidrogênio. Uma das causas para a produção de etanol pelo sistema seria a pressão parcial de hidrogênio no *headspace* dos reatores. Quando a pressão parcial atinge um nível máximo, o meio microbiano produz menos hidrogênio em função da mudança de rota para a produção de etanol (VAN GINKEL et al., 2001)

Alguns trabalhos têm sugerido outras rotas metabólicas via etanol em que há a com geração de hidrogênio com formação concomitante de etanol e de ácido acético. Os autores afirmam se tratar de uma rota metabólica mais estável que as outras apresentadas, a citar: via aceto-butírica. Assim, de acordo com a Equação 8, quando o ácido acético e o etanol são os produtos finais, há a formação de 2 moles de hidrogênio:

Ácido acético e Etanol:



Nas rotas fermentativas para a geração de hidrogênio o principal fator que afeta a rota metabólica a ser seguida é a razão de NADH/NAD⁺ dentro da célula microbiana e o acúmulo de metabólitos no meio reacional (REN et al, 1997). A oxidação do substrato é acompanhada de desidrogenação o que vem a produzir uma quantidade alta de NADH devido à falta de uma cadeia de transporte de elétrons. De modo que haja um processo contínuo e que se mantenha estável a relação NADH/NAD⁺, são produzidos diversos metabólitos: ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, etanol, entre outros. Segundo REN et al. (1997) a produção de ácido acético juntamente com ácido propiônico é a mais comum visto que tende a levar o sistema a um pH próximo do fisiológico entre 5 e 6. Já a produção pela via butírica acontece em pH acima de 6 ou abaixo de 5. Porém, durante a via aceto-alcoólica, ou seja, em que há a formação de ácido acético e etanol é possível manter um balanço entre NADH/NAD⁺.

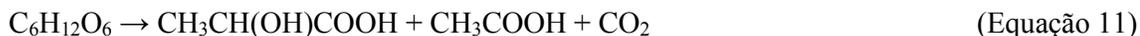
Durante o processo fermentativo para a produção de hidrogênio é indesejada a produção de ácido propiônico visto que esse metabólito leva ao consumo de hidrogênio de acordo com a equação 9.



Acredita-se que o acúmulo de ácido propiônico pelo sistema é devido a alta pressão parcial de hidrogênio. A alta produção de ácido acético é acompanhada por um alto rendimento de NADH, assim, há a necessidade de manter o equilíbrio no sistema com o consumo de hidrogênio e a formação de ácido. Entretanto, pode ser que haja a modificação do equilíbrio NADH/NAD⁺ pela substituição do ácido propiônico através da geração de etanol (REN et al., 1997).

Também pode ser verificada a produção de ácido láctico em reatores acidogênicos. O ácido láctico é gerado através de três tipos de fermentação: homofermentação, em que há unicamente a produção de ácido láctico; a heterofermentação em que há produção equimolar de ácido láctico, etanol, ácido acético e dióxido de carbono. E a terceira através da fermentação mista em que uma mistura de ácidos conjuntamente com o lactato. A depender do tipo de microrganismo presente, o metabolismo será direcionado para uma via diferente (HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL., 2000). Além disso, a manutenção de um pH entre 5 e 7 pode favorecer a produção de lactato.

No que se refere à produção de hidrogênio, a geração de ácido láctico como subproduto pode ser prejudicial ao sistema de produção de hidrogênio. De acordo com as equações 10 e 11, não há formação de hidrogênio durante a fermentação de glicose à ácido láctico (REUNGSANG et al., 2013). Assim, o ácido láctico é indesejado uma vez que na sua geração há o consumo de substrato que poderia ser direcionado a rotas metabólicas favoráveis à produção de hidrogênio.



HALLENBECK et al. (2012) estabeleceu quais seriam os desafios para a produção biológica de hidrogênio e as estratégias de modo a melhorar esse sistema. No que se refere a fermentação no escuro, os autores apresentam que dentre os desafios dessa forma de produção tem-se:

- Rendimentos limitados devido a diversas rotas metabólicas;
- Alta produção de produtos intermediários;
- Substratos abundantes, porém de difícil degradação (compostos lignocelulósicos);
- Necessidade de fermentar uma mistura de carboidratos (hexoses, pentoses)

Diante dessas questões, foram propostas pelos autores algumas soluções:

- Uso de engenharia metabólica com a introdução de enzimas de modo a conduzir a mecanismos específicos;

- Uso de uma etapa secundário de modo a recuperar mais hidrogênio a partir dos metabólitos;
- Desenvolvimento de pré-tratamentos dos substratos de modo a quebrar substratos complexos em cadeias menores.

3.5 Bioreatores em produção de hidrogênio

Boa parte dos experimentos em produção de hidrogênio é realizada em reatores operados em modo batelada. Essa configuração é de fácil operação e controle o que levou a se tornarem o modo mais básico de entendimento dos processos que controlem essa forma de produção. Porém, visando à execução em escala industrial, é necessário entender o comportamento da fermentação durante um processo contínuo e em grande escala.

A configuração do reator é importante tendo em vista que pode facilitar determinadas condições favoráveis à produção de hidrogênio.

Dentre os reatores contínuos utilizados, os mais empregados são: reatores de tanque agitado (CSTR - “continuous stirred tank reactor”); reatores em modo batelada alimentada (ASBR – “anaerobic stirred batch reactor”); reatores de leito fixo (AFBR – “anaerobic fixed-bed reactor”) e os reatores de leito fluidizado (AFBR - “anaerobic fluidized-bed reactor”). Podemos ainda citar como configurações empregadas o reator de manta de lodo ascendente (UASB - “upflow anaerobic sludge blanket”) e o reator granular expandido (EGSB- “expanded granular sludge blanket”).

O reator CSTR tem sido um dos mais empregados em trabalhos para a produção de hidrogênio (CHEN e LIN, 2003; LUO et al., 2010; WU et al., 2013; REUNGSANG et al., 2013a). Entretanto, esse tipo de configuração apresenta como desvantagens o baixo crescimento de microrganismos produtores de hidrogênio e lavagem de microrganismos quando operado em baixos tempos de detenção hidráulica. Uma das maneiras de contornar esses problemas é através da adição de biomassa como suporte de imobilização (WU et al., 2013).

Assim, WU et al (2013) propuseram um estudo em que eles avaliaram diferentes razões de altura/diâmetro do reator utilizando biomassa imobilizada: 1:1; 3:1; 5:1. Segundo os autores, as diferentes razões têm como objetivo diminuir a lavagem das células quando da operação do CSTR em condições de alta diluição. Para cada razão altura/diâmetro foi também variada a concentração de substrato (sacarose: 10, 20, 30 e 40 g.L⁻¹) e o TDH (4,

2, 1 e 0,5 h). Os melhores resultados foram obtidos na razão de 3:1, sob o TDH de 0,5 h e na concentração de 40 g.L⁻¹. A produção volumétrica de hidrogênio atingiu 15,36 L.h⁻¹.L⁻¹ e o conteúdo de H₂ foi de 44,03%.

Apesar da facilidade de operação do reator CSTR, há algumas dificuldades como as apresentadas anteriormente. Outras configurações de reator são testadas de modo a mitigar esses problemas. Devido ao arraste de biomassa que pode ocorrer com o reator CSTR, uma das necessidades de operação para os reatores tratando águas residuárias é que haja uma biomassa no reator de modo que não haja diminuição das condições de tratamento. O reator ascendente de manta de lodo apresenta na sua constituição uma zona de sedimentação de biomassa o que facilita a presença da cultura microbiana.

YU et al. (2002) empregou um reator de manta de lodo (volume de trabalho de 3 L) a fim de verificar a produção de biológica de hidrogênio a partir de água residuária de vinhaça de arroz. Os pesquisadores empregaram uma cultura mista e verificaram o efeito dos seguintes parâmetros: TDH, concentração, pH e temperatura. O reator foi operado numa faixa de tempo de detenção hidráulica de 2 a 24 h. A concentração da água residuária variou entre 14 e 36 g.L⁻¹. Também foi feita a variação do pH entre 4,5 e 6 e a temperatura entre 20- 55°C.

A composição de hidrogênio variou entre 53-61%, sendo o restante do biogás composto de dióxido de carbono, sem produção de metano. O rendimento de hidrogênio variou entre 1,37 – 2,14 mol de H₂/mol hexose. No que se refere à distribuição de metabólitos, foi observado que houve pouca sensibilidade em função da variação do TDH, entretanto, foi verificada influência em relação à concentração de efluente, ao pH e à temperatura.

Os autores atribuíram os resultados à configuração do reator. Segundo os autores, o reator UASB em comparação aos reatores CSTR apresentam uma alta retenção de biomassa. Assim, essa configuração de reator apresenta uma melhor produção volumétrica de biogás.

O reator de manta de lodo é caracterizado pelo processo de formação de grânulos sob os quais a biomassa é aderida. A produção de grânulos por esse sistema facilita o processo de adesão dos microrganismos produtores de hidrogênio e, assim, melhora a taxa de produção de biogás.

JUNG et al. (2010) empregaram tanto o reator UASB quanto o CSTR para analisar a produção de hidrogênio a partir de resíduo de água residuária de produção de café. O meio reacional CSTR serviu de inóculo para o reator UASB. Os autores observaram que o reator UASB se mostrou mais eficiente para a produção de hidrogênio. Além disso, foram

verificadas rotas metabólicas diferentes seguidas em cada reator. O ácido láctico foi o principal metabólito no CSTR enquanto que ácido butírico e ácido capróico foram os principais ácidos orgânicos gerados no UASB.

Uma derivação do reator de manta de lodo é o reator granular expandido (EGSB) o qual tem como principal vantagem em relação ao UASB a melhoria da transferência de massa em função do aumento da recirculação do meio e do aumento da altura do reator a fim de compensar a expansão do leito. Os reatores EGSB operam sob uma velocidade ascensional maior o que contribui para a eliminação de zonas mortas e no aumento da superfície de contato (SEGHEZZO et al. 1998). Tais fatores propiciam o reator ser operado sob altas taxas orgânicas e sob baixos tempos de detenção hidráulica, além de oferecer boas condições de transferência de massa (GUO et al., 2008a e GUO et al., 2008 b).

GUO et al., (2008b) realizaram um estudo para a produção de hidrogênio a partir de melaço em EGSB. No que confere à configuração do reator os pesquisadores observaram que o reator apresentou uma retenção de biomassa mais adequada em comparação com outras pesquisas similares.

Uma das dificuldades do uso de reatores UASB e EGSB está no longo tempo para a formação dos grânulos. Em geral, a formação dos grânulos é natural ou ajudada pela adição de micro partículas como carvão ativado como indutores da granulação. Assim, de modo a facilitar o processo de adesão dos microrganismos para a produção de hidrogênio foram sendo empregados reatores de crescimento aderido com partículas. Nessa área se encontram os reatores anaeróbios de leito fluidizado e os reatores de leito fixo.

Diversos trabalhos têm sido estudados em reator de leito fixo para a produção de hidrogênio (PERNA et al., 2013; SCOMA et al., 2013, FERNANDES et al., 2013).

No que se refere ao efeito do tipo de material suporte de imobilização de biomassa, FERNANDES et al. (2013) empregou a configuração de reator de leito fixo para estudar a produção de hidrogênio a partir da sacarose. Os materiais utilizados como suporte de imobilização foram: argila expandida, turfa vegetal e polietileno de baixa densidade. Foi utilizada a fermentação natural do próprio meio como inóculo do reator. Dois tempos de detenção hidráulica foram empregados: 2 e 0,5 h. Além da análise de diferentes materiais suporte, foi verificada também a influência da porosidade do leito na produção de hidrogênio. Apesar dos autores não terem observado diferenças entre os materiais suporte empregados, foi possível obter um rendimento de 7 mol H₂/mol sacarose sob TDH de 0,5 h. Tal valor é 87,5% do valor teórico máximo esperado para a sacarose (8 mol H₂/mol sacarose). O resultado indica a boa adaptação do reator com biomassa aderida à produção de hidrogênio. No que se refere à

porosidade do leito, verificou-se que para as condições aplicadas ao reator, a maior porosidade de leito de 91 % propiciou uma produção de hidrogênio de modo contínuo enquanto que os reatores sob as porosidades de 50 % e de 75 % cessaram a produção de hidrogênio após alguns dias de operação.

Um dos problemas enfrentados pelos reatores de leito fixo consiste no empacotamento do reator em função do crescimento de material polimérico na forma de EPS (polímeros extracelulares) e crescimento excessivo de biomassa (PERNA et al., 2013). Uma das formas de minimizar esse crescimento é através da lavagem da biomassa excessiva (PERNA et al., 2013) ou através do uso de maiores velocidades de recirculação do leito de partículas. Esse aumento do leito provoca a expansão do leito fixo até o ponto em que o leito se diz fluidizado, momento qual não há arraste de partículas, mas o leito se sustenta num nível estável em função da pressão do leito. A partir dessas condições, tem-se o reator de leito fluidizado o qual também vem sendo empregado como alternativa à produção biológica de hidrogênio.

Da mesma forma que PERNA et al. (2013), BARROS et al. (2010) analisaram o efeito do material suporte de imobilização na produção de hidrogênio, porém, em reator anaeróbio de leito fluidizado. BARROS et al., 2010 verificaram o efeito do tempo de detenção hidráulica e o efeito do material suporte para imobilização: argila expandida e poliestireno. Foi utilizada glicose como substrato orgânico (4000 mg.L^{-1}). Nesse experimento, o inóculo utilizado foi o lodo proveniente de um reator UASB para tratamento de resíduos da suinocultura. Antes da inoculação o inóculo passou por um tratamento térmico a fim de manter inativas as bactérias não formadoras de endósporos (nas quais se incluem as arqueias metanogênicas). Os autores também realizaram um pré-tratamento com ácido das partículas de poliestireno a fim de aumentar a rugosidade do material. As partículas de argila expandida não sofreram tratamento prévio por possuírem cavidades naturais. Diferentemente do trabalho realizado por PERNA et al. (2013) em que não foi verificada uma diferença significativa no emprego de diferentes materiais suporte para imobilização, BARROS et al. (2010) verificaram que para as condições operacionais empregadas o reator fluidizado operado com argila expandida apresentou uma melhor resposta para a produção de hidrogênio do que o reator fluidizado operado com poliestireno. O rendimento de hidrogênio máximo observado pelo reator operado com argila expandida foi $2,52 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose enquanto que o reator preenchido com poliestireno foi $1,92 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose. Um sinal indicativo da boa adequação desse tipo de configuração de reator é a boa adesão da biomassa nas partículas o que favorece a manutenção da comunidade microbiana dentro do reator. No estudo de

BARROS et al. (2010) foi verificada uma relação entre a formação de EPS e rendimento de hidrogênio para ambas as partículas utilizadas, além disso, a formação de EPS foi maior sobre a argila expandida.

Outros trabalhos para produção de hidrogênio recentes empregaram o reator anaeróbio de leito fluidizado (AMORIM et al., 2012; NGOMA et al., 2011; REIS et al. 2011; KUO et al., 2011; OBAZU et al., 2012; SHIDA et al., 2012; WU et al., 2012; BARROS et al., 2012; MUÑOZ-PAES et al., 2013).

MUNOZ-PAES et al. (2013) empregaram o reator anaeróbio de leito fluidizado para estudar a produção de hidrogênio a partir de sacarose sob condições diferentes de temperatura: ambiente e a 35 °C e, ainda, através da variação da carga orgânica (5 e 8 g.L⁻¹.dia⁻¹). Os pesquisadores empregaram um lodo metanogênico proveniente de um digestor de degradação de sacarose. Antes de ser inoculado o lodo passou por um tratamento térmico. Para ambos os casos o tempo de detenção hidráulico foi de 24 h. A primeira parte de operação foi sob 5 g.L⁻¹. Durante essa fase o reator apresentou uma produção máxima de hidrogênio de 10,6 nmLH₂.L⁻¹.d⁻¹. Quando o reator passou a uma carga maior, a produção de hidrogênio acompanhou o perfil e se elevou até 56 nmLH₂.L⁻¹.d⁻¹. Para ambas as temperaturas empregadas, o aumento da carga orgânica propiciou um aumento da produção de hidrogênio. Porém, durante operação sob maior carga orgânica e na temperatura de 35°C houve o aparecimento de gás metano. A fim de eliminar a geração de metano foi feita a redução do pH do reator a valores abaixo de 4,5. Uma vez sob esse pH, a produção de metano cessou.

3.6 Microrganismos em produção de hidrogênio

As culturas mistas apesar de serem menos eficientes do ponto de vista metabólico, visto que podem levar à produção de compostos indesejados (KIVISTO et al., 2013), são as de mais fácil obtenção, não necessitando um tratamento muito sofisticado. A cultura mista pode ter diversas origens: lodo anaeróbio, esterco, lodo de estação de tratamento e até mesmo solo. Apesar da variedade da cultura mista e da facilidade do ponto de vista industrial, pois não há necessidade de esterilização, por exemplo, diversos estudos são conduzidos através do uso de culturas puras. Entretanto, devido à existência concomitante de microrganismos produtores e consumidores de hidrogênio, em processos em que se visa à produção única de biohidrogênio é necessário aplicar um tratamento prévio na cultura mista a fim de inativar os microrganismos consumidores de hidrogênio.

A vantagem do uso de culturas puras está na seletividade por substratos e na facilidade de manipulação do metabolismo. Essas condições permitem controlar a formação de substratos indesejados, aumentando assim, o rendimento de hidrogênio. Por outro lado, o uso de culturas puras exige uma maior atenção quanto à possível contaminação, o que aumenta os custos e o cuidado no manuseio dessas culturas.

Os microrganismos anaeróbios estritos são os principais microrganismos responsáveis por produzir hidrogênio. Entretanto, algumas bactérias facultativas podem estar envolvidas quando a hidrogenase se faz presente. Ainda, tem sido relatada a presença de algumas bactérias aeróbias que podem se envolver no processo de produção de hidrogênio.

No que se refere aos consumidores de hidrogênio, aparecem as arqueias metanogênicas participantes do processo de produção de metano. Outros microrganismos também consumidores de hidrogênio competem no processo anaeróbio ao competirem com os produtores de hidrogênio por substrato. Assim, podemos dividir basicamente os microrganismos envolvidos no processo de produção de hidrogênio em microrganismos produtores de hidrogênio, microrganismos consumidores de hidrogênio e em microrganismos não produtores de hidrogênio.

3.6.1 Microrganismos produtores de hidrogênio

Dentre as bactérias anaeróbias restritas encontra-se a principal espécie produtora de hidrogênio, os microrganismos do ramo *Clostridium sp.* As espécies do ramo *Clostridium sp.* apresentam os maiores rendimentos de hidrogênio, porém, apresentam como desvantagem a alta sensibilidade à presença de oxigênio (HAWKES et al., 2002) e costuma ser a espécie dominante em meios de cultura para produção de hidrogênio que passam por tratamento térmico (CAI et al., 2013).

Uma grande variedade de espécies do ramo *Clostridium sp.* foram isoladas em estudos para produção de hidrogênio: *Clostridium acetobutylicum* (ZHANG et al., 2006); *Clostridium beijerinckii* (SKONIECZNY E YARGEAU, 2009); *Clostridium butyricum* (CAI et al., 2010); *Clostridium cellulosi* (NISSILA et al., 2011). Além de novas espécies como *Clostridium sp.6-5* (CAI et al., 2013)

Os microrganismos facultativos têm a possibilidade de mudar para condições anaeróbias quando o oxigênio não é presente. Entretanto, quando o oxigênio se faz disponível, muda seu metabolismo para a não produção de hidrogênio. Nessa categoria um dos principais representantes é da espécie *Enterobacter sp.* Pode-se citar: *Enterobacter aerogenes*

ATCC13048 (REUNGSANG et al., 2013), *Enterobacter cloacae* II-BT 08 (MISHRA E DAS, 2014).

HU et al. (2013) realizou um estudo utilizando culturas puras de: *Clostridium butyricum* DSM 10702, *Clostridium pasteurianum* DSM 525, *Clostridium beijerinckii* DSM 791 e *Enterobacter aerogenes* DSM 30053. Os autores tiveram o objetivo de comparar a ação de cada bactéria para a produção de hidrogênio a partir de glicose (5, 10, 15 e 20 g.L⁻¹) em reatores em modo batelada. Foi verificado que a *Clostridium butyricum* apresentou os melhores dados de hidrogênio bem como uma alta razão de metabólitos acetato/butirato, um indicativo de boas condições para produção de hidrogênio. Em geral, a produção pelas *Clostridium sp* foram melhores que a *Enterobacter sp* neste estudo.

Como bactérias produtoras de hidrogênio podem ser citadas ainda as bactérias termófilas. Apesar de o aumento da temperatura poder reduzir a diversidade microbiana (SHIN et al., 2004), há bactérias que se adaptam melhor a condições de altas temperaturas dentre as quais uma das mais encontradas é *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (UENO et al., 2001; SHIN et al., 2004; O-THONG et al. 2008).

3.6.2 Microrganismos não-tradicionais em produção de hidrogênio

Além das culturas já conhecidas para a produção de hidrogênio, existem algumas bactérias que têm sido relacionadas em estudos para a produção de hidrogênio, porém com menor direcionamento para a geração de H₂. Como exemplo, pode-se citar a *Megasphaera* e *Prevotella*.

Megasphaera são bactérias capazes de fermentar carboidratos gerando ácido acético, ácido propiônico, ácido lático e pequenas quantidades de hidrogênio (OHNISHI et al., 2010).

Outros microrganismos anaeróbios como a *Prevotella* são capazes de degradar a glicose gerando ácido acético e ácido propiônico.

HUNG et al. (2011) listam algumas estratégias para melhorar a produção biológica de hidrogênio, tais como: retenção da biomassa, manutenção de um sistema livre de oxigênio, quebra prévia de substratos complexos em substratos mais assimiláveis pelo microrganismo. Diante dessas estratégias, pode haver uma seleção por microrganismos preferenciais ou tradicionais para a produção de hidrogênio como os dos ramos *Clostridia* e *Enterobacter* ou ainda, microrganismos ainda poucos estudados para a produção de hidrogênio, como *Bifidobacterium, sp., Megasphaera sp, Ethanoligenes habinenses*, entre

outros. Esses microrganismos são ainda importantes por também atuarem na síntese de ácidos orgânicos.

3.6.3 **Microrganismos consumidores de hidrogênio**

As arqueias metanogênicas são os principais consumidores de hidrogênio. Como citado previamente, os microrganismos metanogênicos podem se dividir em metanogênicos acetotróficos quando se utilizam de ácido acético para produção de metano e dióxido de carbono ou em metanogênicos hidrogenotróficos quando utilizam o hidrogênio e dióxido de carbono para formar metano. As arqueias metanogênicas são microrganismos estritamente anaeróbios (DEMIREL et al., 2008).

Boa parte dos trabalhos que focam na produção de hidrogênio ajusta o sistema de modo que esses microrganismos sejam inibidos. Porém, há casos em que as condições apresentadas não são suficientes para cessar a produção de metano. Mudanças de pH, diminuições de tempos de retenção hidráulica, uso de inibidores químicos são algumas das alternativas empregadas para inibir o crescimento das metanogênicas.

Nem sempre a manutenção de baixos valores de pH pode ser uma garantia da inibição das arqueias metanogênicas. TACONI et al. (2008) observaram que em sistemas em há uma biomassa densa seja na forma de grânulos ou biofilme pode existir a presença de um micro-ambiente que é diferente do presente na fase líquida. Assim, esses micro-ambientes metanogênicos levam a produção de metano em sistemas previamente acidogênicos, de baixo pH.

Podemos citar ainda como bactérias consumidoras de hidrogênio, as homoacetanogênicas. Elas participam da produção de ácido acético a partir de hidrogênio e dióxido de carbono. Em estudo com resíduos de indústria laticínia, SIRIWONGRUNGSON et al. (2007) empregando reator CSTR sob condição termofílica (55°C) apresentou uma condição de homoacetanogênese. O hidrogênio gerado pela via butírica foi convertido juntamente com o CO₂ a acetato pela ação das bactérias homoacetanogênicas. Ao contrário dos microrganismos metanogênicos que são inibidos pelo tratamento térmico, os microrganismos metanogênicos não são eliminados (OH et al., 2003).

3.6.4 Microrganismos competidores ou não-produtores de hidrogênio

Existem outras bactérias que não consomem necessariamente o hidrogênio gerado, porém atuam competindo por substrato, sendo por essa razão competidores do processo, o que pode reduzir o rendimento de hidrogênio. Podemos citar as bactérias sulfatoredutoras e as bactérias produtoras de ácido láctico (lactobacilos).

As bactérias sulfato-redutores são importantes competidoras das bactérias produtoras de hidrogênio e das metanogênicas durante a degradação da matéria orgânica. Elas competem pelos intermediários como ácidos orgânicos e pelo próprio hidrogênio em alguns casos (MIZUNO et al., 1998). No caso da competição por hidrogênio, MIZUNO et al. (1998) afirmam que termodinamicamente a reação de uso de hidrogênio pelas SBR para reduzir o sulfato é mais favorável que a das metanogênicas. De modo que, na ausência de sulfato, as metanogênicas podem utilizar o hidrogênio gerado pelo sistema.

As bactérias produtoras de lactato competem por carboidratos com as bactérias produtoras de hidrogênio, sendo assim, não visadas quando se tem a intenção de gerar H₂. Nesse ramo tem-se *Bacillus racemilacticus* e *Lactobacillus paracasei* (KIM et al., 2006b). Condições de alta carga orgânica pode ser um fator para a predominância de bactérias produtoras de ácido láctico (OH et al., 2004).

Segundo HUNG et al. (2011) a presença de bactérias não produtoras de hidrogênio, como as bactérias produtoras de ácido propiônico e as homoacetanogênicas podem estar relacionadas às condições operacionais do sistema. Culturas empregadas por longos períodos sob condição de não esterilidade pode levar a uma variação da população microbiana de produtora à consumidora de hidrogênio.

3.7 Fatores operacionais

Durante a operação de reatores anaeróbios, alguns parâmetros devem ser ajustados de modo a manter a eficiência do processo. Visando ao aumento da escala produtiva de biogás em reatores anaeróbios, é determinante que os parâmetros escolhidos sejam adequados. O pH, a temperatura, o tipo de inóculo, o pré-tratamento, o tempo de detenção hidráulica, a concentração e tipo de substrato são alguns desses fatores que podem influenciar a operação do reator (JUNG et al., 2011).

3.7.1 pH

O pH é um dos principais parâmetros em processos fermentativos. Ele afeta em grande parte o direcionamento da comunidade microbiana e a atividade da enzima hidrogenase. Além disso, em processos acidogênicos o controle do pH em condições baixas é um modo de inibir a ação de bactérias consumidoras de hidrogênio (KHANAL et al., 2004).

VAN GINKEL et al. (2001) em reatores em modo batelada empregaram uma cultura mista proveniente de solo de plantação de batata, solo de plantação de soja e outra de resíduos de compostagem como inóculo para a produção de hidrogênio a partir de uma solução de sacarose. Numa faixa de pH variando de 4,5 a 7,5 eles observaram que sob pH de 5,5 havia a melhor produção volumétrica de hidrogênio. Em outro trabalho em reator em modo batelada, FANG et al. (2002) realizaram um experimento para determinar a influência dessa condição a partir de uma cultura mista e empregando glicose como substrato orgânico. Numa faixa de variação de 4 a 7, foi verificado que o pH ótimo para a produção de hidrogênio foi em 5,5 com produção de acetato e ácido butírico com ácidos principais. Como reportado, tanto o trabalho de VAN GINKEL et al. (2001) quanto o de FANG et al. (2002) verificaram uma produção ótima de hidrogênio sob pH 5,5 apesar do uso de substratos orgânicos diferentes, sacarose e glicose. Também em reatores em modo batelada, KHANAL et al. (2004) verificaram a influência do pH inicial empregando sacarose e amido e uma cultura mista numa faixa de trabalho que variou de 4,5 a 6,5. Quanto maior o pH empregado, menor eram os valores de potencial de produção de hidrogênio obtidos. Além disso, quanto maior o pH inicial, maior era a queda do pH num curto intervalo de tempo. Essa queda acentuada foi devido à formação de metabólitos ácidos a níveis considerados inibitórios ao processo anaeróbio. Isso levou também ao comprometimento da capacidade de tamponamento do meio. De modo contrário, quando se fez o início a partir de um pH mais baixo (4,5) a produção de hidrogênio começou moderada, porém gradual. Tendo em vista que não houve produção excessiva de ácidos orgânicos, foi possível manter uma produção contínua de hidrogênio.

Empregando um resíduo mais complexo, RAMOS et al. (2013) verificaram a produção de hidrogênio a partir de resíduos alimentícios proveniente de uma cafeteria. Foi empregada uma cultura mista e reatores em modo batelada no estudo. Eles verificaram que a produção específica de hidrogênio foi ótima em pH 7. Da mesma forma que nos experimentos apresentados anteriormente, o pH inicial foi ajustado no início e observada uma queda no pH ao longo do experimento em função da produção de metabólitos orgânicos. CHEN et al.

(2012) empregaram palha de arroz não tratada como substrato orgânico e cultura mista. O pH inicial dos reatores em modo batelada variou entre 3,5 e 8. Entre o pH de 3,5-5 não houve produção de biogás, porém, nos valores de pH mais elevados entre 6 e 8 houve produção de biogás com um máximo sob o pH 6,5. Os autores também atentam ao fato que o uso de diferentes inóculos pode afetar a sensibilidade do sistema a mudanças de pH. MOHAN et al. (2007) empregando melaço estudaram o efeito do pH 5, 6 e 7. A melhor condição de produção de hidrogênio se deu no pH 6. Quando o pH era ajustado a 5, havia uma queda no pH do sistema devido a produção de ácidos orgânicos. Essa produção de ácidos levou a inibição do sistema e, em seguida, à produção de solventes. ESPINOZA-ESCALANTE et al. (2009) empregando vinhaça do processamento da tequila observaram o efeito do pH na produção de hidrogênio em reator em modo batelada. Eles estudaram as seguintes condições: 4,5, 5,5 e 6,5. Foi verificado que a condição de pH inicial de 5,5 é a mais propícia para esse tipo de resíduo.

Em reatores contínuos, a influência do pH é feita através de um controle do pH no próprio meio fermentativo. FAN et al. (2006) observaram o efeito do pH em um reator contínuo de mistura sob o efeito de três condições: 5; 5,5 e 6. A melhor condição de produção se deu sob o valor de 5,5, tal como reportado pelos trabalhos anteriores em reator em modo batelada. LI et al. (2010) utilizando glicose com substrato orgânico em um reator em modo batelada sequencial verificaram que o pH 5 foi o valor ótimo dentre a faixa utilizada entre 4,7 e 5,9 com um incremento de 0,3 em cada condição. Os autores também verificam a produção de metano a qual obteve os melhores valores sob o pH 5,9. WU et al. (2010), também empregando um reator em modo batelada sequencial e glicose como substrato orgânico, verificaram que a mudança do pH de 4,4 a 5,6 gerou mudanças no comportamento da produção de biogás. Sob o pH de 4,4, 4,7 e 5,0 houve produção única de hidrogênio. Porém, diante do aumento ao pH 5,3 e 5,6 o reator passou a gerar metano. Um fato observado pelos pesquisadores foi que os experimentos realizados nos valores abaixo de 5,0 apresentaram uma fase maior para o início da produção de biogás enquanto que os reatores operados em 5,3 e 5,6 apresentaram uma produção de biogás mais rápida, logo após o segundo dia de operação.

3.7.2 Temperatura

A temperatura é um importante fator quando estão envolvidos processos químicos. Termodinamicamente, a temperatura está ligada à energia livre de Gibbs

(CONRAD E WETTER, 1990). Em processos fermentativos, em que há a presença de microrganismos, a manutenção em determinada temperatura pode significar a sobrevivência ou não do sistema. A temperatura afeta a taxa de crescimento e a atividade metabólica microbiana (LEE et al. 2006). A utilização de uma faixa ótima de temperatura vai depender ainda do tipo de cultura empregada (LEE et al., 2006).

Em casos em que a biomassa utilizada como substrato é de difícil degradação, o uso de temperatura mais elevada pode facilitar o processo de quebra das moléculas maiores, como celulose e hemicelulose em moléculas menores, mais facilmente assimiladas pelos microrganismos.

Utilizando uma cultura mista LEE et al. (2006) avaliaram a mudança de temperatura na faixa mesofílica (30, 35, 40 e 45 °C) durante a produção de hidrogênio a partir de uma cultura mista e sacarose. Foi verificada uma mudança da rota metabólica de acordo com a mudança de temperatura. A temperatura ótima para a produção de hidrogênio foi 35 °C e acima desses valores houve uma retração do hidrogênio gerado.

GADOW et al. (2012) verificaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio a partir da celulose sob 37 °C, 55 °C e 80°C. Empregando um reator de mistura, o estudo mostrou que quanto maior a temperatura de operação melhor o rendimento de hidrogênio. O biogás foi composto somente por hidrogênio e dióxido de carbono nas operações termofílicas e hipertermofílicas (55 °C e 80 °C) enquanto que sob 26 °C houve aparecimento de metano. Segundo os autores, uma das vantagens de se utilizar altas temperaturas na digestão anaeróbia de celulose está no fato que bactérias termofílicas já identificadas são capazes de utilizar a celulose como substrato, sem necessidade de adição de enzimas específicas, diminuindo assim, custos futuros de operação.

CHEN et al. (2012) empregaram reatores em modo batelada a fim de avaliar a geração de hidrogênio a partir de palha de arroz, resíduo conhecido como sendo constituído por celulose, hemicelulose e lignina. A temperatura de operação foi 55 °C.

SHI et al. (2013) empregando um reator em modo batelada sequencial verificaram a produção de hidrogênio sob três diferentes temperaturas: 35°C, 50 °C e 65 °C, ou seja, condição mesofílica, termofílica e hipertermofílica. Os autores utilizaram como substrato algas marinhas da espécie *Laminara japonica* contendo basicamente compostos celulósicos. Foi verificado que a temperatura mesofílica se adaptou melhor à produção de hidrogênio, seguido pela temperatura hipertermofílica e termofílica. A produção de acetato foi maior sob 35 °C e inexistente sob 65 °C. De modo inverso, houve aumento da produção de ácido butírico quando houve aumento da temperatura. A operação sob uma condição de

temperatura mais elevada também levou a influência na comunidade bacteriana do meio cuja situação apresentou uma menor diversidade microbiana quanto maior a temperatura.

3.7.3 Inóculo

Como comentado previamente, uma das formas de inibição dos microrganismos metanogênicos é através da realização de um pré-tratamento do inóculo a ser utilizado. Além disso, quando se faz uso de culturas mistas, que apesar de serem mais práticas, corre-se o risco de que haja um balanço desfavorável entre os microrganismos produtores de hidrogênio e os microrganismos consumidores de hidrogênio. Dentre as formas existentes tem-se: tratamento térmico, tratamento ácido ou básico, tratamento com alguma substância química como o bromoetanosulfonato (BES) e ainda a combinação dos tratamentos. Cada qual se adapta a uma condição tendo em vista que em se tratando de cultura mista, diferentes espécies de microrganismos se encontram presentes.

MOHAN et al. (2008a) fez o uso de diferentes pré-tratamentos do inóculo a fim de verificar a eficácia de cada um sobre a produção de hidrogênio a partir de uma cultura mista e de uma água residuária de indústria de laticínios. O lodo empregado era proveniente de um reator UASB tratando água residuária química (laboratório químico). As seguintes condições de pré-tratamento foram empregadas: tratamento ácido, tratamento térmico, tratamento químico, tratamento ácido+térmico, tratamento químico+térmico, tratamento ácido+químico e a combinação de tratamento ácido, térmico e químico. Todos os métodos apresentaram-se como alternativa ao tratamento do lodo, porém o tratamento químico resultou em melhores rendimentos de hidrogênio e em melhores coeficientes de remoção de substrato.

ASSAWAMONGKHOLSIRI et al., (2013) estudaram o efeito do tratamento ácido, térmico e do efeito combinado dos dois métodos de tratamento de inóculo. Foi empregado um lodo do processamento de bebidas. Após o tratamento, a eficácia do lodo foi testada em reator em modo batelada. O lodo foi enriquecido com glicose (20 g.L⁻¹) e levedura (0,5 g.L⁻¹). Foi verificado que a combinação do método ácido e térmico no tratamento do lodo foi mais eficaz para degradação e solubilização dos sólidos presentes em fase líquida. Foi verificado que a produção de metabólitos foi afetada, assim, houve maior produção de ácido butírico no tratamento térmico do que nas outras condições, porém, devido ao efeito inibitório deste ácido na produção de hidrogênio, houve queda na produção de hidrogênio no

experimento com inóculo tratado termicamente. O tratamento ácido único apresentou as melhores condições de produção de hidrogênio a partir do inóculo empregado.

3.7.4 Tempo de detenção hidráulica

Diversos estudos aplicam o TDH como parâmetro importante no processo de produção fermentativa de hidrogênio. O TDH ótimo irá depender entre outras coisas do tipo de reator além das condições aplicadas, de modo que costuma ser uma variável dependente de outras condições aplicadas.

A biomassa aderida às partículas pode ser bastante influenciada pelo TDH aplicado ao sistema, o que irá conseqüentemente, influenciar a produção de biogás e metabólitos pelo sistema. Algumas configurações de reator exigem que o TDH de operação seja mais elevado de modo que haja um tempo necessário para manter a biomassa aderida, neste caso podemos citar o reator de mistura (CSTR) sem massa imobilizada e reatores UASB. Em reatores em que há um processo de imobilização de biomassa, tais como o reator granular, reator de leito fluidizado e reator de leito fixo, pode-se trabalhar sob baixos tempos de detenção hidráulica sem que haja perda significativa da biomassa do sistema. Do ponto de vista econômico, a manutenção de baixos tempos de detenção hidráulica é importante, pois significa diminuição do tempo do processo.

Outro fator importante no que se refere à manutenção de baixos TDH em processos de produção de hidrogênio é que ele consiste em uma das formas de evitar o crescimento de microrganismos indesejados como as arqueias metanogênicas. Tais microrganismos possuem uma taxa de crescimento baixa, assim, em sistemas em que a biomassa não está totalmente estabelecida, tais microrganismos são varridos do reator juntamente com o efluente.

WU et al. (2008) trabalharam em reator CSTR para produção de hidrogênio de hidrogênio. Durante a primeira fase os pesquisadores reduziram o TDH de 12 a 4 h. Nessa fase foi verificado um aumento da produção de hidrogênio à medida que se diminuía o TDH, atingindo uma produção máxima sob o TDH de 6 h. Sob o TDH de 4 h os pesquisadores observaram uma queda na biomassa ativa pelo sistema a que eles atribuíram a redução da produção de hidrogênio. Porém, quando se adicionou biomassa imobilizada ao reator na forma de partículas de silicone e de carvão ativado foi verificada uma melhora da lavagem da biomassa sob uma condição de alta diluição, ou seja, baixos tempos de detenção hidráulica.

3.8 Substratos

A produção biológica de hidrogênio se apoia no uso de substratos orgânicos que possam ser facilmente obtidos, de baixo custo e que levem a um bom aproveitamento da matéria orgânica. A produção renovável de hidrogênio, assim, deve partir de matéria orgânica que possa ser renovável (SHOW et al., 2011). A princípio qualquer material orgânico rico em carboidratos ou ainda proteínas e gorduras pode servir de substrato para a produção de hidrogênio. Como substratos em potencial têm-se os resíduos agrícolas, os materiais lignocelulósicos, os resíduos da indústria alimentícia e os resíduos industriais orgânicos. Há uma vasta fonte de opções de resíduos enriquecidos em carboidratos que ao invés de serem descartados podem ser reincorporados ao processo para a geração biológica de energia na forma de hidrogênio ou metano.

Os carboidratos simples são os mais facilmente degradados e mais adequados a fim de entender o metabolismo da fermentação. Assim, o uso de substratos puros é mais utilizado quando se há a necessidade de estabelecer modelos aos processos. Em posse dos resultados satisfatórios obtidos com substratos simples, passou-se a empregar substratos mais complexos, em especial resíduos agrícolas ou industriais. Em geral, tais resíduos apresentam elevada carga orgânica e podem, assim, servir de matéria-prima para a fermentação.

3.8.1 Carboidratos puros

Tem sido relatada a produção de hidrogênio a partir de uma variedade de substratos simples, entre eles: monossacarídeos puros (glicose) (ZHANG et al., 2007a); ZHANG et al., 2008; AMORIM et al., 2012, BARROS et al. 2012, REIS et al. 2011), dissacarídeos (sacarose) (LIN et al., 2006; CHEN et al., 2008; MUNOZ-PAEZ, 2012) e polissacarídeos (amido, celulose e hemicelulose). Os açúcares simples, tais como glicose, sacarose e lactose são facilmente biodegradáveis e, portanto, preferidos como substratos modelo para a produção de hidrogênio. No entanto, fontes de carboidratos puros são matérias-primas caras para a produção de hidrogênio em escala real, que só pode ser viável quando baseada em fontes renováveis e de baixo custo (SHOW et al., 2011)

A glicose e a sacarose são facilmente degradadas o que leva a uma diminuição do tempo de adaptação dos microrganismos a esse substrato. Porém, outros substratos puros de cadeia longa como amido e celulose levam mais tempo visto que precisam ser hidrolisados

de modo que possam ser assimilados pelas bactérias produtoras de hidrogênio, levando assim, a um aumento do tempo do processo fermentativo (SHOW et al., 2011).

O emprego de substratos simples apresenta a vantagem de maiores rendimentos em comparação ao emprego de substratos complexos (industriais). Entretanto, costuma ser uma matéria-prima cara quando se faz uma projeção para escala industrial. Deste modo, outros substratos foram investigados de modo a viabilizar a produção de hidrogênio (NTAIKOU et al., 2010).

3.8.2 Compostos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos constituem uma boa parcela dos resíduos orgânicos disponíveis para degradação anaeróbia e, por via, para a produção de hidrogênio. Costumam estar prontamente disponíveis sendo, ainda, economicamente acessíveis. De acordo com REN et al. (2009), a produção anual de biomassa lignocelulósica ultrapassa 220 toneladas.

A biomassa lignocelulósica é composta de carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina. Em torno de dois terços é devido aos carboidratos e o um terço restante pela lignina. A lignina e a hemicelulose são as estruturas que conferem a esse tipo de resíduo a sua rigidez, sendo necessária uma hidrólise prévia desse material a fim de degradá-lo (REN et al., 2009). A necessidade de realização de pré-tratamento do material lignocelulósico de modo a quebrar em moléculas assimiláveis pelos microrganismos é uma das limitações do uso desse tipo de material para a produção de hidrogênio (CHONG et al., 2009).

Diversos estudos foram realizados empregando material celulósico: palha de arroz (CHEN et al., 2012), palha de milho (LI et al., 2007); caule de milho (ZHANG et al., 2007b), palha de trigo (FAN et al., 2006).

3.8.3 Compostos domésticos e industriais

Dentre a variedade de resíduos passíveis a digestão anaeróbia, tem-se os resíduos industriais (TOKUMOTO et al., 2012), domésticos (VAN GINKEL et al., 2005) e podemos citar ainda, os resíduos agroindustriais (CHONG et al., 2009; EROGLU et al., 2006;

KOUTROLI et al., 2006) e de estabelecimentos alimentícios (HAN e SHIN 2004; SHIN et al., 2004; SREELA-OR et al., 2011; CAMARILLO et al., 2012; XIAO et al., 2013).

3.9 Vinhaça

Dentre os resíduos industriais ou agro-industriais empregados se encontra a vinhaça. Por ser matéria-prima para produção de hidrogênio empregada nessa pesquisa, uma maior atenção será dada a esse resíduo.

A vinhaça é um resíduo proveniente do processo de destilação de carboidratos para a produção de etanol. Diversos substratos podem servir para a produção de etanol, assim, diferentes vinhaças podem ser geradas: vinhaça de cana-de-açúcar, vinhaça de beterraba, vinhaça de arroz, vinhaça de sorgo, vinhaça de milho, vinhaça de malte. De todo modo, grandes volumes de vinhaça são gerados durante o processo produtivo de produção de etanol ou de produtos destilados independente da origem do resíduo. Como já comentado, estima-se que sejam gerados 14 litros de vinhaça a partir da cana-de-açúcar por litro de etanol produzido. Assim, essa água residuária se torna de grande preocupação tendo em vista o grande volume gerado e o alto impacto poluidor. A figura 1 apresenta um esquema básico do processo de produção de etanol e açúcar a partir de cana-de-açúcar.

Em geral, a vinhaça se apresenta como um resíduo de baixo pH, coloração marrom, podendo conter material particulado e alta presença de matéria de compostos orgânicos e inorgânicos (PANT, 2007). Por ser um resíduo com alta carga orgânica, podendo atingir cerca de 150 g.L⁻¹ de demanda química de oxigênio, ela se torna uma fonte potencial a digestão anaeróbia (SEARMSIRIMONGKOL et. al., 2011). Pode apresentar ainda quantidade considerável de potássio, nitrogênio e fósforo, nutrientes importantes na agricultura. Porém, se eles estiverem em altas concentrações, pode se tornar um fator limitante para a produção de biocombustíveis. Na forma em que é gerado, ele se torna um dos resíduos mais complexos devido à presença de açúcares, lignina, hemicelulose, dextrina, resinas e ácidos orgânicos (MOHAN et al., 2008b).

Segundo WILKIE et al. (2000), a produção e as características deste resíduo são altamente variáveis e dependente da matéria-prima, além de outros aspectos da produção de etanol. A água de lavagem utilizada para a lavagem dos fermentadores e água de refrigeração proveniente do processo pode ser misturado à vinhaça, o que pode alterar a sua composição final.



Figura 3. 3 Esquema básico do processo de produção de etanol e açúcar a partir de cana-de-açúcar.

3.9.1 Composição da vinhaça

A composição da vinhaça pode variar de acordo com o processo de produção que ela seja gerada, seja ela proveniente da cana-de-açúcar, da beterraba, da tequila, da produção de vinho, de milho, entre outros. Entretanto, independente da origem, boa parte das vinhaças apresentam características comuns como a grande demanda química de oxigênio, quantidades consideráveis de potássio, fósforo e sulfato, sendo cada composto maior ou menor em função do processo produtivo envolvido.

Outro fator importante em relação a esse resíduo é a presença de metais pesados e poluentes orgânicos. Os compostos fenólicos (na forma de ácido húmico e ácido tânico), as melanoidinas (resultantes da reação dos açúcares com proteínas através da reação de Maillard), caramelos (provenientes de açúcares aquecidos) e a presença de furfuraldeídos contribuem ainda para a coloração característica da vinhaça (WILKIE et al., 2000). Esses compostos tornam a vinhaça um composto complexo e de difícil degradação o que em alguns casos pode causar inibição da digestão. De acordo com CHEN et al. (2008), a presença de compostos aromáticos podem também inibir a digestão anaeróbia. BORJA et al. (1993)

realizaram um estudo para verificar o efeito inibitório de compostos fenólicos na digestão anaeróbia de água residuária de produção de vinho. Através da realização de um processo prévio de eliminação de compostos fenólicos os pesquisadores observaram que não houve uma diminuição da constante cinética à medida que se aumentava a concentração de vinhaça não tratada. Tal fenômeno não ocorreu quando se fez uso de vinhaça previamente tratada para a remoção de compostos fenólicos.

Segundo BICHARA (1988), a vinhaça de cana-de-açúcar pode ser formada a partir de três mostos diferentes: mosto de melaço, mosto misto e mosto de caldo. O mosto de melaço é o mais rico em nutrientes e apresenta uma carga orgânica mais elevada (57,5 – 72 g.DQO.L⁻¹) e níveis médios de NPK em torno de 0,57; 0,10; 3,95 kg.m⁻³ de vinhaça, respectivamente. O mosto misto que é produzido em destilarias para produção de etanol e melaço possui uma carga orgânica intermediária em torno de 45 g.DQO.L⁻¹ e valores de NPK de 0,48; 0,09; 3,34, respectivamente. Tem-se ainda o mosto de caldo, produzido em destilarias para produção de etanol, apresentando os níveis de NPK de 0,28; 0,09; 1,29 kg.m⁻³, respectivamente e uma carga orgânica menor, em média 23 g.DQO.L⁻¹.

3.9.2 Biodigestão anaeróbia de vinhaça

Devido ao alto volume gerado de vinhaça, faz-se necessário o uso de técnicas que permitam o tratamento adequado desse resíduo quando não há outra destinação como já é uso para a irrigação de solos. A biodigestão da vinhaça é um processo que permite tanto o tratamento deste resíduo antes de ser despejado, pois reduz a carga orgânica como também pode permitir a geração de biogás o qual pode ser utilizado para a produção de energia na própria planta industrial. Alguns trabalhos já verificaram a viabilidade de degradação desses resíduos para a geração de metano (BALAGUER et al., 1992; HARADA et al., 1996; AKUNNA E CLARK, 2000; JIMENEZ et al., 2002; ACHARYA et al., 2007), GANESH et al., 2010; SELVAMURUGAN et al., 2011).

BALAGUER et al. (1992) realizaram um experimento que visava ao tratamento da vinhaça através do uso de um reator anaeróbio de leito fluidizado. Os autores utilizaram partículas de sepiolita e uma vinhaça com adição de metanol para aumentar a fonte de substrato. Eles trabalharam sob um tempo de detenção hidráulica que variou de 2,48 a 0,5 dias. A carga orgânica aplicada variou de 9 a 36 kg DQO. m⁻³. d⁻¹. Para fins de tratamento do resíduo foram atingidos valores acima de 90 % de remoção de DQO.

Uma das características da vinhaça é o seu caráter recalcitrante em função da presença de diversos compostos de difícil degradação e que demandam um maior esforço do ponto de vista técnico (NANDY et al. 2002). A fim de contornar essa característica, HARADA et al. (1996) utilizaram vinhaça de cana-de-açúcar para degradação anaeróbia sob temperatura termofílica. Foi utilizado um reator UASB, com redução de TDH e manutenção da concentração de entrada em 10 g.L^{-1} . Tendo em vista que a vinhaça é liberada numa alta temperatura, segundo os autores é conveniente empregar um tratamento termofílico o que viabilizaria o processo industrial da modalidade. Devido ao seu caráter recalcitrante, houve pouca remoção de DQO da vinhaça a qual se manteve entre 39-67%. Os autores indicaram que o baixo desempenho do reator para a degradação da vinhaça pode ser atribuído a origem da vinhaça. Assim, uma vinhaça contendo mais compostos fenólicos os quais são produzidos por oxidação e dão uma coloração marrom característica são, não somente refratários, como também inibidores dos microrganismos metanogênicos.

Outro tipo de vinhaça foi empregado por AKUNNA E CLARK (2000). Os autores utilizam uma vinhaça proveniente do processamento de uísque. A fim de tratar essa água residuária os autores usaram um reator anaeróbio compartimentado granular. O sistema se mostrou eficiente para a remoção de DQO atingindo até 80 %. Segundo os autores a combinação de um sistema de manta de lodo com um sistema compartimentado propiciou alta retenção de sólidos e a manutenção de biomassa ativa para a degradação da vinhaça.

JIMENEZ et al. (2002) apresentaram um trabalho de biodegradação de melão de indústria de produção etanol a partir de beterraba. Eles realizaram um estudo combinado de processo aeróbio e anaeróbio através de diferentes culturas de microrganismos e verificaram que essa combinação de processos foi mais eficiente que apenas a degradação anaeróbia, além de reduzir o tempo de detenção hidráulica empregado.

ACHARYA et al. (2007) testaram um tratamento anaeróbio para a água de lavagem de destilaria através de um reator de leito fixo. Os reatores foram carregados com uma cultura anaeróbia enriquecida de outro reator convencional e foi deixado incubado para formação de biofilme. Essa etapa durou de 35 a 40 dias. Foi observada uma redução de máxima de 64% na demanda química de oxigênio e uma produção de biogás de $7,2 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

GANESH et al. (2010) também utilizaram reator anaeróbio de leito fluidizado para o tratamento de resíduos de indústria de produção de álcool (vinho) obtendo remoções de 80 % da DQO.

SELVAMURUGAN et al. (2011) utilizaram reator UASB em escala industrial para o tratamento de água de lavagem de destilaria na concentração média de 112,400 mgDQO.L⁻¹. O reator foi projetado a fim de atender a demanda de vazão de 650 m³.dia de água residuária sob um TDH de 6 dias. A DQO efluente apresentou uma concentração variando entre 62,19 – 66,50 mgDQO.L⁻¹. A carga orgânica aplicada no reator foi de 2,15-4,60 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Os trabalhos apresentados anteriormente mostram que diversas condições de tratamento de vinhaça estão sendo empregadas no que confere à digestão anaeróbia, desde condições em escala de bancada até situações de escala plena. Outra vertente na qual se insere o presente trabalho é a recuperação de energia na forma de hidrogênio a partir desse tipo de resíduo industrial. Uma das condições também empregadas e interessantes para o processamento de águas residuárias complexas é a utilização de processos em duplo-estágio em que há a separação da fase acidogênica da fase metanogênica. Assim, consegue-se manter condições propícias para cada grupo de microrganismos envolvidos na fase acidogênica e na fase metanogênica, levando, assim, a uma melhor eficiência de processo. Além disso, consegue-se reduzir o efeito inibitório de compostos tóxicos às metanogênicas (BECARRI et al., 2006; MOTA et al., 2013).

MOTA et al. (2013) empregaram um reator anaeróbio de membrana de duplo estágio para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar com posterior recuperação de energia na forma de metano. O sistema foi operado em temperatura ambiente. Os reatores foram aclimatados com lodo de um reator UASB para tratamento de esgoto doméstico. Durante a operação dos reatores foi observada uma remoção total de DQO média de 96,9 % e uma produção de metano de 0,1- 4,6 % no reator acidogênico e de 60,1-70,1 % no reator metanogênico.

3.9.3 Produção biológica de hidrogênio a partir de vinhaça

Os estudos apresentados com diversos tipos de vinhaça mostram a possibilidade de degradação biológica dos resíduos provenientes de indústrias produtoras de álcool as quais geram resíduos com considerável carga orgânica. Uma das vertentes está focada na recuperação de energia na forma de hidrogênio.

Para a produção de hidrogênio, resíduos provenientes de destilarias com características semelhantes a da vinhaça como o melaço, resíduo gerado no processo de

produção de açúcar ou ainda a própria água de lavagem dos processos de produção de álcool (etanol ou bebidas destiladas e/ou fermentadas) e de açúcar (Tabela 1) tem sido empregados a fim de avaliar sua capacidade de geração de biocombustíveis: MOHAN et al. (2008), VATSALA et al. (2008), ESPINOZA-ESCALANTE et al (2009), KRYSTEVA et al (2010), BUITRON E CARVAJAL (2010) SEARMSIRIMONGKOL et. al., (2011), QIU et.al (2011), MOHAN et. al. (2011), NARS et al. (2011), NARS et al.(2012), WICHER et al. (2013), MISHRA E DAS (2013), LAZARO et al. (2014),BUITRON et al.(2014), GAHDE et al. (2014).

MOHAN et al. (2008) estudaram a produção de hidrogênio a partir de resíduo proveniente de destilaria em reator anaeróbio sequencial de biofilme (AnSBBR). Dois valores de pH (6 e 7) foram mantidos. O estudo ocorreu dentro da faixa mesofílica à 28 °C. Os pesquisadores empregaram como inóculo um lodo proveniente de um reator de manta de lodo (UASB) submetido a tratamento térmico (100 °C, 2 h) e tratamento ácido (pH 3 com ácido orto-fosfórico, 24 h). Antes de iniciar a introdução do resíduo de destilaria, o reator operou com água residuária sintética (sacarose) a fim de criar ambiente para a formação de biofilme no material suporte (*stone chips*-brita). Após 33 dias de operação a uma carga orgânica de 2,42 kg.DQO.m⁻³.d⁻¹ e um pH 7, o reator passou a operar sob o pH 6. Diante desta mudança, foi verificada uma variação na produção cumulativa de hidrogênio a qual passou de 7 mmol. H₂.d⁻¹ a 26 mmol. H₂.d⁻¹. A utilização de condições acidofílicas (<6) é uma das maneiras efetivas de melhorar a produção de hidrogênio a partir de uma cultura anaeróbia tendo em vista que restringe o processo metanogênico, fazendo com que o hidrogênio seja o produto final (MOHAN et al., 2008).

VATSALA et al. (2008) implementaram um projeto em escala-piloto (100 m³) para a produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias de destilaria (cana-de-açúcar) e de uma cultura mista pré-selecionada. Antes do início dos experimentos, foi realizada uma avaliação em laboratório de três culturas bacterianas: *C. freundii* 01, *E. aerogenes* E10 e *R. palustris* P2. Os ensaios no laboratório mostraram que a combinação das três culturas se mostrou mais eficiente do que uma única cultura isolada. Deu-se então a ampliação de escala, variando de 10 a 100 m³, numa série de quatro reatores em modo batelada (0,1 a 100 m³) com uma cultura mista. Nessa operação, os pesquisadores verificaram que um rendimento máximo de hidrogênio de 1,83 kg foi obtido em numa escala de 10 m³ e uma produção de 21,4 kg na ampliada de 100 m³. A produção volumétrica máxima obtida se deu durante 40 h de operação e foi 0,53 kg/100m³/h.

ESPINOZA-ESCALANTE et al. (2009) realizaram um estudo estatístico para determinar a influência de parâmetros como TDH, pH e temperatura podem ter sobre a produção de hidrogênio e metano a partir da vinhaça. Em estudos realizados em reatores em modo batelada, foi mostrado que as três variáveis têm influência na produção de hidrogênio, sendo que o pH mostrou ser o fator principal em qualquer temperatura ou TDH aplicado. Os dados obtidos em reatores em modo batelada em temperatura mesofílica (35°C) mostrou que o pH favorável a produção de hidrogênio era de 6,5 num TDH de 5 dias. Porém sob uma temperatura termofílica de 55 °C, o pH ótimo foi 5,5.

BUITRÓN e CARVAJAL (2010) realizaram um estudo a partir da vinhaça residuária da produção de tequila em reator em modo batelada sequencial. Durante o experimento, foi analisada a influência da temperatura (25 e 35 °C), tempo de detenção hidráulica (24 e 12 h) e concentração de substrato (1 a 5 g.DQO.L⁻¹). Os pesquisadores adotaram a estratégia de iniciar a operação do reator com substrato simples como a glicose na concentração de 2 g.L⁻¹, permanecendo com esse substrato até que a produção de hidrogênio fosse verificada. O pH era ajustado em 5,5 através de soluções de HCl ou NaOH. A produção volumétrica máxima de hidrogênio foi 50,5 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹ sob TDH de 12 h, concentração de 3 g.DQO.L⁻¹ e temperatura de 35 °C. Eles observaram que a produção de hidrogênio aumentava ligeiramente com o aumento de 1 a 5 g. DQO.L⁻¹ na temperatura de 35 ° C e TDH de 24 h.

SEARMSIRIMONGKOL et al. (2011) estudaram a produção de resíduos proveniente de uma destilaria de etanol com altas concentrações de sulfato e potássio. Eles empregaram um reator em modo batelada sequencial (ASBR) sob temperatura mesofílica (37 °C) e pH 5,5. A estratégia de operação se baseou na variação da concentração em termos de demanda química de oxigênio (20, 40 e 60 g.L⁻¹) e taxa de carregamento orgânico (37,5; 60 e 112 kg.m⁻³.d⁻¹). Lodo anaeróbico tratado termicamente serviu como inóculo do reator. Os pesquisadores verificaram que em concentrações acima de 60 g.L⁻¹, o reator apresentou uma baixa produtividade: baixa remoção de DQO, baixa produção de biogás e baixo conteúdo de hidrogênio. Na faixa entre 20 e 60 g.L⁻¹, os resultados indicaram que para o substrato empregado, quanto maior a concentração e maior taxa de carregamento orgânico, maior a produção de biogás. O biogás formado foi composto por hidrogênio, dióxido de carbono e metano. Sob a concentração de 20 g.L⁻¹ e sob a redução do tempo de detenção hidráulico de 32 a 13 (aumento da taxa de carregamento orgânico de 15 a 37,5 kg.m⁻³.d⁻¹) houve aumento da composição de hidrogênio em detrimento do percentual de metano formado. Ao se aumentar a taxa de carregamento orgânico, houve desaparecimento de metano, coexistindo

apenas H_2 e CO_2 . Foi verificado que uma concentração de 40 g.L^{-1} , TCO de $60 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e TDH de 16 h foram as condições ótimas para a produção de hidrogênio, obtendo um rendimento de $172 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$, sem produção de metano.

QIU et.al (2011) empregaram uma vinhaça proveniente do processo de produção de etanol a partir do caule e sabugo de milho sob condições termofílicas. Esterco bovino foi utilizado como inóculo. Os pesquisadores trabalharam com reatores em modo batelada nos quais verificaram o efeito da temperatura (65 a 80°C) e pH. E em seguida, empregaram um reator contínuo de mistura (CSTR) com as condições ótimas obtidas nos ensaios em batelada. Nos ensaios em batelada de temperatura, foi verificado que 70°C foi a condição em que maior quantidade de hidrogênio foi gerado. Durante essa temperatura, os principais metabólitos foi o ácido acético, o ácido láctico e etanol. Em relação ao pH, foi relatado que o pH 7 foi o mais adequado nas condições empregadas. Assim, o CSTR entrou em operação a 70°C e num pH 7. O reator foi operado durante 40 dias. Após o sétimo dia o reator apresentou uma produção estável de hidrogênio, com uma média de $172 \text{ ml.g}^{-1} \text{ SV}_{\text{adicionado}}$. Na primeira fase, o reator operou sob um TDH de 4 dias. Quando o TDH foi reduzido a 3 dias, houve um aumento da produção de hidrogênio, mas uma redução do rendimento ($102,7 \text{ ml.g}^{-1} \text{ SV}_{\text{adicionado}}$). O TDH retornou a 4 dias e novamente, o rendimento atingiu maiores valores.

MOHAN et. al. (2011) avaliou a diversidade microbiana presente em um reator em modo batelada seqüencial (ASBR) utilizando resíduos de destilaria (melaço) como substrato. O lodo que serviu como inóculo foi proveniente de uma planta de tratamento de esgoto doméstico e industrial. Inicialmente, o reator operou com uma carga orgânica de $3,9 \text{ kg.DQO.m}^{-3}$. Após atingir a estabilidade (em função da produção de hidrogênio e da remoção de DQO), a carga orgânica foi alterada ($9,8$ e $24,5 \text{ kg.DQO.m}^{-3}$). O reator operou sob um tempo de detenção hidráulica de 3 dias e sob a temperatura de 28°C . Durante a fase inicial a um TDH de 3 dias, o reator apresentou uma baixa produção de hidrogênio ($0,09 \text{ mol.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), assim, o TDH foi alterado para 5 dias, modificando a carga orgânica de entrada ($9,8 \text{ kg.DQO.m}^{-3}$) o que levou a um aumento da produção de hidrogênio ($0,14 \text{ mol.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). Sob uma nova concentração ($24,5 \text{ kg.DQO.m}^{-3}$) e a um TDH de 10 dias, a produção de hidrogênio apresentou essa tendência ascendente. Sob a última concentração de $24,5 \text{ kg.DQO.m}^{-3}$ o TDH foi elevado a 15 dias. A partir dessa fase houve decréscimo da produção volumétrica de hidrogênio em função do consumo de hidrogênio para a produção de metano.

NASR et al.(2011) utilizaram vinhaça proveniente de processamento de etanol a partir de cana-de-açúcar (*thin stillage*) como substrato para avaliar a produção de hidrogênio

em reatores operados em modo batelada. Os reatores possuíam um volume de líquido de 250 mL. O pH inicial foi ajustado com HCl e NaCO₃ a 5,47. Os pesquisadores ainda verificaram o efeito da aclimatização do lodo para a produção de hidrogênio. O lodo utilizado foi recolhido de um digestor anaeróbio de uma estação de tratamento de água residuária municipal. Uma parte do lodo passou apenas por tratamento térmico antes de ser empregado (70 °C por 30 minutos) enquanto que outra parte também foi submetida a adaptação à produção de hidrogênio. A aclimatização consistiu em empregar o lodo tratado termicamente num sistema contínuo e com glicose (30 g.L⁻¹) o qual foi operado durante 10 dias até que fosse verificada a produção de hidrogênio. Além disso, os pesquisadores estudaram a razão substrato/biomassa (lodo) de 0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 gDQO.g⁻¹SSV_{inóculo} para ambos os casos. Os pesquisadores verificaram que quanto maior a razão de substrato empregada, maior era a produção de hidrogênio, tanto a produção cumulativa quanto o rendimento de hidrogênio. Em relação aos lodos empregados, o lodo aclimatizado se mostrou mais eficiente que o lodo anaeróbio que apenas passou unicamente pelo processo de tratamento térmico. O lodo aclimatizado produziu 19,5 L H₂.L⁻¹ vinhaça, já o lodo não aclimatizado produziu apenas 7,5 L H₂.L⁻¹ vinhaça. Ainda, foi verificada uma variação da faixa de concentração de substrato ótima em função da aclimatização do lodo. Para o lodo aclimatizado, concentrações mais elevadas foram favoráveis (3 – 6 g.DQO. SSV_{inóculo}) enquanto que o lodo não aclimatizado atingiu um melhor resultado sob uma concentração mais baixa entre 1 e 2 g.DQO. SSV_{inóculo}.

Em um trabalho posterior, NASR et al. (2012) avaliaram o tratamento da vinhaça através de um processo de duplo estágio: primeiro a etapa produção de hidrogênio seguida de produção de metano. Eles verificaram que num processo separado, há um rendimento de produção de metano de 0,33 L CH₄.g⁻¹ DQO_{adicionada}, ao invés de 0,26 L CH₄.g⁻¹ DQO_{adicionada} obtido durante a operação em um único estágio. Levando-se em consideração o processo acidogênico para a produção de hidrogênio, NASR et. al (2012) avaliaram três relações substrato/inóculo: 4, 6 e 8 g.DQO. SSV_{inóculo}. Foi verificado um aumento da produção de hidrogênio de 47 a 62 mL.h⁻¹ quando se variou a relação de 4 a 6 g.DQO. SSV_{inóculo}. Porém, sob a concentração de 8 g.DQO. SSV_{inóculo} houve um decréscimo da produção de hidrogênio a 28 mL.h⁻¹.

Empregando vinhaça de arroz, ROY et al. (2012) estudaram o comportamento de uma cultura mista termófila para a produção de hidrogênio. O lodo anaeróbio passou por um pré-tratamento térmico seguido de tratamento químico com 2- bromo etano sulfonato. A vinhaça foi submetida à fermentação em reatores em modo batelada com variação de pH,

concentração de substrato e temperatura. A melhor condição se deu na temperatura de 60 °C, pH 6,5 e concentração de 10 g.L⁻¹.

WICHER et al. (2013) empregaram reatores em modo batelada a fim de avaliar a influência da concentração de resíduo de destilaria para produção de álcool a partir de milho na produção de hidrogênio. Além disso, os autores verificaram a influência da concentração de inóculo e pH no sistema. Foi utilizado como inóculo um lodo anaeróbio proveniente de uma estação de tratamento de esgoto municipal. Para efeito de análise de concentração de inóculo foram empregadas concentrações equivalentes a 10%, 15% e 20 % de volume de inóculo por volume de reator. Os testes foram realizados em temperatura ambiente. A elevação da porcentagem de inóculo no meio levou a uma menor produção de hidrogênio nos ensaios em batelada. Entretanto, quando a concentração de substrato era aumentada havia um acréscimo na produção de hidrogênio. Segundo os autores, em altas concentrações de inóculo, há um direcionamento à formação de biomassa do que para a produção de hidrogênio. De todo modo, variando a relação entre a concentração de resíduo e volume de inóculo foi possível direcionar à produção ótima de hidrogênio. Na análise do efeito do pH, WICHER et al. (2013) desenvolveram sistemas sem controle de pH (4,6 – 4,8) e outros dois sistemas com controle a 5,5 e a 6,0. Nos experimentos com controle foi verificado um direcionamento para a produção de ácido butírico. A melhor condição de produção de hidrogênio se deu sob a concentração de vinhaça na proporção em volume de 20 % e na proporção de inóculo de 10 %. Nessas condições foi produzida uma vazão de 1 L H₂.L⁻¹.

Outro efluente de destilaria com origem no arroz foi utilizado por MISHRA E DAS (2013). Foi utilizada uma cultura pura de *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. Os ensaios foram realizados em reatores em modo batelada e sob a temperatura de 37 °C e pH inicial de 7,5. O pH foi mantido através de soluções de NaOH e HCl. Na fase inicial foi feito um estudo para avaliar o impacto da adição de cinco diferentes nutrientes: extrato de levedura, extrato de malte, FeSO₄, MgSO₄ e CuCl₂. E numa etapa seguinte o efeito da interação de pH, substrato e temperatura. Foi verificada uma produção de hidrogênio máxima de 2,6 mol H₂.kg⁻¹ DQO_{reduzida} e foi obtida sob o pH 7,5 e concentração de substrato de 40 g.L⁻¹. Quando se fez a adição de extrato de levedura e extrato de malte foram atingidos valores mais elevados de produções de hidrogênio: 5,85 molH₂.kg⁻¹DQO_{reduzida} e 4,48 molH₂.kg⁻¹DQO_{reduzida}, respectivamente.

LAZARO et al. (2014) estudaram o efeito da temperatura (37 °C e 55 °C) e da concentração de vinhaça de cana-de-açúcar (2 – 12 g.DQO.L⁻¹) para a produção de hidrogênio em reatores em modo batelada. Os pesquisadores observaram que a temperatura de 55 °C

apresentou melhores resultados de rendimento de hidrogênio ($2,31 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{efluente}}$) em relação a temperatura de 37°C ($2,23 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{efluente}}$).

BUITRON et al. (2014) empregaram vinhaça de tequila para a produção de hidrogênio e metano em processos duplo-estágio (SBR-UASB). Variando a concentração de vinhaça entre 5 g.DQO.L^{-1} e 16 g.DQO.L^{-1} e utilizando um lodo tratado termicamente. Eles obtiveram uma produção volumétrica de hidrogênio de $57,4 \text{ mLH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ sob a concentração de 16 g.DQO.L^{-1} e TDH de 6h. A produção de metano no reator UASB empregou o efluente da parte acidogênica. Nessa etapa foi obtida uma produção de $11,7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no TDH de 24 h. A remoção de matéria orgânica aliando as duas etapas variou entre 73-75%.

GAHDE et al. (2014) avaliaram o uso da ultra-sonificação como pré-tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar empregada substrato à produção de hidrogênio. O uso do ultra-sonificador teve a intenção de romper estruturas complexas presentes na vinhaça de modo a facilitar a sua degradação. A densidade ultrasônica foi utilizada como parâmetro ($0; 0,05; 0,1; 0,15$ e $0,2 \text{ W.mL}^{-1}$) bem como diferentes concentrações de entrada ($40, 50, 60, 70$ e 80 g.L^{-1}). Os materiais resultantes da sonificação foram colocados em frascos de 125 mL para operação em batelada sob temperatura de 37°C . Através de ferramentas estatísticas foi estimada a condição ótima para a produção de hidrogênio. A melhor condição para a produção de biogás foi sob a concentração de 56 g.L^{-1} e densidade ultrasônica de $0,12 \text{ W.mL}^{-1}$ quando foi obtido o rendimento de $10,95 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ e a produção volumétrica de $6,67 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Em relação à amostra de controle, o uso do pré-tratamento da vinhaça com a ultra-sonificação resultou num aumento de 101% do rendimento de hidrogênio.

SANTOS et al. (2014a) realizaram um estudo empregando o reator termofílico (55°C) de leito fluidizado para avaliar produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar na concentração de 10 gDQO.L^{-1} e numa condição de vinhaça bruta de 30 gDQO.L^{-1} . Como inóculo foi empregado lodo termofílico proveniente de reator UASB do tratamento de vinhaça. Os pesquisadores verificaram que quando o reator sob menor concentração apresentou melhores resultados atingindo um rendimento de $2,86 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{adicionada}}$ sob o TDH de 6 h. Quando a concentração foi aumentada o rendimento máximo obtido foi reduzido a $0,79 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{adicionada}}$. Em outro experimento também em reator termofílico de leito fluidizado, SANTOS et. al. (2014b) avaliaram concentrações intermediárias de vinhaça: 15 e 20 gDQO.L^{-1} . Da mesma forma que no experimento anterior, a concentração menor apresentou um rendimento de hidrogênio melhor que o de maior concentração, atingindo $2,23 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1}_{\text{adicionada}}$. Os autores em outro estudo empregaram uma concentração menor de 5 gDQO.L^{-1} para avaliar baixas concentrações de

vinhaça como fator na produção de hidrogênio. O rendimento de hidrogênio atingiu 5,73 mmolH₂.gDQO⁻¹ adicionada no TDH de 4 h.

Em outro reator contínuo, FERRAZ et al. (2014) estudaram a produção de hidrogênio em reator de leito fixo em condições termofílicas (55°C) a partir da vinhaça de cana-de-açúcar. Foi avaliada a variação da carga orgânica de 36 a 108,6 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. A inoculação foi natural e o melhor resultado foi atingido na carga orgânica de 72,4 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e sob o TDH de 12 h. A partir de uma análise estatística foi verificado que nas condições de trabalho aplicadas a melhor configuração para a produção de hidrogênio se daria sob o TDH de 10 h e carga orgânica de 84,2 kgDQO.m⁻³.d⁻¹.

3.10 Uso de co-substratos

Como se pode ver pelos trabalhos citados anteriormente é possível produzir hidrogênio a partir de resíduos complexos como águas residuária de destilaria. Porém, a presença de possíveis compostos inibitórios em resíduos provenientes de destilaria pode apresentar uma barreira ao processo de digestão anaeróbia apesar de sua rica quantidade de matéria orgânica. Os compostos orgânicos de alto peso molecular também podem ser um empecilho a se obter boas taxas de degradação em resíduos de destilaria, os quais são degradados com dificuldade. Assim, é possível realizar um período de aclimação a fim de adaptar o ambiente aos substratos complexos. Em pequenas quantidades, o meio microbiano pode se adaptar ao resíduo complexo ou aos compostos inibitórios (CAMARILLO E RÍNCON, 2012).

Segundo CHEN et al. (2008), a adaptação do meio microbiano é importante, pois pode aumentar tanto a tolerância aos compostos tóxicos presentes como também pode aumentar a biodegradabilidade desses compostos. CHEN et al. (2008) sugerem ainda que quatro métodos de adaptação sejam utilizados: enriquecimento dos organismos que podem degradar os compostos tóxicos; indução de enzimas específicas para a degradação; engenharia genética e saturação com substratos preferenciais antes da mudança a um substrato mais tóxico. Assim, uma das formas de se adaptar o meio para a digestão anaeróbia pode ser feita através do uso de uma mistura de substratos, sendo que um deles é de fácil assimilação pelos microrganismos.

A mistura de substratos é uma forma empregada a fim de maximizar a produção de biogás quando se há a necessidade de se adaptar a comunidade microbiana ao meio. Cria-se, então, um ambiente favorável ao desenvolvimento dos microrganismos, com a

presença de substratos simples e nutrientes. A adição gradual de um novo substrato mais complexo tende a ser facilitada diante da adaptação prévia dos microrganismos. Segundo XIA et al. (2012), normalmente um co-substrato é adicionado a fim de melhorar o tratamento e a disponibilidade das matérias orgânicas mais refratárias para a degradação microbiana.

TAWFIK e EL-QELISH (2014) empregaram a mistura de dois substratos orgânicos para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio segmentado (*baffled reactor*): resíduos alimentícios e água residuária de cozinha. Ambos são resíduos obtidos no ambiente, mas se inserem nesse contexto devido ao uso de um substrato orgânico como complementar aos nutrientes do processo. Os resíduos foram misturados em proporções não controladas a fim de atingir a concentração desejada, uma carga orgânica variando entre 29-47 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ e numa razão de diluição 1:2, 1:3 e 1:4 (relação resíduos alimentícios/água residuária de cozinha). Foi obtido um rendimento máximo de 142,5 mL H₂.g⁻¹DQO_{removida} na relação de diluição 1:3.

Alguns dos estudos citados anteriormente que em empregaram resíduos de destilaria como MOHAN et al. (2008), BUITRON e CARVAJAL (2010) e NARS et al. (2011) realizaram um pré-adaptação do lodo para a produção de hidrogênio antes da introdução direta de vinhaça, porém, não empregaram o uso concomitante da vinhaça e de outro substrato para a produção de hidrogênio. SYDNEY et al. (2014) realizaram um estudo para avaliar a utilização de vinhaça de cana-de-açúcar em reator em modo batelada a partir de dois lodos orgânicos diferentes: fezes de morcego e lodo de lagoa de estabilização de uma fazenda para produção de leite. Previamente, os pesquisadores analisaram a viabilidade da produção de biogás a partir de vinhaça em tubos de ensaio de 15 ml. Em função dos baixos valores de produção obtidos foram adicionados co-substratos a fim de impulsionar a produção de biogás, assim: vinhaça+sacarose, vinhaça+melaço de cana e vinhaça +caldo de cana. As melhores condições foram então levadas a um reator em modo batelada de 1,5 L sob temperatura de 37°C e o uso de vinhaça+caldo de cana. No experimento combinando vinhaça+caldo de cana e o lodo fezes de morcego os autores observaram uma produção inicial de ácido butírico e ácido láctico. Em seguida houve uma mudança do metabolismo para a produção de ácido propiônico. O conteúdo de H₂ ficou em 29,55% ao fim da operação que durou 5 dias. A outra condição operada foi a de vinhaça+caldo de cana e lodo de lagoa. Nesse caso também foi observada a produção mista de metabólitos, com formação de ácido butírico, ácido acético e ácido láctico no primeiro dia de operação. No segundo dia houve consumo dos metabólitos gerados e a diminuição da produção de biogás. No quarto e sexto dia houve nova produção dos ácidos butírico e acético. Nessa condição o conteúdo de H₂ foi 31,2%. A

condição com lodo de fezes de morcego obteve um rendimento de hidrogênio de 7,14 molH₂.mol⁻¹sacarose enquanto que a condição com lodo de lagoa obteve 3,66 molH₂.mol⁻¹sacarose. Esses trabalhos ilustram que o uso de outros substratos associado a outro mais complexo pode impulsionar a produção de biogás.

3.11. Considerações finais

Essa revisão literária apresentou as recentes descobertas em produção de hidrogênio bem como a base na qual esse segmento de pesquisa está estruturado. Foram consideradas a posição do hidrogênio como possível combustível alternativo, as bases da produção de hidrogênio e os desdobramentos na área de produção biológica desse gás.

Na área de produção biológica de hidrogênio, na qual se insere essa pesquisa de doutorado foram citadas as principais e mais recentes trabalhos, mostrando quais as lacunas ou novos segmentos a seguir na área. Os principais fatores influenciadores do processo foram apresentados tendo em vista que ainda não há afirmações absolutas sobre essas condições (pH, inoculo, temperatura, tipo de substrato) visto que cada condição apresentada pode levar a diversos questionamentos.

No que se refere ao tipo de substrato, umas das grandes vantagens da produção biológica de hidrogênio é a ampla variedade de fontes orgânicas. Em especial, devem-se citar os resíduos industriais os quais encontram nesse processo uma forma de redução do grau poluente com também podem agregar valor na forma de energia recuperada. Um desses substratos é a vinhaça, resíduo da produção de álcool em destilarias. Devido ao seu alto potencial orgânico e o grande volume gerado anualmente, esse resíduo se torna uma importante alternativa de substrato à geração de biogás.

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

O escopo do trabalho de pesquisa foi a produção de biogás a partir de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. Assim, foram empregados ao longo do estudo três reatores com diferentes condições operacionais. Dois reatores foram mantidos durante 364 dias, sendo que cada fase operacional teve uma duração média de 40 dias. O terceiro reator foi operado por 210 dias. As condições operacionais das fases foram baseadas na concentração de vinhaça na alimentação e no tempo de detenção hidráulica aplicado. A figura 4.1 ilustra o fluxograma experimental de atividades. Havia mudança de fase à medida que os dados de consumo de carboidratos redutores totais e de produção de biogás eram estabilizados.

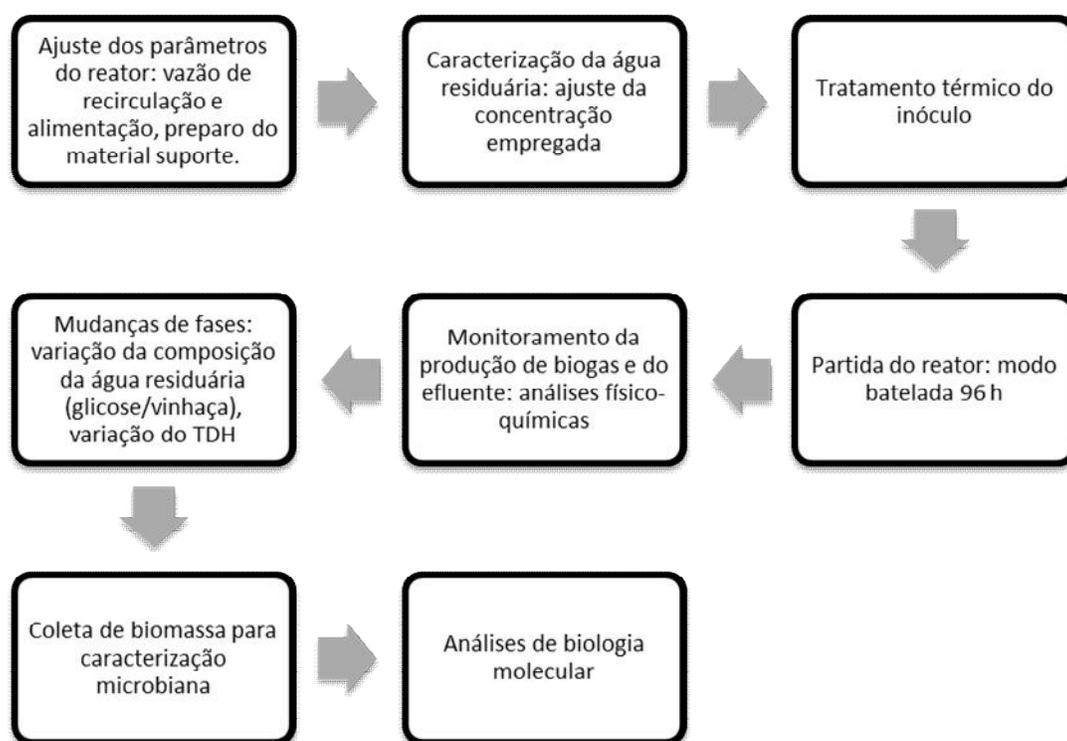


Figura 4. 1 Fluxograma do procedimento experimental

4.1 Reator anaeróbio de leito fluidizado

A figura 1 ilustra o esquema dos reatores empregados. Foram utilizados três reatores de leito fluidizado construídos em acrílico com as seguintes dimensões: altura (151 cm), diâmetro (3,1 cm) e volume total (1452 mL). A argila expandida foi o suporte de imobilização dos microrganismos empregado ($d = 2,8 - 3,35 \text{ mm}$; $\rho = 1,50 \text{ g.cm}^{-3}$; $\text{vmf} = 1,24 \text{ cm.s}^{-1}$). Os reatores foram operados em temperatura ambiente.

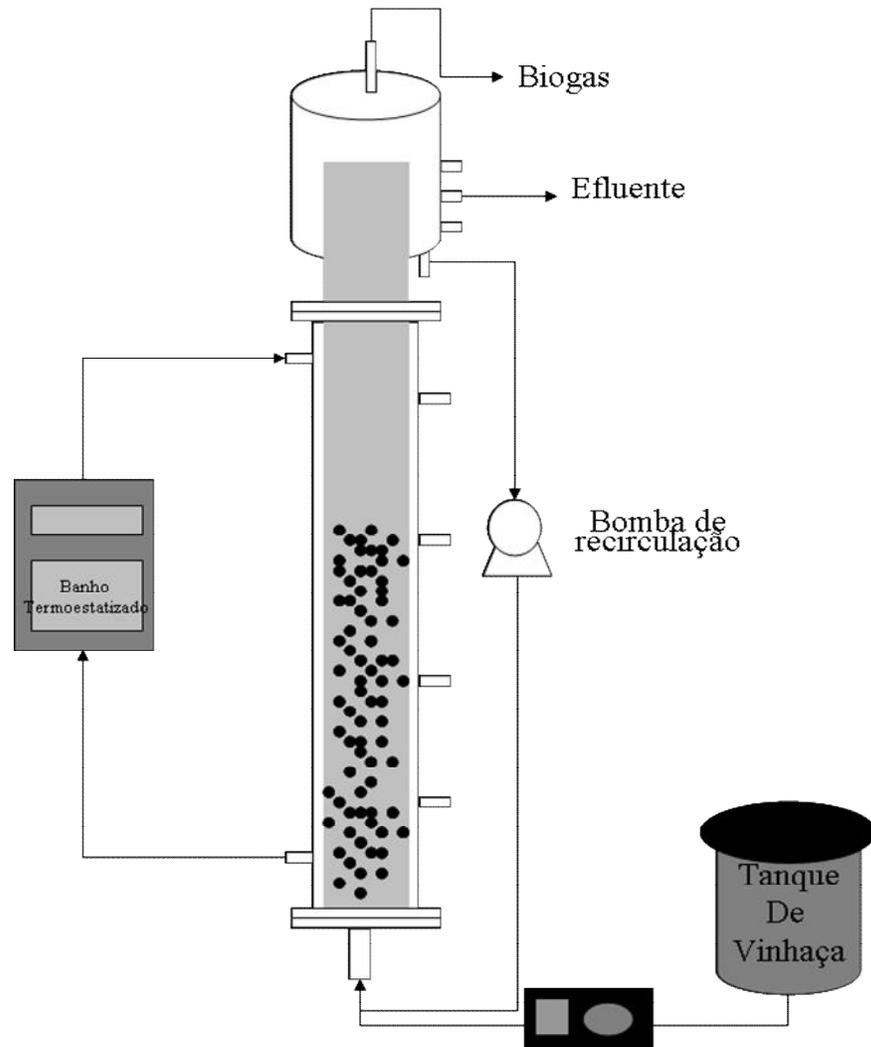


Figura 4. 2 Esquema básico do reator anaeróbio de leito fluidizado

4.2 Inóculo

Nesse experimento uma cultura mista foi empregada como inóculo. Assim, foi utilizado um lodo obtido de um reator UASB operado para o tratamento de água residuária de suinocultura, fornecido pela UNESP-Campus Jaboticabal. Antes de ser inoculado no reator, o lodo passou por um tratamento térmico a fim de ativar as células acidogênicas. Esse tratamento consistiu no aquecimento do lodo até que a temperatura atingisse 90°C. Nessa temperatura ele era mantido durante 10 minutos e, em seguida, era colocado em um banho de gelo até que a temperatura atingisse 25°C segundo método proposto por MAITINGUER *et al.* (2008) adaptado de KIM *et al.* (2006a). Como as arqueias metanogênicas são bastante sensíveis às altas temperaturas, esse prévio tratamento teve o objetivo de inibir a ação desses microrganismos.

4.3 Água residuária

A alimentação dos reatores foi feita inicialmente com glicose e em seguida a vinhaça era adicionada proporcionalmente ao longo das fases até que a vinhaça fosse a única fonte orgânica.

Durante este experimento foi utilizada uma vinhaça recolhida na Usina São Martinho S.A. Essa vinhaça foi estocada e congelada para utilização ao longo do experimento. A Tabela 4.1 ilustra as principais características físico-químicas da vinhaça empregada. A vinhaça *in natura* possuía uma concentração média de 30 g.DQO.L⁻¹ a qual era diluída a fim de atingir a carga orgânica aplicada em cada reator: R5 (5 g DQO.L⁻¹), R10 (10 g DQO.L⁻¹) e R15 (15 DQO.L⁻¹).

Tabela 4. 1 Principais características físico-químicas da vinhaça

Parâmetros	Vinhaça <i>in natura</i>
pH	5,00
Ácidos voláteis totais (mg.L ⁻¹)	3012
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	292
N - total (mg.L ⁻¹)	244
P- total (mg.L ⁻¹)	3796
SO ₄ ⁻² (mg.L ⁻¹)	1400 mg.L ⁻¹

A glicose foi escolhida como substrato de partida. Essa adaptação inicial do reator com glicose foi adotada a fim de condicionar os reatores à produção de hidrogênio antes da introdução da vinhaça.

Além do lodo suíno e do substrato orgânico foram adicionados nutrientes necessários ao crescimento celular através do meio nutritivo proposto por DEL NERY (1987) de acordo com a Tabela 4.2. A fim de controlar o pH do meio entre 4 e 5, ácido clorídrico e bicarbonato de sódio também foram utilizados como solução tampão.

Tabela 4. 2 Composição do meio nutritivo segundo DEL NERY (1987)

Composto	Concentração (mg.L⁻¹)
Ureia	125,0
Sulfato de Níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Cloreto férrico	0,5
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Óxido de selênio	0,07
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4

4.5 Procedimento de partida

Primeiramente foram feitos os ajustes das vazões das bombas de alimentação e recirculação dos reatores fluidizados. A velocidade empregada foi 1,3 vezes maior que a velocidade mínima de fluidização (vmf) para a argila expandida (1,24 cm.s⁻¹). A vmf da argila expandida foi obtida em ensaios hidrodinâmicos prévios que não foram incluídos nesta tese.

O material suporte utilizado foi separado de acordo com a granulometria desejada através do peneiramento das partículas. Foi escolhida uma granulometria entre 2,8 e 3,3 mm. Foi feita uma lavagem com água corrente a fim de eliminar as partículas com diferentes densidades e foram eliminadas as partículas sobrenadantes. Essa lavagem visa a

uniformizar as partículas de modo que quando em operação não houvesse variação do leito do reator devido a presença de partículas com diferentes densidades nem o desprendimento dessas partículas do reator.

A partir de uma altura inicial fixa foi calculada a massa de partículas necessária e foi feito o recheio do leito. Após o preenchimento do reator com as partículas foi dada a partida dos reatores.

A partida dos reatores consistia no preparo da alimentação que foi calculada com base no volume do reator (1452 ml). Assim, foi preparado um volume de solução que preenchesse o reator e as mangueiras acopladas e ainda houvesse um residual para uma possível perda. Foram preparados 5 litros de solução de alimentação contendo o lodo (500 mL), glicose e meio nutriente. Em seguida, o pH da solução era ajustado de modo que atingisse um valor máximo de 5. O sistema foi ligado em modo batelada e nitrogênio foi aspergido no *headspace* e na alimentação do reator de modo a manter as condições anaeróbias do sistema.

No início os reatores operaram em modo batelada durante 96 h. Esse período teve o objetivo de imobilizar a biomassa às partículas, sendo utilizada uma única solução de alimentação e lodo nas concentrações citadas nos itens anteriores. Após 96 h o sistema fechado foi aberto e colocado em modo contínuo. Durante essa etapa havia o controle do pH e do consumo de carboidratos redutores totais. Apenas quando o sistema apresentou consumo de carboidratos, indicando que houve eficiência no processo, é que foi feita abertura do sistema.

O trabalho foi dividido em duas etapas: 1ª etapa – uso de uma mistura de substratos (glicose e vinhaça) como fonte orgânica. Na 2ª etapa os reatores foram alimentados unicamente com vinhaça.

Durante a primeira etapa houve a variação do conteúdo de vinhaça (0, 25, 75 e 100 %) na alimentação sob o tempo de detenção hidráulica constante de 6 h. Na segunda etapa houve a variação do TDH em 4, 2 e 1 h e a operação de uma única concentração de vinhaça (100 %) na alimentação do reator. A tabela 2 ilustra as etapas experimentais.

A estratégia de iniciação do reator a partir do uso de um substrato simples, glicose, teve o intuito de propiciar ao reator uma condição favorável à produção de hidrogênio. À medida que havia uma estabilização dos parâmetros operacionais era feita a variação do conteúdo de vinhaça na alimentação de 0 a 100%. Em ambas as etapas, os reatores operaram sob temperatura ambiente.

Tabela 4. 3 Etapas experimentais para os reatores R5(5gDQO.L⁻¹) e R10(10g.DQO.L⁻¹)

	Substrato	TDH (h)
1ª Etapa	100 % glicose	6
	75% glicose; 25 % vinhaça	6
	25% glicose; 75 % vinhaça	6
	100 % vinhaça	6
2ª Etapa	100 % vinhaça	4
	100 % vinhaça	2
	100 % vinhaça	1

A fim de analisar o comportamento de concentrações maiores de substrato, também foi operado um reator na concentração de 15 g.L⁻¹ como ilustrado na tabela 4.4. Esse reator denominado de R15 passou por três fases de acordo com a proporção glicose/vinhaça empregada: 100% de glicose, 50% glicose-50%vinhaça e a última fase com 100 % de vinhaça. O reator, diferentemente do R5 e R10 foi iniciado sob um TDH de 8 h. Essa opção por um TDH mais alto foi devido à maior carga orgânica adicionada ao reator.

Tabela 4. 4 Etapas experimentais para o reator R15 (15gDQO.L⁻¹)

Substrato	TDH (h)
100 % glicose	8
50 % glicose; 50 % vinhaça	8
100 % vinhaça	8

4.5 Métodos analíticos

As análises empregadas neste estudo se basearam nos principais parâmetros comumente empregados para analisar processos de digestão anaeróbia e tratamento de efluentes.

4.5.1 Determinação de carboidratos redutores totais

A composição de carboidratos redutores totais foi realizada de acordo com DUBOIS et al. (1956).

4.5.2 Análises físico-químicas

O pH, a demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais fixos (SF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram analisados de acordo com o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

4.5.3 Determinação de ácidos voláteis e álcoois

As determinações dos ácidos orgânicos e álcoois foram realizadas através de cromatografia líquida de alta precisão HPLC SHIMADZU em método desenvolvido pelo Laboratório de Processos Biológicos- EESC-USP. A fase móvel era através de H_2SO_4 0,005 M e temperatura de trabalho a 50 °C e fluxo de 0,5 ml.min⁻¹. O equipamento possuía um amostrador automático (HT SIL- 20 A), uma coluna (CTO- 20 A) sob 43 °C, um detector de índice de refração (RID-10 A), um controlador de sistema (SCL- 10AVP) e uma coluna de HPX- 87 H Aminex (300 mm, 7,8 mm Bio-Rad).

4.5.4 Análise da composição dos gases

A determinação do gás hidrogênio foi realizada através de cromatografia gasosa. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu GC- 2110 localizado no Laboratório de Controle Ambiental II (UFSCar). O cromatógrafo é equipado com detector de condutividade térmica apresentava as seguintes temperaturas: forno (30 °C); coluna (200 °C) e detector (230 °C). O gás de arraste utilizado foi o argônio a 21,9 cm.s⁻¹.

A coleta da amostra era feita na saída superior dos reatores. Foram recolhidas 1ml de amostras do gás formado através de uma seringa “gas tight” com trava as quais eram

condicionadas através da lavagem com o próprio biogás antes do recolhimento da amostra para análise. Essas amostras eram então injetadas no cromatógrafo para o mapeamento dos componentes presentes.

4.5.5 Quantificação da produção de hidrogênio

A produção volumétrica de hidrogênio foi medida por meio de um medidor MilliGas-counter da Ritter. A medição era realizada a partir da saída superior do reator. Era acoplado em série ao reator um recipiente contendo uma solução de hidróxido de sódio sob pH 12 e em seguida o medidor de hidrogênio. Era medido o volume de biogás produzido por unidade de tempo. Em seguida, em função dos dados de porcentagem obtidos por cromatográfica gasosa eram calculados o volume de hidrogênio gerado pelo reator por unidade de tempo.

4.6 Biologia molecular

4.6.1 Extração do DNA. PCR e DGGE

Ao final de cada etapa de operação dos reatores R5 (5 gDQO.L⁻¹) e R10 (gDQO.L⁻¹) foram coletadas amostras do meio suporte com biofilme por meio de amostradores distribuídos lateralmente ao longo dos reatores (Figura 4.2). Essas partículas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS (NaCl, KCl, Na₂POH₄, KH₂PO₄) e centrifugada por 3 minutos a 3000 RPM a fim de desprender a biomassa aderida ao material suporte. Também foi feita agitação manual a fim de desprender biomassa aderida ao tubo após centrifugação.

A extração do DNA genômico da biomassa foi feita por meio da lise celular de acordo com metodologia de GRIFFTHS et al.(2000). Para tal procedimento foram empregadas pérolas de vidro (*glass beads*), solução de fenol, clorofórmio e solução tampão.

Os fragmentos de RNAr 16S foram amplificados através da reação de cadeia em polimerase (PCR) cujos primers usados foram os seguintes: 968FGC-1401R para o Domínio Bacteria (NÜBEL et al., 2006) e Parch519fGC-Arch915r para o Domínio Archaea (VISSERS et al. (2009).

O produto da amplificação da PCR foi então submetido à eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE) para ambos os domínios, Bacteria e Archaea a fim de

separar os fragmentos do DNA amplificado. Foi empregado gradiente linear de desnaturante de 45-65% (100% desnaturante: 7 M uréia e 40% (v/v) formamida deionizada). As condições da corrida foram de 75 V e 60 °C durante 16 h. Os perfis de bandas obtidos foram visualizados em câmara com transiluminador Eagle Eye III TM (Stratagene) a 254 nm e as imagens capturadas por meio de software Eagle Vista. Foi utilizado o software Bionumerics 2.5 para o cálculo do coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) a partir do perfil de bandas. O agrupamento foi realizado com o UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Average).

4.6.2 Clonagem e Sequenciamento do gene RNAr 16S

Para a realização da clonagem e sequenciamento foram coletadas amostras da biomassa nas fases de operação em que se obteve melhor produção de hidrogênio e metano. Para a clonagem e determinação da sequência RNAr 16 s foi utilizado o primer 27F-1100R (LANE, 1991) para o domínio Bacteria e primer 21F-Arch958R para o domínio Archaea (VISSERS et al., 2009). O vetor pGEM® Easy Vector System (Promega) foi empregado e transformado em célula competente de *Escherichia coli*. O DNA clonado foi então submetido à PCR empregando os primers M13F e M13R.

Os produtos de PCR foram encaminhados à MacroGen® (www.macrogen.com) para a análise das sequências de nucleotídeos. Essas sequências foram comparadas com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch>)

As árvores filogenéticas foram desenvolvidas através do software MEGA 6.0 empregando o método “*neighbor-joining*”. No método foi utilizada uma análise *Bootstrap* com 1000 replicações. As sequências desse estudo estão depositadas no GenBank com número de acesso entre KM820898 e KM820906.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a serem apresentados são os dados médios das análises em cada etapa para cada reator. A variação da composição da água residuária e a variação do tempo de detenção hidráulica foram tomados com parâmetros de comparação entre as fases para os reatores R5 (5 g.DQO.L⁻¹) e reator R10 (10g.DQO.L⁻¹). No reator R15 apenas houve comparação da variação da composição glicose/vinhaça (0%,50% e 100 de vinhaça). Para a análise da comunidade microbiana a fase com melhor comportamento para a produção de biogás foi escolhida entre os reatores R5 e R10.

5.1 Carboidratos redutores totais

Na primeira fase de operação I (0%, 6h), a glicose foi a única fonte de carbono empregada. Deste modo, todos os açúcares presentes na alimentação eram provenientes da glicose adicionada. Após a introdução da vinhaça na fase II (25%,6h) e III(75%,6h), a fonte de carbono era parcialmente da glicose e dos carbonos provenientes da vinhaça. Por fim, somente os carboidratos provenientes da vinhaça serviram como substrato orgânico para os microrganismos da fase IV (100%, 6h) em diante.

As figuras 5 e 6 mostram a concentração de carboidratos redutores totais afluente e efluente e a porcentagem de conversão ao longo das etapas do experimento. Durante a primeira etapa, a proporção de vinhaça na alimentação dos reatores variou de 0% a 100% (0, 25, 75, 100 %) sob um TDH de 6 h.

A estratégia de iniciar a operação dos reatores com substrato simples como a glicose teve o objetivo de condicionar o reator a produção de hidrogênio tendo em vista que a vinhaça é um resíduo industrial de natureza complexa. Essa complexidade dos resíduos de destilaria é devido à presença de algumas substâncias tóxicas tais como os compostos fenólicos que podem inibir a fermentação biológica da vinhaça (RIBAS, 2007). Como reportado por CHEN et al. (2008) pode-se aumentar a tolerância e a biodegradabilidade de compostos tóxicos através da adaptação prévia do meio microbiano. CHEN et al. (2008) sugerem que quatro métodos de adaptação podem ser utilizados: enriquecimento dos organismos que podem degradar os compostos tóxicos; indução de enzimas específicas para a

degradação; engenharia genética e saturação com substratos preferenciais antes da mudança a um substrato mais tóxico. Neste estudo, a última estratégia foi adotada.

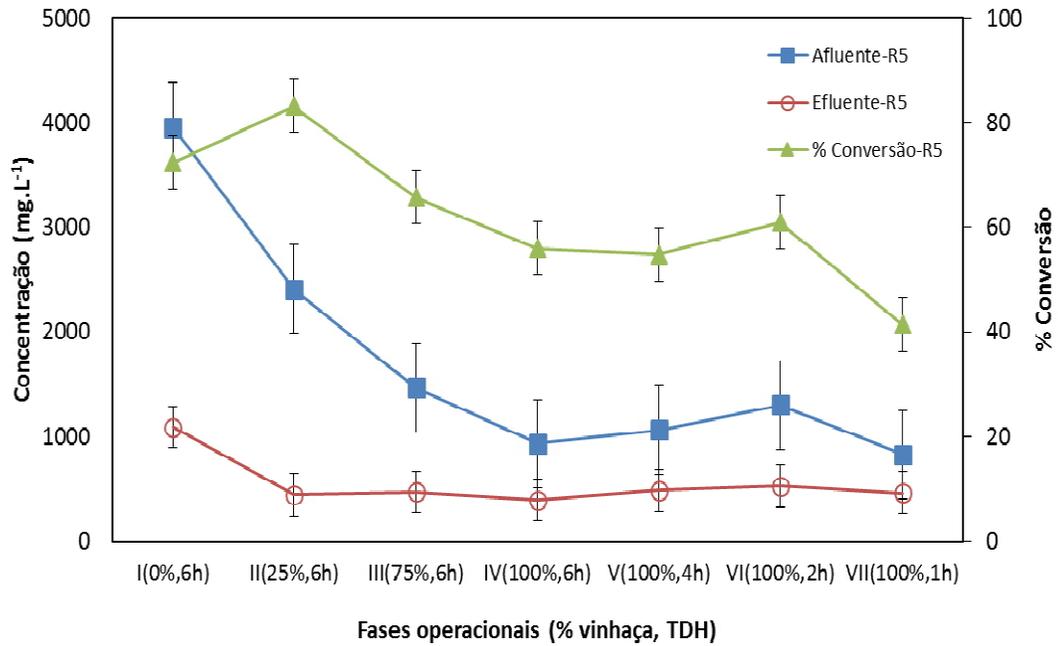


Figura 5. 1 Conversão de carboidratos redutores totais no R5 (5 g.L⁻¹)

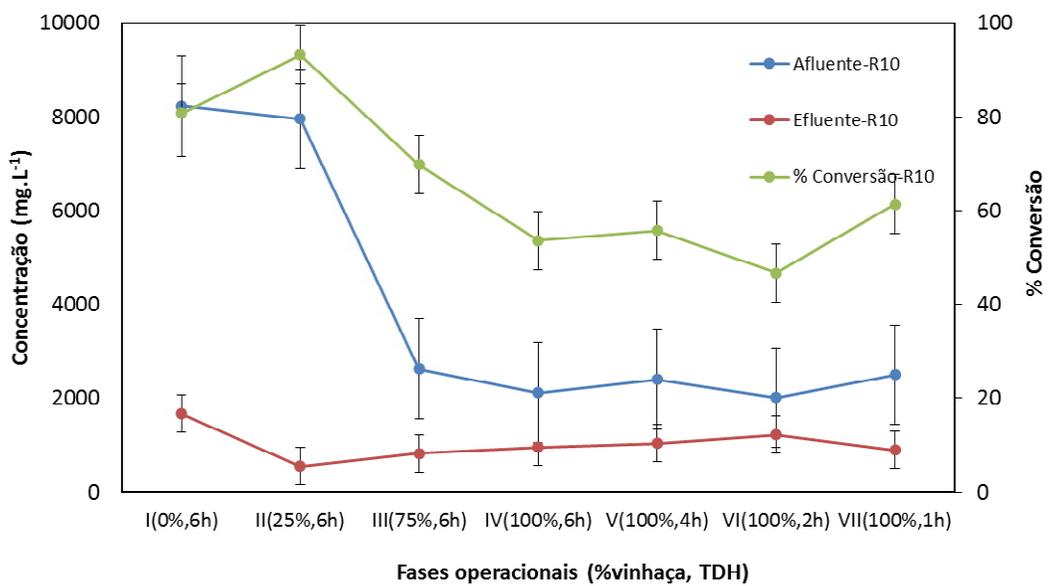


Figura 5. 2 Conversão de carboidratos redutores totais no R10 (10 g.L⁻¹)

Na fase I (0%, 6h) toda a fonte orgânica era proveniente da glicose adicionada. A conversão média para o reator R5 (5 g.L⁻¹) foi de 72 % e para o reator R10 (10 g.L⁻¹) de 81 %. Após a fase II (25%, 6h) a vinhaça foi adicionada ao afluente na proporção de 25 % da carga orgânica. Em função dessa mudança, houve uma queda na concentração de carboidratos redutores totais visto que parte da carga orgânica da vinhaça não é composta unicamente de carboidratos, assim, havia uma queda natural dessa porcentagem de carboidrato. Entretanto, houve um aumento do consumo de substratos que atingiu 83 % e 93 % no R5 e R10, respectivamente. Esse comportamento pode ser atribuído a menor disponibilidade de carboidratos no meio. Essa tendência não foi verificada quando se aumentou a carga de vinhaça para 75 e 100 % nas fases III e IV, respectivamente. A conversão de carboidratos caiu para 56% no R5 (5 gDQO.L⁻¹) e para 55 % no R10 (10 gDQO.L⁻¹) na fase IV (100 % vinhaça). Quando a vinhaça passou à condição de substrato principal, questões relativas ao poder recalcitrante do resíduo podem ter dificultado o consumo dos carboidratos presentes pelos microrganismos.

Na segunda etapa de operação foi realizada a redução do tempo de detenção hidráulica para 4, 2 e 1 h. Como não houve variação da composição da alimentação, ou seja, vinhaça foi 100 % da carga orgânica, não houve variação significativa da concentração inicial de carboidratos totais redutores a qual permaneceu estável. Assim, a taxa de consumo permaneceu estável apesar da variação do TDH e, conseqüentemente, da taxa de carregamento orgânico. Porém, a conversão na última fase apresentou valores distintos entre o R5 e R10. No R5 (5 g.L⁻¹), diante da variação do TDH de 2 a 1 h, foi verificada uma queda no consumo de carboidratos de 60 a 40 %. Já no R10 (10 g.L⁻¹), houve um aumento no consumo de 46 a 61 %. Esse comportamento antagônico mostra que condições de grandes diluições (baixos tempos de detenção hidráulica) podem favorecer o consumo de substrato quando a vinhaça é a única fonte orgânica.

Poucos trabalhos realizados com vinhaça ou efluentes similares realizaram o mesmo processo de adaptação do reator à produção de hidrogênio através da adição gradual de substrato complexo e substrato simples. Assim, não há dados na literatura que possam ser comparados no que se refere ao consumo de carboidratos redutores.

Quando se analisa com trabalhos para a produção de hidrogênio a partir de substratos simples tem-se que os valores médios de consumo de carboidratos na fase I (0%, 6h) foi abaixo do esperado: R5 (72 %) e R10 (81 %). LIN et al. (1999) obtiveram consumos de carboidratos na faixa de 99%. FANG et al. (2002) obtiveram consumo de 90 % também sob o TDH de 6 h. OH et al. (2003) obteve 99 % de consumo de glicose em reatores em modo

batelada. Empregando reatores de leito fluidizado realizados com o mesmo tipo de lodo tem-se SHIDA *et al.* (2009) com conversões entre 92,06 e 98,08%. AMORIM *et al.* (2009) com conversões acima de 90%. BARROS *et al.* (2010) obtiveram conversões entre 70,50 e 96,30%. REIS *et al.* (2011) atingiram conversões de 90 % sob TDH de 6 h.

Trabalhando com vinhaça proveniente do processo de produção de tequila, ESPINOZA-ESCALANTE *et al.* (2009) obtiveram diferentes taxas de consumo de açúcares redutores totais em função das condições operacionais empregadas. Os pesquisadores variaram o pH, a temperatura e o TDH e assim, através de situações de planejamento experimental otimizaram as melhores condições para, entre outros dados, o melhor consumo de carboidratos redutores. Segundo os autores o TDH é o fator maior importante para essa variável. No pH 4,5, temperatura mesofílica de 35 °C e TDH de 1 dia os pesquisadores obtiveram um consumo de 65,4 %, porém no pH 6,5, temperatura de 55 °C e TDH de 5 dias foi possível atingir 100 % de consumo de substrato. O valor médio de consumo de substrato obtido quando se utilizou somente vinhaça IV(100%,6h) foi 56 % para o R5 e 54 % para o R10. As diferenças podem ser atribuídas às diferentes condições aplicadas e aos diferentes inóculos empregados.

Diferentemente do trabalho de ESPINOZA-ESCALANTE *et al.* (2009) em que o TDH foi fator preponderante, a variação do TDH na segunda fase teve influência pouco pronunciada na conversão de carboidratos.

A fim de avaliar uma concentração de vinhaça mais elevada na alimentação foi também empregado um novo reator sob a concentração de 15 g.L⁻¹ e sob o tempo de detenção hidráulico de 8 h. A figura 5.3 ilustra o comportamento do consumo de carboidratos em função do aumento da concentração de vinhaça na alimentação.

A estratégia de início com glicose também foi executada, porém, já se partiu a uma concentração maior de vinhaça na segunda etapa (50%). Em função disso é esperada essa redução dos carboidratos redutores à medida que se adiciona vinhaça ao sistema. Porém, houve um aumento do consumo de carboidratos na segunda etapa (50% Glicose/50%Vinhaça) atingindo valores em torno de 80%. Esse consumo se manteve estável na etapa em que vinhaça foi o único substrato no reator R15 (15 g.DQO L⁻¹).

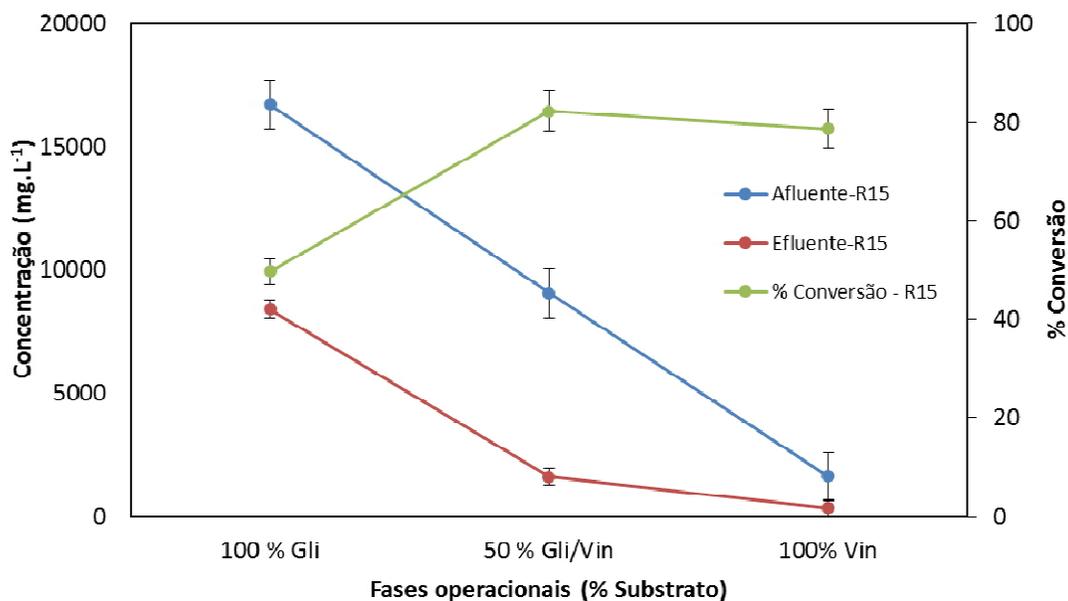


Figura 5. 3 Conversão de carboidratos redutores totais no R15 (15 g.L⁻¹)

5.2 Demanda química de oxigênio

As figuras 7 e 8 apresentam o perfil de remoção média de demanda química de oxigênio em função das fases de operação. Em processos fermentativos acidogênicos, a remoção de DQO costuma ser pequena, em torno de 20 % tendo em vista que parte matéria orgânica consumida é convertida em ácidos orgânicos, uma pequena parte é convertida em biomassa e dióxido de carbono. Assim, apenas em processos metanogênicos, costuma-se ter remoção de DQO acima de 80 %.

Na figura 7, observa-se que a medida que se introduz vinhaça na primeira fase, há uma queda do percentual de remoção de DQO no R5(5gDQO.L⁻¹). Mesma tendência foi verificada na figura 8 para o R10 (10 gDQO.L⁻¹).

Na fase I(0%,6h) e fase II(25%,6h) a remoção média de DQO foi de 23% para ambos os reatores. Entretanto, quando a vinhaça se torna o substrato orgânico majoritário, a partir da fase II(75%,6h), é verificada uma queda do percentual de remoção de DQO em torno de 6 %. A vinhaça, devido à presença de compostos orgânicos de alto peso molecular os quais são pouco biodegradáveis, apresenta uma dificuldade de remoção de DQO da mesma forma como no consumo de açúcares redutores totais (SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011).

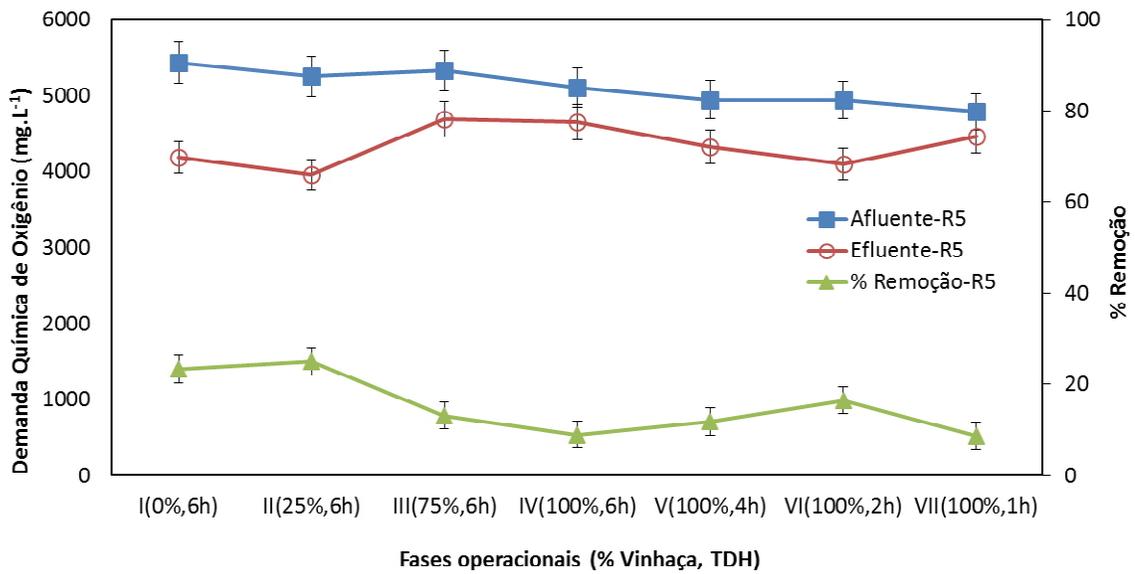


Figura 5. 4 Demanda química de oxigênio no reator R5 (5 g.L⁻¹)

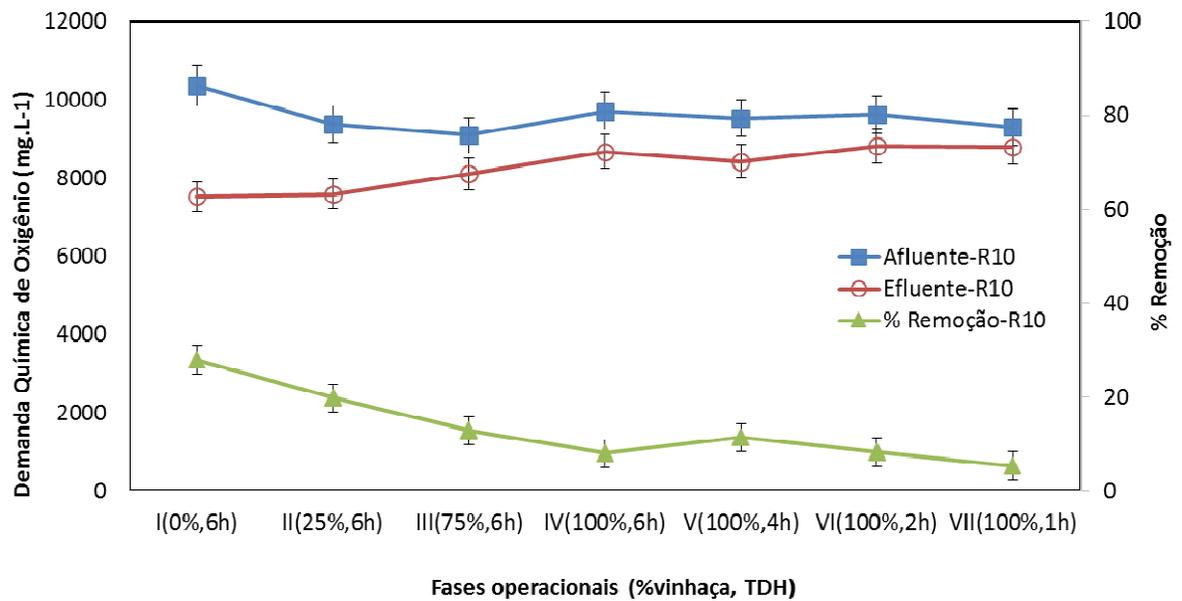


Figura 5. 5 Demanda química de oxigênio no reator R10 (10 g.L⁻¹)

MOHAN et al. (2008) obtiveram remoções de DQO em torno de 70 % ao trabalharem com reator em modo batelada seqüencial sob um TDH de 24 h. SEARMSIRIMONGKOL et al. (2011) obtiveram uma remoção de 27, 30 e 32 % também em reator em modo batelada seqüencial nas diferentes concentrações, 20 (TDH =13), 40 (TDH=16), 60 (TDH=32) g.L-1, respectivamente.

A baixa taxa de remoção de DQO também pode ser atribuída aos baixos tempos de detenção hidráulica empregados neste estudo: 6, 4, 2 e 1 h. Águas residuárias complexas em geral necessitam de um tempo maior a fim de que ocorra a degradação ótima do material.

Da mesma forma foi avaliada a remoção de DQO no R15 diante da variação da alimentação entre glicose e vinhaça. A figura 5.6 ilustra o comportamento do consumo de carboidratos em função do aumento da concentração de vinhaça na alimentação. A alta complexidade da vinhaça e da alta carga ficou evidenciada pelo baixo valor de redução de DQO pelo sistema que variou entre 3 e 6 %.

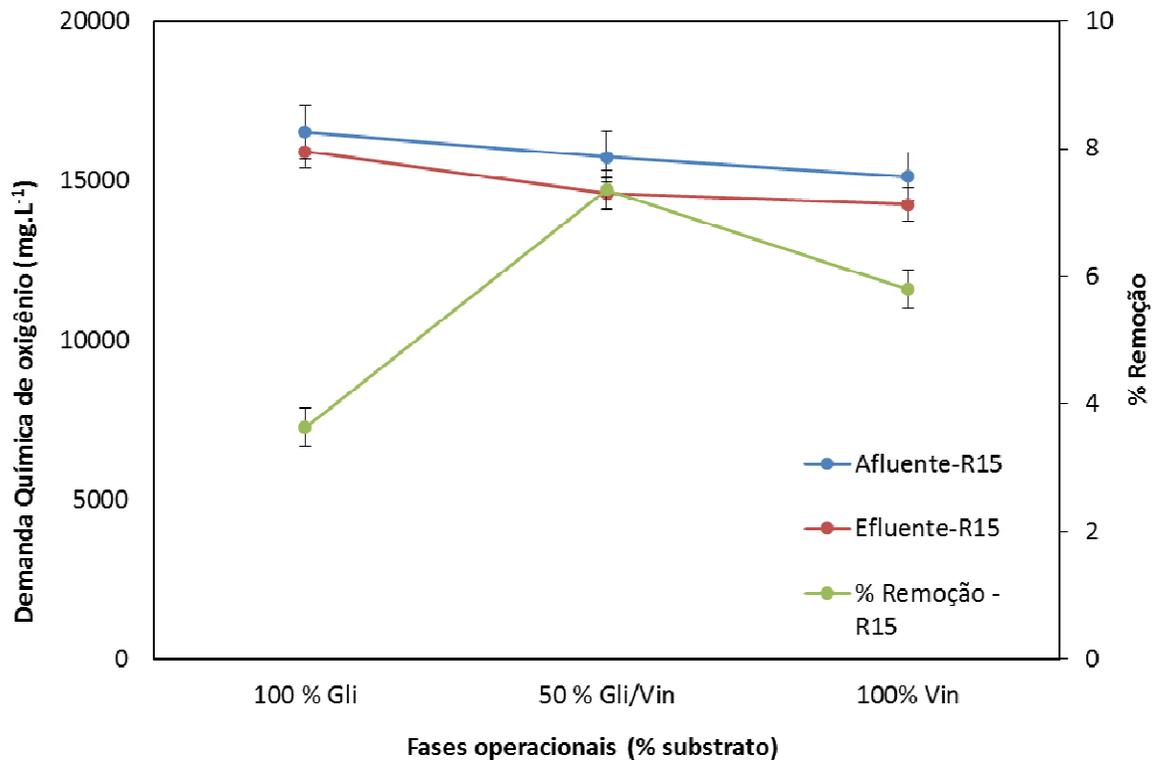


Figura 5. 6 Demanda química de oxigênio no R15 (15 g.L⁻¹)

5.3 Produção de biogás

5.3.1 Conteúdo de hidrogênio

As figuras 5.7 e 5.8 ilustram a composição média do biogás formado pelos reatores R5 (5 gDQO.L^{-1}) e R10 (10 gDQO.L^{-1}) nas fases estudadas. Na fase I(0%,6h) apenas glicose era a fonte orgânica e o biogás foi formado unicamente por hidrogênio e dióxido de carbono. Esse comportamento permaneceu na fase II(25%,6h) e na fase III(75%,6h) apesar da introdução de vinhaça na alimentação. Na fase IV(100%,6h) quando unicamente a vinhaça era a fonte orgânica houve uma mudança na produção do biogás com o aparecimento de metano. Como consequência, houve uma diminuição do conteúdo de hidrogênio no biogás que passou de 27 % na fase I(0%,6h) a em torno de 12 % na fase IV(100%,6h). No reator R10 o conteúdo de biogás teve um comportamento estável entre as fases I e IV variando entre 24% a 32 %. Todavia, também houve aparecimento de metano na fase IV.

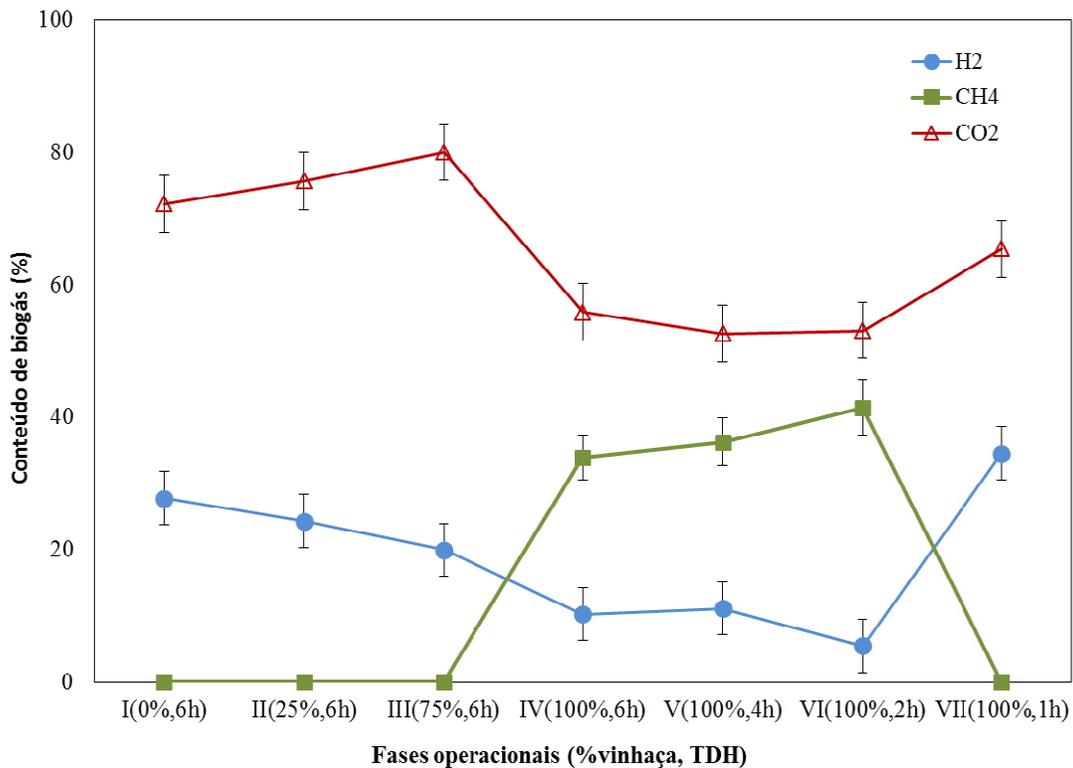


Figura 5. 7 Conteúdo de biogás nas fases operacionais no reator R5 (5 gDQO.L^{-1})

A partir da fase V (100%,4h) houve a redução do TDH e queda do percentual de H₂ no biogás. Atingindo valor mínimo de 5 % no reator R5 (5 gDQO.L⁻¹). O percentual de metano variou entre 31 % e 41 % neste reator. Na última fase sob o TDH de 1h, houve a cessão da produção de metano pelo reator, de modo que o conteúdo de H₂ se reestabeleceu e chegou a 34 %. No reator R10 (10 gDQO.L⁻¹) a produção de metano persistiu apesar da redução do TDH, mesmo sob condições hidrodinâmicas mais turbulentas como no TDH de 1 h. A concentração variou entre 14 % e 31 %, sendo máximo na fase VI sob o TDH de 2 h.

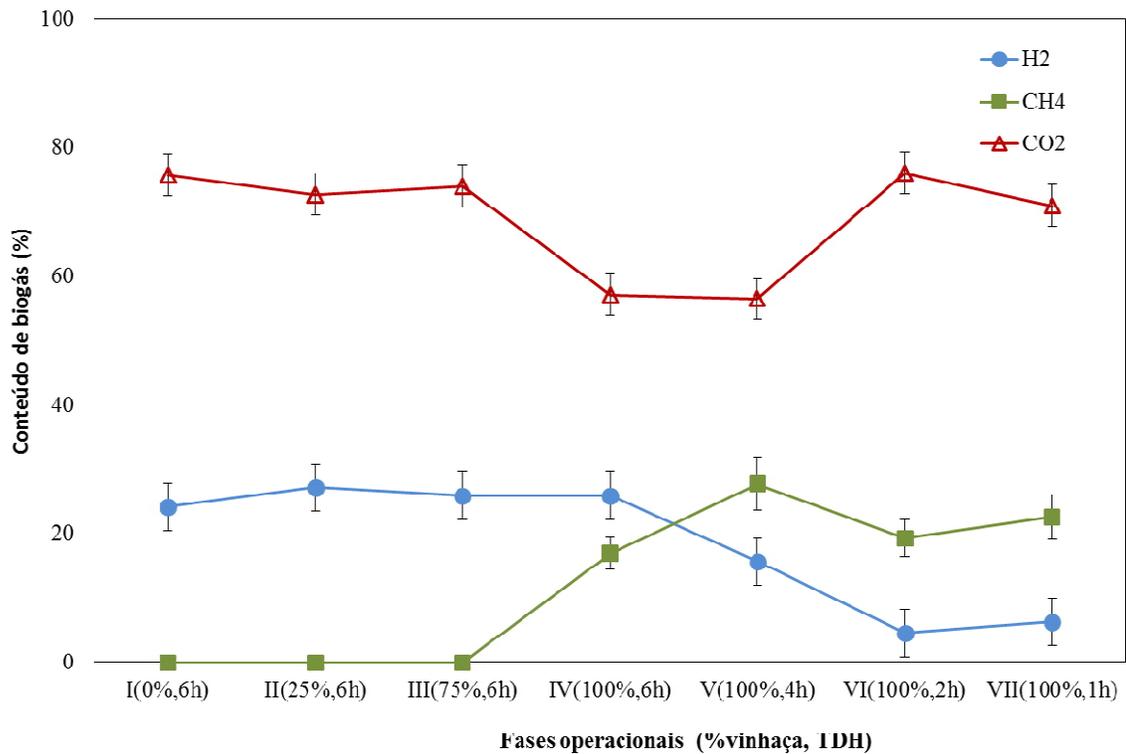


Figura 5. 8 Conteúdo de biogás nas fases operacionais no reator R5 (5 gDQO.L⁻¹)

Durante a produção fermentativa de hidrogênio o ponto chave é a inibição da etapa metanogênica a fim de que o hidrogênio formado não seja consumido para a formação de metano. Estima-se que para a produção de um mol de metano sejam consumidos quatro moles de H₂ segundo a equação (1):



Duas vias podem levar a formação de metano: a via acetoclástica a partir de ácido acético e metanol (microrganismos metanogênicos acetoclásticos ou acetotróficos) e a via hidrogenotrófica a partir de H₂ (microrganismos consumidores de hidrogênio ou hidrogenotróficos).

Dentre as formas de controle da atividade metanogênica tem-se a manutenção do pH em condições ácidas e o tratamento do inóculo a fim de inativar os microrganismos metânogênicos (OH et al. 2003). Em geral, as arqueias metanogênicas são inibidas em pH abaixo de 6. Entretanto, há trabalhos que ilustram a produção de metano em pH baixo. KIM et al. (2006a) realizaram um estudo acerca da influência do pH na atividade das metanogênicas utilizadoras de hidrogênio. Segundo os autores, o metano formado partiu das bactérias consumidoras de hidrogênio, as quais, entretanto, são comumente inibidas em pH abaixo de 5,0. Assim, as bactérias-consumidoras de hidrogênio são mais tolerantes às condições ácidas do que outros microrganismos produtores de metano.

Da mesma forma que a manutenção do pH em condições ácidas não é garantia da inativação dos microrganismos metanogênicos, o tratamento térmico do inóculo também não é conclusivo. A exemplo, os microrganismos acetoclásticos podem sobreviver a choques térmicos, levando ao consumo de hidrogênio para formação de ácido acético (OH et al., 2003). O ácido acético formado é então convertido a metano. No presente estudo, apesar de ter sido realizado o tratamento térmico do inóculo (90°C por 10 min) a produção de metano não foi inativada após a fase IV (100%, 6h).

O substrato orgânico é outro fator que pode afetar a comunidade microbiana, e assim, modificar os produtos finais no biogás. A depender da fonte orgânica utilizada pode haver um favorecimento de determinadas comunidades microbianas. No presente estudo foi verificada a variação da composição do biogás quando houve a mudança do substrato orgânico empregado de uma mistura glicose/vinhaça (fases I (0%,6h), II, (25%,6h), III (75%,6h) para uma composição de somente vinhaça (fase IV (100%, 6h)). A mudança de glicose, substrato simples e de fácil degradação para a vinhaça, um substrato complexo levou o reator de uma fase acidogênica para uma condição metanogênica. Sendo assim, um indicativo que comunidades metanogênicas antes inibidas encontraram condições ótimas para o seu desenvolvimento. Do mesmo modo, Xia et al. (2012) utilizando ensaios em batelada verificaram que o uso de um co-substrato facilitava a conversão de celulose em biogás e que havia uma pré-disposição de alguns microrganismos por determinados substratos. Assim, com uma mistura de celulose/xilose houve consumo de 31 % da celulose com produção de metano enquanto que na mistura celulose/glicose esse consumo foi de 16 % com produção de

hidrogênio. Entretanto, quando somente celulose foi utilizada, não houve consumo do substrato. CHAGANTI et al (2012) verificaram que o uso de misturas de carboidratos (glicose/xilose) foi melhor ao rendimento de hidrogênio que o uso de culturas separadas de glicose e xilose.

Ainda na questão do substrato, TOKUMOTO e KASHIWAGI (2012) verificaram que havia uma mudança do tipo de fermentação a partir de glicerol em função da variação do carboidrato utilizado como co-substrato orgânico promotor da fermentação. Para os autores a produção de metano é favorecida em escala decrescente por: galactose, ácido galacturônico, manose, arabinose e glicose. Ademais, a adição de glicose pode favorecer as bactérias produtoras de hidrogênio em detrimento dos microrganismos metanogênicos, gerando, assim, maior volume de hidrogênio. No mesmo estudo, os autores verificaram que a glicose atua como promotor da fermentação do glicerol, aumentando o consumo do glicerol em comparação a experimentos em que o glicerol é a única fonte orgânica. Realizando um paralelo com o presente estudo, quando foi realizada a troca gradual de glicose por vinhaça houve uma alteração na composição do biogás com o aparecimento de metano na fase IV (100%,6h). Nesta fase foi retirada a parcela de glicose e somente vinhaça foi a fonte orgânica para os reatores R5 (5 g.L⁻¹) e R10 (10 g.L⁻¹).

Segundo OH e MARTIN et al. (2014) a disponibilidade de glicose no sistema, ou de carboidratos em geral, pode facilitar ou dificultar a presença de determinadas populações no meio. Assim, quanto maior a fração molar de glicose, mais difícil é a manutenção de microrganismos hidrogenotróficos, todavia aumenta as chances de presença de microrganismos acetoclásticos. De modo contrário, quanto menor for a disponibilidade de glicose pelo sistema, maior a capacidade de desenvolvimento de arqueias hidrogenotróficas. Como foi apresentado no item anterior, o conteúdo de glicose no sistema diminuía a medida que se adicionava vinhaça na alimentação. Essa variação do substrato, pode ter possibilitado a adaptação das arqueias no sistema,

Do mesmo modo que neste estudo, outros trabalhos realizados com resíduos provenientes de destilaria também verificaram a produção de metano conjunta com hidrogênio. ESPINOZA-ESCALANTE et al. (2008) verificaram a produção de metano juntamente com hidrogênio ao empregaram vinhaça do processamento de agave para produção de tequila. Apesar do pH mais baixo (4,5), houve condições para a produção de metano. BUITRON e CARVAJAL (2010) também ao empregarem a vinhaça de Tequila para a produção de hidrogênio verificaram a produção de gás metano (35-44%) concomitante com a produção de hidrogênio quando se empregou o TDH de 24 h. Eles verificaram que quanto

maior a concentração de vinhaça, maior o percentual de metano atingido. De acordo com os autores poderiam existir microrganismos metanogênicos já presentes na vinhaça e que diante da fonte de ácidos orgânicos e H_2 produzidos pelo reator encontraram um ambiente propício ao desenvolvimento. Com a diminuição do TDH pela metade a 12 h, a produção de metano foi cessada. Possivelmente, os microrganismos metanogênicos eram lavados do reator sob essa condição hidrodinâmica. SEARMISIRIMONGKOL et al. (2011) também produziram metano sob uma condição acidogênica. Foi verificado que quanto maior a carga orgânica aplicada, menor o percentual de metano gerado. Assim, sob uma concentração de 20 gDQO.L^{-1} , ao se diminuir o TDH de 32 a 13 h, a porcentagem média de metano caía de 37 % a 6,5 %, enquanto que o conteúdo de hidrogênio atingia um máximo de 29,6 %. Segundo os autores, essa supressão de metano foi devido ao sistema apresentar um meio favorável a etapa acidogênica com alta produção de ácidos voláteis. Além disso, a presença de compostos xenobióticos presentes na vinhaça poderiam ser um dos fatores inibitórios para a produção de metano quando a carga se tornou elevada. No presente estudo, de modo similar, com a diminuição do TDH de 2 a 1 h, a produção de metano pelo reator R5 cessou. A partir de outro resíduo complexo, THANWISED et al. (2012) ao estudarem a produção de hidrogênio a partir da água de residuária de tapioca verificaram a produção de metano durante o processo acidogênico. De acordo com os autores, o aumento da concentração de metano (0,63 a 3,7 %) no biogás gerados em três diferentes TDH foi possível devido à presença de arqueias metanogênicas no processo, no qual elas podem ter sobrevivido e se adaptado a produzir metano em baixos TDH. Segundo os autores, metanogênicas tolerantes ao pH ácido (Methanobacteriaceae, Methanomicrobiales e Methanosarcinaceae) são capazes de sobreviver em pH 4,4.

O aparecimento de metano durante o presente estudo a partir da fase IV(100%,6h) pode ser atribuído à presença de arqueias metanogênicas no próprio resíduo de vinhaça. A vinhaça recolhida na indústria pode carregar consigo esses microrganismos os quais diante de condições favoráveis de desenvolvimento como a presença de ácidos orgânicos podem ter encontrado o ambiente favorável ao desenvolvimento apesar das condições de baixo pH e TDH. De acordo com HWANG et al (2004) se as metanogênicas, em especial as metanogênicas hidrogenotróficas, estiverem ativas em reatores acidogênicos, o processo de produção de hidrogênio tende a falhar tendo em visto que o hidrogênio pode ser convertido em metano.

Apesar de ser um fator limitante para a produção de hidrogênio, a geração conjunta de metano pode ser uma alternativa aos processos em duplo-estágio a fim de

otimizar a produção de metano. É possível também agregar valor ao metano produzido conjuntamente com hidrogênio nos processos acidogênicos. A exemplo, essa mistura de gases é chamada por alguns de hitano, uma mistura em volume de 20 % de H₂ e CH₄ e patenteada por Hydrogen Consultants Inc (Bauer e Forest, 2001). Segundo BAUER e FOREST, a presença de hidrogênio no gás natural utilizado como combustível veicular ajuda no desempenho do motor e ajuda na diminuição da emissão de gases poluentes. Assim, a geração biológica conjunta de metano e hidrogênio pode servir como nova fonte para esta mistura de combustíveis.

Além da variação da concentração de vinhaça e do tempo de detenção hidráulica nos reatores R5 e R10, também foi avaliada a produção de biogás no reator R15 (15 g.L⁻¹). A figuras 5.11 ilustram a composição do biogás diante do aumento da porcentagem de vinhaça no reator.

Com a variação da composição da alimentação de 100% de glicose para uma mistura de 50 % glicose e 50 % vinhaça foi verificada uma diminuição do conteúdo de hidrogênio no biogás que passou de 22 % a 9% de H₂. Quando a vinhaça se tornou o único substrato houve um reestabelecimento nessa composição e atingiu 36 % de H₂. Diferentemente dos reatores R5 e R10, não houve geração de metano. O reator R15 foi mantido por um tempo menor de tempo (152 dias) e sob um TDH maior (8 h).

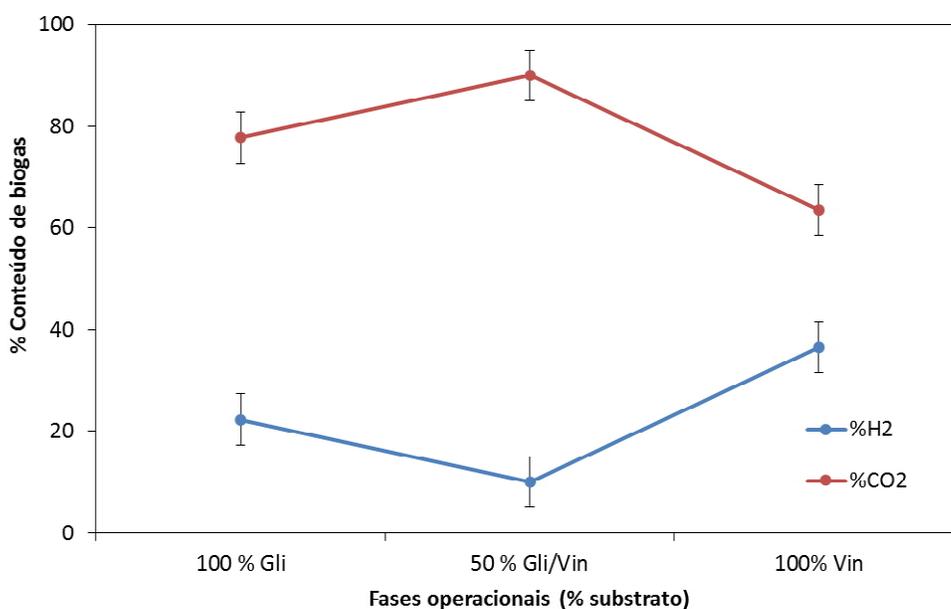


Figura 5. 9 Conteúdo de biogás no reator R15 (15 g.DQO.L⁻¹) sob TDH de 8 h

5.3.2 Produção volumétrica de H₂ e rendimento de H₂

As figuras 10 e 11 ilustram a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento de hidrogênio em função da carga orgânica adicionada para as fases empregadas nos reatores R5 e R10.

Em ambos os reatores a produção volumétrica de H₂ apresentou uma queda em virtude da adição de vinhaça na alimentação dos reatores. Isso indica que os reatores sofreram impacto no que se refere à adição de um substrato complexo. Em trabalho prévio realizado, empregando o mesmo tipo de reator e inóculo e utilizando glicose como substrato orgânico, REIS e SILVA obtiveram uma produção volumétrica de hidrogênio máxima de 0,4 L.h⁻¹.L⁻¹ na mesma condição de TDH de 6 h. Esse valor é três vezes menor ao obtido no presente estudo sob o TDH de 6 h no reator R5 na fase em que se empregou somente glicose bem como na fase que havia uma mistura 75% glicose-25% vinhaça (0,13 L.h⁻¹.L⁻¹).

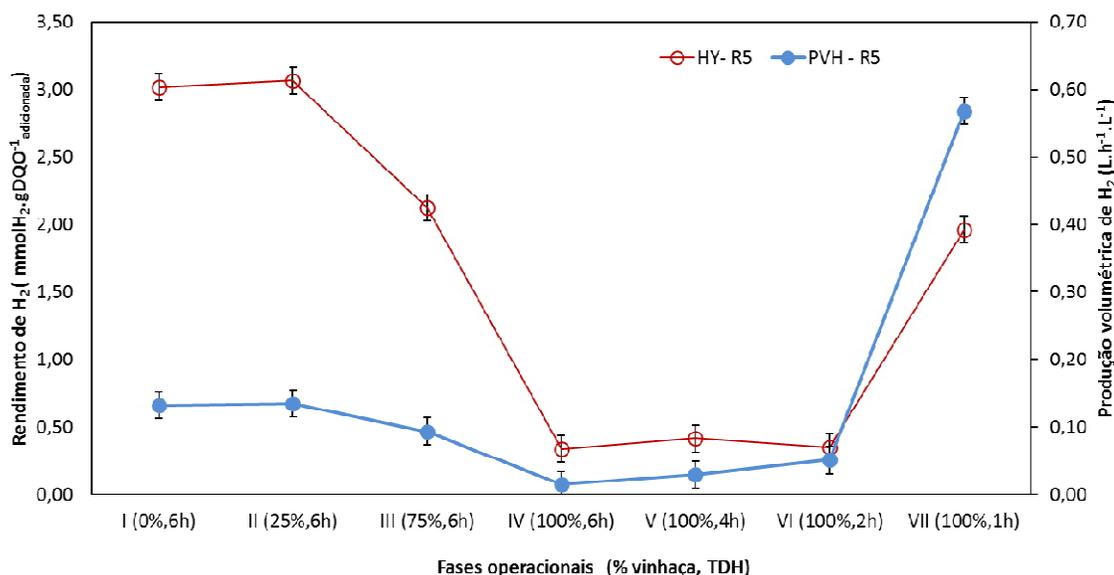


Figura 5. 10 Produção volumétrica de H₂ e rendimento de H₂ no reator R5 (5 gDQO.L⁻¹)

O rendimento de hidrogênio em função da carga orgânica aplicada apresentou um comportamento irregular ao longo das etapas de adição de vinhaça (I-V,6h). Os reatores apresentaram entre si, também, um comportamento distinto. No R5 (5 g.DQO.L⁻¹) o rendimento de hidrogênio atingiu um pico quando a vinhaça foi 75% da carga orgânica,

atingindo $3,07 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$ adicionada. Assim, observa-se que a glicose agiu como agente propulsor do consumo da matéria orgânica presente. Todavia, em virtude do aparecimento do metano, esse rendimento caiu de modo significativo na IV (100%, 6h), atingindo $0,3 \text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}$ adicionada. No R10 (10 g.DQO.L^{-1}) também foi verificado um pico de rendimento na fase II(25%,6h) e em virtude do aparecimento de metano, houve a redução em torno de 50 % na fase IV(100%,6h).

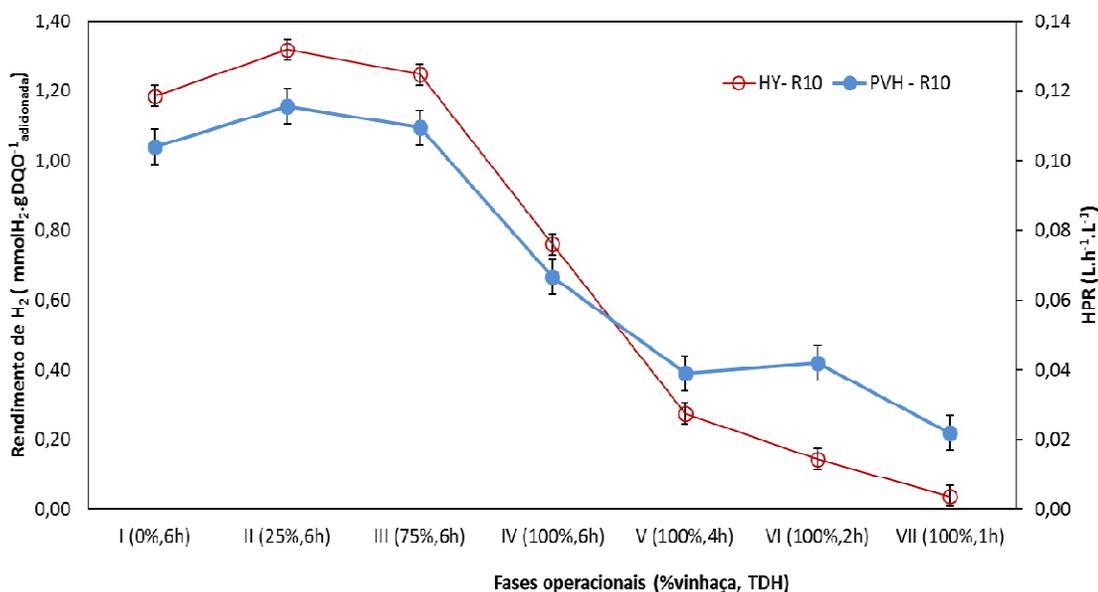


Figura 5. 11 Produção volumétrica de H₂ e rendimento de H₂ no reator R10 (10 gDQO.L^{-1})

Após a introdução gradativa da vinhaça através do auxílio de um co-substrato sob um TDH fixo de 6 h e uma taxa de carregamento orgânico média de $20 \text{ kg.DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no R5 e de $40 \text{ kg.DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, no R10 foi feita a redução do TDH a 4, 2 e 1 hora a fim de verificar a condição ótima de operação do reator anaeróbico operando unicamente com vinhaça como fonte orgânica para a produção de biogás.

Foi verificado no reator R5 (5 g.DQO.L^{-1}) um aumento da produção volumétrica de hidrogênio com a diminuição do TDH a 4, 2 e 1 h em virtude do aumento da produção volumétrica de biogás, independentemente da produção concomitante de metano. A produção volumétrica de hidrogênio variou de 0,01 a $0,57 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Porém, diante da presença de metano nas fases IV (100%, 6h), V(100%,4h) e VI(100%,2h) o rendimento de hidrogênio foi reduzido em mais de 80 %. Na fase VII(100%,1h) houve o desaparecimento da produção

de metano e o rendimento de hidrogênio do reator operado com vinhaça aumentou aos dados da primeira fase em torno de $1,96 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1} \text{DQO}_{\text{adicionada}}$. Isso indica o bom rendimento do reator anaeróbio de leito fluidizado para a produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar quando a produção de metano é inibida. O melhor rendimento quando se operou o reator unicamente com vinhaça foi de $1,96 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{gDQO}^{-1} \text{DQO}_{\text{adicionada}}$.

O reator R10 (10 g.DQO.L^{-1}) foi progressivamente diminuindo a produção volumétrica de hidrogênio a medida que se diminuía o TDH. É importante ressaltar que o metano persistiu em todas as fases que a vinhaça foi o único substrato orgânico. Da mesma forma, o rendimento de hidrogênio apresentou uma tendência de queda com a diminuição do TDH. O valor mínimo foi obtido na fase VII (100%, 1 h) atingindo $0,02 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{adicionada}}$. Sob o TDH de 1 h, ao contrário do que ocorreu no reator R5, não houve a interrupção da produção de metano.

A figura 5.12 ilustra a produção de biogás e o rendimento de hidrogênio no reator R15(15 gDQO.L^{-1}). A alta concentração aplicada nesse reator não foi favorável a produção de hidrogênio diante da introdução de vinhaça ao sistema. Como verificado na situação em que tem-se 50 % glicose/50 % vinhaça tanto a produção volumétrica quanto o rendimento de H_2 sofreram uma redução em torno de 50 %, sendo mais brusco esse efeito no rendimento. SANTOS et al. (2014 a) também verificaram esse comportamento quando foi feita o aumento da carga orgânica do sistema de produção de H_2 a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em reator anaeróbio fluidizado termofílico. Os pesquisadores observaram uma redução do rendimento de hidrogênio de 2,86 a $0,79 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{adicionada}}$ quando aumentaram a concentração de vinhaça de 10 g.L^{-1} a 30 g.L^{-1}

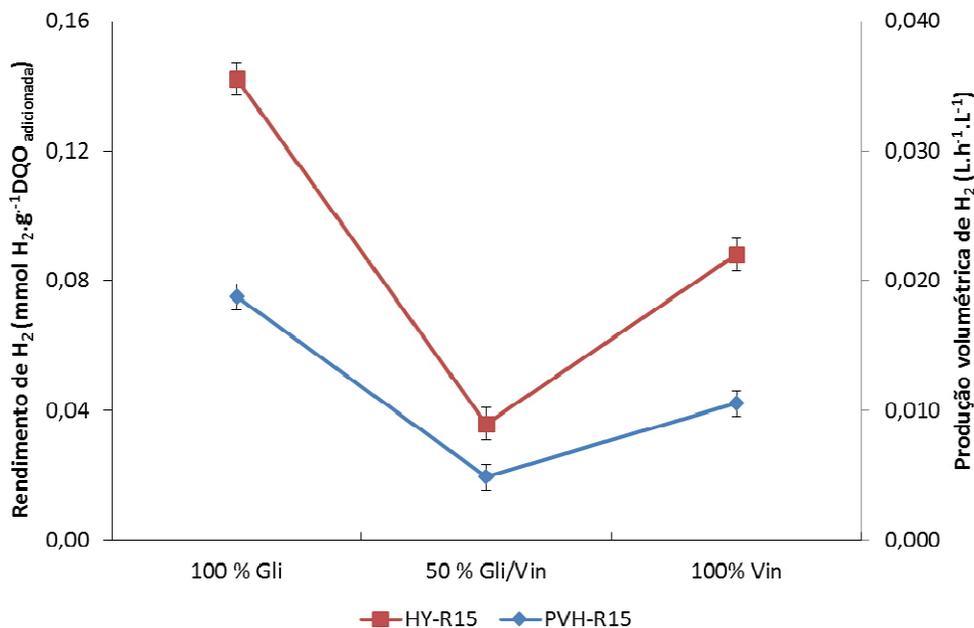


Figura 5. 12 Produção volumétrica de H₂ e rendimento de H₂ no reator R15 (15 gDQO.L⁻¹) sob TDH de 8 h.

A Tabela 5.1 apresenta uma comparação entre os três reatores empregados em relação aos seguintes parâmetros: taxa de carregamento orgânico, produção volumétrica de hidrogênio, rendimento de hidrogênio e conteúdo de biogás. Analisando o comportamento geral dos reatores observa-se que a melhor produção volumétrica foi obtida sob a condição de TDH de 1 h e com uso de vinhaça como única fonte de carbono na concentração de 5 g.DQO.L⁻¹. O melhor rendimento de hidrogênio foi obtido também para o reator R5 (5 g.DQO.L⁻¹) sob o a condição em que havia 75% de vinhaça e 25% de glicose sob o TDH de 6 h. Em todas as fases operacionais o reator R5 se sobressaiu sobre os demais a exceção da fase IV(100%,6h) no reator R10.

Tabela 5. 1 Comparação da produção volumétrica de H₂ e do rendimento de hidrogênio nos reatores R5 (5 g.DQO.L⁻¹), R10 (5 g.DQO.L⁻¹) e R15 (5 g.DQO.L⁻¹).

R5 (5gDQO.L⁻¹)	TCO teórica (kg/m³.d)	TCO real (kg/m³.d)	PVH (L/h/L)	HY (mmolH₂/ gDQO_{adicionada})	HY (mmolH₂/ gDQO_{removida})
I (0%,6h)	20	46,95	0,13	3,02	18,66
II (25%,6h)	20	46,99	0,13	3,07	14,74
III (75%,6h)	20	46,99	0,09	2,12	34,27
IV (100%,6h)	20	46,99	0,01	0,34	4,87
V (100%,4h)	30	75,85	0,03	0,41	3,07
VI (100%,2h)	60	155,66	0,05	0,35	1,96
VII 100%,1h)	120	310,13	0,57	1,96	18,37
R10 (10gDQO.L⁻¹)					
I (0%,6h)	40	93,90	0,10	1,19	4,80
II (25%,6h)	40	93,98	0,12	1,32	5,46
III (75%,6h)	40	93,98	0,11	1,25	6,60
IV (100%,6h)	40	93,98	0,07	0,76	5,74
V (100%,4h)	60	151,71	0,04	0,28	1,75
VI (100%,2h)	120	311,33	0,04	0,14	1,23
VII (100%,1h)	240	620,27	0,02	0,04	0,32
R15 (15g.DQO.L⁻¹)					
100 % Gli	45	80,82	0,019	0,15	4,09
50 % Gli/Vin	45	82,29	0,005	0,04	0,33
100% Vin	45	76,40	0,011	0,10	0,65

Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com a literatura em produção de hidrogênio a partir de resíduos complexos.

Empregando água residuária de indústria de laticínios, MOHAN et al. (2008b) observaram a diminuição do rendimento de H₂ de 0,018 a 0,010 mmolH₂. g⁻¹DQO_{adicionada} em função do aumento da carga aplicada de 2,4 a 4,7 kg.m⁻³.d⁻¹. GAHDE et al. (2014) verificaram um rendimento de 10,95 mmolH₂. g⁻¹DQO_{removida} na melhor condição de produção de H₂ a partir de água residuária de laticínios. Em comparação com o presente estudo, na melhor condição para a geração de biogás foi obtido um rendimento em termos de carga orgânica removida de 18,37 mmolH₂. g⁻¹DQO_{removida} na fase VII no reator R5.

A partir de resíduos de destilaria, BUITRON et al. (2010) sob 35 °C e TDH de 12 h atingiram um rendimento de 0,36 mmolH₂.gDQOr⁻¹ (17mLH₂.gDQO⁻¹.d⁻¹). MOHAN et al. (2011) atingiram 1,60 mmolH₂.g⁻¹DQO_{removida}. SEARMSIRIMONGKOL et al. (2011) obtiveram 6,77 mmolH₂. g⁻¹DQO_{removida} em reator operado em modo batelada sequencial. FERNANDES et al. (2010) obtiveram um rendimento máximo de 25 mmolH₂.g⁻¹DQO_{adicionada}

em ensaio em batelada para geração de biogás a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. INTANOO et al.(2012) em reator em modo batelada sequencial atingiram rendimento de 3,70 mmolH₂. g⁻¹DQO_{removida} sob a temperatura de 55 °C a partir de resíduos de destilaria. MISHRA e DAS (2014) obtiveram um rendimento máximo em reator em modo batelada para produção de hidrogênio a partir de vinhaça 5,85 mmolH₂. g⁻¹DQO_{removida} quando se adicionou levedura ao sistema a fim de impulsionar a fermentação. LAZARO et al. (2014) em reatores operados em batelada atingiram rendimentos máximos de 2,23 mmolH₂. g⁻¹DQO_{adicionada} sob a temperatura de 37 °C e de 2,31 mmolH₂. g⁻¹DQO_{adicionada} sob a temperatura de 55 °C.

A Tabela 5.2 apresenta alguns dados relativos a produção biológica de hidrogênio a partir de efluentes provenientes de águas residuárias de destilarias de álcool e de bebidas.

Tabela 5. 2 Trabalhos em produção de H₂ a partir de resíduos de destilaria/açúcar nas condições ótimas para a geração de biogás

Reator	Inóculo, pré-tratamento	Substrato	Concentração	TDH, pH, Temperatura	Rendimento de H ₂	Produção volumétrica de H ₂	Principais metabólitos	Referência
ASBR	Lodo de UASB, tratamento térmico+ácido	E.D	9,6 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	24 h, 6, 28 °C	6,90 mmolH ₂ .gDQO- l _{rem} .d ⁻¹	26 mmolH ₂ .d ⁻¹	HAc, HBU, HLA, EtOH	MOHAN et al. (2008a)
Batelada	Cepa isolada de efluente de ETE	E.D	101 gDQO.L ⁻¹	60°C, s/controle	-	0,53 g H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹	HAc, HBU, EtOH	VATSALA et al. (2008)
Batelada	Lodo de biodigestor - tratamento de cerveja	V.A	64 g.DQO.L ⁻¹	5 dias;5,5;55°C	-	8307 mL H ₂	HAc, HBU	ESPINOZA- ESCALANTE et al.(2009)
ASBR	Lodo de UASB - tratamento de cerveja	V.A	3 gDQO.L ⁻¹	12 h; 5,5;35°C	16,8 mL H ₂ .gDQO ⁻¹ .d ⁻¹ (8,4 mL H ₂ .gDQO ⁻¹)	50 mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹	HAc, HPr, HBU, HiBu, EtOH, Acetona	BUITRON e CARVAJAI (2010)
ASBR	Lodo de tanque anaeróbio, tratamento térmico	E.D.	60 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	16 h; 5,5;37°C	172 mLH ₂ .gDQO ⁻¹ . l _{removida}	0,55 L.h ⁻¹	HAc, HPr, HBU, HVal	SEARMSIRIMONGKOL et al. (2011)

Continuação. Tabela 5.2 Trabalhos em produção de H₂ a partir de resíduos de destilaria/açúcar nas condições ótimas para a geração de biogás

Reator	Inóculo, pré-tratamento	Substrato	Concentração	TDH, pH, Temperatura	Rendimento de H ₂	Produção volumétrica de H ₂	Principais metabólitos	Referência
CSTR	Lodo bovino biodigerido enriquecido	E.D	15 gDQO.L ⁻¹ (50% volume)	4 dias; 7; 70°C	172 mL.g ⁻¹ SSV	789,1 mL.d ⁻¹	HAc, HLa, EtOH	QIU et al. (2011)
ASBR	Lodo de estação de tratamento,	V.C	24,5 kgDQO.m ⁻³	10 dias; 7-7,3; 28°C	1,6 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ _{rem}	0,32 mol H ₂ .m ⁻³ .d ⁻¹	-	MOHAN et al. (2011)
Batelada	Lodo de CSTR acidogênico	E.D	15 g.L ⁻¹	-; 5,47; 37°C	19,5 L H ₂ .L ⁻¹ vinhaça ⁻¹	-	-	NASR et al. (2011)
ASBR	Lodo de biodigestor, tratamento térmico	Resíduo de destilaria	68 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	21,3 h; 5,5; 55°C	130 ml H ₂ .gDQO ⁻¹ _{removida}	2100 mLH ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	HBu, HVal, HAc, HPr, EtOH	INTANOO et al. (2012)
Batelada	Lodo de ETE, Tratamento térmico	V.M	-	-; 5,5; 37°C	180 ml H ₂ .gDQO ⁻¹ _{removida}	0,122 L H ₂ .L ⁻¹	HBu, HAc, HPr, EtOH	WICHER et al. (2013)
Batelada	Lodo de UASB de tratamento de dejetos avícola, térmico	V.C.	1,8 gDQO.L ⁻¹	-; 5,5; 55°C	2,31 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ _{adicionada}	-	HBu, HAc, HPr, EtOH	LAZARO et al. (2014)

Continuação. Tabela 5.2 Trabalhos em produção de H₂ a partir de resíduos de destilaria/açúcar nas condições ótimas para a geração de biogás

Reator	Inóculo, pré-tratamento	Substrato	Concentração	TDH, pH, Temperatura	Rendimento de H ₂	Produção volumétrica de H ₂	Principais metabólitos	Referência
AFBR	Lodo de UASB termofílico, térmico	V.C.	10 g.DQO.L ⁻¹	6 h;4,36;55°C	2,86 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ .adicionada	0,43 L.L ⁻¹ .h ⁻¹	Hsu, HLa, HBu, HAc, Hpr	SANTOS et al. (2014a)
AFBR	Lodo de UASB termofílico, térmico	V.C.	15 g.DQO.L ⁻¹	6-1 h; 4,61-5,06; 55°C	2,23 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ .adicionada	1,49 L.L ⁻¹ .h ⁻¹	HLa, HBu Hsu,, HIBU, HAc, Hpr	SANTOS et al. (2014b)
AFBR	Lodo de UASB termofílico, térmico	V.C.	5 g.DQO.L ⁻¹	4 h;4,61-5,06 55°C	5,73 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ .adicionada	0,78 L.L ⁻¹ .h ⁻¹	Hsu, HLa, HBu, HIBU, HAc, Hpr	SANTOS et al. (2014c)
Leito Fixo	Fermentação natural	V.C	72,4 kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹	12 h; 24-8h; 55°C	0,7 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ .adicionada	1023 mL H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹ (0,04 L.L ⁻¹ .h ⁻¹)	HAc, EtOH, HBu, HVal,	FERRAZ et al. (2014)
AFBR	Lodo de UASB-tratamento de dejetos suínos, térmico	V.C	5 g.DQO.L ⁻¹	1h; 4,5; Ambiente	1,96 mmolH ₂ .gDQO ⁻¹ .adicionada	0,57 L.L ⁻¹ .h ⁻¹	MeOH, EtOH, HBu, HMal, HVal, HPr	Presente estudo

V.A: Vinhaça de agava; VC: Vinhaça de cana-de-açúcar; V.M: Vinhaça de milho; E.D: efluente de destilaria; ASBR: reator em modo batelada sequencial; CSTR: reator contínuo de mistura; AFBR: reator anaeróbio de leito fluidizado; ETE; estação de tratamento de efluente

5.4 Metabólitos intermediários

As Figuras 5.13 e 5.14 e Tabelas 5.3 e 5.4 ilustram dados referentes a distribuição de metabólitos gerados pelos reatores R5 (5g.DQO.L^{-1}) e R10 (10gDQO.L^{-1}) durante as etapas de variação da razão glicose/vinhaça e de variação de tempo de detenção hidráulica. A Figura 5.15 ilustra a distribuição de metabólitos no reator R15 (15gDQO.L^{-1}).

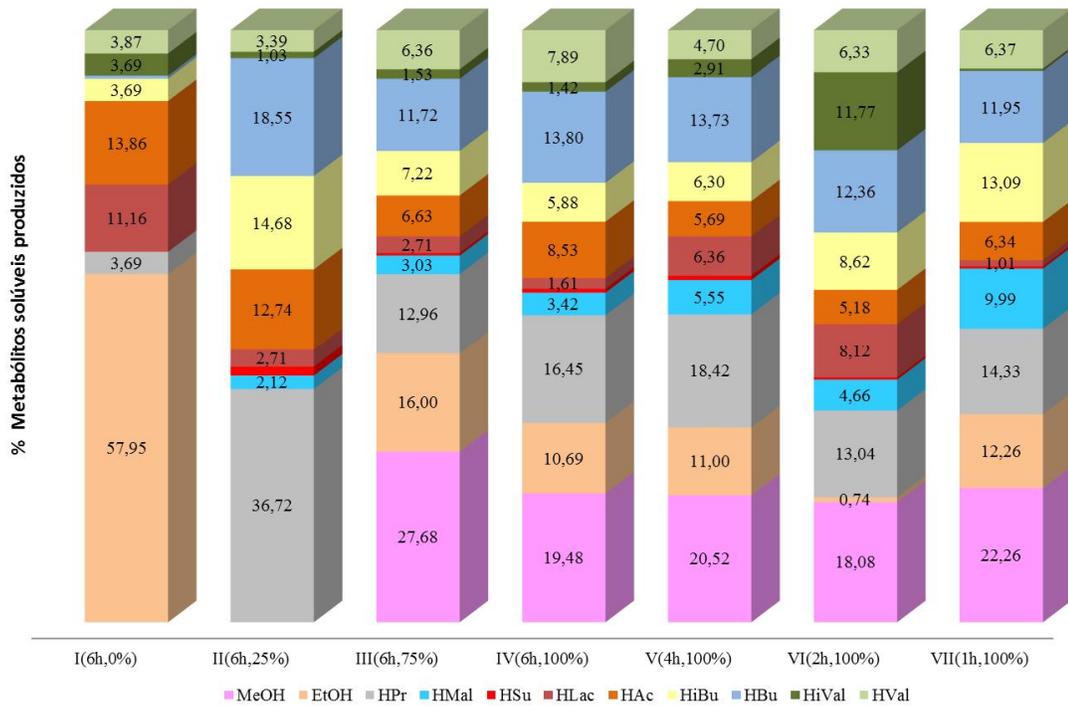


Figura 5. 13 Metabólitos produzidos ao longo das etapas operacionais em valores percentuais molares no reator R5 (5gDQO.L^{-1})

Tabela 5. 3. Concentração dos principais metabólitos produzidos no reator R5 (5 g.L⁻¹)

		HMAL	HSuc	Hlac	MeOH	EtOH	Hac	HPr	HIBu	HBu	Hival	HVal
		(mg.L⁻¹)										
	I (0%,6h)	n.d*	n.d*	241.50±181	n.d*	640.81±40	199.93±128	65.72±16	78.02±19	10.80±3	90.48±34	94.90±55
1 ^a	II (25%,6h)	75.57±13	44.37±37	64.73±32	n.d*	n.d*	202.90±22	721.25±360	342.98±176	433.23±58	27.82±18	91.86±34
Etapa	III (75%,6h)	194.80±59	22.84±14	117.12±78	425.50±90	353.61±69	191.02±37	460.84±102	305.34±108	495.33±139	75.04±30	311.58±117
	IV (100%,6h)	153.57±109	23.77±20	48.49±20	208.72±97	164.62±28	171.37±44	407.57±107	173.38±109	406.58±241	48.60±13	269.40±161
	V (100%,4h)	237.77±157	26.45±20	183.10±130	210.08±97	161.91±93	109.28±39	436.10±150	177.38±85	386.56±178	94.88±33	153.47±83
2 ^a	VI (100%,2h)	208.66±70	14.06±3	244.20±152	193.24±75	11.34±5	103.85±44	322.49±93	253.48±125	363.25±111	400.98±203	215.59±92
Etapa	VII (100%,1h)	422.43±128	13.90±2	28.78±9	224.84±46	178.00±81	120.09±36	334.77±53	363.68±87	331.88±185	13.01±2	204.98±92

*não detectado

Na Figura 5.13 relativa ao reator R5(5gDQO.L⁻¹) durante a fase I(0%,6h), em que glicose foi a única fonte de carbono, houve preponderância da produção de etanol que foi mais de 50% SMP dos metabólitos gerados equivalente a uma concentração de 640 mg.L⁻¹). Em seguida vieram os ácidos acético e láctico. A produção de etanol em reatores acidogênicos alimentados com glicose já foi observada por BARROS e SILVA (2012) os quais obtiveram uma concentração em torno de 550 mg.L⁻¹ também sob o TDH de 6 h em AFBR preenchido com pneu triturado.

Na fase II (25%,6h) com o acréscimo de vinhaça e diminuição da parcela de glicose na alimentação, houve uma mudança nas rotas metabólicas verificada pela mudança do comportamento dos metabólitos gerados. Houve interrupção da produção de etanol, queda da produção de ácido butírico e aumento da produção de ácido propiônico que atingiu 36 % SMP e concentração de 721 mg.L⁻¹. A partir da fase II (25%, 6h) também houve produção de ácido málico e ácido succínico, porém em menores percentuais. Quando a vinhaça se tornou o substrato principal na fase III(75%,6h), o etanol voltou a ser produzido pelo reator. Nesta fase também houve produção de metanol numa concentração de 425 mg.L⁻¹ (28% SMP). Na fase IV(100%, 6h) os reatores se mantiveram estáveis em relação à fase anterior, ou seja, com uma produção de solventes em torno de 38%, etanol e metanol.

Durante a 2ª etapa dos experimentos quando o reator estava adaptado a utilizar vinhaça como fonte orgânica foi feita a redução do tempo de detenção hidráulica de 6 a 4, 2, e 1 h. Na fase V(100%,4h) a produção de ácidos orgânicos e álcoois se manteve estável, porém houve crescimento do percentual de ácido láctico no sistema. Ao mesmo tempo, houve queda da produção de etanol. Quando o reator parou de produzir metano sob o TDH de 1h na fase VII, o etanol voltou a ser um dos principais metabólitos formados.

Da mesma forma que o reator R5, também houve uma produção majoritária de etanol no reator R10 durante a primeira fase de operação com glicose e TDH de 6 h como ilustrado na figura 5.1. A produção de ácido butírico também foi significativa, atingindo 38 % SMP. O perfil de distribuição de metabólitos no R10 foi muito similar que o reator R5 nas etapas seguintes, indicando que a escala de aumento de concentração de 5 a 10 gDQO.L⁻¹ não exerceu influência nas rotas metabólicas seguidas pelo sistema. À exceção do ácido láctico que durante a diminuição do TDH de 4 a 2 h mais que dobrou sua concentração (de 862 a 1734 mg.L⁻¹). Na etapa de TDH de 1 h, essa produção de ácido láctico caiu a quase 1% SMP, possivelmente, bactérias

produtoras de lactato foram lavadas do reator na condição de baixo TDH. A fermentação mista que se sucedeu após a diminuição do TDH do ponto de vista bioquímico não é tão estável quando a fermentação do tipo etanol ou do tipo butírica (REN et al. 1997).

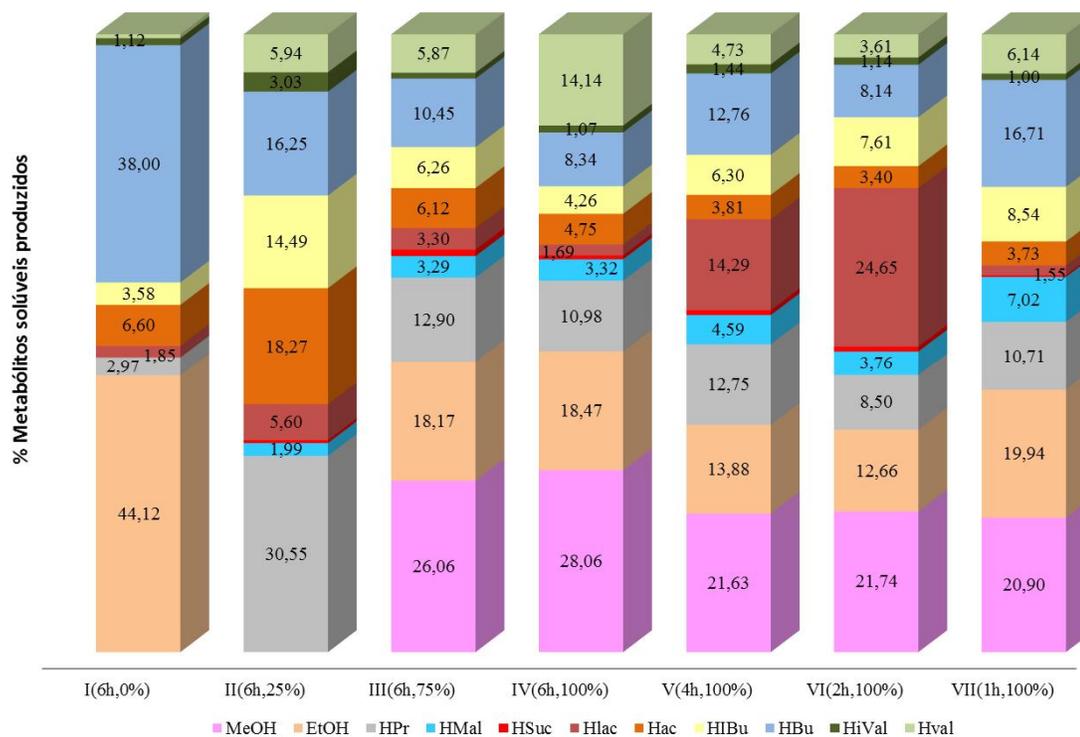


Figura 5. 14 Metabólitos produzidos ao longo das etapas operacionais em valores percentuais molares no reator R10 (10 gDQO.L⁻¹)

Tabela 5. 4 Concentração dos principais metabólitos produzidos no reator R10 (10g.L⁻¹)

		HMai	HSuc	Hlac	MeOH	EtOH	Hac	HPr	HIBu	HBu	Hival	HVal
		(mg.L⁻¹)										
	I (0%,6h)	n.d.*	n.d.*	117.22±93	n.d.*	1431.37±395	279.11±111	154.78±44	222.36±52	2358.15±554	80.23±14	45.27±13
1 ^a	II (25%,6h)	126.25±38	25.95±14	238.36±162	n.d.*	n.d.*	517.88±173	1068.13±93	602.46±309	675.73±371	146.08±41	286.37±66
Etapa	III (75%,6h)	313.22±122	81.10±11	210.92±132	592.92±165	594.44±89	260.97±92	678.73±178	391.47±116	654.24±254	65.34±36	425.83±184
	IV (100%,6h)	277.72±172	44.74±10	94.83±39	560.79±66	530.53±258	178.15±77	507.49±64	234.16±115	458.66±119	68.13±16	900.96±302
	V (100%,4h)	412.48±187	60.22±38	862.61±672	464.34±259	428.17±262	153.51±86	632.77±210	371.76±285	752.89±467	98.33±72	323.27±119
2 ^a	VI (100%,2h)	393.53±162	70.47±12	1734.67±257	543.98±257	455.36±177	159.57±54	491.68±134	523.61±255	560.26±332	90.97±36	287.65±167
Etapa	VII (100%,1h)	606.34±122	20.14±4	90.14±66	431.06±98	591.14±88	144.25±29	511.01±70	484.17±79	948.05±223	65.53±5	403.47±124

*não detectado

A Figura 5.15 ilustra os metabólitos produzidos sob a concentração de 15 gDQO.L⁻¹ sob o TDH de 8 h. Nessa condição já se percebe uma variação nos metabólitos gerados pelo sistema em comparação ao reator R5 e R10. Não houve a detecção de solventes como metanol e etanol, também não foi detectado ácido succínico. Todavia houve, mesmo que em baixas proporções, a produção de ácido fórmico. Foi observada uma fermentação mista sendo os principais: ácido acético, ácido butírico, ácido iso-butírico, ácido valérico e ácido propiônico. Apesar da boa produção relativa de ácido acético (15 a 18% SMP), não foi possível atingir resultados de produção de biogás comparáveis ao R5 e R10.

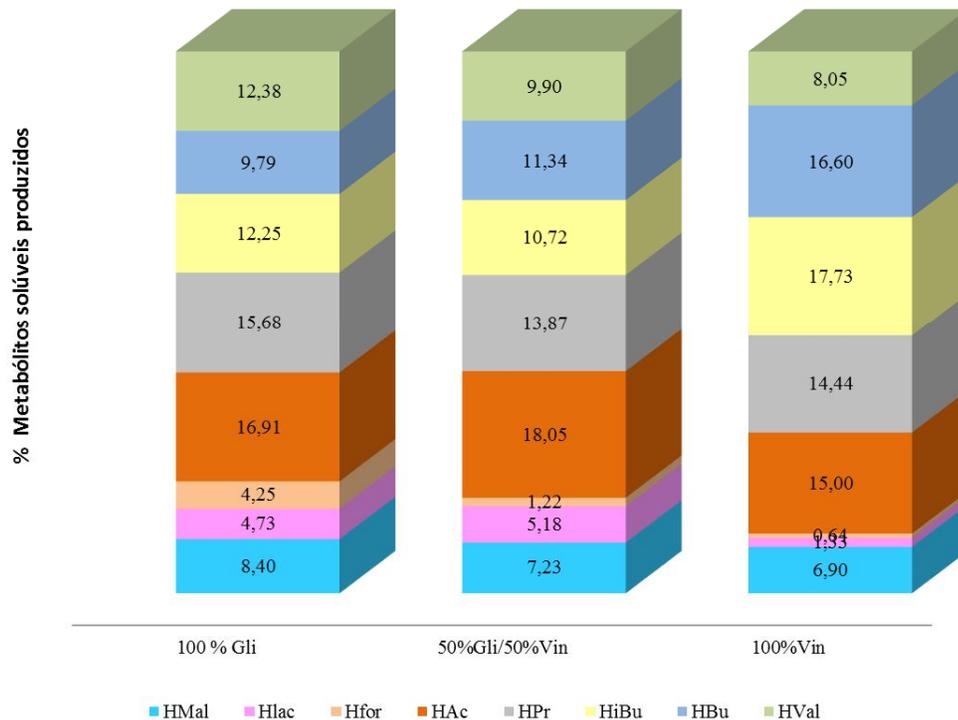


Figura 5. 15 Metabólitos produzidos ao longo das etapas operacionais em valores percentuais molares no reator R15 (15 gDQO.L⁻¹)

A produção de hidrogênio em todos os reatores estudados se deu de modo intermitente ao longo das fases mesmo na presença de um substrato complexo como a vinhaça. É importante comentar que parte da matéria orgânica da vinhaça, é

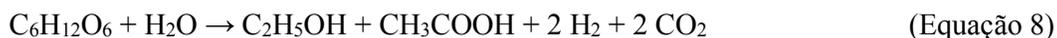
composta por ácidos orgânicos comumente produzidos por reatores anaeróbios. A vinhaça utilizada neste experimento possuía, em média, em ordem decrescente os seguintes ácidos representados em percentagem molar: ácido fórmico (27,04%), ácido láctico (25,64%), ácido málico (14,94%), ácido isobutírico (12,02%). Em menor proporção tem-se os seguintes: ácido succínico (8,88%), ácido propiônico (3,84%), ácido acético (3,21%), ácido butírico (2,51%), ácido iso-valérico (1,60%) e ácido cítrico (0,30%). Os ácidos já presentes na vinhaça podem ter servido também como substrato imediato para a formação de hidrogênio. Esse fato pode ser uma das razões da manutenção da produção de hidrogênio mesmo após a introdução de um substrato complexo como a vinhaça.

Como foi comentado, durante a fase inicial I com apenas glicose, o etanol foi o metabólito preponderante no R5 e R10. A produção de etanol é uma produção ainda controversa tendo em vista que alguns trabalhos indicam que a produção de etanol limita a produção de hidrogênio enquanto que em outros se afirma que pode coexistir a produção de etanol e hidrogênio.

Na rota tradicional de produção de etanol, ele é considerado um metabólito prejudicial a processos acidogênicos tendo em vista que sua formação (Equação 7) não leva a produção de hidrogênio e que sua formação poderia limitar a geração de hidrogênio visto que substrato é utilizado para sua formação.



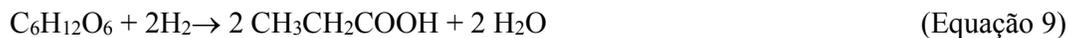
Todavia, trabalhos recentes (WU et al., 2007; REIS e SILVA, 2011; BARROS e SILVA, 2012) observaram que pode ser realizada a produção concomitante de etanol e hidrogênio sem que haja prejuízo na produtividade do reator. Uma rota alternativa (Equação 6) foi lançada (REN et al. 1997) como possível desvio seguido durante o processo acidogênico de produção de hidrogênio e etanol:



Segundo REN et al. (1997) a fermentação do tipo etanol é mais estável que a fermentação mista.

A partir da fase II (25%,6h) houve aumento da proporção de ácido propiônico nos reatores. O ácido propiônico é prejudicial tanto a produção de hidrogênio quanto para a produção de metano, pois consome o hidrogênio gerado pelo sistema. De fato, durante a fase II(25%,6h) houve diminuição do rendimento de hidrogênio. Isso pode ser atribuído tanto a variação do substrato de uma forma mais simples a um substrato mais complexo. E, em resultado, houve uma variação da comunidade microbiana de modo a propiciar o surgimento de ácido propiônico e do rompimento da produção de etanol.

Segundo a equação (9), para cada mol de ácido propiônico gerado, são consumidos 2 moles de hidrogênio:



WANG et al (2006) em estudo acerca da inibição de processos fermentativos pelo ácido propiônico, afirma que a geração de hidrogênio está relacionada a reação $2 \text{NADH} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2 + 2 \text{NAD}^+$ catalisada pela hidrogenase sob condições anaeróbias estritas. O acúmulo de NADH e menores cargas orgânicas vão melhorar a produção de hidrogênio. Além disso, a geração de ácido propiônico é uma forma de reduzir o NADH acumulado no processo. Assim, uma vez acumulado no sistema, o equilíbrio tende a ser deslocado no sentido de seu consumo, liberando ácido propiônico.

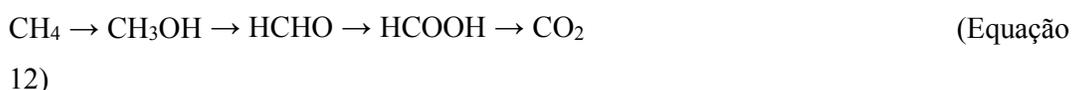
YU et. al. (2002) também verificou quantidades consideráveis de ácido propiônico ao produzir hidrogênio a partir de vinhaça do processamento de vinho de arroz. Os autores contabilizaram 40 % de ácido propiônico sob pH 4 dentre os metabólitos gerados o qual decresceu à medida que o pH foi elevado para 6 (20%).

O metanol foi produzido em grande proporção a partir que a vinhaça se tornou o substrato principal tanto no reator R5 quanto no reator R10. Ainda não há uma rota clara acerca do processo de produção deste álcool em reatores anaeróbios para a produção de hidrogênio e nem se há algum efeito deletério na geração de biogás. Entretanto, algumas indicações podem ser feitas.

Clostridium butyricum, uma espécie bastante comum em processos fermentativos para a produção de hidrogênio é capaz de fermentar alguns substratos com geração de metanol. SCHINK e ZEIKUS (1980) verificaram que algumas espécies

são capazes de formar metano a partir da fermentação da pectina por *Clostridium butyricum* além de *Erwinia chrysanthemi*.

A maior produção de metanol apresentada pelos reatores pode ser um indicativo do aparecimento de metano no biogás o qual foi gerado partir da fase IV(100%,6h) quando foi retirada a glicose e vinhaça passou a ser o substrato principal. Segundo GALBALLY e KIRSTINE (2002), o metanol pode ser produzido quando metano é gerado e oxidado por animais ruminantes, lagoas de estabilização, arrozais, lagos e aterros sanitários. Ainda, o metanol juntamente com o formaldeído e formato é um intermediário do processo de oxidação de metano segundo a equação 12.



Desse modo, o metanol é então utilizado para o crescimento dos microrganismos metilotróficos e é prontamente convertido em formaldeído e formato pela enzima desidrogenase. Há pouca informação sobre o processo de produção de metanol tendo em vista que tanto o seu processo de produção quanto de consumo podem ser favoráveis, e de preferência, em meios líquidos (GALBALLY e KIRSTINE, 2002).

Assim, tendo em vista que a vinhaça empregada neste estudo continha como ácido principal, o ácido fórmico, o qual é formado a partir do metanol, mas que a partir da presença de microrganismos metilotróficos, pode retornar a condição de formato, o que pode justificar a presença em grande proporção de metanol após a introdução de vinhaça ao sistema.

Ainda na questão de conversão de metanol a metano, de acordo com FURUZAKI e NISHIO (1997), metanol pode ser convertido em metano por diversas rotas:

- i) conversão direta do metanol a CH_4 por metanogênicas metilotróficas com a *Methanosarcina barkeri*;
- ii) transformação de metanol a acetato por acetogênicas como *Clostridium formicoaceticum* seguido de quebra a CH_4 pelas metanogênicas acetoclásticas;

- iii) conversão do metanol a H_2 e CO_2 pelas homoacetanogênicas como *Sporomusa ovata* seguido de metanogênese pelas metanogênicas hidrogenotróficas (FURUZAKI e NISHIO, 1997).

Diante dos dados obtidos, a terceira suposição dos autores é uma possível rota apresentada pelos reatores no presente estudo empregando vinhaça.

Alguns estudos utilizam o metanol como substrato orgânico para a produção de metano por digestão anaeróbia. Segundo WEIJMA e STAMS (2001), o metanol pode ser metabolizado por metanogênicos, bactérias redutoras de sulfato e por homoacetanogênicas. O hidrogênio atua neste caso como importante intermediário na conversão dos produtos em metanol. Isso pode significar uma redução da produção deste gás em processos acidogênicos quando há a produção de metanol. De fato, a produção de hidrogênio se tornou deficiente diante da geração de metanol como intermediário, todavia, esse comportamento também está ligado à geração de metano. Os microrganismos metanogênicos produtores de metanol estão comumente relacionados ao gênero *Methanosarcina*, todavia, como será mostrado adiante, não foi verificada a presença deste gênero na amostra submetida a análise microbiana. Isso pode sugerir que uma outra rota possível pode ter sido adotada nesse experimento.

De modo geral, alguns metabólitos foram mais favorecidos a depender das condições operacionais aplicadas. O uso de substratos simples como a glicose favoreceu a produção de butirato. Já o uso da vinhaça, efluente complexo, e sob as condições de pH entre 4 e 4,5 a partir de uma cultura mista há o favorecimento a produção biológica de solventes: metanol e etanol.

5.5 Biologia molecular

5.5 Análise da diversidade microbiana

5.5.1 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

Nesse estudo a fim de entender o comportamento dos microrganismos presentes ao longo das fases empregadas, foram realizadas coletas da biomassa aderida às partículas ao final de cada fase operacional. As mudanças nas populações de bactérias podem ser verificadas através da análise do perfil de bandas por eletroforese

em gel gradiente desnaturante (DGGE) para bactérias (Figuras 5.15 e 5.16) e arqueias (Figuras 5.17 e 5.18). Durante as fases foi verificada alteração significativa entre as populações, provavelmente, houve seleção de bactérias em função dos parâmetros impostos.

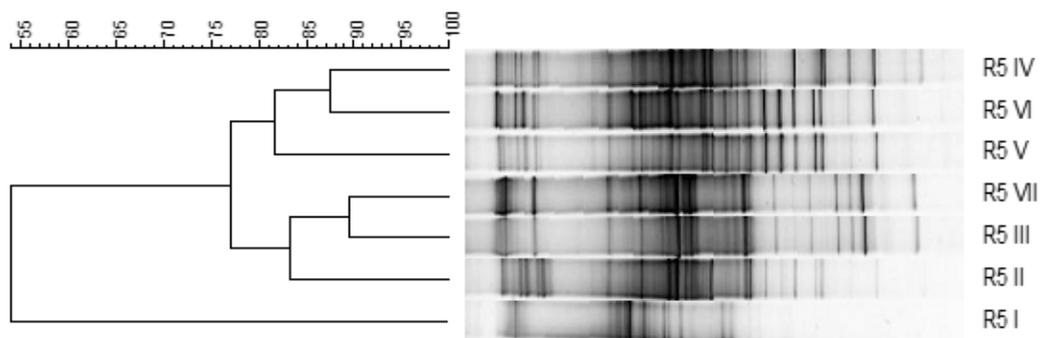


Figura 5. 16 Coeficiente de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas ao reator R5 (5 gDQO.L⁻¹) para o domínio Bacteria.

Observou-se menor coeficiente de similaridade de 55% para a biomassa da fase I (0%, 6h) em relação as demais fases de operação para as populações de bactérias. Nessa fase, apenas glicose estava sendo empregada como fonte orgânica para o tempo de detenção hidráulica de 6 h. Em comparação, verificou-se que entre a fase II (25%, 6h) e a fase III (75%, 6h) esse coeficiente de similaridade aumentou para 83 %, provavelmente, devido a presença de novo substrato, a vinhaça (25%), favorecendo a seleção de microrganismos mais adaptados aquela condição. Em relação a fase IV (100 %, 6h) verificou-se diminuição da similaridade entre as populações em comparação com a fase III, quando a similaridade observada foi entre 76%. Diante da presença única de vinhaça como substrato orgânico, possivelmente, novos microrganismos foram favorecidos, como foi observado diante do maior número de bandas na fase IV.

De acordo com o índice de diversidade de Shannon-Wiener verificou-se que a amostra mais diversa em ordem decrescente foi R5 V (4,90)>R5 IV(4,38)>R5 II(4,16)>R5VI (3,49) > R5III (3,24) >R5 VII (3,23) >R5 I (2,88). Entre as fases IV e V (100%,4h) foi feita a redução do TDH de 6 para 4 h e verificou-se aumento de 82% de correlação. Com nova redução de TDH para 2 h na fase VI verificou-se que o coeficiente permaneceu inalterado. De fato, verificou-se comportamento bastante similar do reator R5 durante as fases V e VI no que se refere a produção de biogás, ácidos orgânicos e consumo de carboidratos. Na última fase VII (100% de vinhaça) para

TDH de 1 h, verificou-se coeficiente de similaridade de 82 % em comparação com a fase VI (100%, 2 h). É provável que populações que foram desfavorecidas nas fases seguintes se adaptaram de modo a retornarem a condições prévias à redução do TDH. As populações mais adaptadas permaneceram no reator, enquanto outras podem ter sido lavadas do reator devido às maiores condições hidrodinâmicas de baixo TDH.

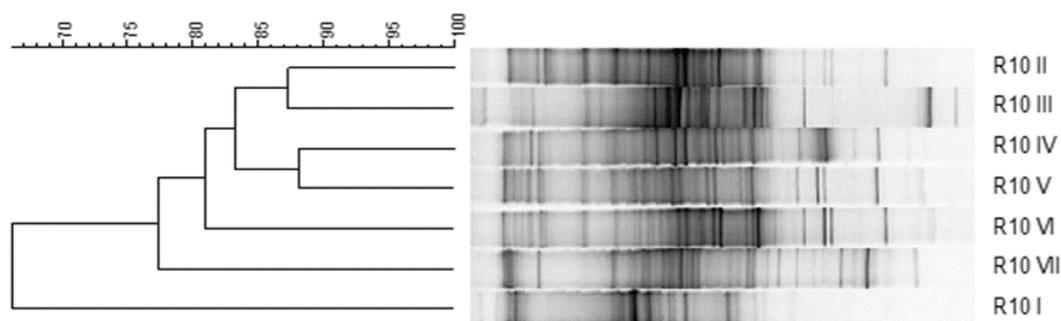


Figura 5. 17 Coeficiente de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas ao reator R10 (10 gDQO.L-1) para o domínio Bacteria.

O reator R10 apresentou um comportamento semelhante ao reator R5 no que se refere ao perfil apresentado diante da variação das fases operacionais. O menor coeficiente de similaridade foi obtido na fase R10 I em que foi obtido um valor de 67 % em relação as fases seguintes. A introdução de vinhaça no sistema levou a um aumento da similaridade que atingiu 87 % entre as fases II e III as quais foram as mais semelhantes dentre as amostradas. Entre a fase IV e V o coeficiente de similaridade apresentou uma redução atingindo 84%. Entre as fases VI e VII o coeficiente de similaridade ficou em 77 %. Verifica-se que o aumento da concentração de vinhaça nas fases II, III e IV bem como a redução do TDH de 6 a 1 h nas fases V, VI e VII levou a uma diminuição nas similaridades apresentadas. Isso é um indicativo que pode ter havido variação da população bacteriana seja ocasionado por lavagem em baixo valor de TDH ou por adaptação a presença de um substrato mais complexo.

Devido a formação de metano a partir da fase IV (100%, 6h) em ambos os reatores também foi feita a eletroforese em gel gradiente desnaturante para as arqueias metanogênicas (Figuras 5.18 e 5.19).

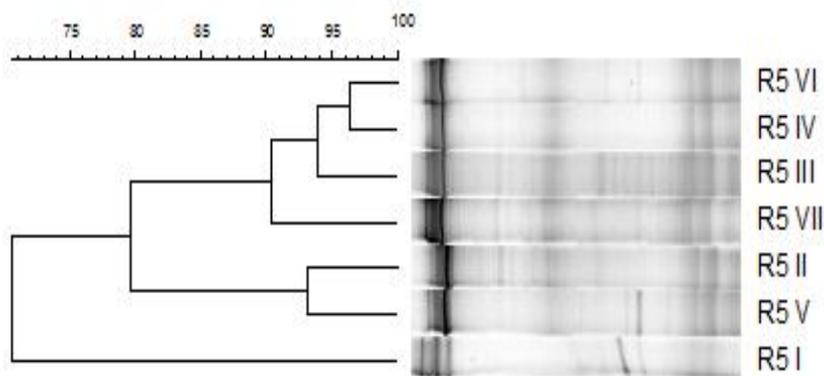


Figura 5. 18 Coeficientes de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas no reator R5 (5 gDQO.L⁻¹) para o domínio Archaea

Na Figura 5.18 está ilustrado o perfil de bandas para o reator R5 (5 gDQO.L⁻¹) em relação ao Domínio Archaea. Verificou-se no início da operação do reator similaridade de 70% entre essa fase e as demais fases (II, III, IV, V, VI e VII). Verificou-se que em função das mudanças de fases operacionais no reator ocorreu aumento da similaridade entre as populações para as diferentes fases. Provavelmente, houve uma seleção de arqueias em função das condições operacionais impostas. As maiores similaridades ficaram acima de 90% e foram observadas nas últimas fases (VI e VII) coincidindo com a maior produção de metano no reator.

O perfil de bandas para o reator R10 está ilustrado na Figura 5.19. Verificou-se para a fase II uma similaridade de 55 %, ou seja, menor em relação as fases operacionais seguintes. Durante essa etapa foi feita a adição de vinhaça ao sistema. Possivelmente, houve um choque nas populações presentes, de modo que apenas as mais adaptadas se mantiveram sob essa condição. Quando se fez o aumento da proporção de vinhaça nas etapas seguintes, essas populações se mostraram mais adaptadas à presença de um substrato mais complexo. A partir da fase IV verificou-se similaridade entre 77 e 97% entre as fases I, VI, VII e V. Provavelmente, ocorreu adaptação das populações à presença de um substrato complexo como a vinhaça neste reator.

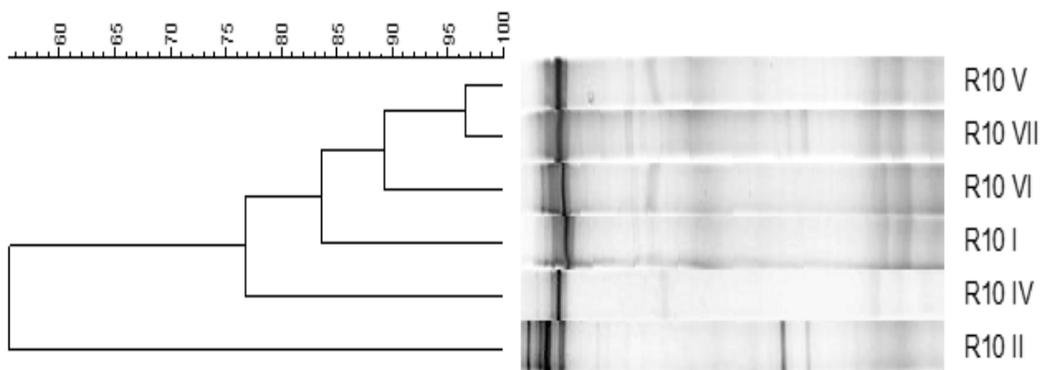


Figura 5. 19 Coeficientes de similaridade através da correlação de Pearson a partir do perfil de bandas do DGGE em relação às fases operacionais aplicadas no reator R10 (10 gDQO.L⁻¹) para o domínio Archaea. OBS: R10 III – essa amostra não foi possível amplificar, provavelmente, as populações de arqueia presentes estavam abaixo do limite de detecção da técnica.

5.5.2 Caracterização microbiana

A fim de identificar os microrganismos presentes nos reatores foram selecionadas duas amostras: uma para identificação de bactérias e outra para identificação de arqueias. O critério de escolha se baseou na melhor produção de hidrogênio e metano, assim, foram recolhidas para a análise as amostras da fase VII (100%, 1h) do reator R5 para caracterização das bactérias e a amostra da fase VII (100%, 1 h) do reator R10 para caracterização das arqueias.

5.5.2.1 Domínio Bacteria

Após a realização do perfil de bandas, foi realizada a clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene RNAr 16S do consórcio microbiano. Foi escolhida a amostra da fase VII (100%, 1 h) por ter sido a melhor fase para a produção de hidrogênio no reator R5 e por não ter apresentado produção de metano. Dessa condição foram obtidos 164 clones pertencentes ao filo Bacteroidetes e Firmicutes. Os clones foram agrupados em 5 unidades taxonômicas operacionais (OTU).

Dentre as sequências obtidas, conforme apresentado na Tabela 5.8, 55 % das sequências foram relacionadas ao filo Bacteroidetes, mais especificamente ao gênero *Prevotella* não-cultivada. Apenas 28 % das sequências obtidas foram similares a representantes pertencentes ao filo Firmicutes, especificamente ao gênero *Megasphaera*

sp. Verificou-se que 3% das sequencias foram relacionadas com bactérias semelhantes a *Clostridia* não-cultivada também pertencente ao filo Firmicutes.

Conforme apresentado na Tabela 5.6 verificou-se que representantes pertencentes às OTUS 1 e 3 foram relacionados ao filo Bacteroidetes. Para a OTU 1 e 6 verificou-se representantes semelhantes a *Prevotella não-cultivada*. Os microrganismos semelhantes a *Prevotella* são bactérias não-formadoras de endósporos e anaeróbias estritas (GOUD et al. 2012). De modo geral, a classe Bacteroidia a qual está afiliada *Prevotella* sp. tem como característica a capacidade de crescer em variedade de carboidratos, podendo converter celulose em ácido acético, ácido propiônico, propionato e ácido succínico e são, ainda, estritamente anaeróbias (GOUD et al., 2012). Durante a fermentação da sacarose geram principalmente ácido succínico e, em menores quantidades, ácido láctico e ácido acético. Algumas espécies podem produzir hidrogênio em baixas concentrações quando o processo é direcionado à rota do ácido acético (MARIKAKIS et al., 2010). Em outros sistemas de produção de hidrogênio também foram identificadas bactérias semelhantes a *Prevotella* (SHIN et al., 2004; LI et al., 2006 ; YANG et al., 2006; OHNISHI et al., 2010; WON et al., 2013).

SHIN et al. (2004) verificaram a produção de biogás a partir de resíduos alimentícios em reator em batelada e identificaram, *Prevotella* sp. De acordo esse estudo, essa espécie pode produzir ácido acético, ácido succínico, ácido isobutírico, ácido isovalérico a partir da degradação de amido, glicose e sacarose. LI et al. (2006) verificaram a presença de microrganismos semelhantes a *Prevotella* em reatores de leito fixo para a produção de hidrogênio a partir de sacarose com TDH de 2 h.

YANG et al. (2006) encontraram 7% de bactérias pertencentes à *Prevotella* de uma cultura para a produção de H₂ a partir de água residuária do processamento de queijo em reator CSTR. Da mesma forma que no presente estudo, YANG et al. (2006) observaram a produção de H₂ e CH₄. OHNISHI et al. (2010) et al. encontraram em seu estudo a presença de *Prevotella stercorea* sob o TDH de 18 e 14 h ao avaliar o uso de um lodo contendo solo, resíduos de compostagem, resíduos alimentícios e lixo para a produção de hidrogênio em reator em modo batelada sequencial. WON et al., (2013) obtiveram em seu estudo 33,9% de espécies pertencentes ao filo Bacteroidetes, sendo que dessas 93,7 % pertenciam ao gênero *Prevotella*. Na condição em que esse gênero foi obtido em maior proporção, os autores trabalharam sob um pH em torno de 4,5 tal como o no presente estudo. Ainda houve uma produção satisfatória de hidrogênio de 2,18 L H₂/L com rendimento de 1,29 mol

$\text{H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ sacarose. MARIKAKIS et al (2011) também encontraram *Prevotella sp* no meio e obtiveram um rendimento de $0,78 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ hexose. Eles observaram ainda que a *Prevotella sp* se tornou presente e mais frequente com o aumento da carga orgânica e sob menores tempos de detenção hidráulica do estudo. Os trabalhos citados mostram a viabilidade de produção de hidrogênio a partir de *Prevotella sp*. Apesar de ser uma bactéria pouco usual em trabalhos com foco em produção de hidrogênio, ela é capaz de gerá-lo concomitante com ácidos orgânicos quando em ambiente adequado, ou seja, com pH em torno de 4,5 e disponibilidade de matéria orgânica tal como observado no presente estudo com vinhaça de cana-de-açúcar.

SANTOS et al. (2014b) em um estudo com vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da mesma usina empregada no presente trabalho (Usina São Martinho-Pradópolis-SP) verificaram a presença dos seguintes microrganismos: *Lactobacillus sp.* e *Megasphaera sp* em reator anaeróbio de leito fluidizado termofílico para a produção de hidrogênio.

No presente estudo também foi verificada a presença de *Megasphaera sp.* Essa bactéria correspondeu a 28% dos microrganismos encontrados e está representada pela OTU 2. São pertencentes ao filo Firmicutes e são capazes de metabolizar carboidratos em geral produzindo ácidos orgânicos de 5 a 6 carbonos, tais como: ácido succínico, ácido butírico, ácido valérico, ácido capróico. Em menores quantidades pode ainda produzir ácido acético e ácido propiônico. Outro fator importante é que é sensível a baixo pH e a concentrações elevadas de etanol (MARCHADIN et al., 2009).

CASTELLÓ et al. (2009) utilizaram soro de queijo não esterilizado em reator UASB e verificaram *Megasphaera sp.* como uma possível produtora de hidrogênio, porém, também pode atuar convertendo ácido láctico em ácido propiônico. Os autores também identificaram bactérias semelhantes a *Prevotella*. Da mesma forma que no presente estudo, os autores observaram que produção de hidrogênio foi reduzida devido geração de metano, mas se manteve constante, mostrando que esses microrganismos também são capazes de gerar H_2 .

OHNISHI et al. (2010) também encontraram em seu estudo a presença de *Megasphaera sp.* Além dos ácidos já citados, segundo os autores, essa bactéria pode produzir hidrogênio em baixas quantidades.

As OTU 4 e 5 estão associadas ao filo Firmicutes. Os microrganismos pertencentes a este filo têm a capacidade de formar endósporos e são bem adaptados a ambientes de baixo pH, entre 5 e 6,5 (GOUD et al., 2012). Verificou-se para a OTU 5

representantes pertencentes a *Clostridia Bacterium* não-cultivada representando 3% dos clones. A classe *Clostridia* é a mais comumente representada em reatores acidogênicos com algumas espécies em maior representatividade (LAOTHANACHAREON et al., 2014). Os microrganismos pertencentes a essa classe são gram-positivos e formadores de endósporos. Eles são capazes de degradar uma diversidade de substratos orgânicos gerando ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico. Em menores proporções, também geram ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico e ácido capróico, (LJUNGDAHL et al., 1989). Dentro dessa classe, está inserido o gênero *Clostridium* o qual é considerado o principal gênero de bactérias produtoras de hidrogênio, em especial a espécie *Clostridium butyricum* (QUÉMÉNEUR et al. 2010).

LAZARO et al. (2014) realizaram estudo de produção de hidrogênio em reator em modo batelada para a produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Os pesquisadores identificaram células semelhantes a *Clostridium*, dentre elas *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium aciditolerans*. KALAMASKAR et al. (2010) isolaram uma cepa de *Clostridium* sp. proveniente do lodo de digestor anaeróbico para o tratamento de vinhaça. Essa cepa foi então cultivada em meio sintético composto de glicose, levedura e nutrientes gerando rendimento máximo de 3,35 molH₂ mol⁻¹ glicose. Já NASR et al. (2011) observaram a presença de diversas espécies de *Clostridium* (*C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*) no meio para produção de H₂ a partir de vinhaça de milho. Como se observa nos trabalhos citados, a presença desses microrganismos relacionados a *Clostridium* é comum em processos a partir de resíduos complexos como a vinhaça para produção de hidrogênio tal como no presente estudo.

A Tabela 5.7 ilustra os produtos de fermentação baseado na literatura dos microrganismos predominantes encontrados no presente estudo. Durante esse estudo verificou-se distribuição variada de metabólitos produzidos. A maior concentração (mg.L⁻¹) de metabólitos foi verificada para ácido propiônico na fase II (25%, 6h) quando foi feita a introdução de vinhaça. Como comentado por CASTELLÓ et al. (2009), *Megasphaera* sp. tem a capacidade de sintetizar ácido propiônico a partir do ácido láctico, elevando a quantidade desse ácido no sistema. Tanto no reator R5 quanto no reator R10 verificou-se diminuição da concentração de ácido láctico diante do aumento da concentração de ácido propiônico no sistema. Verificou-se que a concentração de ácido láctico permaneceu relativamente estável ao longo das fases seguintes, indicando equilíbrio da produção deste metabólito.

Tabela 5.5 Comparação entre os produtos de fermentação dos microrganismos identificados no reator R5 (5gDQO.L⁻¹)

Afiliação do organismo	Abundância relativa(%)	Produtos de fermentação	Substrato utilizado	Referência
<i>Prevotellaceae bacterium</i> <i>Não-cultivada</i>	55	HSu,HAc,HLa,H ₂ *	Sacarose	MARIAKAKIS et. (2010)
<i>Megasphaera</i> sp.	28	HBu, HVal, HAc, HPr, H ₂ *	Resíduo alimentício	OHNISHI et al. (2010)

*Em baixas quantidades. HSu=ácido succínico; HAc=ácido acético; HLa=ácido láctico; HBu=ácido butírico; HVal=ácido valérico; HPr=ácido propiônico.

Na fase IV (100%,1h) de operação do reator R5 verificou-se uma distribuição de metabólitos variada, em especial, de ácido propiônico (14,37% SMP-metabólitos solúveis produzidos), ácido isobutírico (13,09 % SMP), ácido butírico (11,95% SMP) ácido propiônico (10,71 % SMP), ácido málico (9,99 % SMP), ácido valérico (6,37 % SMP), ácido acético (6,34 % SMP), ácido láctico (1 % SMP). Esses metabólitos estão de acordo com os metabólitos gerados pelos principais microrganismos encontrados no reator R5 (Tabela 5.7).

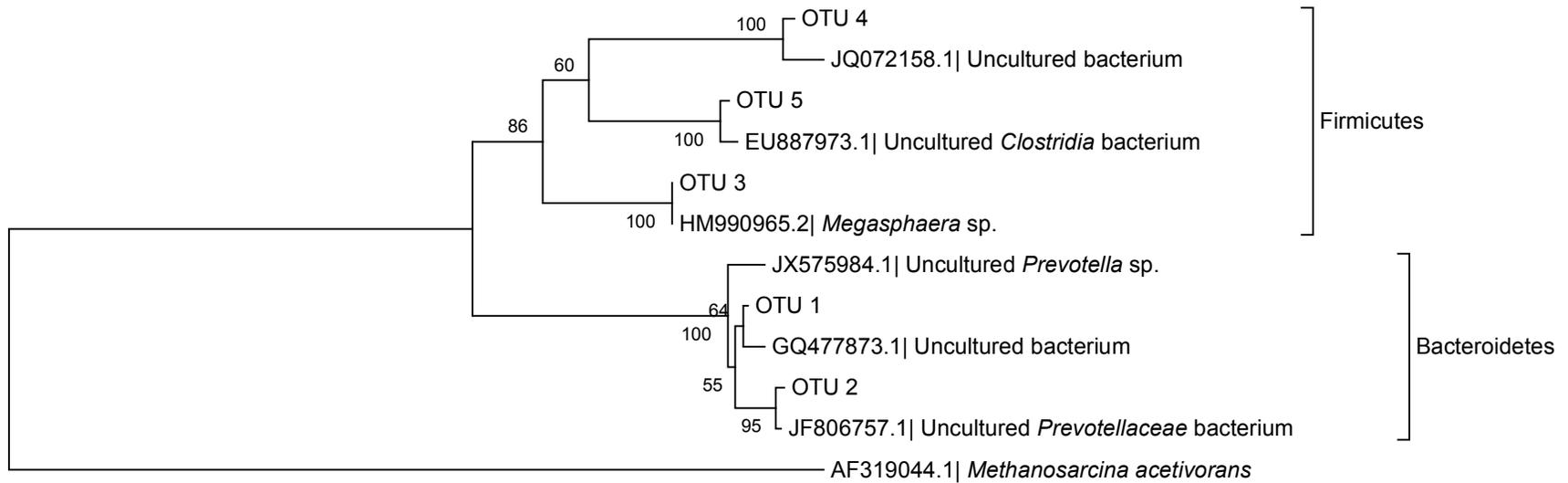
Metanol (22 % SMP) e etanol (12,26 % SMP) também foram verificados em grande quantidade, porém não são relatados como produtos de fermentação apresentados na Tabela 5.7. Algumas espécies referentes a essa classe são capazes de gerar metanol nas condições apresentadas neste trabalho como *Clostridium butyricum* na fermentação de pectina (SCHINK e ZEIKUS, 1980). Como já comentado, também foi verificado no presente estudo microrganismos afiliados a classe Clostridia.

SCHINK e ZEIKUS (1980) realizaram um experimento a fim de demonstrar a degradação da pectina por diversas culturas microbianas, dentre elas a de *Clostridium butyricum*. Foi verificado que o produto principal de fermentação a partir dessa cepa foi o metanol. A amostra de controle com glicose e na ausência de metanol levou a geração de outros metabólitos. Em contraponto com o presente trabalho, a amostra de vinhaça pode conter em sua composição resíduo de pectina resultantes do processamento do bagaço, ainda na etapa de produção de etanol. Essa pectina pode, então, ser utilizada por algumas de espécie de *Clostridium* para a formação de metanol. Como não foi possível identificar as espécies pertencentes à classe Clostridia na biomassa, essa é uma suposição condizente acerca da produção elevada de metanol pelo sistema.

Da mesma forma que o metanol, existem cepas comumente encontradas em processos acidogênicos que podem gerar etanol. Recentemente descoberta, a espécie *Ethanoligenes harbinense* pertencente ao Filo Firmicutes e à Classe Clostridia é capaz de produzir etanol concomitante com a produção de hidrogênio, ácido acético e CO₂ (XING et al., 2006). Ainda, há relato sobre a interação dessa espécie com *Prevotella* resultando em relação estável para o processo acidogênico (MARIKAKIS et al., 2011).

Tabela 5. 6 Resultado do sequenciamento genético do gene RNAr 16 s para o domínio Bacteria

OTU	Filiação	Identidade (%)	Filo	Nº Acesso GenBank	Nº Sequências	Comprimento da sequência (pb)	Abundância Relativa (%)
1	<i>Bacteria não-cultivada</i>	97	Bacteroidetes	GQ477873.1	11	399	7
	<i>Prevotella</i> sp. não-cultivada	96		JX575984.1			
2	<i>Prevotellaceae bacterium</i> não-cultivada	100	Bacteroidetes	JF806757.1	91	321	55
3	<i>Megasphaera</i> sp.	98	Firmicutes	HM990965.2	46	525	28
4	Bactéria não-cultivada	98	Firmicutes	JQ072158.1	11	576	7
5	<i>Clostridia bacterium</i> não-cultivada	99	Firmicutes	EU887973.1	5	471	3



0.05

Figura 5. 20 Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com primers para Domínio Bacteria. Como *outgroup* foi empregada a *Methanosarcina acetivorans*

5.5.2.2 Domínio Archaea

Nas últimas fases operacionais dos reatores verificou-se a produção de metano, em função desse resultado foi feita a análise de Clonagem e Sequenciamento da amostra da fase VII (100%, 1 h) do reator R10 (Tabela 5.7 e Figura 5.21). Como já foi observado no perfil de bandas da amostra através de DGGE, o baixo número de bandas filogenéticas indicou pouca variedade de arqueias. Tal situação foi comprovada quando as quatro OTU identificadas estavam relacionadas a Arqueia *não*-cultivada filiados ao gênero *Methanobacterium*. Esses microrganismos são metanogênicos hidrogenotróficos, ou seja, utilizam H₂ e CO₂ para a formação de metano e ainda utiliza o ácido fórmico como fonte de carbono (DEMIREL e SCHERER, 2008).

Como esperado, a presença desse microrganismo é o responsável pela produção de metano e, conseqüente, pela diminuição da produção de hidrogênio no presente trabalho. A produção de metano pelas arqueias hidrogenotróficas decorre a partir do consumo de 4 moles de H₂ e de um mol de CO₂ liberando CH₄ e H₂O.

Em estudo empregando vinhaça sintética, RODRIGUEZ et al. (2011) também verificaram a presença de microrganismos pertencentes ao gênero *Methanobacterium* em condições de baixa concentração de sulfato (maior relação de substrato/sulfato). Em contra partida, quando havia uma relação menor substrato/sulfato, esses microrganismos desaparecem do reator.

ROSA et al. (2014) encontraram essa cultura microbiana (*Methanobacterium*) em estudo empregando soro de queijo como substrato orgânico para produção de hidrogênio em reator de leito fluidizado. Da mesma forma que no presente estudo, a presença de metano ocorreu em pH baixo, em torno de 4,5.

As condições de baixo pH em torno de 4,5 e tempo de detenção hidráulico abaixo de 1 h são condições adversas para a formação de metano pelas arqueias metanogênicas. Entretanto, essa adversidade pode ser compensada por um ambiente que ofereça outras condições ao desenvolvimento como a disposição de substrato. A presença de metabólitos importantes podem ter favorecido o crescimento desses microrganismos no sistema, além do tempo de duração de operação dos reatores, acima de 200 dias e que pode ter viabilizado a adaptação das metanogênicas no sistema.

As arqueias pertencentes ao gênero *Methanobacterium*, que foram encontradas nesse estudo, não conseguem converter metanol a metano diretamente,

porém algum intermediário tal como o ácido fórmico pode ser gerado a partir da fermentação do metanol e que pode ser utilizado pelas *Methanobacterium* em etapa posterior. Em um estudo realizado por VAN DER MEIJDEN et al. (1984) foi verificado que havia produção de metano diante de cultura mista da bactéria acetogênica *Eubacterium limosum* e da arqueia *Methanobacterium formicum*. De acordo com o estudo, nenhuma das espécies em cultura exclusiva conseguiu produzir metano a partir do metanol, todavia, quando em cultura mista das duas espécies, foi verificada produção de metano. De acordo com os autores, há a utilização de metanol por *Eubacterium limosum* para crescimento e geração de acetato. Algum intermediário dessa conversão do metanol é utilizado, então, por *Methanobacterium formicum* para a geração de metano. Os autores não informaram qual poderia ser esse intermediário na reação.

Essa via indireta de formação de metano a partir do metanol pode ter ocorrido no reator R5 (5 gDQO.L⁻¹) e R10 (10 gDQO.L⁻¹) no presente estudo. Algumas espécies pertencentes a classe Clostridia tem a capacidade de crescer em metanol gerando ácido fórmico como *Clostridium formicoaceticum* (ADAMSE e VELZEBOER, 1982). Esse ácido fórmico pode ser então utilizado por *Methanobacterium* para a formação de metano (DEMIREL e SCHERER, 2008; RICHTER e GESCHER, 2014).

Nesse estudo também foi verificada a presença de *Methanosphaera* não-cultivada representada pela OTU 4 e contabilizando 1 % das sequências representativas. Essa arqueia é capaz de reduzir metanol a metano com utilização de hidrogênio. É uma arqueia presente no intestino dos animais. Esse microrganismo também é capaz de metabolizar acetato e CO₂ para o crescimento (FRICKE et al., 1995). A presença dessa arqueia explica o aparecimento de metano no reator em função da grande presença de metanol no sistema. KIM et al (2013) ao verificarem a comunidade metanogênica de um lodo proveniente do tratamento de resíduos de suinocultura também observaram a presença de *Methanosphaera stadtmanae* na amostra.

Tabela 5. 7 Resultado do sequenciamento genético do gene RNAr 16 s para o domínio Archaea.

OTU	Filiação	Identidade (%)	Gênero	Nº de acesso GenBank	Nº de seqüências	Comprimento da Sequência (pb)	Abundância Relativa (%)
1	<i>Methanobacterium sp não-cultivada</i>	99	<i>Methanobacterium</i>	KC533586.1	81	385	94
2	<i>Arqueia não-cultivada</i>	97	<i>Methanobacterium</i>	EU447673	1	540	1
3	<i>Arqueia não-cultivada</i>	98	<i>Methanobacterium</i>	KF848976.1	3	480	3
4	<i>Arqueia não-cultivada</i> <i>Methanosphaera sp. não-cultivada</i>	94	<i>Methanosphaera</i>	AB935212.1 KJ676678.1	1	360	1

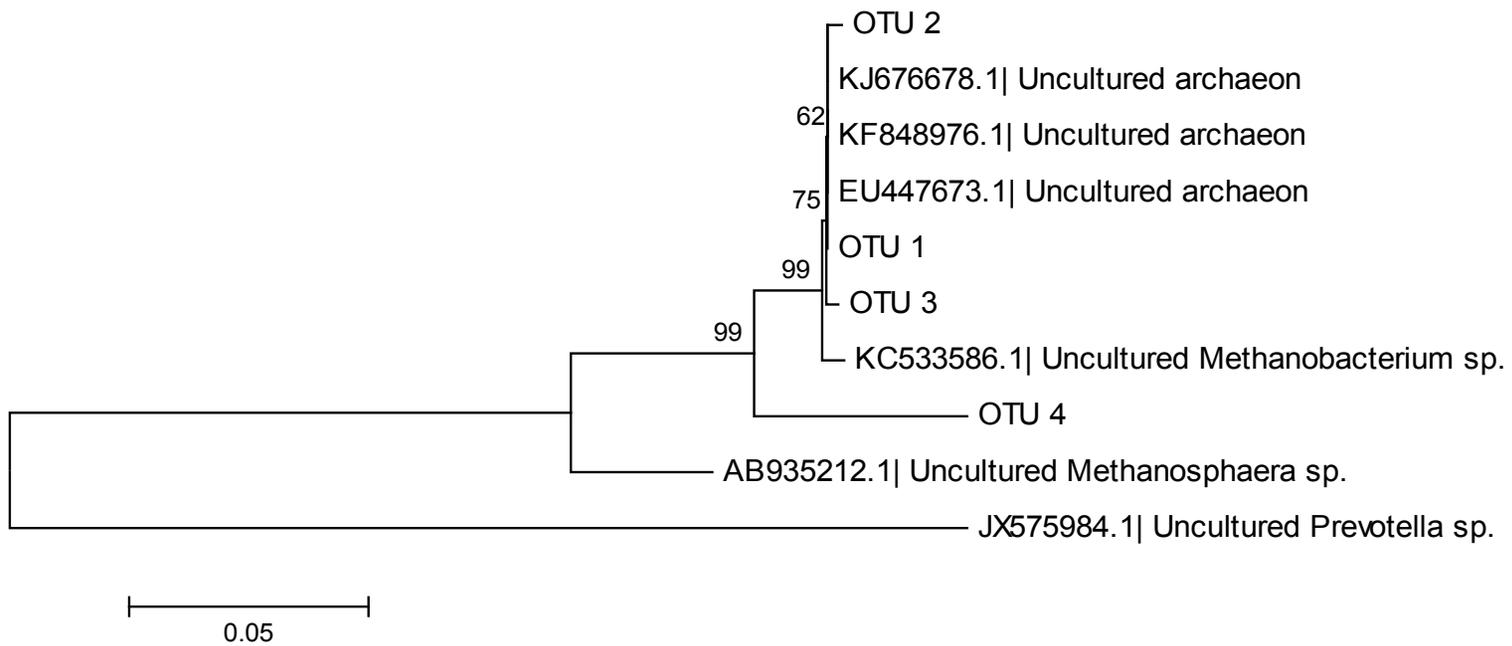


Figura 5. 21 Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com primers para Domínio Archaea. Como *outgroup* foi empregada a *Prevotella* sp não-cultivada.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Durante este experimento foi possível verificar a viabilidade de produção de biogás a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de leito fluidizado.

A manutenção de pH em condições levemente ácidas, entre 4 – 5 não foi suficiente para manter os organismos metanogênicos inativos, de modo que a partir do momento que a vinhaça se tornou o substrato orgânico principal, metano foi detectado no biogás.

A utilização de um substrato auxiliar como a glicose foi efetiva para a manutenção da produção de biogás apesar da introdução gradual de um substrato mais complexo, a vinhaça. Houve produção de metano quando a vinhaça se tornou o substrato principal.

No Reator R5 (5gDQO.L^{-1}) durante a fase IV (100 % vinhaça, TDH 6 h) houve uma produção volumétrica de H_2 ($0,57\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$). O melhor rendimento foi obtido na fase II quando se obteve $3,07\text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}\text{adicionada}$. Foi verificada produção de metano a partir da fase IV (100 % vinhaça, TDH: 6 h).

No reator R10 (10gDQO.L^{-1}) durante a fase I, II e III não foi verificada uma variação da produção volumétrica de H_2 a qual se manteve em $0,11\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Tal como o reator R5, o melhor rendimento se deu na fase II quando se obteve $1,32\text{ mmolH}_2.\text{gDQO}^{-1}\text{adicionada}$. Do mesmo modo que o R5 houve produção de metano a partir da fase IV (100 % vinhaça, TDH 6 h).

Sob alimentação única de vinhaça a produção máxima de hidrogênio se deu sob a concentração de 5 gDQO.L^{-1} e sob o tempo de detenção hidráulico de 1 h: $0,57\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e um rendimento de $1,96\text{ mmolH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQOadicionada}$.

O reator R15 gerou apenas H_2 e CO_2 , todavia, apresentou uma produção volumétrica de hidrogênio e rendimento menor que os reatores R5 e R10.

No que se refere aos metabólitos gerados, foi observada uma fermentação mista nos reatores R5 e R10. Os principais metabólitos produzidos foram o etanol, ácido butírico e o metanol. Durante a primeira fase quando somente glicose era o substrato, houve produção principal de ácido butírico e de etanol. Ambos os substratos são considerados indicadores da produção de hidrogênio.

Quando foi adicionada a vinhaça durante a fase II, houve o aparecimento de ácido propiônico o qual é considerado prejudicial aos reatores acidogênicos tem em vista que há consumo de hidrogênio durante a sua formação. Foi verificada ainda a produção de ácido láctico e ácido isobutírico. Sob a condição em que a vinhaça se tornou o substrato principal houve o aparecimento de metanol em altas proporções, sendo que esse perfil se manteve durante as outras faixas de operação.

Para as condições de maior produção volumétrica de hidrogênio foi realizada as análises de DGGE e de sequenciamento. Foi verificada na fase IV (100%, 1h) do reator R5 a presença de *Prevotella* e *Megasphaera*. Tais bactérias apesar de pouco usuais na literatura em trabalhos para a produção de hidrogênio produzem ácido butírico, ácido acético, ácido propiônico, ácido valérico, além de hidrogênio em baixas concentrações.

No que se refere à biologia molecular das arqueias metanogênicas foi verificada a presença de microrganismos pertencentes ao gênero *Methanobacterium*. Tais arqueias são responsáveis pela produção de metano e algumas espécies são tolerantes ao baixo pH empregado no estudo. Foi encontrado também arqueias do gênero *Methanosphaera* que geram metano a partir da redução de metanol.

Foi proposto nesse estudo que a produção de metano está ligada a alta presença de metanol pelo sistema. As condições de baixo pH e elevado tempo de detenção hidráulica, apesar de serem condições adversas para a formação de metano pelas arqueias, foram compensadas pela disposição de substrato como o metanol para que a produção de metano pudesse ocorrer. Algumas espécies da classe Clostridia podem crescer em metanol gerando algum intermediário que pode ser utilizado pelas *Methanobacterium* para a formação de metano.

Assim, conclui-se que é possível a produção de biogás a partir da vinhaça, especificamente a geração conjunta de metano e hidrogênio é possível e pode ser uma possibilidade futura de obtenção de mistura de combustíveis, como é o caso hitano (hidrogênio+metano). Ainda, a produção de solventes importantes foi verificada como metanol e etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSE, A.D.; VELZEBOER, C.T.M. Features of a *Clostridium*, strain CV-AA1, an obligatory anaerobic bacterium producing acetic acid from methanol. (1982) *Antonie Van Leeuwenhoek*, 48 (4), 305-313.

AMORIM, E.L.C.; SADER, L.T.; SILVA, E.L. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. (2012) *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1248-1263.

AKUNNA, J.C.; CLARK, M. Performance of a granular-bed anaerobic baffled reactor (GRABBR) treating whisky distillery wastewater. (2000) *Bioresource Technology*, 55, 215-221.

ARGUN, H.; KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7443-7459.

ASSAWAMONGKHOLSIRI, T.; REUNGSANG, A.; PATTRA, S. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures (2013) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6146-6153.

BALAGUER, M.D. ; VINCENT, M.T.; PARIS, J.M. Anaerobic fluidized bed reactor with sepiolite as support for anaerobic treatment of vinasse. (1992) *Biotechnology letters*, 4, 433-438.

BARROS, A.R.; ADORNO, M.A.T.; SAKAMOTO, I.K.; MAITINGUER, S.I.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Performance Evaluation And Phylogenetic Characterization Of Anaerobic Fluidized Bed Reactors Using Ground Tire And Pet As

Support Materials For Biohydrogen production.(2010) *Bioresource Technology*, 102, 3840-3847.

BARROS, A.R.; SILVA, E.L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. (2012) *Biochemical Engineering Journal*, 61, 59-65.

BAUER, C.G.; FOREST, T.W. Effect of hydrogen addition on the performance of methane-fueled vehicles. (2001) Part 1: Effect on S.I. engine performance, *International Journal of Hydrogen Energy* 26, 55-70

BECCARI, M; BONEMAZZI, F.; MAJONE, M.; RICCARDI, R. Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. (1996) *Water Research*, 30, 183-189.

BICHARA, J.M. Contribuição ao estudo do tratamento físico-químico da vinhaça: coagulação, floculação e sedimentação.1988. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BORJA, R.; MARTÍN, A.; MAESTRO, R.; LUQUE, M.; DÚRAN, M.M. Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by the removal of phenolic inhibitors (1993) *Bioresource Technology* 45, 99-104.

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen Production From Tequila Vinasses In An Anaerobic Sequencing Batch Reactor: Effect Of Initial Substrate Concentration, Temperature And Hydraulic Retention Time (2010) *Bioresource Technology*, 101, 9071 – 9077.

BUITRON, G.; KUMAR, G.; MARTINEZ-ARCE, A.; MORENO, G. Hydrogen and Methane production via a two-stage processes (H₂-SBR+CH₄-UASB) using tequila vinasses (2014) *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (33), 19249-19255

CAI, G. ; JIN, B.; SAINT, C.; MONIS, P. Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations (2010). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 6681-6690.

CAI, G.; JIN, B.; MONIS, P.; SAINT, C. A genetic and Metabolic Approach to Redirection of Biochemical Pathways of *Clostridium butyricum* for Enhancing Hydrogen Production. (2013) *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 338-342.

CAMARILLO, R.; RINCÓN, J. Effect of inhibitory compounds on the two-phase anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. *Chemical Engineering Journal*. (2012) 193-194, 68–76.

CASTELLO, E.; GARCIA y SANTOS, C.; IGLESIAS, T, PAOLINO, G; WENZEL, J.; BORZACCONI, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance (2009). *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 5674-5682.

CHAGANTI, S.R.; KIM, D.H.; LALMAN, J.A. Impact of oleic acid on the fermentation of glucose and xylose mixtures to hydrogen and other by products. (2012) *Renewable Energy*, 42, 60-65.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing Reactor. (2003) *Advances in Environmental Research*, 7, 695-699.

CHEN, Y.; CHENG, J.J.; CREAMER, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. (2008) *Bioresource Technol*, 99, 4044 – 4064.

CHEN, C.C. ; CHUANG, Y.S.; LIN, C.Y; LAY, C.H.; SEN, B. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15540-15546.

CHIN-CHAO C., YEONG-SONG C., CHIAN-YU L., CHYI-HOW L., BISWARUP S. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15540–15546

CHONG, M.L.; RAHIM, R.A.; SHIRAI, Y.; HASSAM, M.A. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. (2009) *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 764–771

CONRAD, R.; WETTER, B. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. (1990) *Archives of Microbiology*. 155:94-98.

CORREA NETO, V.; RAMON, D. VIBHAVA Consultoria Empresarial S/C Ltda.; SETAP Brazil Representation. (2002) *Sustainable Energy Technology Assistance Program*.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N.; Advances in biological hydrogen production processes (2009) *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046-6057.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. (2008) *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7-173-190.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A., HAMILTON, J.K.; REBERS,P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. (1956) *Anal Chem*, 28, 350-356.

ESPINOZA-ESCALANTE, F.M.; ORTIZ, C.P.; CORONA, J.N.; GARCIA, Y.G.; BORIES, A.; PULIDO, H.G. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of agave tequilana weber to tequila: the effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. (2009) *Biomass Bioenergy*, 33, 14 – 20.

EROGLU, E.; EROGLU, I; GUNDUZ, U.; TURKER, L.; YUCEL, M. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes (2006) *International Journal of Hydrogen Energy* 31 1527 – 1535

FAN, Y.;ZHANG, Y., ZHANG. S.; HOU, H.; REN, B. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost (2006) *Bioresource Technology*, 97, 500-505

FANG, H.H.P.; LIU, H. Effecto of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. (2002) *Bioresource Technology*, 82, 97-93.

FERNANDES, B.S; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F.R.; AGUILLA, N.K.S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. (2010) *Energy for sustainable Development*, 14, 143-148.

FERNANDES, B.S.; SAAVEDRA, N.K.; MAINTIGUER, S.I.; SETTE, L.D.; OLIVEIRA, V.M.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M. The Effect of Biomass Immobilization Support Material and Bed Porosity on Hydrogen Production in an Upflow Anaerobic Packed-Bed Bioreactor. (2013) *Applied Biochemical Biotechnology*, 170, 1348-1366.

FERRAZ, A.D.N.; WENZEL, J.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. (2014) *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 16852-16862.

FRICKE, W.F.; SEEDORF, H.; HENNE, A.; KRUER, M.; LIESENG, H.; HEDDERICH, R.; GOTTSCHALK, G; THAUER, R.K. The Genome Sequence of *Methanospaera stadtmanae* Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis (1995) *Journal of Bacteriology*, 188(22), 642-658

FURUZAKI, S.; NISHIO, N. Methanogenic Fermentation and Growth of Granular Methanogenic Sludge on a Methanol-Propionate Mixture (1997) *Journal of fermentation and Bioengineering*, 84, 382-385.

GALBALLY, I.E.; KIRSTINE, W. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol (2002) *Journal of Atmospheric Chemistry* 43, 195-229

GANESH, R; RAJINIKANTH, R.; THANIKAL, J.V.; RAMANAJAM, R.A.; TORRIJOS, M. Anaerobic treatment of winery wastewater in fixed bed reactors. (2010) *Bioprocess Biosystem Engineering*, 33, 619 – 628.

GADOW, S.I.; LI, Y.Y.; LIU, Y. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. (2012) *International Journal of hydrogen Energy*, 37, 15465-15472

GAHDE, A.; SONAWANE, S.S; VARMA, M.N. Evaluation of ultrasonication as a treatment strategy for enhancement of biohydrogen production from complex distillery

wastewater and process optimization (2014) *International Journal of hydrogen Energy*, 39(19), 10041-10050

GUO, W.Q. ; REN, N.Q.; CHEN, Z.B.; LIU, B.F. ; WANG, X.J. ; XIANG, W.S. ; DING, J. Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in an acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for long-term operation. (2008a). *International Journal of hydrogen Energy*, 33, 7397-7404.

GUO, W.Q.; REN, N.Q.; WANG, X.J.; MENG, Z.H.; DING.J.; QU, Y.Y; ZHANG, L.S. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. (2008b). *International Journal of hydrogen Energy*, 33, 4981-4988.

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRERE, H.; STEYER, J.P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. (2010) *International Journal of hydrogen Energy*, 35, 10660-10673.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry (2008) *Biotechnology for biofuels*, 1:6

GOUD, RK.; RAGHAVULU, S.V.; MOHANAKRISHNA, G.; NARESH, K.; MOHAN, S.V. Predominance of *Bacilli* and *Clostridia* in microbial community of hydrogen producing biofilm sustained under diverse acidogenic operating conditions (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 4068-4076.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELLA, A. G.; BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and rna from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rrna-based microbial community composition.(2000) *Applied Microbiology. Biotechnology*, 66, 5488–5491.

HALENBECK, P.C and GHOSH, D. (2012) Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. *Journal of Environmental Management*, 95, S360-S364

HAN, S.K.; SHIN, H.S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste (2004) *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 569-577.

HARADA, H.; UEMURA, S.; CHEN, A.C.; JAYADEVAN, J. Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor (1996) *Bioresource Technology*, 55, 215-221.

HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D.; SKONIECZNY, M.T., YARGEAU, V. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. (2009) *Indian Journal of Microbiology*, 49, 48-59.

HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D. Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering (2012) *Journal of Environmental Management*, 95, S360-S364.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization (2002) *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources.(2000) *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87-107.

HU, C.C.; GIANNIS, A.; CHEN, C.L.; WEI, Q.; WANG, J.Y. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria (2013) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 15686-15692

HUNG, C.H.; CHANG, Y.T.; CHANG, Y.J. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. (2011) *Bioresource Technology*, 102 (18), 8437-8444

HWANG, M.H.; JANG, N.J.; HYUN, S.H.; KIM, I.S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. (2004) *Journal of Biotechnology*, 111, 297-309.

INTANOO, P; RANGSUNVIGIT, P; NAMPROHM, W.; THAMPRAJAMCHIT, B.; CHAVADEJ, J; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation (2012) *International Journal of hydrogen Energy* 37, 11104-11112

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. (2005) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 260-265.

JIMENEZ,A.M.; BORJA, R.; MARTIN, A. Aerobic/ anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. (2003) *Process Biochemistry*, 38-1275-1284.

JUNG, K.W.; KIM, D.H.; SHIN, H.S. Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. (2010). *International Journal of hydrogen Energy*, 35, 13370-13378.

JUNG, K.W. ; KIM, D.H. ; KIM, S.H. ; SHIN, H.S. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. (2011) *Bioresource Technology*, 102, 8612-8620.

KALAMASKAR, L.B.; DHAKEPHALKAR, P.K.; MEHER, K.K.; RANADE, D.R. High biohydrogen yielding *Clostridium* sp. DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant (2010) *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10639-10644

KHANAL, S.K.; CHEN, W.H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products (2004) *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123-1131.

KIM, I.S.; HWANG, M.H.; JANG, N.; HYUN, S.H.; LEE, S.T. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. (2006a) *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 133-1140.

KIM, S.H.; HAN, S.K.; SHIN, H.S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. (2006b) *Process Biochemistry*, 41, 199-207.

KIM, W.; CHO, K.; LEE, S.; HWANG, S. Comparison of methanogenic community structure and anaerobic process performance treating swine wastewater between pilot and optimized lab scale bioreactors (2013) *Bioresource Technology* (145), 48-56.

KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol (2013) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 11749-11755.

KUO, S.C.; CHAO, Y.C.; TIEN, Y.M.; CHEN, I.C.; CHENG, S.S. Bio-hydrogen behavior of suspended and attached microorganisms in anaerobic fluidized bed (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 8800-8808

KOUTROLI, E.C.; GAVALA, H.N; SKIADAS, I.V; LYBERATOS, G. Mesophilic Biohydrogen Production From Olive Pulp. (2006) *Process Safety and Environmental Protection*, 84(B4): 285 – 289

KRYSTEVA, M.; LALOV, I; BESCHKOV, V. Acceleration and increase of hydrogen production by simultaneous fermentation of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* on wine-vinasse substrate. (2010) *Bulgarian Chemical Communications*, 42, 46–50

LANE, J.D. 16S/23S rRNA sequencing (1991) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons Inc, New York, 115–148

LEE, K.S.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 465-472.

LI, C.; ZHANG, T.; FANG, H.H. Fermentative hydrogen production in packed-bed and packing-free upflow reactors (2006) *Water Science and Technology*, 54, 95-103.

LI,C, FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. (2007) *Crit Rev Environ Sci Technol*; 37,1-39

LIN, C.Y.; CHANG, R.C Hydrogen production during the anaerobic conversion of glucose. (1999) *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 498-500

LIN, C.; LEE, C.Y.; TSENG, I.C.; SHIAO, I.Z. Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. (2006) *Process Biochemistry*, 41, 915-919.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q.; SHIM, H. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). (2010) *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 11733-11737.

LAOTHANACHAREONA T.; KANCHANASUTAB S.; MHUANTHONGA W.; PHALAKORNKULEB C.; PISUTPAISALB N. ; CHAMPREDAA V. Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing (2014) *Journal of Environmental Management*, 144 (1), 143-151

LAZARO, C.Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M.B.A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: the effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* 2014; 39: 6407-6418.

LJUNGDAHL, L.G.; HUGENHOLTZ, J.; WIEGEL, J. Acetogenic and Acid-Producing Clostridia (1989) *Biotechnology Handbooks*, 3, 145-191.

LI, C.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production in packed-bed and packing-free upflow reactors.(2006) *Water Science Technology*, 54, 95-103.

MAINTINGUER, S.I.; FERNANDES, B.S.; DUARTE, I.C.S.; SAAVEDRA, N.K.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B.A. Fermentative hydrogen production with xylose by Clostridium and Klebsiella species in anaerobic batch reactors. (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 3508-3517.

MARCHADIN, H.; JUVONEN, R.; HAIKARA, A. BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Volume 3 Firmicutes. Second Edition. Volume Four. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. 2010., 1082-1090

MARIAKAKIS, I.; BISCHOFF, P.; KRAMPE, J.; MEYER, C.; STEINMETZ, H. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during biohydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. (2010) *International Journal of Hydrogen Production*, 36, 10690-10700.

MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate (2007) *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4), 506-515.

MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate (2008 a) *Bioresource Technology*, 99, 59-67.

MOHAN, S.V.; MOHANAKRISHNA, G.; RAMANAIAH, S.V.; SARMA, P.N. Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment in biofilm configured anaerobic periodic discontinuous batch reactor using distillery wastewater. (2008 b) *International Journal of Hydrogen Production*, 35, 550-558.

MOHAN, S.V.; AGARWA, L.; MOHANAKRISHNA, G.; SRIKANTH, S.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J.; SMARMA, P.M. Firmicutes with iron dependent hydrogenase drive hydrogen production in anaerobic bioreactor using distillery wastewater. (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 8234-8242.

MOTA, V.T.; SANTOS, F.S.; AMARAL, M.C. Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: Assessment on biological activity and filtration performance (2013) *Bioresource Technology*, 146, 494-503

MISHRA, P.; DAS, D. Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent (2014) *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (14), 7496-7507.

MIZUNO, O.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion (1998). *Water Research*, 32, 1626-1634.

MUNOZ-PAEZ, K.M.; RUIZ-ORDAZ, N.; GARCIA-MENA, J.; PONCE-NOYOLA, M.T.; RAMOS-VALDIVIA, A.C.; ROBLES-GONZALEZ, I.V; VILLA-TANACA, L; BARRERA-CORTES, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35 °C. (2013) *International Journal of hydrogen Energy*, 38, 12570-12579.

NANDY, T.; SHASTRY, S.; KAUL, S.N. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery (2002) *Journal of Environmental Management*, 65(1), 25-38

NASR, N; ELBESHISHY, E.; HAFEZ, H; NAKKLA, G; NAGGAR. Biohydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 2761-2769.

NASR, N; ELBESHISHY, E.; HAFEZ, H; NAKKLA, G; NAGGAR. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. (2012) *Bioresource Technology*, 111, 122-126.

NISSILA, M.E. ; TAHTI, H.P. ; RINTALA, J.A. ; PUHAKKA, J.A. Effects of heat treatment on hydrogen production potential and microbial community of thermophilic compost enrichment cultures. (2011) *Bioresource Technology*, 102, 4501-4506.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. (2010) *Waste Biomass Valor* 1, 21–39

NGOMA L, MASILELA P, OBAZU F, GRAY VM. The effect of temperature and effluent recycle rate on hydrogen production by undefined bacterial granules. (2011) *Bioresource Technology* ; 102:8986-8991.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKA, A.; SNAIRD, J.; WIESHUBER, A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis (1996) *Journal of Bacteriology*, 178, 5636-5643

OBAZU, F.O.; NGOMA, L.; GRAY, V.M. Interrelationship between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H₂, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures.(2012) *International Journal of Hydrogen Energy*; 37:5579-5590.

OH, S. E. VAN GINKEL, LOGAN, B.E The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing bio-hydrogen gas production (2003) *Environmental Science Technology*, 37, 5186–5190

OH, S.E; IYER,P. BRUNS, M.A. LOGAN, B.E. Biological hydrogen production using a membrane bioreactor (2004) *Biotechnology Bioengineering*, 119–127

OH, S.T.; MARTIN, A.T. Glucose contents in anaerobic ethanol stillage digestion manipulate thermodynamic driving force in between hydrogenophilic and acetoclastic methanogens. (2014) *Chemical Engineering Journal*, 243, 526-536.

OHNISHI, A; BANDO, Y.; FUJIMOTO, N.; SUZUKI, M. Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora.(2010) *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 8544-8553.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. (2008). *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1204-1214.

OHNISHI, A.; BANDO, Y.; FUJIMOTO, N.; SUZUKI, M. Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. (2010) *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (16), 8544-8553.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. (2007) *Bioresource Technology*, 98, 2321-2343.

PERNA, V. ; CASTELLÓ, E. ; WENZEL, J. ; ZAMPOL, C.; FONTES LIMA, D.M.; BORZACONNI, L.; VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; ETCHEBERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. (2013) *International Journal of hydrogen Energy*, 38, 54-62.

QIU, C.; WEN, J.; JIA, X. Extreme-thermophilic biohydrogen production from lignocellulosic bioethanol distillery wastewater with community analysis of hydrogen-producing microflora (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36,8243-8251.

QUÉMÉNEUR, M.; HARNELIN, J.; LATRILLE. E.; STEYER, J.P.; TRABLY, E. Development and application of a functional CE-SSCP fingerprinting method based on [Fe-Fe]-hydrogenase genes for monitoring hydrogen-producing *Clostridium* in mixed cultures (2010) *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (24), 13158-13167

RAMOS, C. ; BUITRON, G. ; MORENO-ANDRADE, I ; CHAMY, R. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. (2013) *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 13288-13295

REIS, C.M; SILVA, E.L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production (2011) *Chemical Engineering Journal*, 172, 28-36

REN, N; Wang, B; Huang, J. Ethanol type fermentation from carbohydrate in high rate acidogênico reactor. (1997) *Biotechnology and Bioengineering* 54- 428-433.

REN, N.; LI, Z.; LI, B.; WANG, Y.; LIU, S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system (2006) *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2147-2157.

REN, N.; WANG, A.; CAO, G.; XU, J.; GAO, L. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. (2009) *Biotechnology Advances*, 27, 1051-1060.

REUNGSANG, A. SREELA-OR, C.; PLANGKLANG, P. Non-sterile bio-hydrogen fermentation from food waste in a continuous stirred tank reactor (CSTR): Performance and population analysis. (2013 a) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15630-15637.

REUNGSANG, A. ; SITTIJUNDA, S. ; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate (2013 b) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6970-6979.

RIBAS, M.M.F. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio operado em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

RICHTER, K.; GESCHER, J. Accelerated glycerol fermentation in *Escherichia coli* using methanogenic formate consumption. (2014) *Bioresource Technology*, 162, 389-391.

RIFKIN, J. A economia do hidrogênio. *Makron Books*. São Paulo, 2003.

RODRIGUEZ, E.; LOPES, A.; FDZ-POLANCO, M.; STAMS, A.J.M.; GARCIA-ENCINA, P. Molecular analysis of the biomass of fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. (2011) *Environmental Biotechnology*, 93, 2181-2191.

ROY, S.; GHOSH, S.; DAS, D. Improvement of hydrogen production with thermophilic mixed culture from rice spent wash of distillery industry (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 7767-7773.

ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Hydrogen Production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition (2014) *Bioresource Technology*, 161, 10-19.

SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. (2014 A) Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 9599-9610.

SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Organic Loading Rate impact hydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane vinasses (2014 B) *Bioresource Technology*, 159, 55-63.

SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. (2014 C) Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage (2014 B). *International Journal of Hydrogen Energy*, 39,9000-9011.

SCHINK, B.; ZEIKUS, J.G. Microbial Methanol Formation: A major end product of pectin metabolism (1980) *Current Microbiology*, 4,387-389

SCOMA, A.; BERTIN, L.; FAVA, F. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen and volatile fatty acids production during acidogenic digestion of dephenolized olive mill wastewaters. (2013) *Biomass and Bioengineering*, 48, 51-58.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M.; VALLIAPAN, K. Performance evaluation of full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating distillery spentwash (2012) *Clean Techn Environ Policy* 14, 267–271

SHI, XY; JIN, D.W.; SUN, Q.Y.; LI, W.W. Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. (2010) *Renewable Energy*, 35, 1493-1498.

SHI, X.; KIM, D.H.; SHIN, H.S.; JUNG, K.W. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* by anaerobic mixed cultures. (2013) *Bioresouce Technology*, 144, 225-231

SHIDA, G.M.; BARROS, A.R.; REIS, C.M.; AMORIM, E.L.C.; DAMIANOVIC, M.H.Z.; SILVA, E.L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. (2009)*International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3679-3688.

SHIN, H.S.;YOUN, J.H.; KIM, S.H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis (2004) *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1355-1363.

SIRIWONGRUNGSON, V., RAYMOND, J. Zeng, ANGELIDAKI I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. 2007 *Water Research*; 41(18):4204-10

SIDNEY, E.B; LARROUCHE, C.;NOVAK, A.C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; LETTI, L.A.J.;SOCCOL,V.T.; SOCCOL, C.R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. (2014) *Bioresource Technology*, 159,380-386.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, D.C., USA, 1998.

SEARMSIRIMONGKOL, P; RANGSUNVIGT, P.; LEETHOCHAVALIT, M.; CHADEJ, S. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using anaerobic sequencing batch reactor. (2011) *Int J Hydrogen Energy*, 36, 12810-12821.

SEGHEZZO, L.; ZEEMAN, G; VAN LIER, J.B.; HAMELERS, H.V.M.; LETTINGA, G. (1998) A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, 65, 175-190.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M.; VALLIAPAN, K. Performance evaluation of full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating distillery spentwash (2012) *Clean Techn Environ Policy* 14, 267–271

SHIDA, G.M; SADER, L.T; AMORIM, E.L.C.; SAKAMOTO, I.K.; MAITINGUER, S.I.; SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 16925-16934.

SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. (2011) *Bioresource Technology*, 102, 8524-8533.

SREELA-OR,C.; PLANGKLANG, P.; IMAI, T.; REUNGSANG, A. Co-digestion of food waste and sludge for hydrogen production by anaerobic mixed cultures: Statistical key factors optimization (2011) *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 14227-14237.

SKONIECZNY, M.T; YARGEAU,V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. (2009) *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3288-3294.

TACONI, K.; ZAPPI, M.; FRENCH, T; BROWN, L. Methanogenesis under acidic pH conditions in a semi-continuous reactor system (2008) *Bioresource Technol*, 99, 8075–8081

TANISHO,S; ISHIWATA, Y. Continuous Hydrogen Production from molasses by the bacterium *Enterobacter Aerogenes*. (1994) *International Journal of Hydrogen Energy*, 19, 807-812.

TAWFIK, A.; EL-QELISH Key factors affecting on bio-hydrogen production from co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and kitchen wastewater (2014) *Bioresource Technology*, 168, 106-111.

THANWISED, Effect of hydraulic retention time on hydrogen production and chemical oxygen demand removal from tapioca wastewater using anaerobic mixed cultures in anaerobic baffled reactor (ABR). (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15503-15510.

TOKUMOTO, H; KASHIWASHI, M. Changes in dominant fermentation type during anaerobic digestion of high-loading glycerol with slight glucose content.(2012) *Bioresource Technology*, 126, 13–17

UENO, Y.; HARUTA, S.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost (2001). *Applied Microbiology Biotechnology*, 57, 555-562.

VAN DER MEIJDEN, P.; VAN DER DRIFT, C.; VOGELS, G. Methanol conversion in *Eubacterium limosum*. (1984) *Archives of Microbiology*, 138, 360-364.

VAN GINKEL, S., LAY, J.J.; SUNG, S. Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. (2001) *Environmental Science and Technology*, 35, 4726-4730

VAN GINKEL, S.; OH, S.E.; LOGAN, B.E. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters.(2005) *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1535-1542.

VATSALA, T.M.; RAJ, S.M.; MANIMARAN, A. A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture. (2008) *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1359 – 1365.

VIGNAIS, P.M.; COLBEAU, A. Molecular Biology of Microbial Hydrogenases (2004) *Current Issues on Molecular Biology*, 6, 159-188.

VISSERS, E.; BODELIER, P.L.E.; MUYZER, G.; LAANBROEK, H.J. A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16SrRNA gene fragments from fresh water samples (2009) *FEMS Microbiology Letters*, 298, 193-198

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage Characterization And Anaerobic Treatment Of Ethanol Stillage From Conventional And Cellulosic feedstocks. (2000) *Biomass bioenergy*, 19, 63 – 102.

WON, S.G.; BALDWIN, A.K.; LAU, A.K.; REZADEHBASHI, M. Optimal operational conditions for biohydrogen production from sugar refinery wastewater in ASBR (2013) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38 (32), 13895-13906.

WU, K.J.; CHANG, C.F.; CHANG, J.S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. (2007) *Process Biochemistry*, 42, 1165–1171.

WU, S.Y.; HUNG, C.H.; LI HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. (2008) *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1542-1549.

WU, X.; YAO, W.; ZHU. Effect of pH on continuous biohydrogen production from liquid swine manure with glucose supplement using an anaerobic sequencing batch reactor (2010) *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 6592-6599.

WU, S.Y.; CHU, C.Y.; SHEN, Y.C. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed reactor with activated carbon immobilized cells. (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37,15496-15502.

WU, S.Y.; CHU, C.Y.; Y., W.Z. Aspect ratio effect of bioreactor on fermentative hydrogen production with immobilized sludge (2013). *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 6154-6160.

XIA, Y; CAI, L; ZHANG, T.; FANG, H. Effects of substrate loading and co-substrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (18),13652-13659

XIAO, L.; DENG, Z.; FUNG, K.Y.; NG, K.M. Biohydrogen generation from anaerobic digestion of food waste (2013). *International Journal of Hydrogen Energy*, 38 (18),13907-13913.

XING, D.; REN, N.;LI, Q.; LIN, M.; WANG, A.;ZHAO, L. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov.,isolated from molasses wastewater (2006) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58,755-760

XING, Y; LI, Z.; FAN, Y.; HOU, H. Biohydrogen production from dairy manures with acidification pretreatment by anaerobic fermentation. (2010) *Environmental Science Pollutants Research*, 17, 392-399.

YANG, P.; ZHANG, R.; McGARVEY, J.A.; BENEMANN, J.R. Biohydrogen Production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities (2006) *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 4761-4771.

YU, H.; ZHU, Z.; HU, W.; ZHANG, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. (2002) *International Journal of Hydrogen Energy*, 19, 807-812.

WU, S.Y.; CHU, C.Y.; SHEN, Y.C Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. (2012) *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15496-15502.

WEIJMA, J. ; STAMS, A.J.M. Methanol conversion in high –rate anaerobic reactors. (2001) *Water Science and Technology*, 44, 7-14.

WICHER, E.; SEIFERT, K. ; ZAGRODNIK, R. ; PIETRZYK, M. ; LANIECKI, M. Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation (2013) *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 7767-7773.

VISSERS, E.; BODELIER, P.L.E.; MUYZER, G.; LAANBROEK, H.J. A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16SrRNA gene fragments from fresh water samples. (2009) *FEMS Microbiol Lett*; 298, 193-198.

WU, S.Y.; HUNG, C.H.; LIN, C.Y.; LIN, P.J.; LEE, K.S.; LIN, C.N.; CHANG, F.Y.; CHANG, J.S. HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate (2008) *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1542-1549.

ZHANG, H.; BRUNS, M.A.; LOGAN, B.E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor (2006) *Water Research*, 40, 728-734.

ZHANG, Z.B.; SHOW, K.Y.; TAY, J.H.; LIANG, D.T.; LEE, D.J. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors—A comparison of biofilm-based and granule-based systems.(2007a) *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1559-1564.

ZHANG, M.L., FAN Y., XING Y, PAN C, ZHANG G, LAY J. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures.(2007b) *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 250-254