



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



**Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação
acidogênica de águas residuárias agroindustriais em reator
anaeróbio de leito fluidizado**

Aluna: Paula Rúbia Ferreira Rosa

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos, 2014

**Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação
acidogênica de águas residuárias agroindustriais em reator
anaeróbio de leito fluidizado**

Paula Rúbia Ferreira Rosa

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 doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos, 2014

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

R788ph

Rosa, Paula Rúbia Ferreira.

Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação acidogênica de águas residuárias agroindustriais em reator anaeróbio de leito fluidizado / Paula Rúbia Ferreira Rosa. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

165 f.

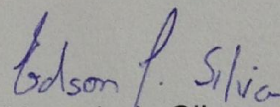
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Engenharia química. 2. Produção de hidrogênio. 3. Etanol. 4. Soro de queijo. 5. Manipueira. I. Título.

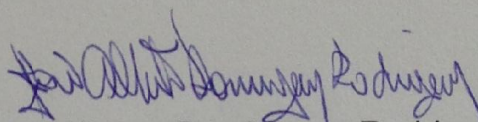
CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **PAULA RÚBIA FERREIRA ROSA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 28 DE MARÇO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



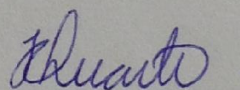
Edson Luiz Silva
Orientador / UFSCar



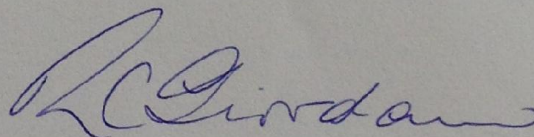
José Alberto Domingues Rodrigues
IMT



Ariovaldo José da Silva
UNICAMP



Iolanda Cristina Silveira Duarte
UFSCar Sorocaba



Roberto de Campos Giordano
UFSCar

Ao meu marido Octávio;
À minha filha Giovanna;
Aos meus pais Vicente e Tânia;
Pelo apoio, estímulo e compreensão.

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer".
(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e dar força e coragem nas horas mais difíceis.

Ao meu marido Octávio e minha filha Giovanna pelo carinho, suporte e confiança desde o início de minha caminhada.

Aos meus pais Tânia e Vicente pela compreensão, amor e confiança. Tudo que conquistei até hoje foi graças a vocês. Ao meu irmão, Vicente Júnior pela sua amizade e por sempre me apoiar.

A minha irmã do coração, minha prima Fernanda, sempre presente nas minhas horas mais difíceis, mesmo estando longe, me apoiando e me incentivando na luta pelos meus sonhos.

Ao Professor Dr. Edson Luiz Silva, pela oportunidade, confiança, dedicação na orientação, conselhos e também pela paciência. Por ter me mostrado que, como todas as pessoas, eu também sou capaz ! Muito obrigado!

À Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amâncio Varesche pelos ensinamentos constantes, pela dedicação, e valiosas contribuições durante meu doutorado.

À querida Dra. Isabel Sakamoto, pelo grande ajuda e paciência no trabalho referentes as análises de Biologia Molecular. Sua enorme tranquilidade, confiança e pensamento positivo fizeram com que todas as etapas fossem um sucesso.

À minha grande amiga e parceira Samantha, pelas infinitas conversas, pelo apoio, e pelos momentos inesquecíveis de alegria e descontração que me proporcionou. Com certeza uma amizade que vou levar para a vida toda.

Às minhas amigas especiais, companheiras diárias, Mariana, Cristiane, Carolina, Janaina e Morgana, pelo carinho, apoio nos momentos difíceis, e pela grande amizade.

Ao técnico Oscar Silva, pessoa de enorme coração. Sempre disposto a ajudar e solucionar problemas sempre que necessário.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar, pelas instalações e oportunidade concedida.

À Maria Ângela Adorno (Janja), pelo carinho, ensinamentos e colaboração na utilização do cromatógrafo.

Aos colegas e laboratoristas do Laboratório de Processos Biológicos, no Departamento de Hidráulica e Saneamento, por proporcionarem condições para a realização de uma parte da etapa experimental deste projeto.

Aos novos amigos, que tive o prazer de conhecer nesta trajetória no LPB (Tiago, Priscila, Livia e Bruna).

Aos Professores Dr. Alberto e Dr. José Alberto, pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos membros da comissão julgadora, agradeço pelo exemplo de postura, pessoal e profissional, e pelas considerações incorporadas nesta tese.

À Cargill e a Farinheira Plaza pelo fornecimento das águas residuárias, soro de queijo e manipueira.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido e pelo investimento no Laboratório de Controle Ambiental II do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

Às pessoas que, cada um de sua maneira, contribuíram para realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH), da origem de diferentes inóculos (lodo de suínos e lodo de aves), e da fonte de carbono (glicose, manipueira e soro de queijo) sobre a estabilidade e eficiência do reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF) na produção de hidrogênio e etanol. Foram utilizados doze reatores idênticos, sendo que em dois reatores foram utilizados mistura de glicose com soro de queijo (R1S, R2S), seis reatores foram utilizados a mistura de água do processamento da mandioca (manipueira) e glicose (R1M, R2M, R3M e R4M). Também foi avaliado o uso individual do soro de queijo (R3S, R4S, R5S e R6S) e da manipueira (R5M e R6M). Os RALFs foram inoculados com lodo proveniente do tratamento de águas residuárias de suinocultura (R1S, R3S, R1M, R3M, R5S, R6S, R5M e R6M) e de águas residuárias do abatedouro de aves (R2S, R4S, R2M, R4M), ambos tratados termicamente. Foram realizadas variações de TDH (14-1 h) e concentrações de substrato (2- 15 g. L⁻¹), com controle de temperatura a 30°C. Os reatores que utilizaram soro de queijo como substrato apresentaram um maior potencial para a produção de hidrogênio, com rendimentos (HY) de 3,2 mmolH₂.g⁻¹DQO (R6S) e 2,6 mmolH₂.g⁻¹DQO (R5S), por meio da aplicação de um TDH de 6 e 14 horas, com uma concentração de 3 e 5 g.L⁻¹, respectivamente. Ambos os substratos apresentaram potencial para a produção de etanol, com rendimentos (EtOHY) de 4,2 mmolEtOH.g⁻¹DQO (R6M) e 3,5 mmolEtOH.g⁻¹DQO (R2S). Na comparação entre os dois inóculos utilizados, ambos apresentaram um equilíbrio em termos de produção de hidrogênio, porém em termos de produção de etanol, o lodo proveniente do abatedouro de aves apresentou um maior potencial. Por meio da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S para o domínio bactéria do reator R4S (soro de queijo), houve a predominância do gênero *Selenomonas* (69% das sequências) e do gênero *Clostridium* (8% das sequências). Para o reator R3M (glicose e manipueira) as análises de clonagem e sequenciamento do consórcio bacteriano revelaram semelhanças com *Lactobacillus*. Já para o domínio archaea, o sequenciamento do gene RNAr 16S, teve altas similaridades com gênero *Methanobacterium* (98,5% e 95% das sequências), para os reatores R4S e R3M, respectivamente.

Palavras chaves: Produção de hidrogênio, produção de etanol, reator anaeróbico de leito fluidizado, soro de queijo e manipueira.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of hydraulic retention time (HRT), the origin of different inoculum (sludge from a UASB reactor for swine wastewater treatment and poultry slaughterhouse), and different carbon source (glucose, cassava processing wastewater and cheese whey) on the stability and efficiency of the anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) for producing hydrogen. Twelve identical reactors were used, and in two reactors the mixture of glucose with cheese whey (R1S, R2S) was used as a substrate, six reactors were used with mix cassava processing wastewater and glucose (R1M, R2M, R3M and R4M). It was evaluated use of cheese whey (R3S, R4S, R5s and R6S) and cassava processing wastewater (R5M and R6M). The AFBRs were inoculated with sludge from a UASB reactor used in the treatment of swine wastewater (R1S, R3S, R1M, R3M, R5S, R6S, R5M and R6M) and sludge from a UASB reactor that treated poultry slaughterhouse wastewater (R2S, R4S, R2M, R4M), both heat treated. Variations of HRT (12-1 h) and substrate concentrations were performed (2-15 g .L⁻¹), with temperature control at 30 ° C. The reactors that used cheese whey as substrate showed a greatest potential for hydrogen production, with yields (HY) of 3.2 mmolH₂.g⁻¹COD (R6S) and 2.6 mmolH₂.g⁻¹COD (R5S) were obtained by applying a HRT of 6 and 14 hours, with a concentration of 3 and 5 g.L⁻¹, respectively. Both substrates showed potential for the production of ethanol with yields (EtOHY) of 4.2 mmolEtOH.g⁻¹COD (R6M) and 3.5 mmolEtOH.g⁻¹COD (R2S). In the comparison between the two inocula used, both showed a balance in terms of hydrogen production, but in terms of ethanol production, the sludge from poultry slaughterhouse showed highest potential. By cloning and sequencing of the 16S rRNA gene for bacteria domain reactor R4S (whey), there was a predominance of the genus *Selenomonas* (69 % of the sequences) and *Clostridium* (8 % of the sequences). For the reactor R3M (glucose and cassava) analyzes cloning and sequencing of bacterial consortium revealed similarities with *Lactobacillus*. As for the archaeal domain, the sequencing of the 16S rRNA gene had highly similar to the genus *Methanobacterium* (98.5 % and 95 % of the sequences), for R4S and R3M, respectively reactors.

Keywords: Hydrogen production, ethanol production, anaerobic fluidized bed reactor, cheese whey and cassava processing wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema da digestão anaeróbia.	10
Figura 2.2	Fluxograma do processo de produção da farinha.	25
Figura 3.1	Esquema do reator anaeróbio de leito fluidizado.	33
Figura 3.2	Reator anaeróbio de leito fluidizado	34
Figura 3.3	Componentes do experimento: (a) distribuidor da alimentação; (b) topo do reator; (c) leito do reator.	35
Figura 3.4	Partículas de poliestireno com tratamento para utilização como suporte para imobilização da biomassa.	38
Figura 4.1	Comportamento da concentração média de carboidratos afluente e efluente, e a conversão de carboidratos: a) reator R1S; b) reator R2S.	47
Figura 4.2	Comportamento da concentração média de lactose afluente, efluente, e a conversão da lactose: a) reator R3S; b) reator R4S.	48
Figura 4.3	Comportamento da concentração média de lactose afluente, efluente, e a conversão da lactose para o reator R5S	49
Figura 4.4	Comportamento da concentração média de lactose afluente, efluente, e a conversão da lactose para o reator R6S	50
Figura 4.5	Comportamento da concentração média de carboidratos afluente, efluente, e a conversão de carboidratos: a) reator R1M; b) reator R2M.	51
Figura 4.6	Comportamento da concentração média de carboidratos afluente, efluente, e a conversão de carboidratos: a) reator R3M; b) reator R4M.	52
Figura 4.7	Comportamento da concentração média de carboidratos afluente, efluente, e a conversão de carboidratos para o reator R5M.	53
Figura 4.8	Comportamento da concentração média de carboidratos afluente, efluente, e a conversão de carboidratos para o reator R6M.	54
Figura 4.9	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção de DQO: a) reator R1S b) Reator R2S.	56

Figura 4.10	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção de DQO: a) reator R3S b) Reator R4S.	57
Figura 4.11	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R5S	58
Figura 4.12	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R6S.	58
Figura 4.13	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção: a) reator R1M b) Reator R2M.	59
Figura 4.14	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção: a) reator R3M b) Reator R4M.	60
Figura 4.15	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R5M.	61
Figura 4.16	Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R6M.	62
Figura 4.17	Comportamento da produção de H ₂ para os reatores R1S e R2S: a) Conteúdo de hidrogênio; b) Produção volumétrica de hidrogênio; c) Rendimento de hidrogênio.	66
Figura 4.18	Comportamento da produção de H ₂ para os reatores R3S e R4S: a) Conteúdo de hidrogênio; b) Produção volumétrica de hidrogênio; c) Rendimento de hidrogênio.	71
Figura 4.19	Comportamento da produção de H ₂ para o reator R5S : a) Conteúdo de hidrogênio; b) Produção volumétrica de hidrogênio; c) Rendimento de hidrogênio.	75
Figura 4.20	Comportamento da produção de H ₂ para o reator R6S: a) Conteúdo de hidrogênio e metano; b) Produção volumétrica de hidrogênio e metano; c) Rendimento de hidrogênio.	78
Figura 4.21	Comportamento da produção de H ₂ para o reator R5M: a) Conteúdo de hidrogênio e metano; b) Produção volumétrica de hidrogênio e metano; c) Rendimento de hidrogênio.	80
Figura 4.22	Comportamento da produção de H ₂ para o reator R6M: a) Conteúdo de hidrogênio e metano; b) Produção volumétrica de hidrogênio e metano; c) Rendimento de hidrogênio	82
Figura 4.23	Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores R1M e	87

	R2M a partir da glicose (fase 1) e da mistura de glicose e manípueira bruta (fase 2).	
Figura 4.24	Conteúdo de hidrogênio para os reatores R1M e R2M com glicose e manípueira bruta.	88
Figura 4.25	Comportamento do conteúdo de biogás para os reatores R3M e R4M: a) Conteúdo de hidrogênio; b) Conteúdo de metano.	90
Figura 4.26	Comportamento da produção de biogás para os reatores R3M e R4M: a) Produção volumétrica de H ₂ ; b) Produção volumétrica de CH ₄ .	91
Figura 4.27	Comportamento do rendimento de H ₂ para os reatores R3M e R4M.	92
Figura 4.28	Metabólitos solúveis produzidos em cada fase: a) R1S b) R2S.	97
Figura 4.29	Rendimento de etanol em cada fase para os reatores R1S e R2S.	100
Figura 4.30	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH aplicado: a) R3S b) R4S.	101
Figura 4.31	Rendimento de etanol em cada TDH aplicado para os reatores R3S e R4S.	104
Figura 4.32	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH par o reator R5S.	105
Figura 4.33	Rendimento de etanol em cada TDH aplicado para o reator R5S.	106
Figura 4.34	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH par o reator R6S.	107
Figura 4.35	Rendimento de etanol em cada TCO aplicada para o reator R6S.	108
Figura 4.36	Metabólitos solúveis produzidos em cada fase: a) R1M b) R2M.	110
Figura 4.37	Rendimento de etanol em cada fase para os reatores R1M e R2M.	112
Figura 4.38	Metabólitos solúveis produzidos em cada fase: a) R3M b)	113

	R4M.	
Figura 4.39	Rendimento de etanol em cada TDH aplicado para os reatores R3M e R4M.	116
Figura 4.40	Efeito do TDH sobre a seletividade para os reatores R3M e R4M.	116
Figura 4.41	Metabólitos solúveis produzidos em cada fase para o reator R5M.	117
Figura 4.42	Rendimento de etanol em cada fase para o reator R5M.	119
Figura 4.43	Metabólitos solúveis produzidos em cada fase para o reator R6M.	119
Figura 4.44	Rendimento de etanol em cada fase para o reator R6M.	121
Figura 4.45	Seletividade ao longo das fases operacionais para os reatores R5M e R6M.	122
Figura 4.46	Comparação entre as melhores condições de cada reator para a produção de hidrogênio.	123
Figura 4.47	Comparação entre as melhores condições de cada reator para a produção de etanol.	125
Figura 4.48	Análise do dendograma (DGGE) mostrando a influência do TDH nos reatores R3S e R4S: a) comunidade das bactérias b) comunidade das archaea.	127
Figura 4.49	Análise do dendograma (DGGE) mostrando a influência do TDH nos reatores R3M e R4M: a) comunidade das bactérias b) comunidade das archaea.	128
Figura 4.50	Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R4S com a aplicação do TDH de 1 hora para o domínio bactéria. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas.	134
Figura 4.51	Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R3M com a aplicação do TDH de 2 horas para o domínio bactéria. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na	137

comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas.

Figura 4.52 Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R4S com a aplicação do TDH de 1 hora para o domínio archaea. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas. 140

Figura 4.53 Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R3M com a aplicação do TDH de 2 horas para o domínio archaea. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas. 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Oferta interna de energia.	7
Tabela 2.2	Produção nacional de leite.	19
Tabela 3.1	Composição da água residuária sintética utilizada.	36
Tabela 3.2	Especificações do Soro em pó.	36
Tabela 3.3	Informação nutricional (porção de 100 gramas).	37
Tabela 3.4	Condições operacionais dos reatores R1S (lodo suíno) e R2S (lodo de aves).	40
Tabela 3.5	Condições operacionais dos reatores R3S (lodo suíno) e R4S (lodo de aves).	40
Tabela 3.6	Condições operacionais do reator R5S (lodo de suínos).	41
Tabela 3.7	Condições operacionais do reator R6S (lodo de suínos).	41
Tabela 3.8	Condições operacionais dos reatores R1M (lodo suíno) e R2M (lodo de aves).	41
Tabela 3.9	Condições operacionais dos reatores R3M (lodo suíno) e R4M (lodo de aves).	42
Tabela 3.10	Condições operacionais do reator R5M (lodo de suíno).	42
Tabela 3.11	Condições operacionais do reator R6M (lodo de suíno).	43
Tabela 4.1	Valores médios de pH afluente e efluente ao longo das fases operacionais.	63
Tabela 4.2	Valores médios de sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo das fases operacionais.	64
Tabela 4.3	Valores médios de conteúdo de H ₂ , Produção volumétrica e rendimento de H ₂ para os reatores R1S e R2S.	67
Tabela 4.4	Estudos comparativos na produção fermentativa de hidrogênio utilizando mistura de substratos.	69
Tabela 4.5	Valores médios de conteúdo de H ₂ , Produção volumétrica de H ₂ e CH ₄ , e rendimento de H ₂ para os reatores R3S e R4S.	70
Tabela 4.6	Valores médios de conteúdo de H ₂ , Produção volumétrica de H ₂ e CH ₄ e rendimento de H ₂ para o reator R5S.	72
Tabela 4.7	Estudos com reatores acidogênicos na produção fermentativa de hidrogênio e metano.	75

Tabela 4.8	Valores médios de conteúdo de H ₂ e CH ₄ , Produção volumétrica de H ₂ e CH ₄ , e rendimento de H ₂ para o reator R6S.	77
Tabela 4.9	Valores médios de conteúdo de H ₂ e CH ₄ , Produção volumétrica de H ₂ e CH ₄ , e rendimento de H ₂ para o reator R5M.	79
Tabela 4.10	Valores médios de conteúdo de H ₂ e CH ₄ , Produção volumétrica de H ₂ e CH ₄ , e rendimento de H ₂ para o reator R6M.	81
Tabela 4.11	Comparação dos estudos a partir de águas residuárias complexas que avaliaram o efeito da TCO.	84
Tabela 4.12	Estudos comparativos na produção fermentativa de hidrogênio em utilizando soro de queijo como substrato.	86
Tabela 4.13	Valores médios de conteúdo de H ₂ e CH ₄ , Produção volumétrica de H ₂ e CH ₄ , e rendimento de H ₂ para os reatores R3M e R4M.	93
Tabela 4.14	Estudos comparativos na produção fermentativa de hidrogênio utilizando mistura de substratos.	95
Tabela 4.15	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R1S e R2S.	98
Tabela 4.16	Concentração média dos principais metabólitos solúveis para os reatores R1S e R2S.	98
Tabela 4.17	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para os reatores R3S e R4S.	102
Tabela 4.18	Concentração dos principais metabólitos solúveis para os reatores R3S e R4S.	102
Tabela 4.19	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R5S.	105
Tabela 4.20	Concentração dos principais metabólitos solúveis para o reator R5S.	106
Tabela 4.21	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R6S.	107
Tabela 4.22	Concentração dos principais metabólitos solúveis para o	108

	reator R6S.	
Tabela 4.23	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R1M e R2M.	111
Tabela 4.24	Concentração dos principais metabólitos solúveis para o reator R1M e R2M.	111
Tabela 4.25	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R3M e R4M.	114
Tabela 4.26	Concentração dos principais metabólitos solúveis para o reator R3M e R4M.	115
Tabela 4.27	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R5M.	118
Tabela 4.28	Concentração dos principais metabólitos solúveis (mg.L^{-1}) para o reator para o reator R5M.	118
Tabela 4.29	Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R6M.	120
Tabela 4.30	Concentração dos principais metabólitos solúveis (mg.L^{-1}) para o reator para o reator R5M.	120
Tabela 4.31	Produção de H_2 a partir de diferentes fontes de substratos, em comparação com os resultados obtidos no presente estudo.	124
Tabela 4.32	Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria no reator R4S.	132
Tabela 4.33	Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria no reator R3M.	135
Tabela 4.34	Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Archaea no reator R4S.	138

LISTA DE ABREVIATURAS

CSTR	Reator Contínuo de Tanque Agitado (Continuous-Stirred Tank-Reactor)	
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	
FAO	Organização para a alimentação e agricultura	
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	
PET	Politereftalato de Etila	
RALF	Reator anaeróbico de leito fluidizado	
R1S	Reator operado com glicose e soro de queijo inoculado com lodo de suínos	
R2S	Reator operado com glicose e soro de queijo inoculado com lodo de aves	
R3S	Reator operado com soro de queijo inoculado com lodo de suínos	
R4S	Reator operado com soro de queijo inoculado com lodo de aves	
R5S	Reator operado com soro de queijo inoculado com lodo de suínos	
R6S	Reator operado com soro de queijo inoculado com lodo de suínos	
R1M	Reator operado com manipueira bruta e glicose, inoculado com lodo de suínos.	
R2M	Reator operado com manipueira bruta e glicose, inoculado com lodo de aves.	
R3M	Reator operado com manipueira e glicose, inoculado com lodo de suínos.	
R4M	Reator operado com manipueira e glicose, inoculado com lodo de aves.	
R5M	Reator operado com manipueira, inoculado com lodo de suínos	
R6S	Reator operado com manipueira, inoculado com lodo de suínos	
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket.	
UNESP	Universidade Estadual Paulista	
UTO	Unidades Taxonômicas Operacionais	
DQO	Demanda Química de Oxigênio	(mg.L ⁻¹)
EtOH	Etanol	(mg.L ⁻¹)
EtOHY	Rendimento de Produção de Etanol	(mmol.g ⁻¹ DQO)
HAc	Ácido Acético	(mg.L ⁻¹)

HBu	Ácido Butírico	(mg.L ⁻¹)
HIBu	Ácido Isobutírico	(mg.L ⁻¹)
HLa	Ácido Láctico	(mg.L ⁻¹)
HPr	Ácido Propiônico	(mg.L ⁻¹)
HY	Rendimento de Produção de Hidrogênio	(mmol.g ⁻¹ DQO)
MeOH	Metanol	(mg.L ⁻¹)
PVH	Produção Volumétrica de Hidrogênio	(L.d ⁻¹ .L ⁻¹)
PVM	Produção Volumétrica de Metano	(L.d ⁻¹ .L ⁻¹)
SSV	Sólidos em suspensão voláteis	(mg.L ⁻¹)
TCO	Taxa de carregamento orgânico	(kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
TDH	Tempo de detenção hidráulica	(h)

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – ENERGIAS RENOVÁVEIS	4
2.2 – HIDROGÊNIO COMO FONTE DE ENERGIA	5
2.3 – PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO	6
2.3.1 – Digestão Anaeróbia	7
2.4 – REATORES UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	9
2.4.1 – Reatores Anaeróbios de leite fluidizado (RALF).....	10
2.5 – FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	14
2.6 – SUBSTRATOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	15
2.6.1- Produção de leite	16
2.6.2- Soro de queijo	18
2.6.3- O processo de industrialização da mandioca.....	21
2.6.4- A água do processamento da mandioca (Manipueira)	22
2.7 – O USO DE CO- SUBSTRATOS	26
2.7.1- Uso da glicose como co-substrato	28
2.8– CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 - REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO.....	30
3.2 - SUBSTRATOS.....	33
3.2.1- Glicose.....	33
3.2.2-Soro de queijo	34
3.2.3- Manipueira	35
3.3 – INÓCULO	35

3.4- MATERIAL SUPORTE UTILIZADO NOS REATORES	36
3.5- OPERAÇÕES DOS REATORES	37
3.5.1- Reatores operados com soro de queijo e glicose como substrato	38
3.5.2- Reatores operados com soro de queijo como substrato.....	38
3.5.3- Reatores operados com manipueira e glicose como substrato	39
3.5.4- Reatores operados com manipueira.....	40
3.6- AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA POR TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR....	41
3.7- ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	42
3.8-CÁLCULO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS	43
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1- CONVERSÕES DE CARBOIDRATOS	46
4.1.1 Reatores com soro de queijo e glicose: R1S e R2S	46
4.1.2 Reatores com soro de queijo: R3S, R4S, R5S e R6S	47
4.1.3 Reatores com manipueira bruta e glicose: R1M e R2M.....	50
4.1.4 Reatores com manipueira hidrolisada e glicose: R3M e R4M	51
4.1.5 Reatores com manipueira hidrolisada: R5M e R6M	53
4.1.6 Discussão sobre a conversão de carboidratos nos reatores.....	54
4.2- REDUÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO	55
4.2.1 Reatores com soro de queijo e glicose: R1S e R2S	55
4.2.2 Reatores com soro de queijo: R3S, R4S, R5S e R6S	56
4.2.3 Reatores com glicose e manipueira bruta: R1M e R2M.....	59
4.2.4 Reatores com glicose e manipueira hidrolisada: R3M e R4M	60
4.2.5 Reatores com manipueira hidrolisada: R5M e R6M	61
4.2.6 Discussão sobre a remoção de DQO nos reatores	62
4.3- PH E SÓLIDOS SUSPENSOS.....	63
4.4- PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E CONTEÚDO DE BIOGÁS	64
4.4.1- Reatores R1S e R2S: Efeito de diferentes proporções utilizadas entre os substratos sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás	64
4.4.2- Reatores R3S, R4S e R5S: Efeito do TDH sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás.....	69

4.4.3- Reatores R6S, R5M e R6M: Efeito da TCO sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás.....	76
4.4.5- Discussão sobre os reatores que utilizaram soro de queijo como substrato.....	85
4.4.6- Reatores R1M, R2M, R3M e R4M: Efeito da hidrólise do amido e do TDH sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás.....	86
4.5- METABÓLITOS SOLÚVEIS PRODUZIDOS	96
4.5.1 Reatores com mistura de soro de queijo: R1S e R2S	96
4.5.2 Reatores com soro de queijo: R3S, R4S, R5S e R6S	100
4.5.3 Reatores com glicose e manipueira bruta: R1M e R2M.....	109
4.5.4 Reatores com glicose e manipueira hidrolisada: R3M e R4M.....	112
4.5.5 Reatores com manipueira hidrolisada: R5M e R6M	117
4.6 DISCUSSÃO SOBRE AS MELHORES CONDIÇÕES OPERACIONAIS E FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL.....	122
4.7- EFEITO DO TDH SOBRE A COMUNIDADE MICROBIANA.....	126
4.7.1 – O efeito de diferentes origens de inóculos sobre a produção de hidrogênio e etanol	129
4.8- IDENTIFICAÇÕES DA COMUNIDADE BACTERIANA E ARCHAEA	131
4.8.1 Identificação microbiana para o domínio bactéria	131
4.8.2 Identificação microbiana para o domínio archaea	137
CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES	142
CAPÍTULO 6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	144
CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CAPÍTULO 8- APÊNDICES - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	163

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A produção de hidrogênio como uma fonte de energia renovável a partir de matérias-primas renováveis e por meio de processos biológicos vem se tornando uma alternativa promissora, pois reduz o esgotamento de combustíveis fósseis e ajuda a diminuir o efeito estufa (Show et al., 2012). No Brasil, 48% da energia é proveniente de fontes renováveis, sendo que para as fontes não renováveis, o petróleo ocupa a maior parte, com 38% da energia, (Ministério das Minas e Energia, 2012).

Dentre os vários tipos de produção de hidrogênio, a produção biológica se torna mais atraente quando efluentes orgânicos ou outros resíduos são utilizados como matérias-primas. Os processos biológicos são particularmente úteis para esta aplicação porque eles são catalisados por microrganismos a temperatura e pressão ambiente. Estes processos exigem um baixo consumo de energia e investimentos, o que os torna alternativas mais atraentes para a produção de hidrogênio (Amorim, 2009). Além disso, esses processos não são apenas ecologicamente corretos, mas também podem abrir caminho para a obtenção de energia a partir de recursos renováveis, utilizando como substrato vários materiais que são descartados no ambiente, diminuindo a poluição e gerando energia.

A utilização de águas residuárias como fonte de carbono para energia sustentável podem eventualmente definir o uso futuro do hidrogênio. Para que um substrato seja utilizado na produção biológica de hidrogênio por meio de fermentação, o substrato empregado deve ser rico em carboidratos. Assim, a utilização de águas residuárias reais tem demonstrado forte e atual tendência para a produção de hidrogênio, como por exemplo, em reatores em batelada a partir de óleo de palma (Chong et al., 2013); soro de queijo (Davila-Vazquez et al., 2011; Ferchichi et al., 2005) e vinhaça de cana-de-açúcar (Searmsirimongkol et al., 2011) e em reatores contínuos a partir de águas residuárias do processamento da mandioca (Wang et al., 2012), de soro de queijo (Davila-Vazquez et al., 2009) e de vinhaça de cana-de-açúcar (Han et al., 2012a).

O soro de queijo é o principal subproduto da fabricação de queijo, considerado um efluente altamente poluente dentre os produtos lácteos, devido a sua elevada carga orgânica e volume gerado, apresentando um elevado potencial como substrato para a produção de hidrogênio, não somente por ser abundante e prontamente disponível, mas também por ser altamente biodegradável (Carrillo-Reyes et al., 2012). Estima-se que 70% do extrato seco do soro de queijo é composto de lactose (Perna et al., 2013).

O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor mundial de mandioca, com uma produção nacional para 2013 estimada em 23.440.077 toneladas (Instituto Brasileiro de Geografia, 2013). A mandioca contém 70% de amido da sua massa seca e seu subproduto gerado, a água do processamento da mandioca, contém todos os constituintes líquidos solúveis da raiz, além de ser rica em carboidratos (Cappelletti et al., 2011).

Assim, a água do processamento da mandioca (manipueira) e o soro de queijo se destacam por serem abundantes e de baixo custo, possuem uma elevada concentração de carboidratos, e alto teor de demanda química de oxigênio, cujo lançamento no ambiente sem tratamento, pode causar sérios danos. A produção de hidrogênio por fermentação utilizando estas águas residuárias como substrato permite retirar destes materiais uma parte significativa de energia que, se indevidamente tratada, produz prejuízos ao ambiente.

Existem relatos na literatura de que substratos simples tais como a glicose, têm sido utilizados misturados a outros substratos na busca por condições ideais de produção de hidrogênio, utilizando a glicose com a xilose (Hniman et al., 2011; Prakasham et al., 2009), com o glicerol (Trchounian e Trchounian, 2013) e com a galactose (Rosales-Colunga et al., 2012). A mistura de substratos realizada pelos autores demonstra uma estratégia que viabiliza a produção de hidrogênio a partir da fermentação de resíduos na presença de glicose.

Dentre os reatores anaeróbios de alta velocidade testados com sucesso para a produção biológica de hidrogênio, o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) tem se destacado devido a capacidade de favorecer a transferência de massa entre o meio e o biofilme. A literatura destaca a potencialidade do RALF em produzir hidrogênio (Barros e Silva 2012; Munoz et al. 2012; Obazu et al. 2012; Shida et al., 2012).

A inexistência de estudos realizados na avaliação do impacto da proporção de co-substratos e substratos orgânicos para a produção de hidrogênio utilizando glicose, soro de queijo e manipueira dificultam avanços comparativos nesta área de conhecimento. Além disso, poucos trabalhos avaliam o efeito de diferentes origens de inóculo e da taxa de carregamento orgânico (TCO) utilizando soro de queijo e manipueira como substrato em reatores contínuos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do TDH, o uso de co-substratos, o uso de diferentes origens do inóculo, utilizando diferentes fontes de carbono (mistura de glicose com soro de queijo; com manipueira, e 100% de soro de queijo).

1.1 Objetivos

Esta pesquisa teve como objetivo geral avaliar a influência do TDH, de diferentes fontes de carbono (soro de queijo, mistura de glicose com manipueira e manipueira), e das diferentes origens de inóculo na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado, preenchido com poliestireno como material suporte para a adesão microbiana.

Visando uma melhor compreensão do reator, tiveram-se como objetivos específicos:

- a) Avaliar as diferentes proporções utilizadas entre os substratos sobre a produção de H₂;
- b) Avaliar o efeito da hidrólise ácida do amido sobre o desempenho e estabilidade dos reatores;
- c) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de substratos (soro de queijo e de manipueira) na capacidade de produção de hidrogênio (produção volumétrica, rendimento e conteúdo de H₂ no biogás);
- d) Caracterizar a produção e a distribuição de ácidos orgânicos e solventes durante a operação dos reatores;
- e) Avaliar a dinâmica da comunidade microbiana ao longo do tempo de operação dos reatores por meio da técnica de eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE);
- f) Estabelecer as relações filogenéticas dos microrganismos do domínio Bacteria e Archaea presentes por meio do sequenciamento do RNAr 16S.

CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Energias renováveis

A crescente preocupação com as questões ambientais, como a redução da dependência de combustíveis fósseis e o efeito estufa, contribuiu para um aumento de interesse mundial por soluções sustentáveis de geração de energia oriunda de fontes limpas e renováveis. Neste contexto, o Brasil ocupa uma posição destacada em função da sua liderança nas principais frentes de negociação e da significativa participação das fontes renováveis a sua matriz energética. As fontes renováveis de energia terão participação cada vez mais relevante na matriz energética global nas próximas décadas (Ministério das Minas e Energia, 2012).

A situação do Brasil é privilegiada em termos de utilização de fontes renováveis de energia. Segundo dados do Ministério das Minas e Energia, cerca de 44,1% da demanda total de energia no País em 2011 é renovável, enquanto a média mundial é de 14% sendo que nos países desenvolvidos, seria de apenas 6% (Ministério das Minas e Energia, 2012).

Na Tabela 2.1 é mostrada a estrutura da oferta de energia nos últimos anos, na qual se observa um pequeno decréscimo na participação das fontes renováveis de energia no último ano devido principalmente, a queda nos produtos da cana de açúcar. Dentre as energias renováveis vinda de outras fontes, se destacam a produção de biodiesel e geração eólica.

Os recursos naturais renováveis mais utilizados na obtenção de energia são o sol, que fornece energia solar; o vento, que produz a eólica; rios e correntes de água doce, fornecedores de energia hidráulica e a matéria orgânica, que produz biomassa (biodiesel, biogás e etanol, dentre outros). A maior oferta de energia renovável no Brasil vem dos produtos da cana de açúcar, seguidos da energia hidráulica e eletricidade.

O uso de fontes limpas e renováveis de energia é importante no combate ao aquecimento do planeta, apontado por especialistas como causador de fenômenos climáticos severos como secas, furacões e enchentes, que geram prejuízos econômicos e afetam a saúde de milhões de pessoas em todo o mundo. A emissão de gases poluentes a partir da queima de combustíveis fósseis está se tornando um grande problema sendo necessária a diminuição das fontes poluentes como o carvão e o petróleo de suas matrizes energéticas.

Tabela 2.1 **Fonte interna de energia**

Especificação	Estrutura %				
	2008	2009	2010	2011	2012
Não renovável	51,6	53,3	54,9	55,9	57,6
Petróleo e derivados	39,7	41,9	37,8	38,6	39,2
Gás natural	9	8,7	10,2	10,1	11,5
Carvão mineral e derivados	5,1	5,2	5,4	5,6	5,4
Urânio (U ₃ O ₃) e derivados	1,7	1,7	1,4	1,5	1,5
Renovável	48,4	46,7	45,1	44,1	42,4
Hidráulica e eletricidade	13,4	13,9	14	14,7	15,4
Lenha e carvão vegetal	12,4	10,2	9,7	9,7	9,1
Derivados da cana	19	18,8	17,5	15,7	13,8
Outras renováveis	3,6	3,8	3,9	4,1	4,1

Fonte: Ministério das Minas e energia, 2012.

Segundo dados preliminares do balanço energético de 2012 (Ministério das Minas e energia, 2012), a oferta de energia elétrica cresceu 11,3 milhões de toneladas equivalentes de petróleo, sendo que o gás natural, petróleo e seus derivados responderam em 97% deste incremento. Outro reflexo foi a redução da proporção de energias renováveis na matriz energética. Contudo, essa participação manteve-se em patamar muito elevado, de 42,4%, significativamente acima da média mundial, calculada em 13,2% pela Agência Internacional de Energia. No segmento dos combustíveis líquidos, foram registradas altas de 2,4% na produção de etanol (a exportação do energético cresceu 55,3% em relação a 2011). A forte expansão da demanda por etanol no mercado brasileiro deve se manter devido ao aumento expressivos da frota de veículos bi combustíveis e à competitividade do preço do etanol hidratado em relação à gasolina.

2.2 – Hidrogênio como fonte de energia

O gás hidrogênio é visto como uma fonte alternativa de energia sustentável, pois possui uma elevada eficiência de conversão, é reciclável e não poluente. Além disso, é uma fonte inesgotável de energia, ajudando na redução do esgotamento de combustíveis fósseis (Mohan et al., 2008).

É o elemento químico mais simples abundante no Universo, o mais leve e o que contém o maior valor energético, cerca de 121 kJ/g. Quando resfriado ao estado líquido, este combustível de baixo peso molecular ocupa um espaço equivalente a 1/700 daquele que ocuparia no estado gasoso. Esta é uma das razões pelas quais o hidrogênio é utilizado como

combustível para propulsão de foguetes e cápsulas espaciais, que requerem combustíveis de baixo peso, compactos e com grande capacidade de armazenamento de energia. No estado natural e sob condições normais, o hidrogênio é um gás incolor, inodoro e insípido (Barros, 2010).

2.3 – Produção biológica de hidrogênio

O H_2 pode ser produzido recorrendo a vários métodos: a partir de combustíveis fósseis e de biomassa agrícola ou florestal, a partir da água por métodos “não biológicos” (processos térmicos, termoquímicos, eletrólise ou fotoeletrólise da água), produção biológica de hidrogênio (produção de H_2 através da fermentação de compostos orgânicos ou fotoprodução de H_2 por microrganismos).

A produção fotobiológica de hidrogênio pode ser realizada por bactérias fotossintéticas, cianobactérias e algas, utilizando a radiação solar para converter H_2O , compostos de enxofre ou compostos orgânicos, em hidrogênio. As cianobactérias encontram-se entre os candidatos ideais uma vez que têm os requisitos nutricionais mais simples (Amorim, 2009).

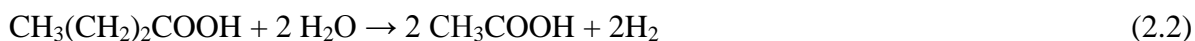
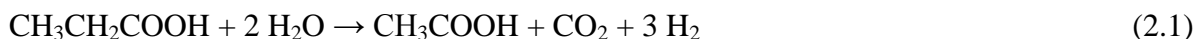
No caso da produção de biohidrogênio por fermentação, o H_2 é liberado pela ação de hidrogenases como meio de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação de carboidratos. A degradação de compostos orgânicos é o meio de sobrevivência das bactérias fermentativas. Para realizar trabalho biológico, a célula necessita de energia química. Essa energia química é obtida através da oxidação de compostos de carbono, principalmente carboidratos. Os organismos degradam moléculas energéticas, como forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP, que é o principal transportador de energia química em todas as células. O substrato é degradado na primeira fase da fermentação em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar o piruvato. Essas reações produzem ATP. A energia também é conservada em moléculas de NADH. Os elétrons gerados nessas reações são transferidos para coenzimas especializadas no transporte de elétrons, no caso o NAD^+ , que passa para sua forma reduzida, NADH. Quando um composto é oxidado ele perde elétron ou hidrogênio, o NAD^+ é o carregador de elétron, e quando reduzido fica na forma NADH. O NADH formado durante a degradação deve ser regenerado a NAD^+ , na segunda fase da fermentação o ácido pirúvico é então reduzido através do hidrogênio do NADH em alguns compostos.

A produção biológica de hidrogênio é um processo complexo e é afetada por vários parâmetros, tais como, pH, temperatura, concentração do substrato, e comunidade microbiana (Amorim, 2009). O controle do pH é crucial devido ao seu efeito na atividade da hidrogenase nas vias metabólicas e nos microrganismos (Lay, 2000). A produção de hidrogênio também é acompanhada pela produção de ácidos orgânicos voláteis e álcoois que contribuem para a redução de pH, onde as bactérias irão tentar reduzir a concentração de íon hidrogênio (H^+) e não irão produzir hidrogênio. Sendo assim, as bactérias acidófilas com atividade em baixos pHs podem resultar em rendimentos maiores de hidrogênio.

2.3.1 – Digestão Anaeróbia

O processo de digestão anaeróbia permite converter matéria orgânica complexa em gás carbônico e metano. É desenvolvida por uma sequência de ações e uma variedade de bactérias e archaeas, no qual se podem distinguir as fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na primeira etapa, a matéria orgânica complexa (carboidratos, proteínas e lipídeos) é quebrada formando um composto mais simples (açúcares, aminoácidos e ácidos graxos livres) com o auxílio de uma exo-enzima. Estes compostos são absorvidos por bactérias fermentativas e após a acidogênese são produzidos ácidos (tais como propiônico, acético, butírico). Na acetogênese, ocorre a conversão dos produtos da acidogênese (os álcoois e os ácidos graxos) em substratos para a metanogênese. De todos os produtos metabolizados pelas bactérias acidogênicas, apenas o hidrogênio e o acetato podem ser utilizados diretamente pelas metanogênicas. E por fim, na metanogênese o metano é produzido por dois mecanismos distintos, onde os produtos finais da acetogênese são os substratos essenciais para o terceiro estágio, que por sua vez constitui dois diferentes grupos de arqueas metanogênicas. Um grupo usa o acetato, transformando-o em metano e dióxido de carbono, enquanto o outro produz metano, através da redução do dióxido de carbono (Siriwongrungron et al., 2007).

As principais reações para a formação de metano são descritas nas equações de 2.1 a 2.4. Aproximadamente 70% de todo o metano produzido no processo de digestão anaeróbia provem da equação 2.3, onde o grupo metil é reduzido a metano e o grupo carboxílico é oxidado a gás carbônico:





Na Figura 2.1 é ilustrado o processo de digestão anaeróbia de compostos complexos e, as conversões dos compostos intermediários (aminoácidos, sais orgânicos e glicose entre outros) em gás carbônico (CO_2) e gás metano (CH_4).

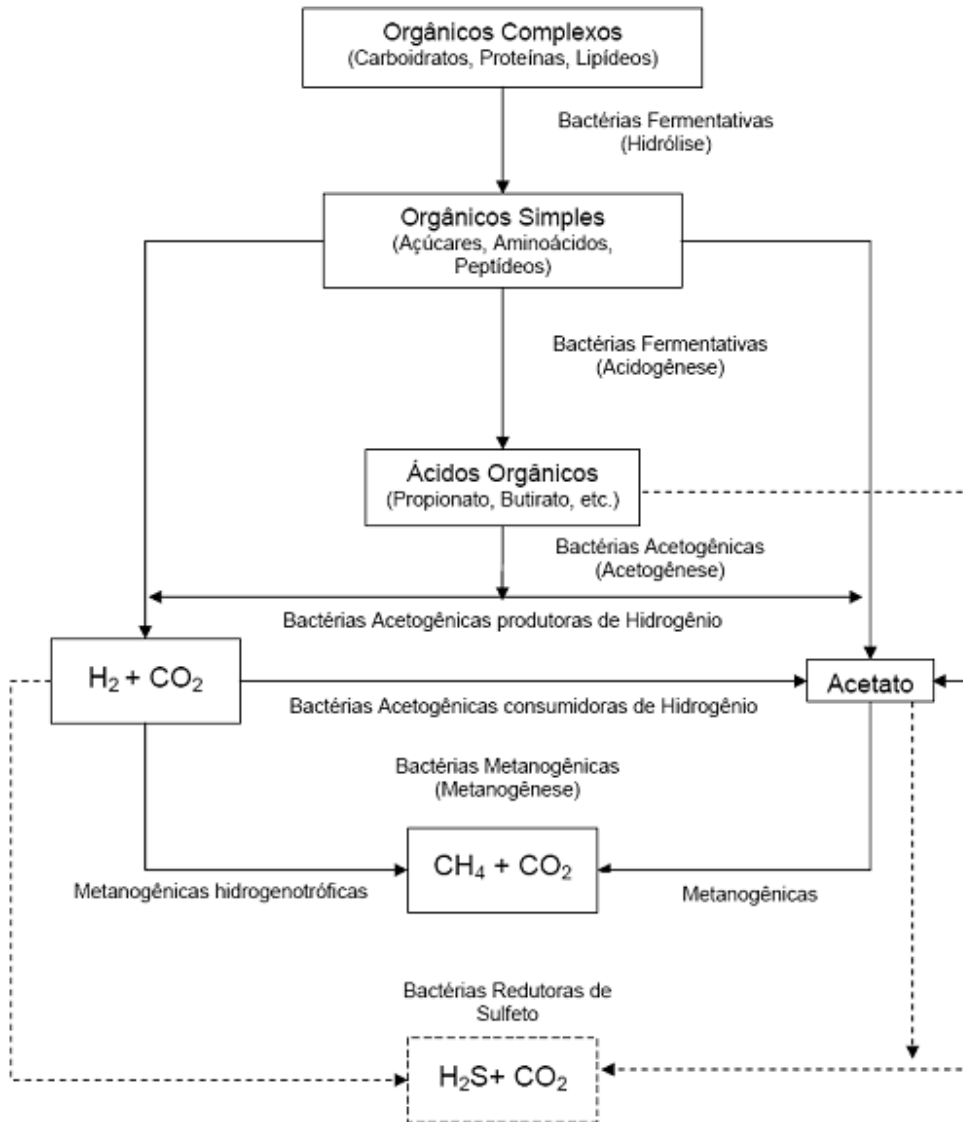


Figura 2.1- Esquema da digestão anaeróbia (Fonte: Adaptada de Chernicharo, 1997).

A maioria dos estudos relatados na literatura envolvem as fases acidogênica ou metanogênica. Segundo Siriwongrungronson et al. (2007) o acetado formado na acetogênese pode ser um consumidor de hidrogênio. A reação do hidrogênio reduzindo o dióxido de carbono a acetato é chamada de homoacetogênese (Eq. 2.5). Esta por sua vez, se torna um

fator importante na produção de hidrogênio, uma vez que há um consumo e queda no rendimento.



Chen et al. (2003) relataram que, quando H_2 e CO_2 foram fornecidos como substratos para um aterro de resíduos sólidos urbanos, houve um acúmulo significativo de acetato e a produção de metano foi relativamente baixa, o que indica que bactérias homoacetogênicas e as archeas metanogênicas competiram no aterro pelo substrato. Em um estudo de produção de hidrogênio a partir do amido de trigo, Hussy et al. (2003) verificaram que a produção de hidrogênio diminuiu com os altos níveis de acetato, indicando que metabolismo foi deslocado para homoacetogenese.

2.4 – reatores utilizados na produção de hidrogênio

A configuração do reator e a otimização de parâmetros operacionais torna-se essencial para a obtenção de melhores taxas de produção de hidrogênio, indicando que o desempenho do sistema é largamente influenciado pela retenção de biomassa do reator (Ren et al., 2011). Os modos de operações em batelada e de modo contínuo têm sido relatados na literatura para a produção de hidrogênio. A maioria dos estudos é em batelada por terem a vantagem de serem facilmente operados e flexíveis, gerando uma série de trabalhos com diferentes resíduos na produção de hidrogênio (Guo et al., 2010). Porém estes reatores fornecem taxas de produção de H_2 menores em comparação com os sistemas contínuos.

O CSTR é o reator usado nos sistema contínuo para a produção de energia. Estes sistemas são mais estáveis e possuem uma alta produtividade, bem como o controle mais eficaz do pH e temperatura quando comparada com a fermentação em batelada (Argun e Kargi, 2011). Outros estudos relataram o uso bem sucedido em reator anaeróbio sequencial batelada (ASBR), ao invés de CSTR, para a conversão de resíduos de alimentos (Guo et al., 2010).

Os reatores de leito fixo também têm sido estudados para a produção de hidrogênio, e são operados sob as condições com um menor grau de turbulência hidráulica, assim, as suas culturas imobilizadas geralmente encontram resistência de transferência de massa que resultaria em taxas inferiores de conversão do substrato e produção de hidrogênio (Show et al., 2012).

Guo et al. (2010) relataram uma grande variação de produção de hidrogênio em diferentes configurações de reatores anaeróbios, variando ente 3 mL H₂.g_{sv}⁻¹ a 290 mL H₂. g_{sv}⁻¹, justificando esta variação devido à diferente composição da matéria envolvida. Exemplos significativos de reatores anaeróbios são os reatores com manta de lodo de fluxo ascendente (UASB), leitos fluidizados, leito fixo, anaeróbios de batelada sequencial entre outros.

2.4.1 – Reatores Anaeróbios de leito fluidizado (RALF)

O sistema RALF tem sido amplamente utilizado para o tratamento de águas residuárias e produção de biogás devido a capacidade de favorecer a transferência de massa entre o meio e o biofilme. Além disso, possuem elevadas eficiências de remoção da matéria orgânica alcançadas com TDH relativamente baixos (Shida, 2008).

Os RALF são sistemas de tratamento que utilizam o princípio da fluidização para promover adequada transferência de massa entre o líquido a ser tratado e os microrganismos que atuarão na degradação da matéria orgânica. Neste processo, a biomassa cresce aderida a suportes de pequeno tamanho, como areia, poliestireno, pneu triturado, cinazita, entre outros, e formam biofilmes delgados. Com a retenção dos microrganismos dentro do reator, consegue-se desmembrar o tempo de detenção hidráulica do tempo de retenção celular. Esta característica permite que a elaboração do projeto seja baseada na capacidade degradativa dos microrganismos anaeróbios e não na sua taxa de crescimento, além de dispensar o uso de qualquer sistema para recirculação de biomassa (Barros, 2009). Uma vez que o desempenho do processo é dependente da população microbiana presente no sistema, é fundamental conhecer a influência de parâmetros operacionais, fatores físico-químicos e diferentes propriedades do meio suporte (densidade, rugosidade, porosidade) no processo de formação do biofilme (Amorim, 2009).

Alguns aspectos que influenciaram a produção de hidrogênio em reatores anaeróbio de leito fluidizado já foram estudados, como: adaptação do inóculo a fonte de carbono no próprio reator (Koskinen et al., 2007), otimização do tempo de adaptação da biomassa para cada TDH empregado (Wu et al., 2003; Lin et al., 2006; Zhang et al., 2007; Shida, 2008; Amorim et al., 2009), verificação da formação de biogás pelo sistema (Wu et al., 2003), concentração de substrato (Lin et al., 2006; Zhang et al., 2007), metabólitos produzidos (Amorim et al. 2009; Koskinen et al., 2007; Lin et al., 2006; Shida, 2008; Zhang et al., 2007) influência do material suporte (Barros e Silva, 2012), influência da temperatura (Munoz -Paez et al. 2012) e a da velocidade de fluxo ascendente (Reis e Silva, 2011).

No estudo realizado por Wu et al. (2003), a biomassa foi imobilizada com gel de alginato, e as células imobilizadas foram utilizadas para produzir gás hidrogênio em reatores de leito fluidizado trifásico. A produção de hidrogênio foi avaliada em diferentes velocidades ascensionais e TDH (1 h a 6 h). Os resultados mostram que o reator de leito fluidizado pode estabilizar em taxas de carregamento elevadas (TDH igual ou inferior a 2 h). Os resultados mostraram que a produção volumétrica máxima de hidrogênio foi de 0,93 L.h⁻¹.L⁻¹ e o rendimento máximo foi de 2,67 mol H₂.mol⁻¹ sacarose.

Lin et al. (2006) operaram um reator de leito fluidizado com tubo draft contendo partículas de silicone gel com células imobilizadas para a produção de hidrogênio. Os autores avaliaram a influência do TDH de 8,9 h; 6,0 h; 3,0 h e 2,2 h sobre a produção de hidrogênio. Durante a operação com 20 g DQO. L⁻¹, a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 1,4 a 1,9 vezes com a redução do TDH de 8,9 h para 3 h, enquanto que em TDH de 3 h e 2,2 h as produções volumétricas de hidrogênio foram similares. O rendimento de produção de hidrogênio variou entre 2,62 e 4,28 mol H₂.mol⁻¹ sacarose em TDH de 8,9 h a 3 h e depois reduziu para 1,9 mol H₂.mol⁻¹ sacarose em TDH de 2,2 h. Ao contrário o conteúdo de hidrogênio no biogás e a conversão de sacarose não sofreram variação com o TDH. O conteúdo de hidrogênio no biogás foi mantido entre 40% e 44% e a média de conversão de sacarose foi de 92% a 99%, sugerindo a estável e a eficiente utilização do carbono pelas bactérias acidogênicas. Os metabólitos solúveis consistiram, principalmente, de ácido butírico e acético, variando de 62% a 73% e 17% a 23% do total dos produtos metabólicos formados, respectivamente.

Koskinen et al. (2007) estudaram a dinâmica da comunidade microbiana durante a produção fermentativa de hidrogênio a partir da glicose, visando conhecer sobre a microbiologia da produção fermentativa de H₂ e fatores resultantes da instabilidade do processo de formação do biofilme. Os pesquisadores utilizaram glicose (5 g .L⁻¹ ou 10 g .L⁻¹) como fonte de carbono e variaram o TDH de 1,4 h a 5,6 h. O RALF foi submetido a instabilidades operacionais, sendo logo em seguida observada uma rápida redução da produção de H₂. Os resultados obtidos mostraram que o rendimento de produção de hidrogênio variou entre 0,15 e 1,35 mol H₂.mol⁻¹glicose. Além disso, o gradual enriquecimento dos microrganismos aumentou a diversidade da biomassa aderida e em suspensão durante a operação do RALF. Observou-se no início uma rápida produção de H₂ devido ao rápido crescimento de *Clostridium butyricum* (99-100%) logo após a alimentação no reator. A proporção de *C. butyricum* aderidos e em crescimento suspenso no RALF

coincidiu com a produção de H₂ e butirato. A alta taxa de carregamento de glicose favoreceu a produção de H₂ através da *Escherichia coli* (100%). Observou-se redução da produção de H₂ quando ocorreu mudança na produção de acetato-butirato para acetato-propionato, decorrente das mudanças da composição da comunidade bacteriana aderida e em suspensão no RALF. Durante essa transição, organismos, incluindo potenciais produtores de propionato, foram enriquecidos enquanto a proporção de *C. butyricum* reduziu. Os autores sugerem que a instabilidade na produção fermentativa de H₂ nos reatores de biofilme é devido ao enriquecimento e eficiente aderência sobre o material suporte de consumidoras de H₂ e, portanto, não favorecendo a produção fermentativa mesofílica de H₂.

Zhang et al. (2007) operaram um reator anaeróbio de leito fluidizado preenchido com carvão ativado como material suporte para adesão da biomassa para avaliar a redução do TDH de 4 h para 0,5 h em uma concentração de glicose de 10 g.L⁻¹. Sob condições ácidas (pH 4,0) e temperatura de 37°C, a conversão da glicose reduziu aparentemente de 99,47% em TDH de 4 h para 71,4% em TDH de 0,5 h. A composição de hidrogênio no biogás reduziu levemente de 61,2% para 57,2% quando o TDH foi reduzido. Foi encontrado um rendimento de produção de hidrogênio de 0,94 mol H₂.mol⁻¹ glicose, em TDH de 4 h e estabilizou em 1,12-1,19 mol H₂.mol⁻¹ glicose (média 1,16 ± 0,03) entre o TDH de 0,5 h e 2 h. Ambas a produção volumétrica e a produção específica de hidrogênio aumentaram significativamente com a redução do TDH, com um valor máximo em TDH de 0,5 h de 2,22 L .h⁻¹ .L⁻¹ e 4,18 mmol H₂ g⁻¹ SSV⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Além disso, a biomassa aderida foi altamente correlacionada com o TDH, aumentando de 8,1 g SSV L⁻¹ para 21,5 g SSV L⁻¹, com a redução do TDH de 4 h para 0,5 h. Em geral, os metabólitos solúveis foram em ordem decrescente, ácido acético (43% a 46%), ácido butírico (20% a 31%), etanol (14% a 21%), ácido capróico (7% a 10%), seguida por uma insignificante quantidade de ácido propiônico (0% a 3%). Os metabólitos reduziram levemente quando o TDH foi reduzido com exceção do ácido butírico que inicialmente aumentou, mas diminuiu com a redução do TDH de 1 h para 0,5 h.

Obazu et al. (2012) obtiveram elevadas produtividades volumétricas de hidrogênio de 231,3 mmol.L⁻¹.h⁻¹ e rendimentos elevados de 3,55 mol H₂.mol⁻¹ glicose, através do aumento da temperatura para 70°C, redução do volume total do reator para 5,74 L, e aumento da taxa de reciclagem de efluentes desgaseificado para 3,2 L. min⁻¹, ao utilizarem a sacarose como substrato para a produção de hidrogênio. Munoz-Paez et al. (2012) avaliaram o efeito da temperatura e da concentração de sacarose em RALF, com um TDH constante de 24 horas.

Os autores relataram que o aumento da concentração de sacarose teve um efeito positivo no desempenho dos reatores, alcançando 54% de H₂ no biogás.

O primeiro trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Ambiental II do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (LCAII/DEQ/UFSCar) foi o de Shida (2008) que estudou a produção biológica de hidrogênio em RALF, utilizando argila expandida como material suporte para adesão de biomassa. O sistema foi operado com TDH de 8 a 1 h, contendo água residuária sintética com uma concentração de glicose de 2000 mg.L⁻¹. Com a redução do TDH de 8 para 1 h, houve um aumento na produção volumétrica de hidrogênio de 0,28 para 1,15 L.h⁻¹.L⁻¹. No TDH de 8 para 2 h, o rendimento de produção de hidrogênio aumentou de 1,84 a 2,29 molH₂.mol glicose⁻¹. O conteúdo do biogás foi de H₂ e CO₂, livre de CH₄, sendo o conteúdo máximo de H₂ de 37%, no TDH de 2 h. Além disso, foram alcançados desempenhos de produção de hidrogênio sob condições de pH em torno de 4,0.

Dando continuidade a esta pesquisa, Amorim et al. (2009) também utilizaram RALF para produção de hidrogênio, com argila expandida como material suporte e pH efluente entre 3,68 e 4,05. O reator foi inoculado da mesma maneira de Shida (2008) e também a mesma água residuária foi utilizada, na mesma concentração de glicose. Os pesquisadores operaram o reator com TDH de 8 h a 1 h, velocidades superficiais entre 236 e 1900 L.h⁻¹.m⁻², por 90 dias a uma temperatura de 30°C ± 1. O rendimento de produção de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 para 2 h de 1,41 para 2,49 molH₂.mol glicose⁻¹, entretanto, quando o TDH diminuiu para 1 h, esse rendimento caiu para 2,41 molH₂.mol glicose⁻¹. O biogás produzido foi composto de hidrogênio e gás carbônico, com ausência de metano e o hidrogênio presente no biogás aumentou de 8% para 35% com a redução do TDH.

Barros (2009) avaliou a influência de diferentes materiais suporte (poliestireno - R1), pneu inservível triturado - R2 e PET - R3) na produção de hidrogênio utilizando três RALF, alimentado com meio contendo glicose como fonte de carbono (4000 mg.L⁻¹) com TDH entre 8 e 0,5 h. O melhor desempenho foi do R2, apresentando melhor rendimento de H₂ (2,15 mol-H₂.mol⁻¹glicose), melhor conteúdo de H₂ no biogás (53%) e maior conversão de glicose (90%). Entretanto, o R3 foi melhor na produção volumétrica de H₂, 1,07 L.h⁻¹.L⁻¹. Em todos os reatores, a produção volumétrica de hidrogênio e o conteúdo de H₂ no biogás aumentaram com a redução do TDH de 8 h para 1 h e o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 h para 2 h.

Objetivando estudar a influência da velocidade de fluxo ascendente (V_{up}) na produção de hidrogênio, Reis e Silva (2011) utilizaram dois reatores anaeróbios de leito fluidizado (R124 e R188) preenchidos com argila expandida como material suporte e aplicaram as velocidades de $1,24 \text{ cm.s}^{-1}$ e $1,88 \text{ cm.s}^{-1}$, respectivamente, e alimentados com glicose (5 g.L^{-1}). Os melhores resultados para a produção de hidrogênio foram obtidos no reator R124, o que foi operado com a velocidade mínima de fluidização. Os autores obtiveram $2,21 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ de taxa máxima de produção de hidrogênio para TDH de 1 h, e melhor rendimento de $2,55 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol de glicose}^{-1}$ para TDH de 2 h. Cerca de 40 a 67% de hidrogênio foi encontrado no biogás e elevada quantidade de etanol foi produzida, sugerindo, assim, uma via metabólica preferível.

Barros e Silva (2012) também compararam a eficiência da produção de hidrogênio e etanol em reatores de leito fluidizado contendo diferentes materiais suporte (poliestireno, pneu triturado e polietileno tereftalato - PET). Os reatores, contendo glicose como fonte de carbono, foram operados com TDH de 8 a 1h, sob condições mesofílicas. Neste estudo, o reator contendo pneu triturado também foi o que apresentou melhor desempenho para produção de hidrogênio ($2,11 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$), e maior conteúdo de H_2 no biogás (60%), provavelmente devido a maior porosidade deste material em relação aos outros. A porosidade pode favorecer o acúmulo de maiores quantidade biomassa. Em todos os reatores ácido acético, ácido butírico, ácido lático e etanol foram os subprodutos predominantes, sendo que no reator contendo pneu triturado foi verificada maior produção de ácido acético e butírico.

2.5 – Fatores que afetam a produção de hidrogênio

As condições de operação do sistema tem grande influencia no desempenho do processo de produção de hidrogênio em associação com tratamento de águas residuais. O pH do meio desempenha um papel crucial nas vias metabólicas do organismo, em que a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio é considerado . A produção de hidrogênio ocorre na fase de acidificação no processo metabólico. O sistema de controle de pH também afeta a eficiência do metabolismo do substrato, a síntese de proteínas, síntese de material de armazenamento e liberação de subproduto metabólico (Show et al., 2012).

O TDH é um dos parâmetros de controle mais importantes que afetam a produção contínua de hidrogênio, podendo evitar a utilização do H_2 como substrato para a metanogênese. No entanto, os melhores TDHs relatados para a produção de hidrogênio são

bastante inconsistentes e variam de 8 h de sacarose e 24 h para a glicose sacarose, (Lin et al., 2006; Munoz-Paez et al., 2012). Por meio da diminuição do TDH aplicado e consequentemente, aumento da taxa de carga orgânica, é possível obter maiores taxas de produção volumétrica de hidrogênio e elevação da porcentagem de hidrogênio no biogás (Carrillo-Reyes et al., 2012; Davila-Vazquez et al., 2009).

A escolha do inóculo também desempenha papel fundamental na seleção de microrganismos para a produção eficiente de hidrogênio (Tang et al., 2008). Fontes diversas de inóculos podem produzir hidrogênio em condições controladas de pH, embora possam ocorrer diferenças nas porcentagens de metabólitos produzidos, como acetato e etanol, e ainda na quantidade de substrato orgânico consumido. A aclimação da biomassa escolhida como fonte de inóculo é fundamental para alcançar maior consumo do substrato e maiores produções de hidrogênio (Abreu et al., 2010).

2.6 – Substratos utilizados na produção de hidrogênio

Na produção fermentativa de hidrogênio, os potenciais das matérias-primas incluem a biomassa, subprodutos de resíduos agrícolas, produtos lignocelulósicos, resíduos de processamento de alimentos, lodo de esgoto e efluentes agrícolas e pecuárias. Com o controle adequado destes recursos, estes irão se tornar a principal fonte de energia no futuro (Show et al., 2012).

Vários substratos têm sido utilizados na produção de hidrogênio, como por exemplo, óleo de palma (Chong et al., 2013); soro de queijo (Davila-Vazquez et al., 2011; Ferchichi et al., 2005), vinhaça de cana-de-açúcar (Searmsirimongkol et al., 2011), águas residuárias do processamento da mandioca (Wang et al., 2012). A aplicação de resíduos justifica-se, uma vez que a produção de hidrogênio por fermentação só será economicamente viável se o substrato conter principalmente carboidratos, sendo altamente nutritivo, ser produzido a partir de recursos renováveis, estar em concentração suficiente para que a fermentação e a recuperação da energia sejam energeticamente favoráveis e que, se algum tratamento prévio for necessário, este seja de baixo custo. Além deste fator, a utilização de resíduos permite retirar deste material uma parte significativa de energia que, se indevidamente tratada, causará prejuízos ao ambiente.

Açúcares simples como a glicose, sacarose e a lactose são substratos preferidos para esta finalidade. Entretanto, fontes puras de carboidratos se tornam caras para o processo e, sendo assim, resíduos com o mesmo potencial podem ser utilizados (Kapdan e Kargi, 2006).

Deste modo, os carboidratos aparecem como substrato preferido nas fermentações para produzir hidrogênio. A maioria dos estudos na produção de hidrogênio até hoje, entretanto, tem se limitado ao uso de fontes puras de carboidratos, tais como glicose, sacarose e amido, e pouco ainda é conhecido sobre a viabilidade do uso de resíduos agroindustriais ricos em carboidratos. Assim, resíduos e efluentes que contêm uma alta concentração de carboidratos gerados pelos processos industriais, são mais indicados por razões econômicas.

2.6.1- Produção de leite

O Brasil é tradicionalmente um grande produtor de leite, ocupando uma posição de destaque no cenário econômico, sendo atualmente o quinto maior produtor do mundo com uma produção de 31.667.600 litros (Embrapa, 2012), gerando uma renda de R\$ 17 bilhões, que corresponde a 10% do valor gerado pela agropecuária brasileira e 76% do valor gerado pela pecuária (IBGE, 2013).

No País, a maior produção de leite está em Minas Gerais com uma produção nacional, com 27,3%, ficando em segundo lugar Rio Grande do Sul com 11,8% da produção (Tabela 2.2). As mudanças de 2009 para 2010, em termos percentuais, tiveram uma variação muito grande. Alguns estados reduziram a produção e outros aumentaram em até 16,3% (Pará, Acre, Rio Grande do Norte e Alagoas). Os que mais cresceram, em termos absolutos, foram Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Santa Catarina, que são os principais estados produtores de leite. Esse fato indica que a pecuária de leite tem-se especializado, tornando mais forte a vocação de algumas regiões onde a atividade está mais concentrada.

Tabela 2.2- Produção nacional de leite

Estado	Volume de produção (mil litros)		Taxa de crescimento	% total
	2010	2011		
Minas Gerais	8.388.039	8.767.932	0,045	27,3
Rio Grande do Sul	3.633.834	3.896.650	0,072	11,8
Paraná	3.595.775	3.930.428	0,093	11,7
Goiás	3.193.731	3.365.703	0,054	10,4
Santa Catarina	2.381.130	2.573.337	0,081	7,8
São Paulo	1.605.657	1.593.515	-0,008	5,2
Bahia	1.238.547	1.354.714	0,094	4,0
Pernambuco	877.420	964.769	0,100	2,9
Rondônia	802.969	841.092	0,047	2,6
Mato Grosso	708.481	735.719	0,038	2,3
Pará	563.777	540.287	-0,042	1,8
Mato Grosso do Sul	511.270	517.185	0,012	1,7
Rio de Janeiro	488.786	495.411	0,014	1,6
Ceará	444.144	457.464	0,030	1,4
Espírito Santo	437.205	441.178	0,009	1,4
Maranhão	375.898	387.737	0,031	1,2
Sergipe	296.650	316.496	0,067	1,0
Tocantins	269.491	289.639	0,075	0,9
Alagoas	231.367	229.687	-0,007	0,8
Rio Grande do Norte	229.492	232.860	0,015	0,7
Paraíba	217.018	233.518	0,076	0,7
Piauí	87.354	90.585	0,037	0,3
Amazonas	47.203	57.368	0,215	0,2
Acre	41.059	34.386	-0,163	0,1
Distrito Federal	36.256	37.745	0,041	0,1
Amapá	6.952	7.737	0,113	0,0
Roraima	5.954	6.172	0,037	0,0
TOTAL	30.715.460	32.297.667	0,052	100,0

Fonte: IBGE/Pesquisa da Pecuária Municipal
Elaboração: R.ZOCCAL - Embrapa Gado de Leite
Atualizado em fevereiro/2012

O leite é um produto importante para o País e o cenário mundial é favorável; entretanto, para que a atividade seja sustentável e competitiva, grandes desafios devem ser vencidos, principalmente no setor produtivo, com uma produção de leite com qualidade e uma maior eficiência dos sistemas de produção, em que a incorporação de tecnologias, produtos e processos é lenta.

2.6.2- Soro de queijo

A indústria de laticínios vem apresentando problemas em relação ao despejo final de suas águas residuárias contaminadas. Estes efluentes têm diferentes composições, de acordo com o produto obtido, como queijo, iogurte, leite e manteiga (Prazeres et al., 2012). De acordo com a FAO (Organização para a Alimentação e Agricultura), o queijo é um dos principais produtos agrícolas mundiais, sendo o grande responsável pela geração destes efluentes contaminados, representando um significativo impacto ambiental para a indústria de laticínios (Carvalho et al., 2013). A cada 1 kg de queijo fabricado, são produzidos 9 kg de soro de queijo (Prazeres et al., 2012), e no Brasil a produção de soro de queijo chegou a quase 6 milhões de litros em 2010 (IBGE 2013). O alto volume gerado de soro de queijo provoca um problema em relação a sua disposição final, tornando-se importante a busca de novas alternativas para reduzir o potencial de poluição do soro e os custos associados ao tratamento do mesmo como efluente.

A caracterização soro de queijo depende da qualidade do leite utilizado (de cabra, vaca, ovelhas e búfalos), a qual pode variar dependendo da raça animal, alimentos para animais e saúde. Este resíduo é um subproduto do leite, obtido durante a produção de queijo ou de caseína. Consiste em cerca de 90% do volume de leite utilizado para a produção de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou, tais como: proteínas solúveis (0,6 a 1,1%), lactose (4,5 a 6%), ácido láctico (0,05-0,9%), gorduras (0,06-0,5%) e minerais (0,8 a 1%). Além disso, possui quantidades significativas de ácido cítrico, vitaminas, ureia e ácido úrico. O valor elevado de matéria orgânica é causado pelo conteúdo de lactose (0,18 e 60 kg m⁻³), proteína (1,4-33,5 kg.m⁻³) e gorduras (0,08-10. kg.m⁻³). Esta matéria orgânica é em torno de 99% biodegradável (Prazeres et al., 2012).

As matérias minerais mais importantes do soro são: cálcio (500 a 725 mg/100g), sódio (650 a 950 mg/100g), magnésio (880 a 1600 mg/100g), potássio (2.400 a 2.900 mg/100g) e fósforo (700 a 800 mg/100g) . O soro é também bastante rico em vitaminas hidrossolúvel tais como: riboflavina (1,37 a 1,86 mg/L), ácido pantotênico (3,85 a 4,26 mg/L), tiamina (0,38 a 0,40 mg/L), piridoxina (0,39 a 0,44 mg/L) e ácido ascórbico (0,20 a 0,26 mg/L) (Rosa, 2010).

O soro de queijo é uma matéria prima de grande valor nutritivo é perecível e requer um tratamento específico por parte das indústrias que o geram. O seu tratamento adequado pode resultar a sua melhor utilização e maior conservação. A secagem do soro tem como objetivo maior na sua conservação, reduzindo a umidade e podendo inibir crescimentos

bacterianos e reações químicas permitindo a sua conservação por longo período (Prazeres et al., 2012). Decorre também o fator econômico no que se refere ao custo de transporte, já que é expressiva a redução de volume do material como um todo.

O uso do soro de queijo em fermentação vem sendo uma estratégia adequada, já que o mesmo tem uma composição nutricional bastante apropriada para o metabolismo de diversos microrganismos que consomem os nutrientes do soro de forma a reduzir a alta demanda química de oxigênio (DQO), cerca de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio. L⁻¹ (aproximadamente 100 vezes maiores que o de um esgoto doméstico) e o volume gerado quando o soro torna efluente (Richards, 2002).

A hidrólise da lactose, um dissacarídeo, conduz à geração de monossacarídeos (Eq. 2.6), como a glicose e a galactose (Zhao et al., 2008). O soro de queijo tem sido considerado substrato suficiente para processos fermentativos e destaca-se sua relevância na produção de ácido lático, ácido butírico, ácido acético, butanol, glicerol, acetona, etanol e hidrogênio (Prazeres et al., 2012).



Recentemente, alguns estudos mostram a viabilidade da utilização do soro de queijo para a produção de hidrogênio (Carrillo-Reyes et al., 2012; Davila-Vazquez et al., 2011; Perna et al., 2013). A partir de soro de queijo (Azbar e Dokgoz, 2010; Venetsaneas et al., 2009); soro de queijo diluído (Azbar et al., 2009; Castello et al., 2009; Ferchichi et al., 2005), soro de queijo em pó (Davila-Vazquez et al., 2008; Davila-Vazquez et al., 2009; Rosales-Colunga et al., 2010) e permeado do soro de queijo em pó (Yang et al., 2007) foram realizados para a produção de hidrogênio.

O soro de queijo tem sido estudado como fonte exclusiva de carbono para a bioprodução de hidrogênio por meio da fermentação na ausência de luz e, em sua maioria em modo batelada (Davila-Vazquez et al., 2011; Ferchichi et al., 2005; Rosales-Colunga et al., 2010). A fermentação deste resíduo também foi considerada em reatores contínuos, a partir de biodigestor anaeróbio (Azbar et al., 2009), de reatores UASB (Carrillo-Reyes et al., 2012; Castello et al., 2009), de reator anaeróbio de leito fixo (Perna et al., 2013) e de reatores CSTR (Azbar e Dokgoz, 2010; Davila-Vazquez et al., 2009; Venetsaneas et al., 2009; Yang et al., 2007), mostrando que a operação contínua de reatores fornece estabilidade, elevada

produtividade e rendimento de H₂, quando comparada em modo batelada (Argun e Kargi, 2011).

Ferchichi et al. (2005) avaliaram o efeito do pH inicial sobre a produção de hidrogênio usando águas residuárias com soro de queijo. O pH ácido inicial obteve rendimentos superiores aos de pHs alcalinos. A taxa de produção máxima foi de 47,1 mL.h⁻¹, obtido em pH 6.

Yang et al. (2007) estudaram a produção de hidrogênio com águas residuárias com soro de queijo, com culturas mistas. Com concentração de alimentação baseada na DQO do soro de queijo que foi de 5 g .L⁻¹ obtiveram rendimentos de hidrogênio de 10 mM.g⁻¹ DQO. Já para as fermentações contínuas, a concentração de DQO variou de 10, 12 e 14 g.L⁻¹ para um TDH de 1 dia, e uma concentração de alimentação de 5 g. L⁻¹ obtendo os maiores rendimentos de hidrogênio de 2 mM/g DQO para a faixa de DQOs entre 10 a 14 g/L em 1 dia. Os valores entre 4-5 de pH são os mais favoráveis para a fermentação contínua com águas residuárias contendo soro de queijo.

Azbar et al. (2009) mostraram que o soro de queijo se torna um substrato atrativo, para a produção de hidrogênio, em fermentações contínuas, utilizando culturas mistas sob temperaturas termófilas, para diferentes TDH (3,5, 2 e 1 dia), e DQO (21, 35 e 47 DQO.L⁻¹.dia⁻¹). Com TDH fixado em 1 dia, obteve-se biogás com média de 45% de hidrogênio, com uma taxa de produção média de 2,5L.d⁻¹.L⁻¹. Já para uma DQO constante de 40g.L⁻¹, obteve-se rendimentos de hidrogênio de 22, 15 e 5 mmol H₂.g⁻¹ DQO para os TDH de 3,5, 2 e 1 dia, respectivamente.

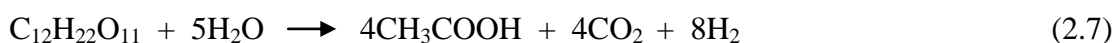
Davila- Vasquez et al (2009) também observaram a queda de rendimento por meio da diminuição do TDH aplicado. Ao utilizarem um CSTR, com aplicação de três TDH (10, 6 e 4 horas), os autores obtiveram o maior rendimento de 2,4 mol.mol⁻¹ lactose com o maior TDH aplicado, de 10 horas, e máxima produção volumétrica de hidrogênio de 0,5 L.h⁻¹.L⁻¹ com TDH aplicado de 6 h. A diminuição do TDH mostrou que houve queda no rendimento de hidrogênio, de 1,7 mol.mol⁻¹ lactose para 1 mol.mol⁻¹ lactose, nos TDH de 6 e de 4 horas, respectivamente.

Carrillo-Reyes et al.(2012) avaliaram diferentes estratégias operacionais e estruturas de inóculo, sobre a produção de hidrogênio, utilizando um reator UASB com soro de queijo como substrato. A partir da aplicação de uma carga de 20 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ e uma diminuição gradual de TDH de 24 para 6 horas, os autores verificaram uma queda de produção de H₂ de 0,03 para 0,015 LH₂.L⁻¹.h⁻¹, devido a presença de metano. Segundo os autores, o atraso na

produção de metano deste reator, quando comparado aos demais reatores de seu estudo, foi devido a aplicação de altas concentrações de substrato. As máximas produções de metano de $0.02 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ foram obtidas nos reatores com aplicação de TDH de 6 horas, e carga variando de 5 gDQO.L^{-1} a 20 gDQO.L^{-1} .

Perna et al. (2013) avaliaram o efeito da variação de carga orgânica, sobre a produção de hidrogênio em um reator de leito fixo com diferentes TCO ($22, 33$ e $37 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) com um TDH fixo em 24 horas. O aumento da TCO provocou um aumento de rendimento de $0,2$ para $0,6 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}$ lactose, alcançando produções de $1 \text{ L H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

No tratamento de águas residuárias com soro de queijo, o efluente obtido após a produção de hidrogênio contém matéria orgânica residual na forma de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, butírico), álcool (etanol) e carboidratos (lactose remanescente) (Prazeres et al., 2012). A produção molar de hidrogênio poderá alcançar valores máximos de $8,0$ e de $4,0 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ lactose (Eq.2.7 e Eq.2.8) por meio da fermentação do acetato e do butirato, respectivamente. O acetato pode ser posteriormente clivado para dar 4 mol de metano e 4 mol de dióxido de carbono por via metanogênese acetoclástica. Se esta via for seguida, a proporção volumétrica de hidrogênio em metano é de $2:1$. No entanto, o rendimento de H_2 com base em lactose poderia ser inferior, se outros metabolitos tais como ácido láctico, etanol, butanol ou acetona são também formados (Davila-Vazquez et al., 2011).



2.6.3- O processo de industrialização da mandioca

A mandioca é uma planta extremamente cultivada no Brasil sob condições climáticas diversas, possuindo uma elevada adaptabilidade sendo uma das principais e importantes fontes de carboidratos para os consumidores de renda mais baixa em países tropicais da América Latina. A mandioca é produzida principalmente por produtores de pequeno porte, em sistemas de produção complexos, com pouco ou nenhum uso de tecnologia moderna, especialmente agroquímica (EMBRAPA, 2012).

O Brasil aparece como um dos maiores produtores e consumidores desta raiz, com uma produção estimada para 2013 de $23.440.077$ toneladas (IBGE 2013). O processamento industrial da mandioca gera quantidades significativas de resíduos sólidos e líquidos que causam sérios problemas ambientais. Os resíduos sólidos são constituídos basicamente de

cascas, fibras, bagaço. As cascas de mandioca contêm glicosídeos cianogênicos, principalmente linamarina e, a eliminação e tratamento inadequado deste resíduo muitas vezes criam um problema ambiental devido à liberação de cianeto de hidrogênio (HCN) (Ki et al., 2013). O resíduo líquido gerado, chamado de “manipueira” ou água de extração de fécula, apresenta um elevado teor poluente devido a presença de carboidratos, açúcares solúveis e matérias graxas.

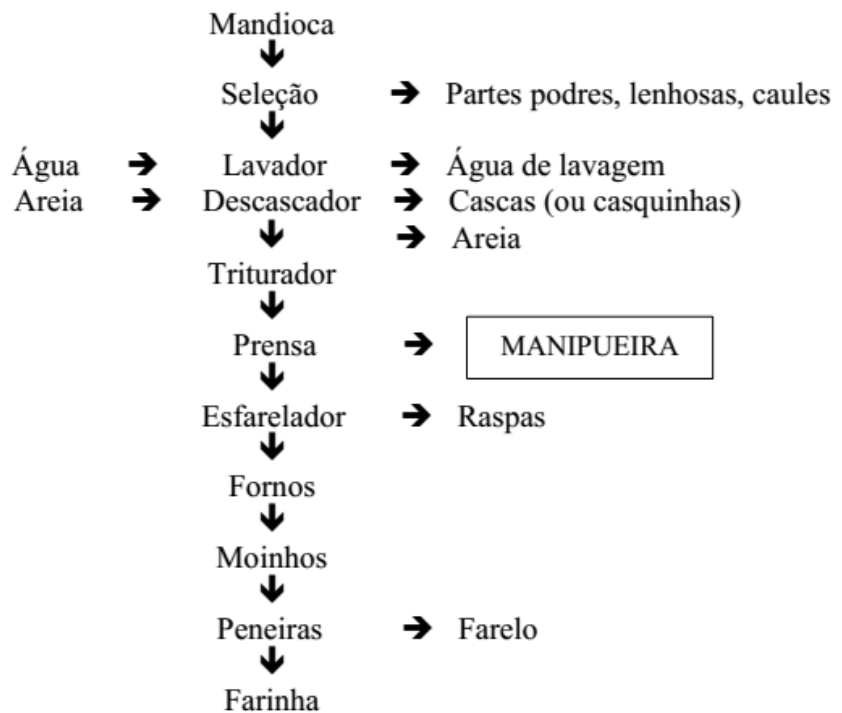
Apesar da disponibilidade de vários sistemas para o tratamento de efluentes líquidos, a indústria da mandioca faz parte de um segmento que ainda não permite grandes investimentos em tecnologia para o tratamento dos seus efluentes e, existe outra preocupação com o pós-tratamento, pois a grande maioria das empresas esta instalada em áreas rurais, restando como alternativa a disposição em solo através de fertirrigação. A pesquisa sobre tratamento de efluentes de agroindústrias tem mostrado que os processos biológicos são considerados uma alternativa para o tratamento de resíduos gerados pelas fecularias, de forma simples e econômica.

2.6.4- A água do processamento da mandioca (Manipueira)

A manipueira, a água da prensagem da mandioca no processo de fabricação de farinha, contém todos os constituintes líquidos solúveis da raiz, além de 20 a 40 g.L⁻¹ de carboidratos. Usualmente, a manipueira é descartada em correntes de água ou utilizada para a fertilização de solos. Ela representa, em média, 30% da matéria-prima processada, no caso de produção de farinha de mandioca (Wosiacki e Cereda, 2002).

Sendo considerado um resíduo complexo, a manipueira é composta por minerais e matéria orgânica apresentando aspecto leitoso, contendo apreciável quantidade de amido (em farinheiras) sedimentável e em suspensão coloidal, proteínas, glicose, resto de fibras, ácido cianídrico, bem como outras substâncias orgânicas (Ribas, 2003). Além disso, apresenta elevada carga orgânica, sendo composta basicamente por açúcares solúveis de fácil fermentação (Cappelletti et al., 2011).

Dependendo da forma de processamento das raízes, a manipueira, tanto de farinheiras quanto fecularias, pode apresentar variadas concentrações, principalmente com relação à matéria orgânica e ao potencial tóxico, sendo atribuído a estas variações à constituição da raiz, em função da variedade cultivada, tipo de solo, condições climáticas, época de colheita, entre outro (Wosiacki e Cereda, 2002). A Figura 2.2 mostra o fluxograma de produção da farinha.



.. **Figura 2.2-** Fluxograma da produção de farinha

O amido pode ser hidrolisado em glicose e maltose, por hidrólise ácida ou enzimática, seguido por conversão dos hidratos de carbono em ácidos orgânicos e, em seguida, em gás de hidrogênio (Leano e Babel, 2012). Assim, é possível tratar esses efluentes, e o alto teor de matéria orgânica qualifica esta água residuária a ser usada como substrato em processos para a produção de hidrogênio.

A produção de hidrogênio a partir de fontes ricas em amido vem sendo amplamente estudada (Cakir et al., 2010; Sun et al., 2012; Thanwised et al., 2012). A maioria dos estudos tem sido realizada em processo bateladas (Akutsu et al., 2009b; Cappelletti et al., 2011; Leano e Babel, 2012; Wang et al., 2011). Poucos trabalhos utilizando fontes ricas em amido foram realizados em reatores contínuos para a produção de hidrogênio (Akutsu et al., 2009c; Luo et al., 2010).

Akutsu et al. (2009a) avaliaram o efeito do TDH, pH e concentração de substrato sobre a produção de hidrogênio em condições termófilas, em um reator UASB, utilizando o amido como substrato. Os autores obtiveram um rendimento máximo de $1,7 \text{ mol.mol}^{-1}$ de glicose com um TDH de 48 horas, e por meio do monitoramento do pH (de 5,1), obtiveram produção de hidrogênio de $0,075 \text{ L.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Estes mesmo autores no mesmo ano avaliaram o

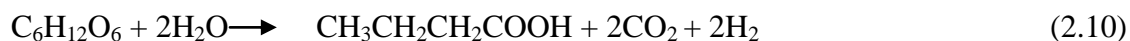
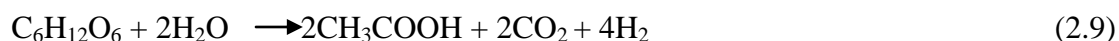
efeito da temperatura e concentração de amido como substrato, alcançando rendimentos de 2,8 mol H₂.mol⁻¹ com uma concentração de amido de 20 g.L⁻¹. Com o aumento da concentração de substrato para 70 g.L⁻¹, houve uma queda no rendimento de hidrogênio (1,84 mol H₂.mol⁻¹).

Cakir et al. (2010) avaliaram o efeito da temperatura sobre a produção de hidrogênio, utilizando trigo hidrolisado como substrato. As maiores produções de H₂ de 752 mL foram obtidas na maior temperatura (55°C). Cappelletti et al. (2011) avaliaram o efeito da concentração de substrato (5, 7,5, 10,7, 15 e 30 g/L) sobre a produção de hidrogênio, utilizando manipueira como substrato. Os autores alcançaram um rendimento máximo de 2,41 mol H₂/mol glicose com a menor concentração de 5gDQO.L⁻¹ e verificaram uma correlação inversa entre a concentração de substrato e o rendimento de hidrogênio para a manipueira. Quando passou a carga orgânica para 10 gDQO.L⁻¹, houve uma redução de rendimento, tendo valores de 1,34 mol H₂.mol⁻¹ glicose.

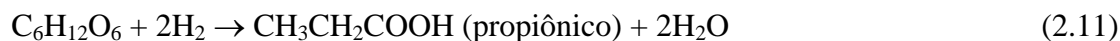
Thanwised et al. (2012) ao avaliarem o efeito do TDH (24-3 h) sobre a produção de hidrogênio, utilizando água residuárias de tapioca, verificaram que a partir da redução do TDH de 12 para 3 horas houve um aumento de produção de metano (3,7%), sendo que o máximo HY foi de 0,74 mmol H₂.g⁻¹.

Leano e Babel (2012) avaliaram o efeito de diferentes pré-tratamento da manipueira, em processo bateladas. Os autores alcançaram os maiores rendimentos de 5,02 mol H₂/g DQO a partir do pré-tratamento com α amilase a 0,20%, e pH 7. Os autores não verificaram a presença de metano devido ao pré-tratamento do lodo. As melhores porcentagens da remoção de DQO foram de 60%.

Segundo Levin et al. (2004) os carboidratos são os substratos preferenciais para a produção de hidrogênio. Polímeros na forma de amido apresentam diferentes rendimentos de hidrogênio por mol de glicose, dependendo da via metabólica e do produto final. Quando ácido acético é o produto final, o máximo rendimento teórico obtido é 4 mol.mol⁻¹ glicose, (mostrado na Equação 2.9). Porém, quando butirato é o produto final, o máximo rendimento teórico é de 2 mol.mol⁻¹ de glicose (mostrado na Equação 2.10).



A ausência da produção de ácido propiônico garante maior produção de hidrogênio em decorrência de não haver demanda de H₂ para formação de ácido propiônico (Equação 2.11).



O ácido láctico é produzido a partir da glicose através de três rotas metabólicas, a homofermentativa (Eq. 2.12), a heterofermentativa (Eq. 2.13) e a rota bifidum (Eq. 2.14). Em todas as três rotas o saldo de hidrogênio é zero, ou seja, o hidrogênio não é consumido nem produzido. O mesmo é para produção do etanol, onde o saldo de hidrogênio é zero (Eq. 2.15).

Rota homofermentativa:



Rota heterofermentativa:



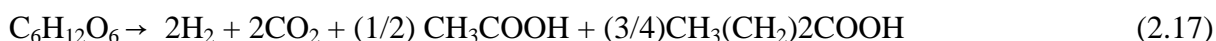
Rota bifidum:



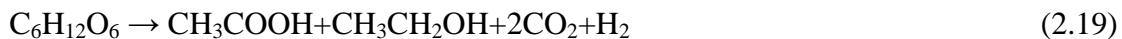
Produção do etanol:



Porém, hoje já se sabe que é possível produzir hidrogênio a partir da rota aceto-alcólica, que também é uma rota favorável na produção de hidrogênio a partir de etanol, (Equação 2.16). Já com a produção conjunta de ácido acético e butírico, as vias metabólicas são mostradas pelas equações 2.17 e 2.18 (Hwang et al., 2004; Zhu et al., 2009).



Ding et al. (2008) também propõe a rota de acetato como favorável a produção de hidrogênio, conforme mostra a Equação 2.19.



Por causa da obtenção de um elevado rendimento de H_2 , os caminhos de metabolismo celular devem ser redirecionados, o que exige uma extensa análise e compreensão de vias metabólicas e regulação dos organismos produtores de H_2 .

2.7 – O uso de co- substratos

Recentemente, a co-fermentação anaeróbia tem recebido mais atenção, por oferecer uma melhor condição de pH e uma relação de carbono/nitrogênio mais equilibrada, aumentando assim a produção de biogás (Tawfik e Salem, 2012; Wang et al., 2011). Gioannis et al. (2013) afirmaram que a mistura de substratos é motivada por objetivos concomitantemente, incluindo: (a) tratamento combinado de diferentes resíduos, (b) a capacidade para tratar resíduos de outra maneira difícil de gerir individualmente, (c) a diluição de compostos potencialmente tóxicos / inibitória (d) que resultem efeitos sinérgicos sobre a biomassa, (e) a otimização das condições para a produção de hidrogênio, (f) o controle interno de pH e (g) otimização da relação carboidrato / proteína.

No estudo da co-fermentação, a maioria dos trabalhos utilizaram como substrato materiais lignocelulósicos (Hniman et al., 2011; Xia et al., 2012), e resíduos de alimentos (Tawfik e El-Qelish, 2012; Zhu et al., 2008) e ainda é limitada o estudo da co-fermentação para a produção de hidrogênio utilizando resíduos agroindustriais. A maioria dos estudos para a produção de hidrogênio utilizando a mistura de substratos tem sido conduzida em processos por bateladas (Hniman et al., 2011; Zhu et al., 2008) e CSTR (Dareioti et al., 2009; Wang et al., 2013b).

Sabendo que os carboidratos são fontes preferenciais para as bactérias produtoras de hidrogênio, como aquelas que pertencem ao gênero *Clostridium* sp., e que substratos ricos em proteínas e lipídeos dificilmente produzem hidrogênio, algumas experiências mostraram que, em algumas circunstâncias, as proteínas misturadas com lamas residuais são uma fonte para a produção de hidrogênio em ambas as culturas puras e mistas. Este fato é relatado por Zhu et al. (2008) que testaram diferentes misturas de resíduos de alimento, lodo primário e resíduo de lodos ativados e encontradas proporções de mistura apropriado dos três substratos para

promover a produção de hidrogênio (até um máximo de 112 ml / g SV adicionado) devido a um melhor equilíbrio de hidratos de carbono, nitrogênio, fósforo e traços de metais , além disso , o lodo primário teve uma maior capacidade de tamponamento em baixos valores de pHs , em comparação com os resíduos de alimentos.

Ren et al. (2008) avaliaram diferentes proporções entre glicose e xilose com concentrações de substrato de 10 g.L⁻¹. À medida que os autores foram aumentando a quantidade de xilose na proporção de substratos, foi havendo queda no rendimento de hidrogênio. O rendimento máximo foi de 2,42 mol.mol⁻¹ glicose, com apenas glicose.

Prakasham et al. (2009) também investigaram a relação de glicose e xilose como substratos na produção de hidrogênio, e revelaram que a xilose é preferida como fonte de carbono quando comparada com a glicose quando usados individualmente. Quando adicionaram um co-substrato, aumentaram sua produção de hidrogênio, tendo um máximo de 1900 mL H₂ com uma concentração de 5 g.L⁻¹ de substrato com a proporção de glicose e xilose de 2:3.

Wang et al. (2011) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando uma co-digestão de vinhaça de mandioca e lodo de esgoto, sob condições termófilas. Os autores mostraram um aumento de produção de H₂ motivada pela mistura de substratos, resultando em uma produção de hidrogênio de 74 ml/g SV na proporção de 3:1 (vinhaça de mandioca: lodo de esgoto).

Tawfik e El-Qelish (2012) investigaram o efeito da taxa de carregamento orgânico sobre a produção de hidrogênio, utilizando a co-digestão anaeróbia de resíduos alimentares municipais e uma água residuária de cozinha, operando um reator anaeróbio contínuo. Os autores mostraram que o aumento da TCO de 29 para 36 g DQO L⁻¹.d⁻¹ ,com um tempo de detenção hidráulica de 1,6 dias, resultou em uma queda de H₂ de 245 para 164 mL H₂.g⁻¹ DQO.

Xia et al. (2012) relatam que a adição de co-substratos melhora a tratabilidade e disponibilidade de materiais resistentes para os microrganismos durante a degradação microbiana, e ainda que estes efeitos têm sido estudados em águas residuárias contendo compostos orgânicos inibitórios. Os autores investigaram a influência de diferentes co-substratos (glicose, amido e xilose) na conversão da celulose. A xilose alcançou a maior conversão, cerca de 30%, e o maior rendimento de hidrogênio (180 ml.L⁻¹), quando combinado na proporção de 10:1 em termos de DQO com a celulose, quando comparados com apenas a celulose.

Rosales-Colunga et al. (2012) afirmaram que a cinética do hidrogênio e a produção dos metabólitos, são afetadas pelo tipo de açúcar utilizado como substrato, refletindo nos desvios das rotas metabólicas de produção de hidrogênio. Os autores avaliaram a influência das fermentações de glicose, lactose e uma mistura de glicose e galactose, sobre a produção de hidrogênio. Por meio da utilização de apenas glicose como substrato, alcançaram rendimento de $0,3 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose e uma produção de $18,61 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Quando utilizaram a mistura de 50% de glicose e 50% de galactose, o rendimento aumentou de $1,02 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ hexose e produção de $0,024 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, 24% a mais, quando comparada com apenas a glicose.

Recentemente, Wang et al. (2013b) estudaram a influencia de diferentes co-substratos sobre a produção de hidrogênio, utilizando a vinhaça de mandioca. Os autores aumentaram em 46% quando utilizaram a mistura de lodo de descarte do processamento de mandioca e vinhaça de mandioca.

2.7.1- Uso da glicose como co-substrato

Alguns autores tem adotado a estratégia de adaptação dos microrganismos frente a açúcares mais simples anterior a introdução parcial ou completa de substratos complexos, a fim de ativar a produção de hidrogênio utilizando águas residuárias complexas. Buitron e Carvajal (2010) iniciaram a operação dos reatores com apenas glicose ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), até a estabilização da produção de hidrogênio e substituíram o substrato, glicose por vinhaça de tequila, em reatores seqüenciais bateladas alcançando uma produção volumétrica máxima de $50,5 \text{ mL H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com um TDH de 12 horas e uma concentração de $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Ding e Wang (2008) também tiveram sucesso quando utilizaram em sua partida 65 % de glicose, deixando a biomassa do reator densa e em grande quantidade.

2.8– Considerações finais

Esta revisão demonstra que existe uma necessidade cada vez maior na busca de energias renováveis, a fim de se minimizar problemas ambientais e de esgotamento de combustíveis. Sendo assim, a produção anaeróbia de hidrogênio tem ganhado destaque recentemente no que concerne a aplicabilidade de diferentes matérias-primas para a produção de bioenergia e o tratamento de águas residuárias combinado.

Águas residuárias agroindustriais, como o soro de queijo e a manipueira, apresentam um elevado potencial poluidor, representando atualmente uma das maiores fontes causador de

poluição ambiental. Sendo assim, diversos estudos têm demonstrando que o tratamento anaeróbio de águas residuárias é eficaz, possibilitando a utilização de reatores com altas velocidades de conversão e tolerantes à aplicação de elevadas cargas orgânicas, garantindo a estabilidade do processo de digestão anaeróbia.

Como foi apresentada nessa revisão, a produção em reatores vem sendo analisada com variação de diversos parâmetros. Condições operacionais dos reatores utilizados, uso de diferentes culturas microbiana, diferentes substratos, e tempos de detenção hidráulica são algumas das propriedades que podem ser modificadas para aprimorar o conhecimento a cerca do metabolismo favorável envolvido na produção de hidrogênio.

Ainda, a partir da revisão da literatura, foi obtido melhor entendimento de várias questões relacionadas à produção de hidrogênio. As informações obtidas permitiram a ampliação dos conhecimentos referentes ao uso de diferentes fontes de carbono, bem como o uso de fontes de substratos misturadas, concebidos a partir de observações em estudos tratando diferentes águas residuárias reais. Para os reatores anaeróbios de leito fluidizado, os quais possuem alta concentração de biomassa e alto tempo de retenção celular, favoreceu sistemas de produção de hidrogênio de alto desempenho.

Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema eficiente que possa operar como fonte de tratamento, tanto na remoção de matéria orgânica quanto no seu reaproveitamento, com baixo consumo de energia, é de grande interesse para a produção de hidrogênio e etanol.

Assim, o presente trabalho vem a somar conhecimentos a cerca da aplicabilidade do RALF para a produção de hidrogênio e etanol a partir de diferentes fontes de carbono e diferentes origens de inóculo, utilizando águas residuárias reais, juntamente com pesquisas anteriores já desenvolvidas na área diante das lacunas que ainda são apresentadas no que concernem a esse tema.

CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada a configuração do sistema utilizado para o desenvolvimento da parte experimental, juntamente com os métodos adotados para avaliar o desempenho do reator anaeróbio de leito fluidizado utilizado para a produção de hidrogênio.

Para facilitar a discussão dos resultados e identificar os reatores, optou-se por nomear cada reator com três caracteres, significando o número de cada reator e o tipo de substrato utilizado (S: soro de queijo e M manipueira). Exemplo: R1S: Reator contendo soro de queijo, R1M: Reator contendo manipueira.

3.1 - Reator anaeróbio de leito fluidizado

Na Figura 3.1 é mostrado o esquema do reator anaeróbio de leito fluidizado que foi utilizada para o estudo de produção de hidrogênio, apresentando todos os componentes utilizados durante a operação do sistema.

Foram utilizados reatores semelhantes, construídos com acrílico transparente de 5 mm de espessura que apresenta as seguintes dimensões: altura de 80 cm e diâmetro interno de 3,5 cm, com volume total de 770 cm^3 . Eles foram incubados com o meio de alimentação, inóculo e suporte descrito abaixo. A temperatura foi mantida em $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por meio de encamisamento do reator em banho termostaticado.

A bomba de alimentação utilizada foi da marca DOSITEC, modelo DLX MA/A, operado com vazão e pressão máxima de $1 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ e 15 Bar, respectivamente, e bomba de recirculação utilizada foi da marca ECOSAN-Bomba dosadora, cuja vazão varia de 10 a 200 L h^{-1} e pressão de 6 kg cm^{-2} . O sistema para manter o reator com temperatura constante utilizado foi banho ultratermostaticado Marconi modelo 184.

Na Figura 3.2 é mostrada uma fotografia do reator utilizado e na Figura 3.3 é apresentada, em detalhe, alguns dos componentes do reator anaeróbio de leito fluidizado.

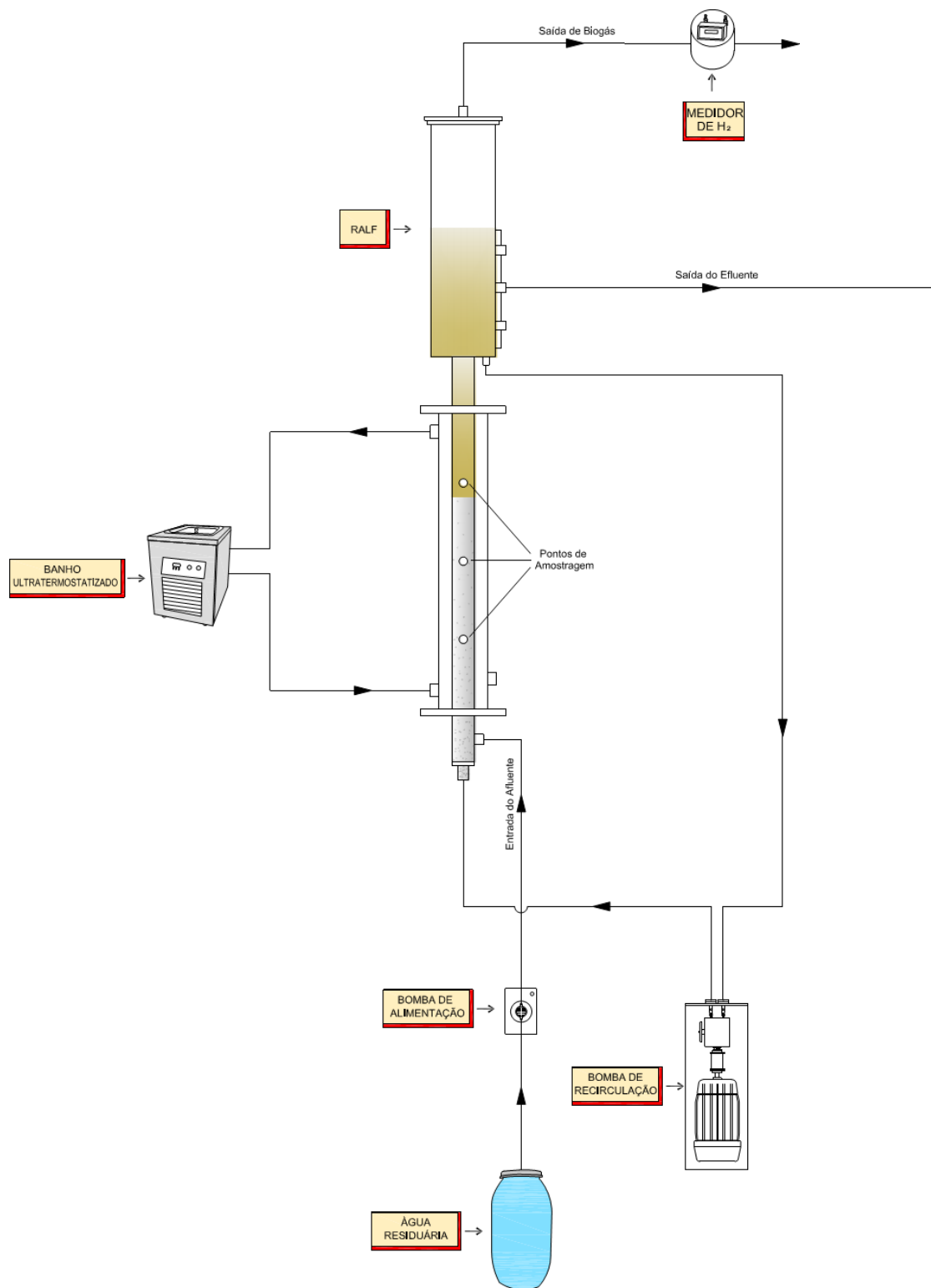


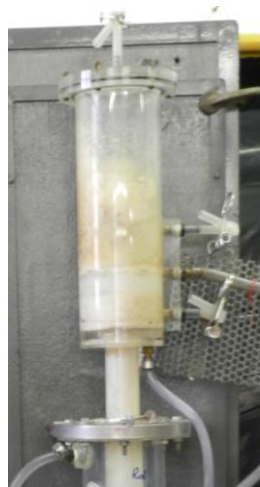
Figura 3.1- Esquema do reator anaeróbio de leito fluidizado.



Figura 3.2 – Reator anaeróbio de leito fluidizado.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.3 – Componentes do experimento: (a) distribuidor da alimentação; (b) topo do reator; (c) leito do reator.

3.2 - Substratos

Durante a operação dos 12 RALFs, foram utilizados 3 diferentes fontes de carbono descritas a seguir. Todas as águas residuárias foram armazenadas em recipientes mantidos refrigerados a 4 °C, para garantir a não fermentação dos meios.

3.2.1- Glicose

A partida de oito reatores foi feita com uma água residuária sintética composta por apenas de glicose (5000 mg.L⁻¹) como principal fonte de carbono e preparada de acordo com Shida (2008). As características desta água residuária estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição da água residuária sintética utilizada (Shida, 2008).

Composto	Concentração (mg. L⁻¹)
Glicose	5000,0
Uréia	125,0
Sulfato de níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Sulfato 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

A alimentação dos nutrientes para preparo da solução foi feita com valores constantes desde o início ao fim da operação de cada reator conforme apresentado na Tabela 3.1.

Segundo Chen et al. (2008) a estratégia de adaptação dos microrganismos a compostos mais simples pode aumentar tanto a tolerância aos compostos tóxicos presentes como também a biodegradabilidade, propondo uma saturação com tais substratos previamente a mudança para o substrato mais tóxico. Neste sentido, a aclimatação do inóculo frente a açúcares simples, como glicose, anteriormente à introdução parcial ou completa de águas residuárias complexas como o soro de queijo e a manipueira, foi considerada a fim de aumentar o rendimento de hidrogênio.

A escolha da glicose como substrato mais simples e biodegradável foi pelo fato de se ter bons resultados de produção de hidrogênio com este substrato em reatores anaeróbios de leite fluidizado dentro do grupo de pesquisa (Amorim et al. 2009; Barros e Silva 2012; Reis e Silva 2011; Shida et al. 2012).

3.2.2-Soro de queijo

Soro de queijo em pó utilizado como substrato neste estudo foi fornecido pela empresa Cargill Agrícola S/A unidade de Porto Ferreira, que faz o processamento e distribuição de produtos e serviços aos parceiros nos setores agrícola, alimentício, industrial, financeiro e de gerenciamento de risco. Foi realizada uma diluição do soro de queijo, de acordo com a DQO utilizada para cada reator e esta água residuária foi suplementada de acordo com Shida (2008). A cada 5 g.L⁻¹ de soro diluído em água, era constituído de 4g.L⁻¹ de carboidratos, DQO de 5 g.L⁻¹ e pH de 6. Nas Tabelas 3.2 e 3.3, fornecidas pela Cargill, são apresentadas as especificações e informações nutricionais do soro de queijo.

Tabela 3.2 - Especificações do Soro em pó

Umidade(%)	Máx 4,5
pH (1:9) *	Min. 6
Cinzas (%)	Máx. 10
Bactérias mesófilas (UFC/g)	Máx. 30.000
Coliformes fecais (UFC/g)	Máx. 10
<i>Salmonella</i> sp (/25g)	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (/g)	Máx. 100

Fonte: Cargill 2008

(*) - Fator de diluição.

Tabela 3.3- Informação nutricional (porção de 100 gramas)

Valor energético	380 Kcal(1590 kj)
Carboidratos	73,9 g
Proteínas	12,5 g
Gorduras Totais	3,8 g
Gorduras Saturadas	2,3 g
Gorduras Trans	0,1 g
Fibra Alimentar	Menor 0,5 g
Sódio	1205,05 mg

Fonte: Cargill 2008

3.2.3- Manipueira

A manipueira utilizada como substrato foi obtida na Plaza - Indústria e Comércio LTDA, fábrica de farinha de mandioca localizada em Santa Maria da Serra- SP, sendo coletada na caixa de retenção, localizada abaixo das prensas da massa ralada na farinheira que após a coleta era armazenada a 4 °C. Esta água residuária tinha pH de 4,5, açúcares totais 4 g.L⁻¹, DQO de 45.000 mg.L⁻¹ e também foi suplementada de acordo com Shida (2008). Foram operados seis reatores com manipueira.

Para quatro reatores que foram operados com manipueira (R3M, R4M, R5M e R6M), antes de ser utilizada no meio de alimentação, a manipueira foi submetida a uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 0,05 M e autoclavada a 120°C por 30 minutos , para facilitar a quebra do amido em glicose.

3.3 – Inóculo

Dois diferentes tipos de inóculos foram utilizados neste estudo: quatro reatores que utilizaram soro de queijo como substrato (R1S, R3S, R5S e R6S) e mais outros quatro

reatores com manipueira (R1M, R3M, R5M e R6M) foram inoculados com lodo de reator UASB utilizado no tratamento de águas residuárias de suinocultura fornecido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP), Campus Jaboticabal. Da mesma maneira, os reatores R2S, R4S, R2M e R4M foram inoculados com lodo proveniente do abatedouro de aves fornecido pela empresa Dacar-Tiete. Estes inóculos foram submetidos a um tratamento térmico de acordo com Kim et al. (2006). O tratamento térmico possibilita a eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos, garantindo a sobrevivência de células acidogênicas com capacidade de formação de endósporos, estruturas de resistência a condições desfavoráveis.

3.4- Material suporte utilizado nos reatores

Em todos os reatores foram utilizados como suportes de imobilização da biomassa partículas de poliestireno. As condições fluidodinâmicas dos reatores, tais como velocidade de mínima fluidização e vazão de recirculação para o suporte foi calculada a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga. As partículas tinham como principais características, diâmetro da partícula de 2,2 mm, velocidade de mínima fluidização de $0,74 \text{ cm.s}^{-1}$ e densidade de $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$, conforme mostra a Figura 3.4.



Figura 3.4 – Partículas de poliestireno com tratamento para utilização como suporte para imobilização da biomassa.

Antes de serem adicionadas ao reator as partículas de poliestireno foram mergulhadas em solução sulfocrômica por 40 minutos, em seguida lavadas com água, secas e mergulhadas em ácido nítrico concentrado por 50 minutos. Posteriormente, foram lavadas novamente e secas em estufa a 40°C, aumentando assim a rugosidade das partículas. Este procedimento foi realizado três vezes (Barros, 2009).

3.5- Operações dos reatores

Inicialmente, os dados experimentais de velocidade de mínima fluidização foram ajustados para partículas de poliestireno no reator de leito fluidizado utilizado neste trabalho. Com estes dados foi possível calcular a vazão de recirculação necessária para que o reator atingisse as condições de fluidização, ou seja, correspondente a 1,3 vezes a velocidade de mínima fluidização (V_{mf}). O valor da velocidade de mínima fluidização para a partícula de poliestireno foi de $0,74 \text{ cm s}^{-1}$, porém o utilizado durante a operação do sistema foi $0,962 \text{ cm s}^{-1}$ (1,3 vez V_{mf}) e com o uso de um medidor de vazão acoplado no reator a bomba foi regulada.

Foi realizado o acionamento da bomba dosadora da ECOSAN, deixando o sistema permanecer em recirculação como se estivesse em batelada com uma vazão de recirculação de $0,962 \text{ L.h}^{-1}$, correspondendo a 1,3 vezes a vazão mínima de fluidização. Nesta fase, monitorou-se a concentração de carboidratos da água residuária contendo inóculo para, em seguida, retirar o reservatório de inóculo, acoplando mangueira de alimentação, passando assim a operar o sistema continuamente.

Cada reator foi inoculado utilizando a água residuária, diluída na concentração de faixa de DQO desejada e lodo pré-tratado (10% v/v). As condições anaeróbias foram realizadas a partir do uso de nitrogênio e a temperatura do reator foi mantida a 30°C. O sistema foi mantido em modo batelada por 72 horas para ativar a produção de hidrogênio no lodo. Durante este período, as concentrações de carboidratos, DQO e controle de pH foram realizadas com adição de NaOH ou NaHCO_3 . Quando o estado estacionário era alcançado (variação inferior a 10% na produção de hidrogênio) foram feitas variações no TDH ou na concentração de substrato.

3.5.1- Reatores operados com soro de queijo e glicose como substrato

Para os reatores R1S e R2S, foi avaliado o efeito da adição da glicose como co-substrato, sobre a produção de hidrogênio. Na Tabela 3.4 apresenta-se de forma objetiva a operação dos reatores R1S e R2S, que foram operados por 110 dias com uma concentração de 5 g.L⁻¹ e TDH de 6 h. A primeira fase durou 45 dias e o reator foi alimentado apenas com glicose. A opção da adição de glicose como substrato mais simples viabiliza a aclimação dos microrganismos a compostos mais complexos. Sendo assim, os soro de queijo foi sendo adicionado gradativamente e na fase 2, do dia 46 ao 66, a água residuária foi preparada na proporção de 33% de soro de queijo e 67% de glicose. Na fase 3, do dia 67-88, foi feita uma proporção de 67% de soro e 33% de glicose, e finalmente na fase 4 até o dia 110 utilizou-se apenas soro de queijo. Em todas as etapas o TDH foi de 6 h (TCO de 20 Kg.m⁻³.d⁻¹) e a concentração de 5 g.L⁻¹. O pH afluente foi de 5,5, controlado com NaHCO₃ e mantido na faixa de 4-4,5 para o efluente.

Tabela 3.4- Condições operacionais dos reatores R1S (lodo suíno) e R2S (lodo de aves).

Fases	Dias	% de glicose	% de soro	TDH (h)
1	1-45	100	0	6
2	46-66	67	33	6
3	67-88	33	67	6
4	89-110	0	100	6

3.5.2- Reatores operados com soro de queijo como substrato

Quatro reatores foram operados utilizando soro de queijo como substrato, e foi avaliado o efeito do TDH e da concentração de substrato sobre a produção de hidrogênio.

Para os reatores R3S (lodo de suínos) e R4S (lodo de aves), foi feita uma redução de TDH de 6, 4, 2 e 1 h e conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico (TCO) de 20, 30, 60 e 120 kgDQO.m⁻³ d⁻¹ (Tabela 3.5). A DQO utilizada foi de 5 g.L⁻¹, e o pH também foi controlado com NaHCO₃ e mantido na faixa de 4-4,5.

Tabela 3.5- Condições operacionais dos reatores R3S (lodo suíno) e R4S (lodo de aves).

Fases	Dias	TDH (h)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	1-43	6	20
2	44-91	4	30
3	62-113	2	60
4	114-142	1	120

Para o reator R5S também foi avaliado o efeito do TDH a partir da redução de 14 para 8 h, com uma concentração de 5 g.L⁻¹ resultando em um aumento de taxa de carregamento orgânico (TCO) de 8,5 para 15 kg.m⁻³.d⁻¹. Já para o reator R6S, foi avaliado o efeito da concentração de substrato, variando de 3 a 10 g.L⁻¹, com um TDH fixo em 6 h e. Estes reatores foram operados por 160 dias, e nas Tabelas 3.6 e 3.7 é mostrado a operação dos reatores R5S e R6S. O controle do pH foi realizado da mesma maneira que os reatores R3S e R4S.

Tabela 3.6- Condições operacionais do reator R5S (lodo de suínos).

Fases	Dias	TDH (h)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	1-40	14	5	8,5
2	41-97	12	5	10
3	98-125	10	5	12
4	126-160	8	5	15

Tabela 3.7- Condições operacionais do reator R6S (lodo de suínos).

Fases	Dias	TDH (h)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	1-40	6	3	12
2	41-97	6	5	20
3	98-125	6	7	28
4	126-160	6	10	40

3.5.3- Reatores operados com manipueira e glicose como substrato

Os reatores R1M e R2M foram operados por 51 dias, utilizando como substrato a mistura de 50% de glicose e 50% de manipueira bruta. A partida para estes reatores (fase 1) foi realizada com 100% de glicose e durou 24 dias, e após a estabilização do sistema foi introduzida a manipueira bruta (fase 2), e assim durante este período a operação dos reatores foi dividida em 2 fases. O TDH foi mantido em 8 horas (TCO de 15 kg DQO.m⁻³.d⁻¹), com concentração de 5 g DQO.L⁻¹, nas duas fases. O pH foi controlado com NaHCO₃ com uma faixa de 4-4,5 para o efluente, em todo tempo de operação (Tabela 3.8).

Tabela 3.8- Condições operacionais dos reatores R1M (lodo suíno) e R2M (lodo de aves).

Fases	Dias	% de glicose	% de manipueira	TDH (h)
1	1-24	100	0	8
2	25-51	50	50	8

Para se avaliar o efeito do TDH sobre a produção de hidrogênio, os reatores R3M e R4M foram operados por 146 dias de modo contínuo, divididos em cinco fases. Foi feita a redução de TDH de 10, 8, 6, 4 e 2 horas e consequente aumento da TCO de 12, 15, 20, 30 e 60 kgDQO.m⁻³ d⁻¹. Para estes reatores, a alimentação foi feita com 50% de água residuária sintética composta por glicose, e 50% da manipueira hidrolisada. Antes de ser utilizada no meio de alimentação, a manipueira foi submetida à hidrólise ácida, com ácido sulfúrico e aquecida a 120°C por 30 minutos. A faixa de DQO aplicada foi de 5 g DQO.L⁻¹, com um pH efluente de 3,5 a 4,0 controlado com NaOH.

Na Tabela 3.9 é mostrada as condições operacionais para o R3M e R4M. Na fase 1 o TDH foi de 10 h, e durou 31 dias. Na fase 2 (TDH 8 h) foi do dia 42 a 51. A fase 3 (TDH 6 h) foi do dia 51 a 92. A fase 4 (TDH 4h) foi do dia 93 a 113, e finalmente na fase 5 (TDH 2h) até o dia 146.

Tabela 3.9- Condições operacionais dos reatores R3M (lodo suíno) e R4M (lodo de aves).

Fases	Dias	TDH (h)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	1-31	10	12
2	32-50	8	15
3	51-92	6	20
4	93-113	4	30
5	114-146	2	60

3.5.4- Reatores operados com manipueira

A operação dos reatores R5M e R6M foram realizadas com o objetivo de se utilizar apenas a manipueira como fonte de carbono, e avaliar o efeito da concentração de substrato sobre a produção de hidrogênio. Ambos os reatores foram operados por 160 dias, porém a estratégia adotada para ambos os reatores foi realizada de maneira diferente, e é apresentada na Tabela 3.10 e Tabela 3.11 para os reatores R5M e R6M, respectivamente. Para estes reatores, o controle do pH efluente foi realizado pela adição de NaOH, mantido ente 4,5-5.

Para o reator R5M, a primeira fase durou 37 dias e o reator foi alimentado com 50% de glicose e 50% de manipueira hidrolisada, com uma concentração de 3 g.L⁻¹. Já para as fases 2, 3 e 4, foi utilizado apenas a manipueira hidrolisada como substrato, com uma concentração de 2, 3 e 5 g.L⁻¹, respectivamente. Para as fases de 1 a 4, foi aplicado um TDH de 12 horas. Apenas na ultima fase (fase 5), reduziu-se o TDH para 10 h, com uma concentração de 5 g.L⁻¹.

Tabela 3.10- Condições operacionais do reator R5M (lodo de suínos).

Fases	Dias	TDH (h)	Proporção de substratos utilizados	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	1-37	12	50% glicose e 50% manipueira	3	6
2	38- 73	12	100% manipueira	2	4
3	74-106	12	100% manipueira	3	6
4	107-130	12	100% manipueira	5	10
5	131-160	10	100% manipueira	5	12

Tabela 3.11- Condições operacionais do reator R6M (lodo de suíno).

Fases	Dias	TDH (h)	Proporção de substratos utilizados	Concentração de substrato (g DQO.L ⁻¹)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	1-37	12	50% glicose e 50% manipueira	15	30
2	38- 73	12	50% glicose e 50% manipueira	7	14
3	74- 111	12	100% manipueira	7	14
4	112-139	12	100% manipueira	9	18
5	140-160	10	100% manipueira	9	22

Com uma estratégia diferente, o reator R6M iniciou sua operação com uma elevada concentração, de 15 g.L⁻¹ na fase 1, utilizando 50% de glicose e 50% de manipueira hidrolisada. Na fase 2, ainda utilizando a mesma mistura de substrato, foi feita uma redução da concentração de alimentação para 7 g.L⁻¹. Para as fases 3 e 4, foi utilizado apenas a manipueira hidrolisada como substrato, com concentrações de 7 e 9 g.L⁻¹, respectivamente. Para as fases de 1 a 4, foi aplicado um TDH de 12 horas. Apenas na última fase (fase 5), reduziu-se o TDH para 10 h, com uma concentração de 9 g.L⁻¹.

3.6- Avaliação da comunidade microbiana por técnica de biologia molecular

No fim de algumas fermentações, foram retiradas amostras da biomassa para se realizar a análise da comunidade microbiana a partir da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). As amostras foram coletadas dos reatores R3S e R4S, nos TDH de 4, 2 e 1h e também para os reatores R3M e R4M, nos TDH de 6, 4 e 2 h. O sequenciamento e identificação dos microrganismos foram realizados a partir das amostras do R4S (lodo de aves) com um TDH aplicado de 1 hora, e do R3M (lodo suíno) com o TDH de 2 h para o domínio Bactéria e Archaea.

O DNA foi extraído pela lise celular com glass beads (Sigma), fenol tamponado com Tris e clorofórmio de acordo com o protocolo de Griffiths et al. (2000). O fragmento de RNAr 16S foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando o primer 968FGC-1401R (Nubel et al., 1996) para o domínio bactéria e primers Parch519f–Arch915r (Vissers et al. 2009) para o domínio archaea na comparação da comunidade microbiana pela técnica de DGGE.

O DGGE foi preparado com gradiente desnaturante nas concentrações de 45 e 65% para a comparação entre a comunidade bacteriana e archaea das amostras, em 75 V e 60 °C por 16 horas, durante a eletroforese. Para se revelar o perfil das bandas, foi utilizado um EagleEye™ III (Stratagene), com comprimento de onda UV de 254 nm ligado a um computador e software vista de Eagle. A partir do perfil de bandas foi analisado o coeficiente de similaridade pelo software BioNumerics versão 2.5.

Na clonagem e sequenciamento foram utilizados os primers específicos 27F-1100R e de 21F-Arch958R (Vissers et al. 2009) para se detectar a população bacteriana e archaea, respectivamente. Os produtos de PCR purificados foram clonados em plasmídeos pGEMEasy Vector System I, de acordo com as especificações do fabricante. O sequenciamento dos oligos foram realizados pela Macrogen (<http://www.macrogen.com>). Todas as sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) utilizando-se a ferramenta Complete linkage clustering. Posteriormente, usando a ferramenta Dereplicate request foram determinadas as sequências representativas de cada UTO, e estas sequências foram comparadas com o Banco de Dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RDP (<http://pyro.cme.msu.edu>).

A árvore filogenética foi construída com auxílio do software MEGA versão 5 usando o método Neighbor-Joining. A confiabilidade da árvore foi avaliada pelo teste e *bootstrap* para 1000 repetições.

3.7- Análises físico-químicas

As análises de pH, DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram feitas de acordo com o APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012). A determinação dos carboidratos foi determinada pelo método colorimétrico (Dubois et al., 1956).

A determinação de ácidos e álcoois foram feitas por cromatografia líquida (HPLC Shimadzu) equipado com uma bomba (LC-10ADVP), auto amostrador (SIL-20A HT), forno

de coluna (CTO-20A) a 43°C, detector de índice de refração (RID-10A), controlador de sistema (SCL-10AVP) e uma coluna HPX-87H Aminex (300 milímetros, 7,8 milímetros, BioRad). A fase móvel consistiu de H₂SO₄ (0,01 N) a 0,5 ml min⁻¹.

A determinação do gás hidrogênio foi efetuada por meio da retirada de 0,1 mL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa “gastight” com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm) e detector de condutividade térmica, e o gás de arraste foi o argônio sob fluxo de 21,9 cm.s⁻¹. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram de 30°C, 200°C e 230°C, respectivamente. A produção volumétrica de hidrogênio foi medida por meio do MilliGas-counter Ritter[®] (Tipo: MGC-1).

Foram realizadas coletas semanais de amostras do afluente, efluente e saída de gás do reator durante a etapa experimental. O desempenho deste reator foi avaliado e a produção de H₂ e ácidos graxos voláteis foram os principais parâmetros avaliados no desempenho dos reatores.

3.8-Cálculo dos principais parâmetros

De acordo com os resultados obtidos nas análises previamente descritas, utilizou-se o Microsoft Excel[®] para os cálculos da Equação 3.1 a Equação 3.8, valores médios e desvio padrão. Cada equação está apresentada com as respectivas unidades de medida.

- Vazão de biogás produzido no reator (Q_g):

$$Q_g (mL. h^{-1}) = \frac{v_m}{t} \quad 3.1$$

Na qual, v_m é o volume de gás obtido no medidor, t é o intervalo de tempo.

- Produção volumétrica de hidrogênio (PVH):

$$PVH (L. d^{-1}. L^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%H_2}{V} \quad 3.2$$

Na qual a porcentagem de hidrogênio (%H₂) é dada pela medida no cromatógrafo, e V é o volume útil do reator.

- Produção volumétrica de metano (PVM):

$$PVM (L. d^{-1}.L^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%CH_4}{V} \quad 3.3$$

Na qual a porcentagem de metano (%CH₄) é dada pela medida no cromatógrafo, e V é o volume útil do reator.

- Taxa de carregamento orgânico real (TCO real):

$$TCO_{real} (kg. m^{-3}. d^{-1}) = \frac{DQO_A}{TDH_{real}} \quad 3.4$$

Na qual a DQO_A é a demanda química de oxigênio do afluente.

- Rendimento de hidrogênio (HY):

$$HY (molH_2. mol^{-1}carboidrato) = \frac{n_{H_2}}{n_{C_s}} \quad 3.5$$

Na qual a n_{H₂} é o numero de moles de H₂ produzido, e n_{C_s} é o número de moles de carboidrato consumido.

- Rendimento de hidrogênio (HY):

$$HY (mmol. g^{-1}DQO) = \frac{PVH}{TCO_{real} \cdot V_g} \quad 3.6$$

Na qual V_g é o volume de gás ocupado por n numero de mol, a temperatura T, e pressão P.

- Rendimento de etanol (EtOHY):

$$EtOHY(mol. mol^{-1}carboidrato) = \frac{n_{EtOH}}{n_{C_s}} \quad 3.7$$

Na qual n_{EtOH} é o número de moles de etanol produzido.

- Rendimento de etanol (EtOHY):

$$EtOHY(mm\text{ol. } g^{-1}DQO) = \frac{M_{EtOH}}{TCO_{real} \cdot TDH_{real}} \quad 3.8$$

Na qual M_{EtOH} é a concentração molar de etanol produzido.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Conversões de carboidratos

4.1.1 Reatores com soro de queijo e glicose: R1S e R2S

Os reatores anaeróbios de leite fluidizado R1S e R2S foram operados por 110 dias e, durante esse período, a produção de hidrogênio, ácidos orgânicos e solventes foi avaliada à medida que se era introduzido o soro de queijo ao meio de alimentação. Para estes reatores foi avaliado o efeito da adição de um co-substrato, com um TDH de 6 horas. Conforme o sistema alcançava o estado estacionário definido como a estabilidade na conversão da glicose e formação dos produtos desejados no reator, foi feita a introdução de soro de queijo no meio de alimentação.

Na Figura 4.1 são apresentadas as variações de concentrações de carboidratos afluentes, efluente e conversão de carboidratos no reator R1S (lodo de suíno) e R2S (lodo de aves). Para o R1S, a menor conversão foi na fase 2 (33% de soro e 67% de glicose) e fase 1 (100% glicose) com médias de 83% sendo a conversão mais alta na fase 4 com 89% (100% soro de queijo) seguida da fase 3 (67% de soro de queijo e 33% de glicose) com 87%. A concentração de carboidratos afluente teve uma média de 4091, 3553, 3371 e 3115 mg.L⁻¹ e a do efluente médias de 677, 944, 459 e 359 mg.L⁻¹ para as fases 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Com o mesmo comportamento, o reator R2S teve a menor conversão na fase 2 com uma média de 83% sendo a conversão mais alta na fase 3 com 91% seguida da fase 4 com 89% e da fase 1 com 86%. A concentração de afluente foi idêntica ao reator R1S, pelo fato de se usar o mesmo meio de alimentação. Já a concentração efluente teve média de 464 mg.L⁻¹ durante todas as fases. Na comparação entre os reatores, que foram inoculados a partir de diferentes inóculos (lodo de suínos e lodo de aves), apresentaram valores semelhantes demonstrando altos valores de conversões de substrato.

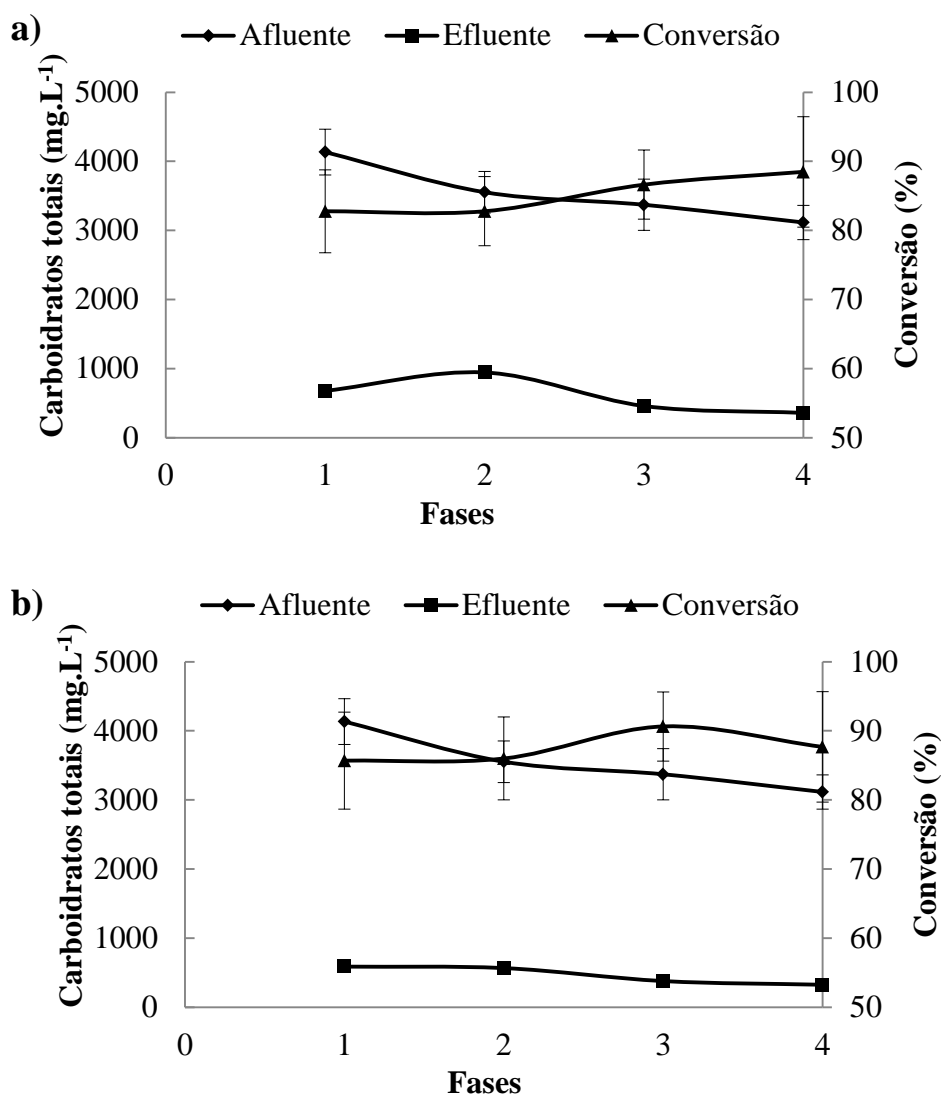


Figura 4.1 – Comportamento da concentração média de carboidratos afluente e efluente, e a conversão de carboidratos: a) reator R1S; b) reator R2S.

4.1.2 Reatores com soro de queijo: R3S, R4S, R5S e R6S

Para os reatores R3S e R4S, foi avaliado o efeito da do TDH aplicado de 6, 4, 2 e 1 h sobre a produção de hidrogênio. Na Figura 4.2 são apresentados o comportamento da concentração de afluente, efluente e conversão da lactose para estes reatores. No reator R3S, a conversão de substrato no TDH de 6 para 4 horas teve uma pequena queda de 96 para 93%. Embora com elevados valores de conversão de lactose, a aplicação do TDH de 2 horas demonstrou uma queda linear para o reator, chegando a 87% e para o TDH de 1 hora foi de 90%. A concentração de afluente teve uma média de 3137 mg.L⁻¹ e para o efluente teve médias 300 mg.L⁻¹ para todas as fases.

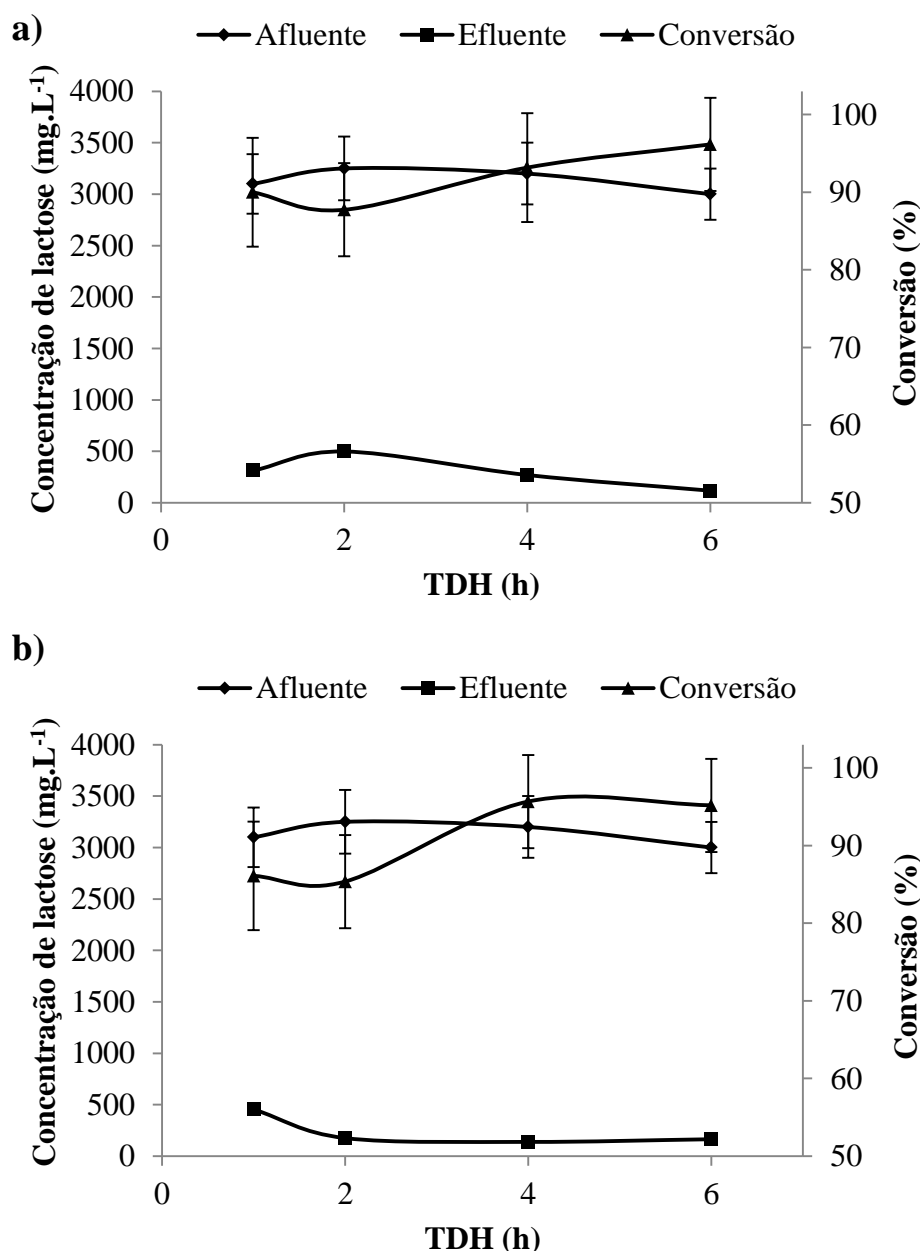


Figura 4.2 – Comportamento da concentração média de lactose afluente, efluente, e a conversão da lactose: a) reator R3S; b) reator R4S.

Para o R4S, a conversão de substrato foi de 96, 93, 87 e 90%, para os TDH de 6, 4, 2 e 1h, respectivamente. A concentração de afluente foi a mesma do reator R3S, pelo fato de se utilizar o mesmo meio de alimentação para ambos os reatores. Já a concentração efluente teve médias 233 mg.L⁻¹ para todas as fases.

Na Figura 4.3 é apresentado o comportamento da concentração de afluente, efluente e conversão da lactose para o reator R5S (lodo de suínos). Para este reator também foi avaliado o efeito do TDH aplicado reduzindo de 14 para 8 h. A conversão de lactose no TDH de 14 h

foi de 82 %, subindo para 92% para os demais TDHs. A concentração de afluente teve uma média de 3900 mg.L⁻¹ e a do concentração efluente médias 557 mg.L⁻¹ para todas as fases.

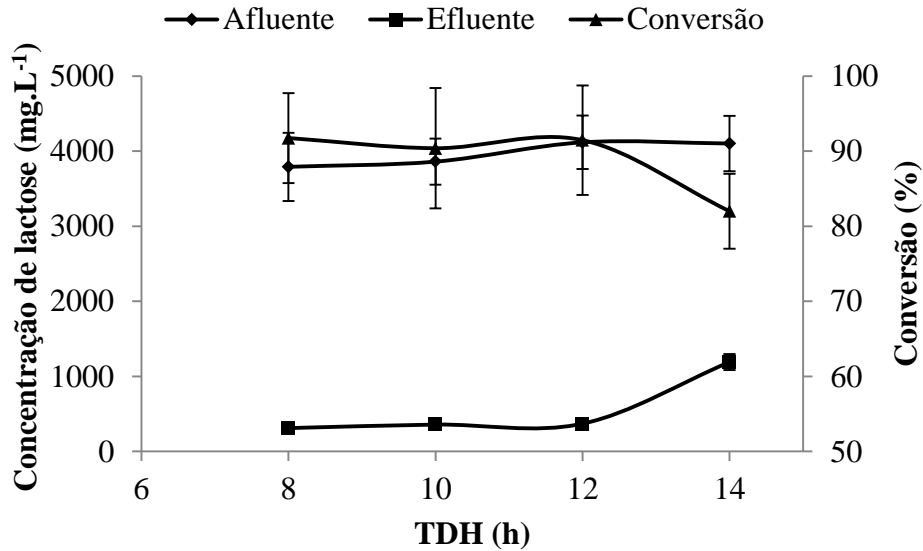


Figura 4.3 – Comportamento da concentração média de lactose afluente, efluente, e a conversão da lactose para o reator R5S.

Na Figura 4.4 é apresentado o comportamento da concentração de afluente, efluente e conversão da lactose para o reator R6S (lodo de suínos). Para este reator foi avaliado o efeito da concentração de substrato de alimentação, que foi variada a TCO de 12 a 40 kg.m⁻³.d⁻¹ de (Concentrações iniciais de DQO variando entre 3 a 10 g.L⁻¹), com um TDH fixo em 6 h. As maiores conversões de substratos de 91 e 88% foram obtidas as demais TCOs de 20 e 28 kg.m⁻³.d⁻¹, respectivamente, e para as TCOs de 12 e 40 kg.m⁻³.d⁻¹ foram obtidas conversões médias de 80%. As concentrações afluentes tiveram médias de 3500, 4200, 5300 e 7100 mg.L⁻¹ e as concentrações efluentes tiveram médias de 715, 385, 612 e 1293 mg.L⁻¹ para as TCOs de 12, 20, 28 e 40 kg.m⁻³.d⁻¹, respectivamente.

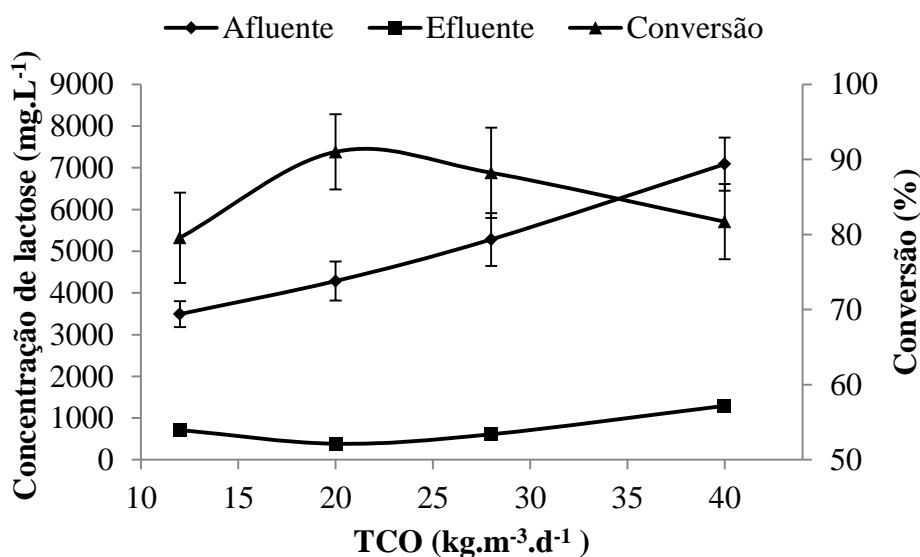


Figura 4.4 – Comportamento da concentração média de lactose afluyente, efluente, e a conversão da lactose para o reator R6S.

4.1.3 Reatores com manipueira bruta e glicose: R1M e R2M

Para os reatores R1M e R2M, foi avaliado e feito da adição da manipueira bruta ao meio de alimentação, com um TDH de 8 horas, durante os dias de operação. Na Figura 4.5 são apresentadas as variações de concentrações de carboidratos afluyente, efluente e conversão de carboidrato para o reator R1M (lodo de suínos) e R2M (lodo de aves). Para o reator R1M, a conversão se manteve estável e teve uma média de 91%. A concentração de afluyente teve uma média de 4016 mg.L⁻¹ e 3125 mg.L⁻¹, enquanto a concentração efluente teve média de 325 e 265 mg.L⁻¹ para a fase 1 (100% glicose) e fase 2 (50% glicose e 50% manipueira), respectivamente.

De maneira similar ao reator R1M, para o reator R2M a conversão se manteve estável durante todos os dias de operação, tendo uma média de 89%. A concentração de afluyente foram as mesmas do reator R1M, pelo fato de se usar o mesmo meio de alimentação e as concentrações de efluente foram 399,4 e 274,9 mg.L⁻¹ para as fases 1 e 2, respectivamente. Os reatores tiveram praticamente as mesmas conversões, de 91 e 89% para o R1M e R2M, respectivamente. Mesmo com a introdução de manipueira, a conversão se manteve estável nos dois reatores.

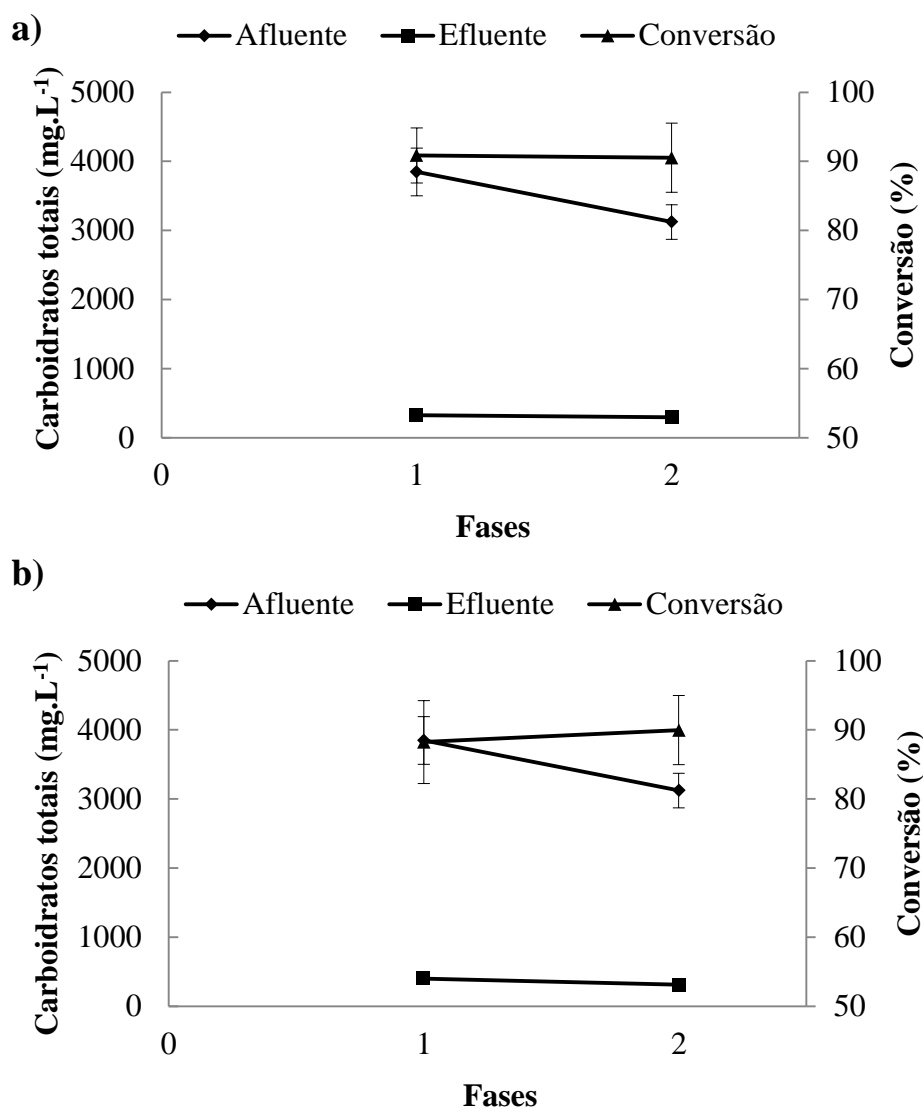


Figura 4.5 – Comportamento da concentração média de carboidratos afluyente, efluente, e a conversão de carboidratos: a) reator R1M; b) reator R2M.

4.1.4 Reatores com manipeira hidrolisada e glicose: R3M e R4M

Para os reatores R3M e R4M, foi avaliado o efeito da redução do TDH de 10 para 2 h, sobre a produção de hidrogênio, utilizando uma mistura de 50% de glicose e 50% de manipeira hidrolisada. Na Figura 4.6 são apresentadas as variações de concentrações de carboidratos afluyente, efluente e conversão de carboidratos no reator R3M (lodo de suínos) e R4M (lodo de aves). Para o R3M, a conversão teve uma média de 95% em todas as fases, apresentando maiores eficiências de 99% para o TDH de 8 h, mas a conversão diminuiu para 90% com o TDH de 2h. A concentração de afluyente teve uma média de 3300 mg.L⁻¹ e o efluente teve uma média de 150 mg.L⁻¹ em todas as fases.

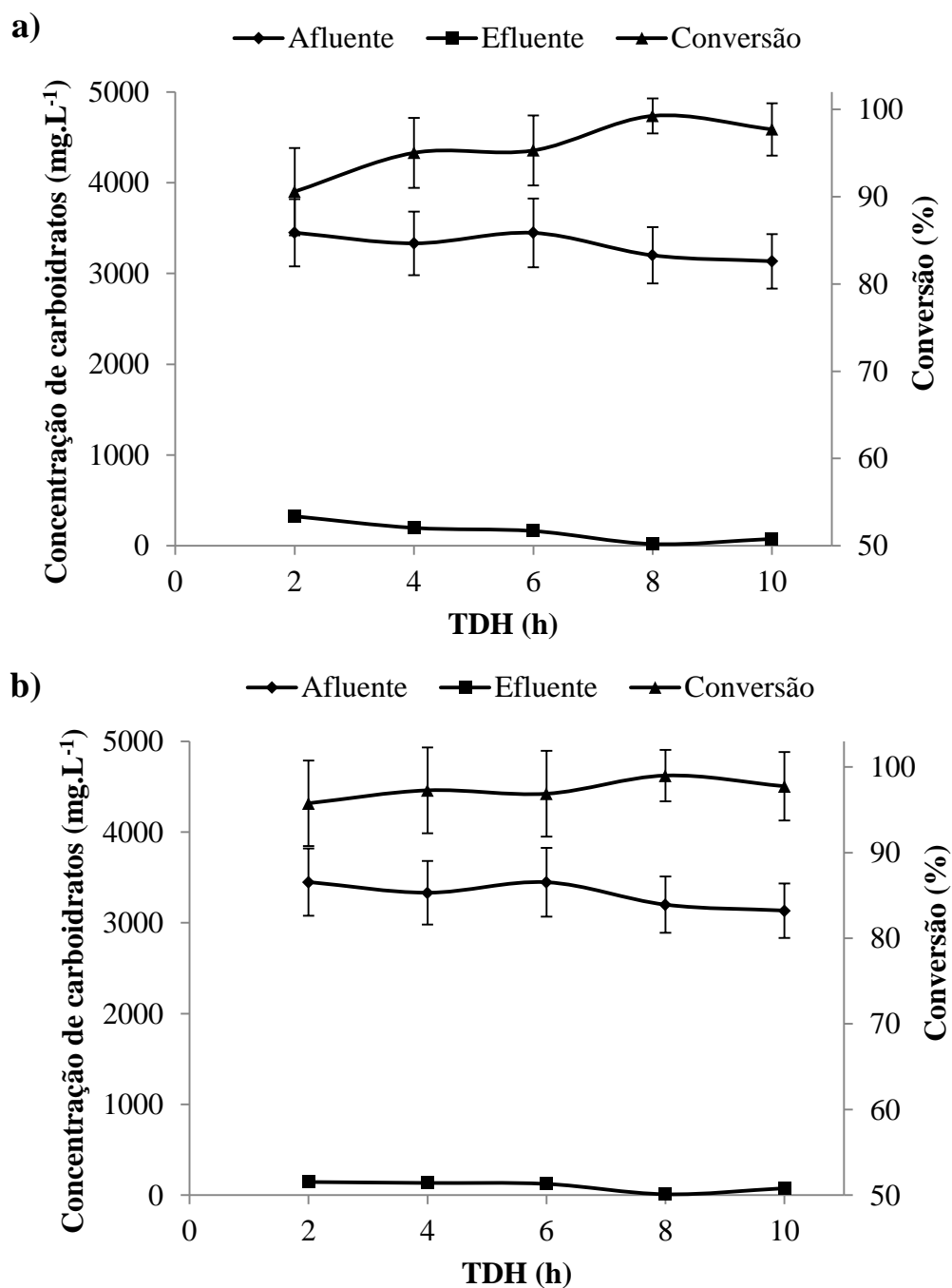


Figura 4.6 – Comportamento da concentração média de carboidratos afluyente, efluente, e a conversão de carboidratos: a) reator R3M; b) reator R4M.

Para o reator R4M a conversão se manteve estável com médias de 97%, sendo máxima no TDH de 8 horas (99%). As concentrações afluentes foram idênticas ao do R3M, e para as concentrações efluente tiveram médias de 97 mg.L⁻¹ para todas as fases.

4.1.5 Reatores com manipueira hidrolisada: R5M e R6M

Para os reatores R5M e R6M foi avaliado o efeito de diferentes TCOs sobre a produção de hidrogênio, sendo que antes da adição total da manipueira hidrolisada, foi realizada uma adaptação anterior com 50% de glicose e 50% de manipueira hidrolisada. Na Figura 4.7 são apresentadas as variações de concentrações de carboidratos afluente, efluente e conversão de carboidratos no reator R5M (lodo de suínos).

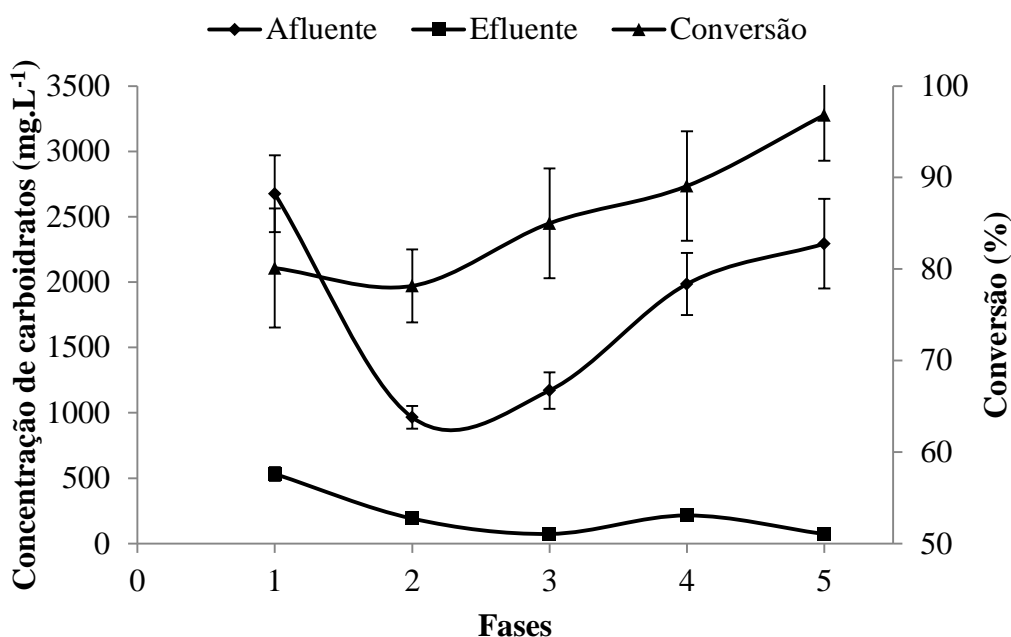


Figura 4.7 – Comportamento da concentração média de carboidratos afluente, efluente, e a conversão de carboidratos para o reator R5M.

Para este reator, a conversão de carboidratos variou de 80 a 97%, sendo máxima na fase 5 (TCO de 12 kg.m⁻³.d⁻¹). Para a concentração afluente, na fase 1 (50% de manipueira hidrolisada e 50% de glicose, TCO de 6 kg.m⁻³.d⁻¹) teve-se uma média de 2680 mg.L⁻¹, caindo para 970 mg.L⁻¹ na fase 2 (100% de manipueira hidrolisada, TCO de 4 kg.m⁻³.d⁻¹), devido a retirada da glicose do meio de alimentação e também da redução da concentração inicial de substrato de 3 para 2 g.L⁻¹. Para as fases de 3 a 5, com o uso exclusivo da manipueira hidrolisada como fonte de carbono, a concentração afluente aumentou de 1170 para 2300 mg.L⁻¹, de acordo com o aumento da TCO de 6 para 12 kg.m⁻³.d⁻¹. Já as concentrações efluentes variaram de 72 a 532 mg.L⁻¹ ao longo das fases.

Na Figura 4.8 são apresentadas as variações de concentrações de carboidratos afluente, efluente e conversão de carboidratos no reator R6M (lodo de suínos). Para este reator, a conversão de carboidratos variou de 82 a 94%, sendo máxima na fase 4 (TCO de $18 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$). Para a concentração afluente, na fase 1 (50% de manipueira hidrolisada e 50% de glicose, TCO de $30 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) teve-se uma média de 10820 mg.L^{-1} , caindo para 5770 mg.L^{-1} na fase 2 (50% de manipueira hidrolisada e 50% de glicose, TCO de $14 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), devido a redução da concentração inicial de substrato de 15 para 7 g.L^{-1} . Na fase 3 (100% de manipueira hidrolisada, TCO de $14 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), ainda foi verificada uma queda para 3100 mg.L^{-1} devido ao fato de se retirar totalmente a glicose do meio de alimentação. Para as demais fases, os valores de concentração de carboidratos afluentes foram semelhantes (5000 e 4750 mg.L^{-1}) pois foi utilizada a mesma concentração inicial de 9000 mg.L^{-1} , porém com TDHs de 12 e 10 h. Já as concentrações efluentes variaram de 320 a 1800 mg.L^{-1} ao longo das fases.

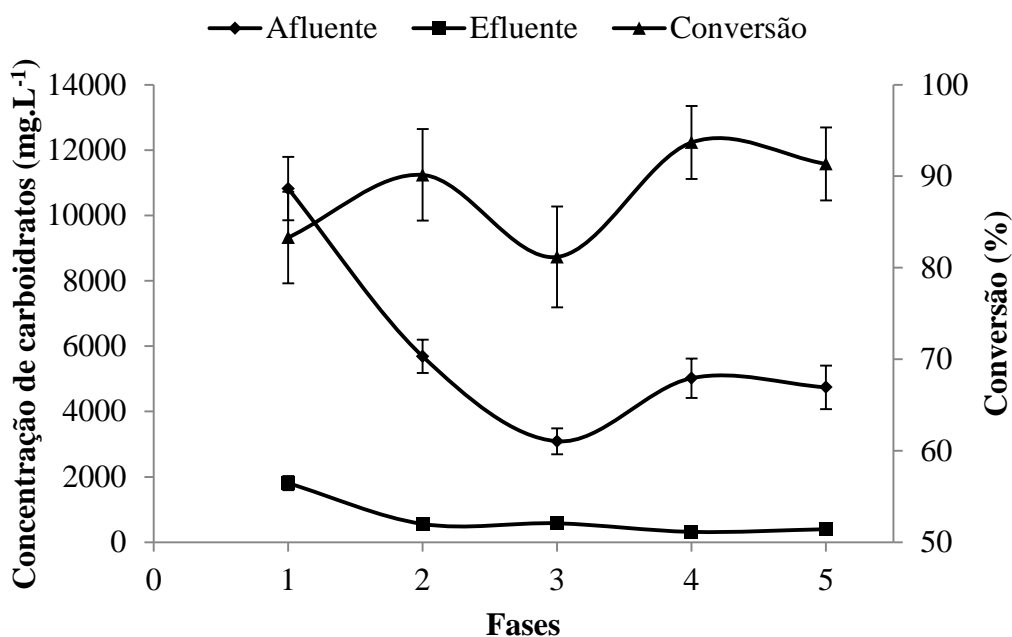


Figura 4.8 – Comportamento da concentração média de carboidratos afluente, efluente, e a conversão de carboidratos para o reator R6M.

4.1.6 Discussão sobre a conversão de carboidratos nos reatores

Pelos gráficos 4.1 a 4.8, observam-se as altas conversões de carboidratos, atribuídas aos baixos valores de verificados de concentração de carboidratos efluente. Estas conversões estão de acordo com outros estudos utilizando reator anaeróbico de leito fluidizado para

produção de hidrogênio (Barros e Silva, 2012; Shida et al., 2012; Wu et al., 2003; Zhang et al., 2007). Zhang et al. (2007) utilizando um reator RALF, com 10000 mg.L⁻¹ de concentração de glicose, obtiveram conversões de 99,5% a 71,4%, com a redução do TDH de 4 para 0,5 h. Barros (2009) apresentou uma eficiência semelhante (84%) utilizando o mesmo reator, com o mesmo material suporte deste trabalho, tendo como substrato a glicose. Já Shida et al. (2012) obtiveram conversões variando entre 79 a 99%, ao utilizarem glicose como substrato, com concentrações de 4000 mg.L⁻¹.

Essas constatações podem ser atribuídas aos elevados tempos de retenção celular devido ao sistema de crescimento aderido, o qual proporcionou maior acúmulo de biomassa no sistema.

4.2- Redução da demanda química de oxigênio

4.2.1 Reatores com soro de queijo e glicose: R1S e R2S

A DQO afluente, efluente e redução da DQO no reator R1S e R2S é mostrada na Figura 4.9. A concentração média afluente foi de 5025 mg.L⁻¹ para os dois reatores. Para o R1S, a média da concentração do efluente em todas as fases foi de 3245 mg.L⁻¹, tendo uma eficiência maior de 38% na fase 3 (67% de soro e 33% de glicose) . Para o reator R2S a média da concentração efluente em todas as fases foi 3368 mg.L⁻¹, tendo uma eficiência maior na fase 2 (67% de glicose e 33% de soro) com 42% de remoção.

O reator R2S, inoculado com lodo de aves, obteve resultados mais satisfatórios, quando comparados com o reator R1S, inoculado com lodo de suínos, atingindo 42% de eficiência e tendo uma média em todas as fases de 35%. Observa-se também que a menor remoção de DQO foi menor na fase 1, valores de 22 e 25%, onde se utilizava apenas a glicose como substrato.

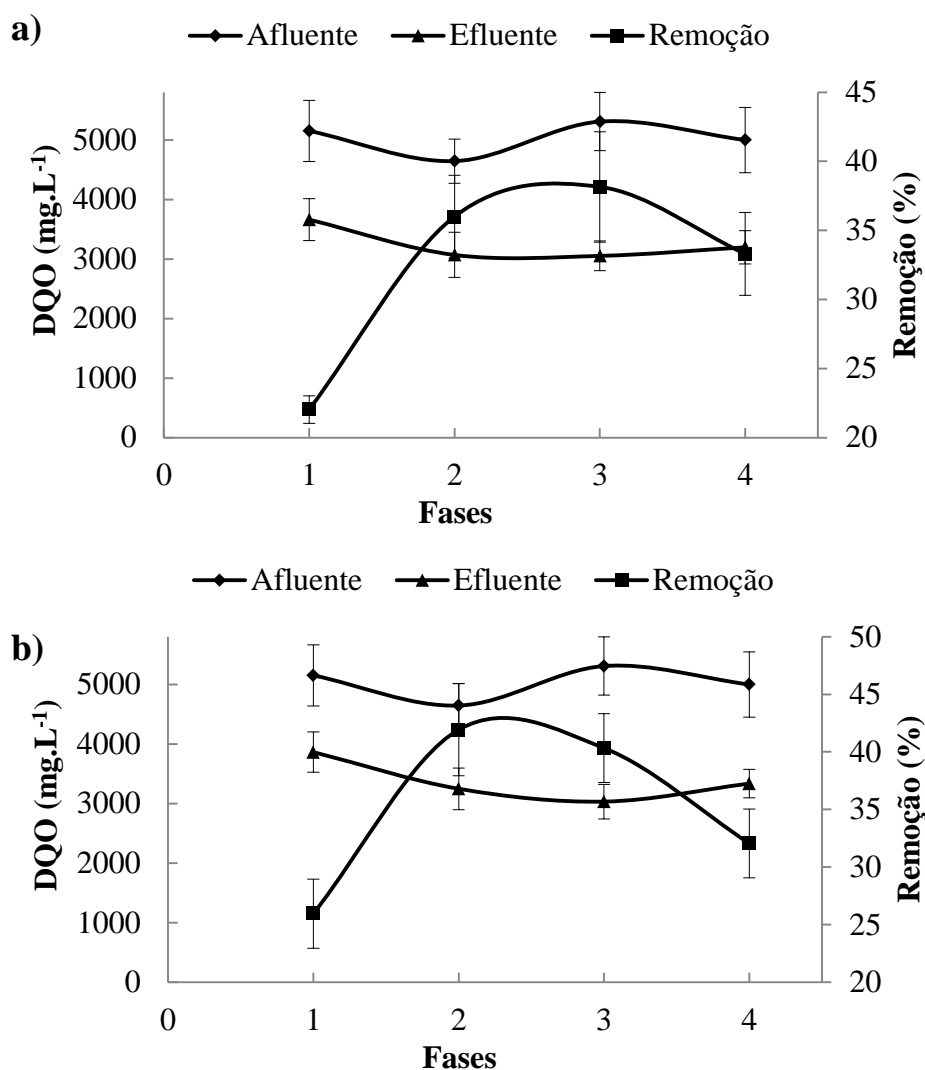


Figura 4.9- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção de DQO: a) reator R1S b) Reator R2S.

4.2.2 Reatores com soro de queijo: R3S, R4S, R5S e R6S

Na Figura 4.10 é apresentada a DQO afluente, efluente e redução da DQO nos reatores R3S e R4S. A concentração média de DQO afluente foi de 5118 mg.L⁻¹ para ambos os reatores. As médias de DQO efluentes foram de 3268 mg.L⁻¹ (R3S) e de 3155 mg.L⁻¹ (R4S). Para o R3S a máxima remoção foi de 38% no TDH de 1 hora, enquanto no R4S a máxima remoção foi de 38% no TDH de 6 horas. Ambos os reatores que utilizaram diferentes lodos tiveram boas remoções de 38%.

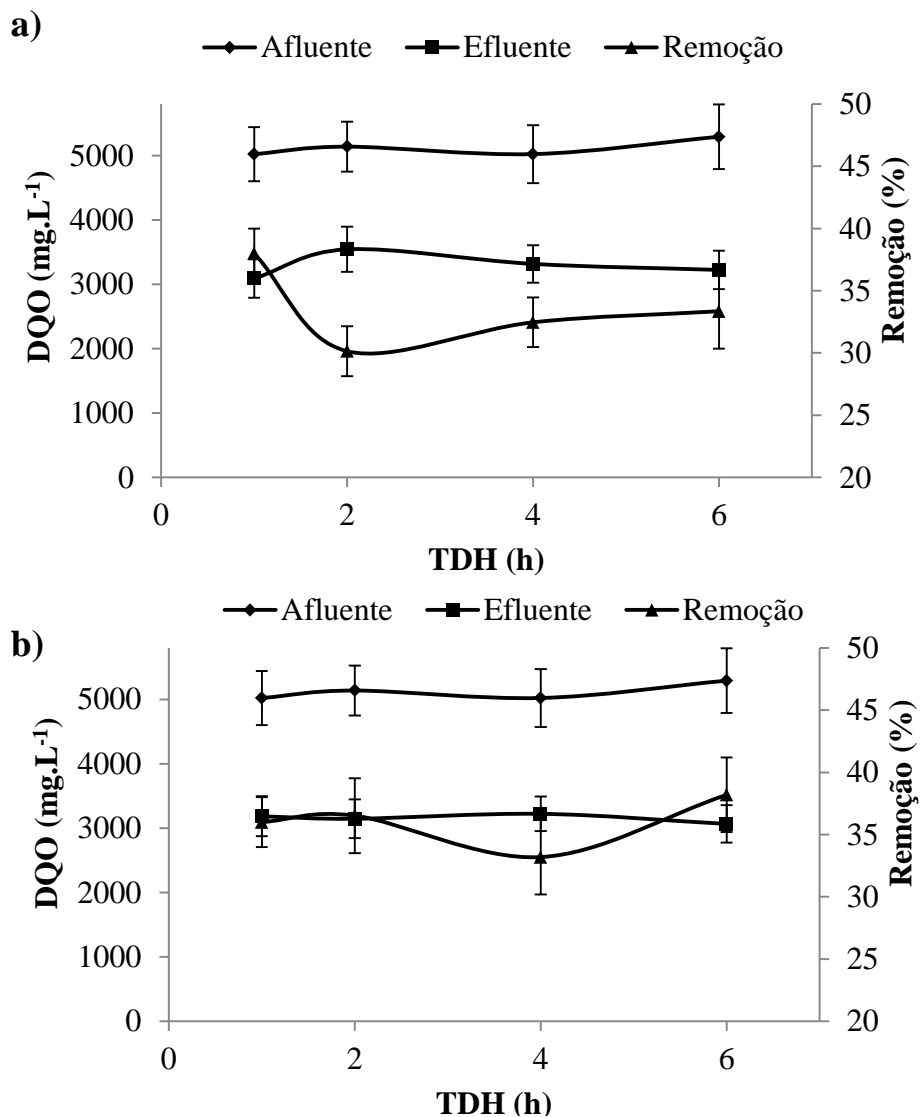


Figura 4.10- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção de DQO: a) reator R3S b) Reator R4S.

Na Figura 4.11 é apresentada a DQO afluente, efluente e redução da DQO no reator R5S. A concentração média de DQO afluente foi de 5065 mg.L⁻¹, enquanto as médias de DQO efluentes foram de 3800 mg.L⁻¹. Para este reator, a remoção de DQO variou de 18 a 35%, sendo máxima no menor TDH aplicado (8 h).

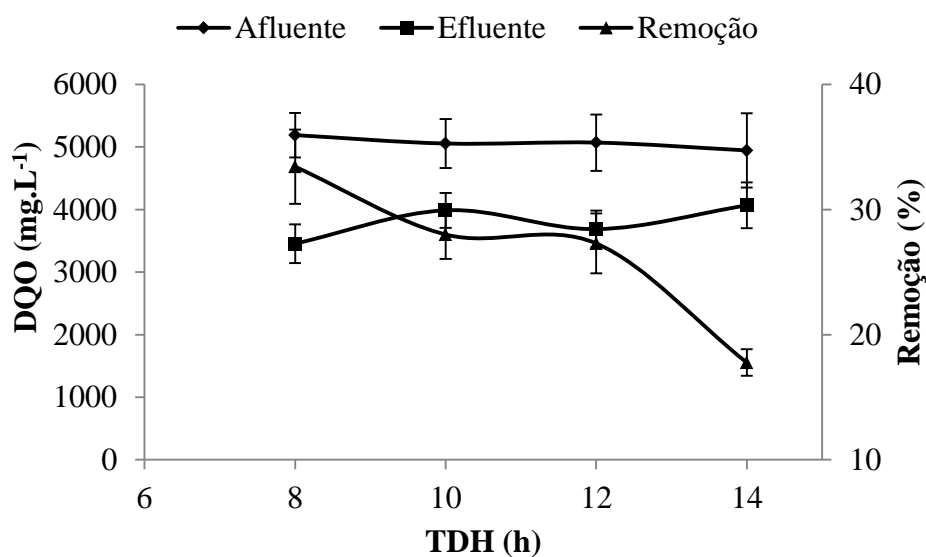


Figura 4.11- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R5S.

Na Figura 4.12 é apresentada a DQO afluente, efluente e redução da DQO no reator R6S. A concentração média de DQO afluente foram de 3210, 5060, 7100 e 10400 mg.L⁻¹, enquanto para a DQO efluente foram de 2460, 3910, 6000 e 6730 mg.L⁻¹, para as TCOs de 12, 20, 28 e 48 kg.m⁻³.d⁻¹, respectivamente. Para este reator, a remoção de DQO variou de 21 a 34%, sendo máxima na maior TCO aplicada (48 kg.m⁻³.d⁻¹).

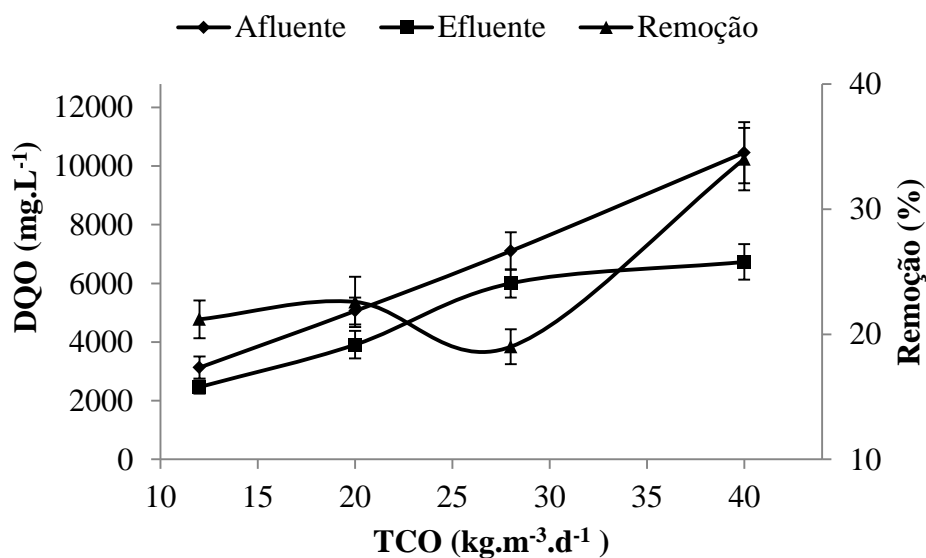


Figura 4.12- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R6S.

4.2.3 Reatores com glicose e manipueira bruta: R1M e R2M

A DQO afluente, efluente e redução da DQO nos reatores R1M e R2M estão mostradas na Figura 4.13. A média da concentração do afluente foi de 5231 mg.L⁻¹ para ambos os reatores. Já a DQO efluente teve médias de 3324 mg.L⁻¹ (R1M) e de 3500 mg.L⁻¹ (R2M). A eficiência foi 38%, nas duas fases para o R1M e de 39 e 35% nas fases 1 e 2, para o R2M. Observa-se que mesmo com a introdução da manipueira, a remoção de DQO se manteve estável.

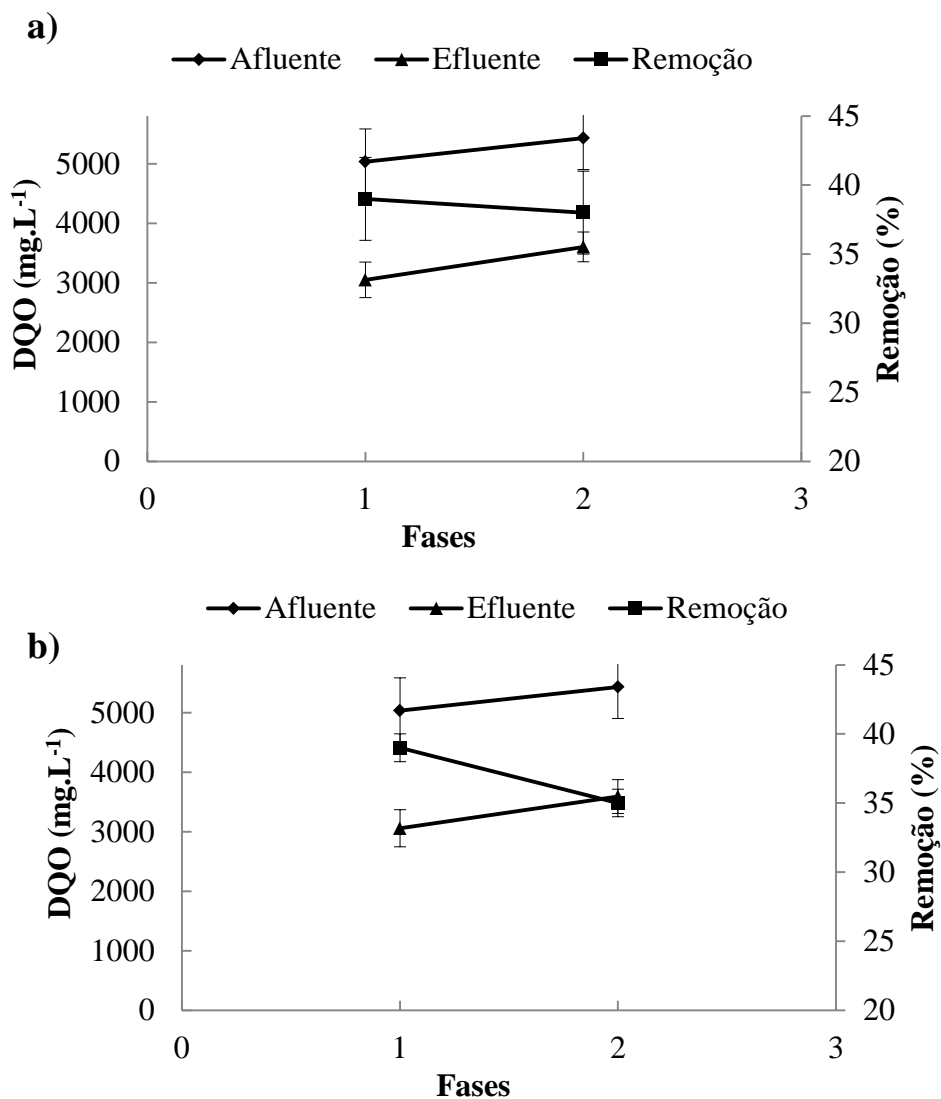


Figura 4.13- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção: a) reator R1M b) Reator R2M.

4.2.4 Reatores com glicose e manipueira hidrolisada: R3M e R4M

A DQO afluente, efluente e redução da DQO para os reatores R3M e R4M estão sendo mostrada na Figura 4.14. A média da concentração afluente foi de 5112 mg.L⁻¹ para os dois reatores. A DQO efluente teve valores médios de 3500 mg.L⁻¹ (R3M) e de 3266 mg.L⁻¹ (R4M) em todas as fases. A máxima eficiência foi de 46% no R3M com um TDH de 6 horas, e de 39% no R4M com um TDH de 10 horas.

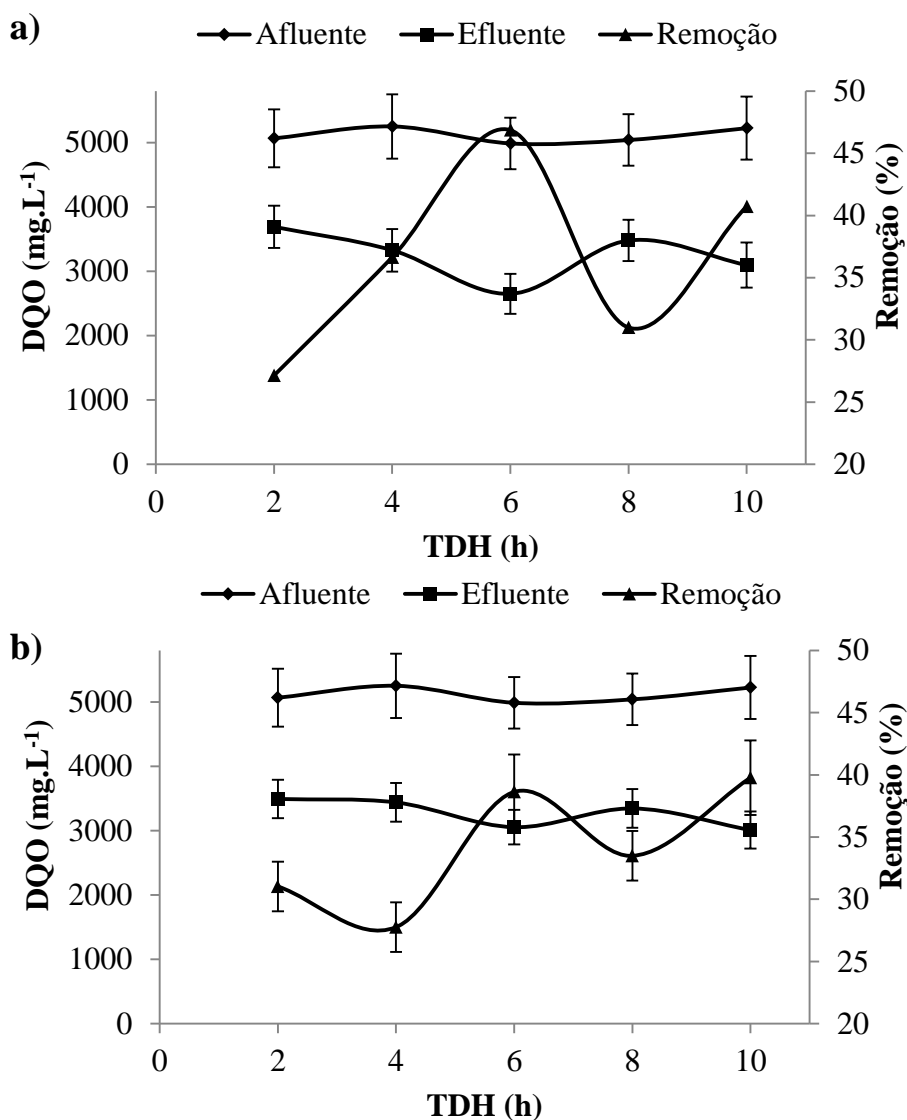


Figura 4.14- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção: a) reator R3M b) Reator R4M.

4.2.5 Reatores com manipueira hidrolisada: R5M e R6M

Na Figura 4.15 é apresentada a DQO afluente, efluente e redução da DQO para o reator R5M. A concentração média de DQO afluente foram de 3190, 2300, 3300, 5300 e 5110 mg.L^{-1} , enquanto para a DQO efluente foram de 2290, 2500, 2500, 4230 e 2814 mg.L^{-1} , para as fases de 1 a 5, respectivamente. Para este reator, a remoção de DQO variou de 20 a 45%, sendo máxima na fase 5 (TCO $12 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$).

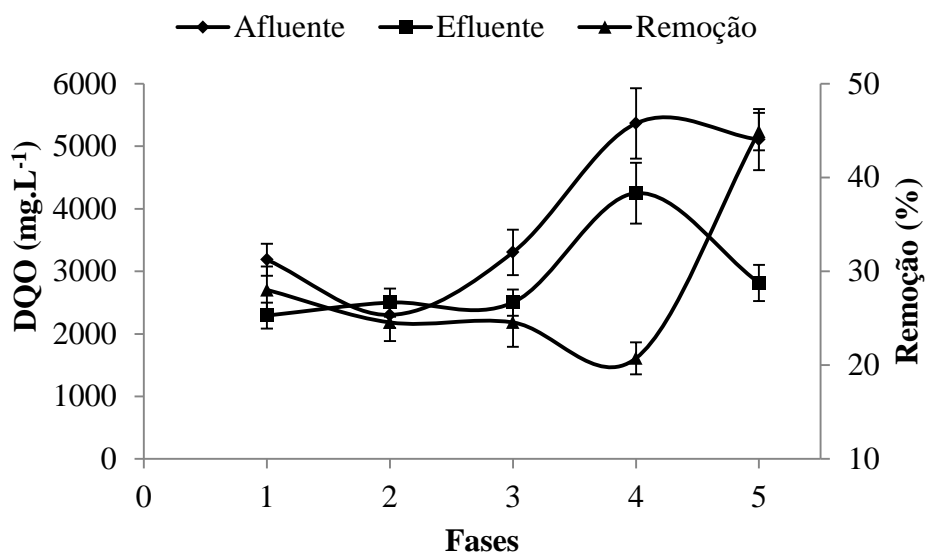


Figura 4.15- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R5M.

Na Figura 4.16 é apresentada a DQO afluente, efluente e redução da DQO para o reator R6M. A concentração média de DQO afluente foram de 15278, 7160, 7270, 9300 e 8960 mg.L^{-1} , enquanto para a DQO efluente foram de 8097, 5700, 5690, 8090 e 7740 mg.L^{-1} , para as fases de 1 a 5, respectivamente. Para este reator, a remoção de DQO variou de 12 a 49%, sendo máxima na fase 1, onde foi aplicada a maior TCO de $30 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

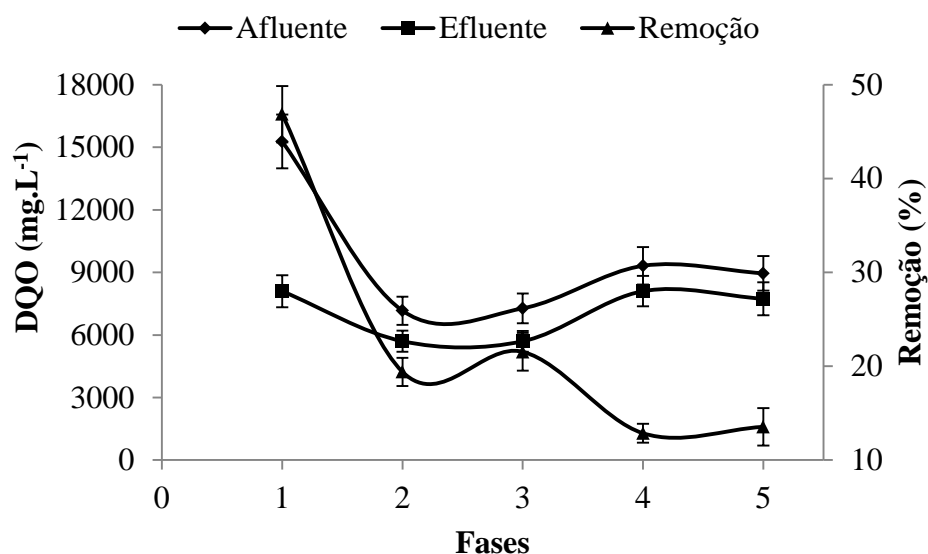


Figura 4.16- Concentração média de DQO afluente, efluente e remoção para o reator R6M.
4.2.6 Discussão sobre a remoção de DQO nos reatores

Os valores médios de remoção de DQO para reatores utilizados neste estudo variaram entre 35 a 49%. Em RALFS, Amorim (2009) teve valores de remoção de DQO inferiores aos deste trabalho, ao utilizar a glicose como substrato com uma concentração de 4000 mg.L⁻¹, resultando em remoções variando entre 15-20%. Já Reis (2010) ao fazer comparação de diferentes valores de velocidade de ascensão do fluido, tiveram valores de remoção de DQO de 24-30% para o reator com velocidade 1,88 cm.s⁻¹, também utilizando a glicose como substrato (5000 mg.L⁻¹).

Em outras configurações de reatores, mas utilizando águas residuárias reais, Perna (2011) operando um reator de leito fixo com soro de queijo obteve uma remoção de DQO de 16,5 % durante todos os dias de operação, resultados inferiores a este trabalho. Na Etapa 2, com uma carga de 24 g DQO/L.d, alcançou uma remoção máxima de 31,7 %, resultados similares a este trabalho. Já Azbar et al. (2009) tiveram uma eficiência média de 27% em um reator contínuo variando a carga de 21 a 47 g DQO.L⁻¹.d⁻¹.

Resultados similares aos reatores R3M e R4M, foram encontrados por Cappelletti et al. (2011) que analisaram o efeito da concentração inicial de substrato, na produção de hidrogênio, utilizando a manipueira como fonte de carbono. Os resultados mostraram uma remoção de 17 e 35% para concentrações iniciais de 30 e 15 g/L, respectivamente.

4.3- pH e Sólidos suspensos

Os valores médios de pH verificados nas amostras afluentes e efluentes de todos os reatores utilizados neste estudo, ao longo das fases operacionais estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Valores médios de pH afluente e efluente ao longo das fases operacionais

pH afluente e efluente					
Fases					
Reatores	1	2	3	4	5
R1S					
Afluente	6,5±0,5	6,8±0,4	6,6±0,4	6,9±0,5	-
Efluente	4,3±0,3	4,1±0,15	4,2±0,18	4,3±0,2	-
R2S					
Afluente	6,5±0,35	6,8±0,4	6,6±0,3	6,9±0,35	-
Efluente	4,2±0,18	4,1±0,15	4,3±0,20	4,4±0,15	-
R3S					
Afluente	6,7±0,4	6,8±0,3	6,6±0,35	6,8±0,25	-
Efluente	4,2±0,15	4,1±0,17	4,2±0,12	4,3±0,18	-
R4S					
Afluente	6,7±0,2	6,8±0,16	6,6±0,23	6,8±0,22	-
Efluente	4,1	4,1	4,0	4,2	-
R5S					
Afluente	5,5±0,4	5,8±0,5	5,9±0,44	6,1±0,35	-
Efluente	4,4	4,5	4,3	4,3	-
R6S					
Afluente	6,5±0,45	6,3±0,50	6,0±0,47	6,0±0,55	-
Efluente	4,5	4,2	4,0	4,1	-
R1M					
Afluente	7±0,5	6,5±0,55	-	-	-
Efluente	4,2±0,3	4,2±0,4	-	-	-
R2M					
Afluente	7±0,45	6,5±0,47	-	-	-
Efluente	4,1±0,33	4,2±0,45	-	-	-
R3M					
Afluente	4,8±0,35	4,4±0,33	4,6±0,4	4,7±0,44	4,9±0,35
Efluente	3,9±0,25	3,7±0,35	3,8±0,33	3,8±0,30	4±0,3
R4M					
Afluente	4,8±0,25	4,4±0,22	4,6±0,29	4,7±0,30	4,90±0,30
Efluente	4	3,9	3,9	3,7	4,1
R5M					
Afluente	4,0±0,5	4,2±0,45	4,8±0,47	5,3±0,44	5,1±0,42
Efluente	4,4±0,24	4,6±0,20	4,8±0,20	5,0±0,18	4,8±0,15
R6M					
Afluente	5,5±0,55	4,7±0,4	4,9±0,44	5,0±0,47	5,3±0,35
Efluente	4,1±0,24	4,8±0,22	5,1±0,20	4,9±0,29	5,1±0,19

Os valores de pH no afluente e no efluente mantiveram-se similares e constantes durante toda as fases operacionais nos reatores anaeróbio de leite fluidizado. Para os reatores R1S a R6S, o afluente teve valores médios entre 5,5 a 6,9, enquanto para o efluente os valores médios foram mantidos entre 4- 4,5.

Já para os reatores R1M e R2M, onde foi utilizada a manipueira bruta, os valores de pH afluentes tiveram valores médios de 6,5-7, enquanto para o efluente os valores médios foram mantidos entre 4-4,5. A partir da hidrólise da manipueira, para os demais reatores (R3M a R6M) os valores médios de pH afluente foram entre 4,2-5,5. Já para os valores de pH efluente, foram mantidos entre 3,5-4 para os reatores R3M e R4M, e entre 4,5-5 para os reatores R5M e R6M.

Na Tabela 4.2 são apresentados os valores médios de sólidos suspensos voláteis ao longo de todas as fases operacionais. Os sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores foram representados por sólidos suspensos voláteis (SSV). Para os reatores com soro de queijo (R1S a R6S), os SSV variaram de 183 a 864 mg.L⁻¹, e para os reatores que utilizaram manipueira (R1M a R6M), os SSV variaram entre 191 a 736 mg.L⁻¹.

Tabela 4.2 Valores médios de sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo das fases operacionais.

Reatores	SSV (mg.L ⁻¹)				
	Fases				
	1	2	3	4	5
R1S	250±20	321±19	324±24	316±23	-
R2S	183±12	312±24	334±29	348±29	-
R3S	391±34	383±31	490±44	450±36	-
R4S	365±31	484±36	440±35	414±31	-
R5S	378±31	477±35	671±55	594±43	-
R6S	270±35	462±40	729±82	864±91	-
R1M	191±14	326±29	-	-	-
R2M	276±22	290±31	-	-	-
R3M	402±36	340±33	332±25	366±29	464±38
R4M	298±25	284±21	243±16	303±23	276±19
R5M	228±19	282±22	243±15	394±41	346±32
R6M	736±55	584±38	480±44	428±36	525±46

4.4- Produção de hidrogênio e conteúdo de biogás

4.4.1- Reatores R1S e R2S: Efeito de diferentes proporções utilizadas entre os substratos sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás

Para estes reatores foi avaliado o efeito da adição da glicose como co-substrato e adição parcial de soro de queijo, com aplicação de TDH de 6 h. Na Figura 4.17 a-c é mostrado o comportamento do conteúdo de biogás, produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e rendimento de hidrogênio (HY) para os reatores R1S e R2S. Não foi detectado metano em nenhum dos reatores. Para o reator R1S (lodo suínos), na fermentação da glicose como fonte exclusiva de carbono (Fase 1), os valores médios foram 16,2% para o conteúdo de hidrogênio no biogás (H_2), $0,96 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$ para a produção volumétrica (PVH) e $0,2 \text{ mol } H_2.\text{mol}^{-1}$ glicose ($1,0 \text{ mmol } H_2.\text{g}^{-1} \text{ DQO}$) para o rendimento (HY). Para o reator R2S (lodo de aves), os valores de conteúdo de H_2 , PVH e HY foram de 26,2%, $1,92 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e $0,4 \text{ mol } H_2.\text{mol}^{-1}$ glicose ($1,7 \text{ mmol } H_2.\text{g}^{-1} \text{ DQO}$), respectivamente.

Para as demais fases, as modificações na proporção de glicose e de soro de queijo foram refletidas no conteúdo de hidrogênio no biogás para o R2S, tendo na fase 2 apenas 13% de H_2 . Esta queda de conteúdo de biogás resultou em uma diminuição de HY e PVH. Demonstrando uma correlação positiva, o aumento da porcentagem de soro de queijo nas demais fases na mistura forneceu 21 e 22% de H_2 no biogás. Já para o R1S o conteúdo de hidrogênio foi estável (16,2-18,5 %).

A PVH aumentou de 0,96 para $2,16 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (R1S) e 1,2 a $2,64 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (R2S) para as fases de 2 a 4. O HY também aumentou de acordo com o aumento de soro de queijo no meio de alimentação e o maior HY foi de $2,1 \text{ mmol } H_2.\text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R1S) e $2,2 \text{ mmol } H_2.\text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R2S) foram obtidos na fase 4.

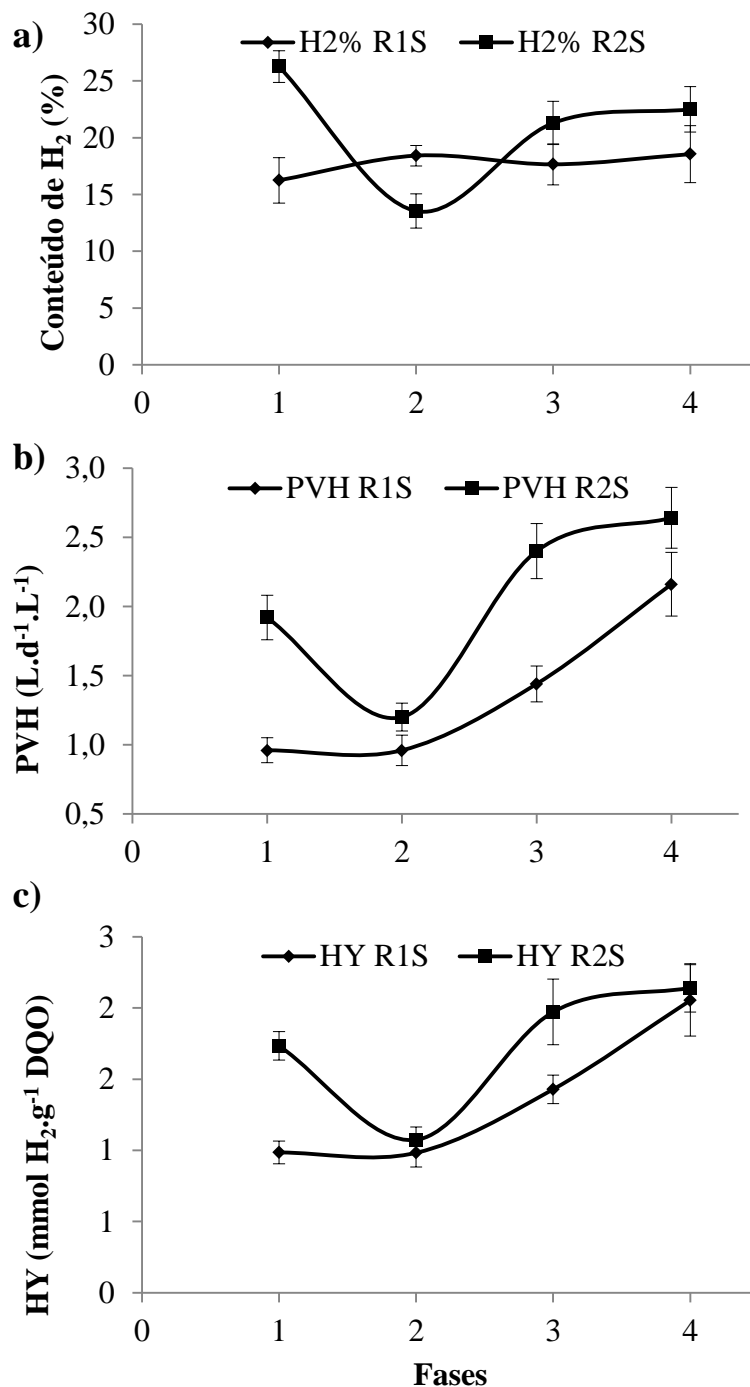


Figura 4.17- Comportamento da produção de H₂ para os reatores R1S e R2S: a) Conteúdo de hidrogênio no biogás; b) Produção volumétrica de hidrogênio; c) Rendimento de hidrogênio.

Na Tabela 4.3 são apresentados os valores médios do conteúdo de H₂, PVH e YH para os reatores R1S e R2S. Observa-se que a mudança nas proporções de soro de queijo, ao longo das fases, afetou o rendimento de hidrogênio. Na comparação entre os inóculos, o lodo proveniente de águas residuárias do abatedouro de aves (R2S) apresentou maior potencial

para a PVH (2,64 L.d⁻¹.L⁻¹) e também para o conteúdo de H₂ (26%). Ambos os reatores tiveram HY semelhantes.

Tabela 4.3- Valores médios de conteúdo de H₂, Produção volumétrica e rendimento de H₂ para os reatores R1S e R2S.

Fases	R1S (lodo de suínos)			R2S (lodo de aves)		
	H ₂ ^a (%)	PVH ^b (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^c (mmol.g ⁻¹ DQO)	H ₂ ^a (%)	PVH ^b (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^c (mmol.g ⁻¹ DQO)
1	16,3±1,4	0,96±0,09	1,0±0,08	26,2±2,0	1,92±0,16	1,7±0,10
2	18,4±1,5	0,96±0,11	1,0±0,1	13,5±0,9	1,20±0,10	1,1±0,09
3	17,6±1,9	1,44±0,13	1,5±0,1	21,3±1,8	2,40±0,20	2,0±0,23
4	18,5±2,0	2,16±0,23	2,1±0,25	22,4±2,5	2,64±0,22	2,2±0,17

^a conteúdo de H₂; ^b produção volumétrica de hidrogênio ; ^c rendimento de hidrogênio.

A estratégia de se iniciar a operação dos reatores com substratos mais simples como a glicose, também foi adotada por outros autores (Antonopoulou et al., 2010; Buitrón e Carvajal, 2010; Ding e Wang, 2008; Zhao et al., 2008). Os autores realizaram a substituição de glicose ou sacarose por substratos mais complexos, como a vinhaça. Neste trabalho, esta estratégia resultou em elevados HY na fase 4, apenas com soro de queijo, que indicam um favorecimento do crescimento microbiano frente as condições impostas neste trabalho, melhorando assim a adesão dos microrganismo ao material suporte no reator. Além disso, os resultados mostram que a produção de hidrogênio é dependente do tipo de inóculo utilizado e do tipo de substrato, assim como a proporção entre substratos.

A co-fermentação usando soro de queijo vem sendo estudada recentemente por Bertin et al. (2013) que utilizaram uma mistura de 50% de soro de queijo e 50% de esterco de galinha em um processo de duas fases obtiveram uma produção de hidrogênio de 0,1 L.d⁻¹.L⁻¹. Gelegenis et al. (2007) utilizaram varias diluições de esterco de galinha com soro de queijo em reatores CSTR e relataram que a adição de 40% de soro de queijo ao meio de alimentação foi favorável a produção de hidrogênio, tendo um aumento de 40% de produção de biogás quando comparada a fase sem soro de queijo.

Wang et al. (2011) afirmaram que a co-digestão anaeróbia favorece a produção de hidrogênio, resultando em uma relação de C/N mais equilibrada além de melhores condições de pH. Já Gioannis et al. (2013) afirmaram que a mistura de substratos é motivada pelo tratamento simultâneo de mais de um resíduo, pela diluição de compostos tóxicos ou inibitórios, melhoria nas condições de produção de hidrogênio e na relação de

carboidrato/proteína. Assim, alguns autores vêm utilizando misturas de substratos e verificam uma melhoria de produção de H₂ (Bertin et al., 2013; Manuel Rosales-Colunga et al., 2012; Mohan et al., 2007; Wang et al., 2011).

Mohan et al. (2007) aumentaram seu HY em duas vezes mais, quando adicionaram outros substratos (glicose ou esgoto) com a água residuária de produtos químicos, quando comparada com apenas a glicose como substrato, ao avaliarem o efeito da composição do substrato sobre a produção de hidrogênio.

No presente trabalho, foi observado que a mistura de substratos resultou em maiores HY quando comparado com apenas o uso da glicose como fonte individual de carbono. Na Tabela 4.4 são apresentados alguns trabalhos que utilizaram a glicose juntamente com outros substratos e tiveram o mesmo comportamento deste trabalho. A literatura relata o uso de processos bateladas utilizando glicose juntamente com a xilose (Hniman et al., 2011; Prakasham et al., 2009, Xu et al., 2010) e glicose com galactose (Rosales Colunga et al., 2012), mostrando que a diferença entre as proporções utilizadas entre os substratos afetou o rendimento de hidrogênio. Observa-se a dificuldade em estabelecer comparações de HY deste trabalho com outros estudos, devido as grandes diferenças nas unidades. Porém, mesmo com diferentes reatores e condições operacionais, os trabalhos apresentados tiveram o mesmo padrão de comportamento, mostrando que a mistura de fontes de carbono é preferida em comparação com a glicose.

A ausência de literatura avaliando o impacto da proporção mistura com soro de queijo sobre a produção de hidrogênio não permite a comparação dos resultados a partir da mistura destes substratos orgânicos. Além disso, os estudos encontrados na literatura são em modo de operação batelada. São encontrados estudos relacionados à mistura de substratos provenientes da utilização de materiais lignocelulósicos, que tem grande dificuldade de quebra em açúcares menores (Hniman et al., 2011; Prakasham et al., 2009). Assim como neste trabalho, a utilização da mistura de substratos também favoreceu a produção de hidrogênio, fato relatado por Prakasham et al. (2009) que investigam a relação de glicose e xilose como substratos na produção de hidrogênio. Quando adicionaram um co-substrato, observaram um aumento na produção de hidrogênio, tendo um máximo de 1900 mL H₂ com uma concentração de 5000 mg.L⁻¹ de substrato com 40% de glicose e 60% xilose.

Tabela 4.4 – Estudos comparativos na produção fermentativa de hidrogênio utilizando mistura de substratos.

Modo de operação	Produção de H ₂ A partir da glicose	Melhores proporcoes de mistura	Produção de H ₂ a partir da mistura	Referência
Batelada	1550 mL	40% Xilose 60% Glicose	1900 mL	Prakasham et al. (2009)
Batelada	9,37 mol.g ⁻¹ .h ⁻¹	67% xilose 33% Glicose	12,56 mol.g ⁻¹ .h ⁻¹	Xu et al., (2010)
Batelada	1190 mLH ₂ .L ⁻¹	50% Xilose 50% Glicose	1506 mLH ₂ .L ⁻¹	Hniman et al. (2011)
Batelada	0,3 mol H ₂ . mol ⁻¹ glicose	50% Glicose 50% Galactose	1,02 mol H ₂ . mol ⁻¹ hexose	Rosales Colunga et al. (2012)
Contínuo	1,0 mmolH ₂ .g ⁻¹ ¹ DQO	67% glicose 33% soro de queijo	1,5 mmolH ₂ .g ⁻¹ ¹ DQO	Este Estudo

Resultados semelhantes ao deste estudo Rosales-Colunga et al. (2012) avaliaram o efeito de diferentes açúcares sobre a produção de hidrogênio em processo bateladas, a partir de diferentes tipos de fermentações: glicose, lactose e uma mistura de glicose e galactose. Os resultados sugeriram que a produção de hidrogênio foi afetada pelo tipo de açúcar que foi utilizado. Por meio da utilização de glicose como substrato, alcançaram rendimento de 0,3 mol H₂. mol⁻¹ glicose e uma produção de 18,61 mL.L⁻¹.h⁻¹. Quando utilizaram a mistura de 50% de glicose e 50% de galactose, o rendimento aumentou para 1,02 mol H₂. mol⁻¹ hexose e produção para 24,45 mL.L⁻¹.h⁻¹.

Davila-Vazquez et al. (2008) relatam que a lactose seja um substrato preferencial quando comparado com a glicose. Estes autores relatam uma comparação de glicose e lactose, individualmente, em testes em bateladas, sendo que a lactose alcançou rendimentos 2,12 vezes superiores ao da glicose.

4.4.2- Reatores R3S, R4S e R5S: Efeito do TDH sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás.

Na Tabela 4.5 e na Figura 4.18 a-c é apresentado o efeito do TDH sobre a o conteúdo de biogás (Fig. 4.18 a) para o PVH (Fig. 4.18 b) e HY (Fig. 4.18 c) para os reatores R3S e R4S, utilizando apenas soro de queijo como substrato. O conteúdo de hidrogênio no biogás para o R3S mostrou-se mais estável mesmo com as mudanças no TDH, variando de 26 a 30% a partir da redução do TDH de 6 para 1h. Já para o R4S foi possível observar uma queda

acentuada na porcentagem de H₂ de 23 para 10% por meio da redução do TDH de 6 para 1 h. Para o TDH de 1 hora, houve o aparecimento de metano que foi produzido simultaneamente com o hidrogênio, com conteúdos de 16% (R1S) e 17% (R2S), mostrando que as archaea metanogênicas precisam de um maior tempo de adaptação, aparecendo com um tempo maior de operação (113 dias).

Tabela 4.5- Valores médios de conteúdo de H₂, Produção volumétrica de H₂ e CH₄ e rendimento de H₂ para os reatores R3S e R4S.

R3S (lodo suíno)					
TDH ^a (h)	H ₂ ^b (%)	PVH ^c (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	PVM ^d (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^e (mol.mol ⁻¹ lactose)	HY ^e (mmol.g ⁻¹ DQO)
6	28,2±2,2	2,88±0,6	0	1,2±0,18	2,0±0,28
4	27,2±2,5	5,52±0,9	0	1,3±0,19	2,5±0,34
2	30,0±2,9	9,12±0,9	0	1,1±0,16	1,8±0,27
1	26,9±2,0	17,76±1,5	11,28±1,4	1,0±0,15	1,8±0,21
R4S (lodo aves)					
6	23,2±1,9	2,88±0,37	0	1,1±0,13	1,9±0,19
4	27,9±2,2	5,28±0,89	0	1,2±0,18	2,2±0,33
2	19,8±1,5	7,20±1,0	0	0,8±0,12	1,3±0,20
1	9,9±1,1	12,00±1,44	16,32±1,9	0,4±0,08	1,0±0,14

^a tempo de detenção hidráulica, ^b conteúdo de H₂ no biogás; ^c produção volumétrica de H₂; ^d produção volumétrica de CH₄; ^e rendimento de hidrogênio.

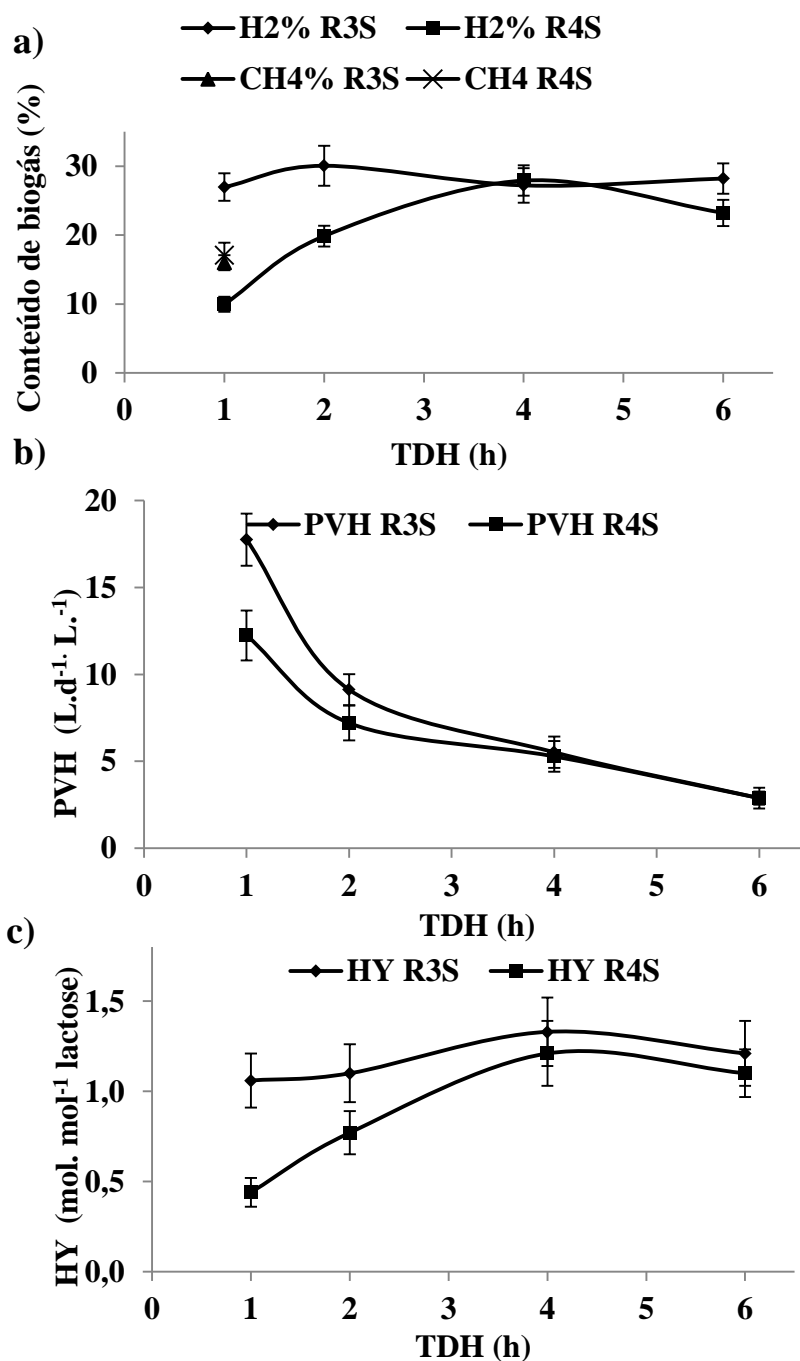


Figura 4.18- Comportamento da produção de H₂ para os reatores R3S e R4S: a) Conteúdo de hidrogênio; b) Produção volumétrica de hidrogênio; c) Rendimento de hidrogênio.

Já produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 2,88 para 17,76 L.d⁻¹.L⁻¹ (R3S) e de 2,88 para 12 L.d⁻¹.L⁻¹ (R4S), quando o TDH foi reduzido de 6 para 1 hora. O aumento do PVH com a redução de TDH já foi relatada em outros estudos a partir do uso do soro de queijo como substrato (Carrillo-Reyes et al., 2012; Davila-Vazquez et al., 2009).

Mesmo com o tratamento térmico do lodo, e as condições ácidas do reator, metano foi produzido concomitantemente com hidrogênio nos dois reatores, com aplicação de TDH de 1 h, resultando em produções de 11,28 LCH₄.d⁻¹.L⁻¹ (R3S) e 16,32 LCH₄.d⁻¹.L⁻¹ (R4S). Para o R3S estes valores foram inferiores as produções de hidrogênio, porém, este mesmo comportamento não foi verificado no R4S. As maiores produções de metano obtidas neste reator afetaram seu desempenho, tendo uma queda mais acentuada de HY.

Já os valores de HY para o R3S foram estáveis, variando de 1,0 para 1,2 molH₂.mol⁻¹ lactose a partir da redução do TDH de 6 para 1 hora. Porém, o reator R4S apresentou uma queda acentuada de HY, estes valores diminuíram para 1,1 mol.mol⁻¹ lactose para 0,4 molH₂.mol⁻¹ lactose. Na comparação entre os inóculos, o lodo proveniente de águas residuárias de suinocultura apresentaram um maior potencial para a produção de H₂, com os maiores valores de PVH e conteúdo de H₂. Ambos os reatores tiveram HY máximos semelhantes.

A fim de se obter maiores HY a partir do uso do soro de queijo como substrato, foi feita a escolha de um inoculo (lodo de suínos), e optou-se por trabalhar com maiores TDHs (14-8 h) para o reator R5S. Na Tabela 4.6 e na Figura 4.19 a-c é apresentado o efeito do TDH sobre a o conteúdo de biogás, para a PVH e HY para o reator R5S, utilizando apenas soro de queijo como substrato.

Tabela 4.6- Valores médios de conteúdo de H₂, Produção volumétrica de H₂ e CH₄ e rendimento de H₂ para o reator R5S.

TDH ^a (h)	H ₂ ^b (%)	CH ₄ ^c (%)	PVH ^d (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	PVM ^e (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^f (mol.mol ⁻¹ lactose)	HY ^f (mmol.g ⁻¹ ¹ DQO)
14	19±1,8	0	1,92±0,19	0	1,9±0,17	2,6±0,20
12	14±1,2	0	2,16±0,23	0	1,2±0,12	2,4±0,26
10	25±2,0	4±0,92	1,73±0,20	0,40±0,09	1,1±0,11	1,7±0,23
8	9±1,35	15±2,25	1,25±0,18	1,29±0,19	0,7±0,10	1,0±0,01

^a tempo de detenção hidráulica, ^b conteúdo de H₂ no biogás; ^c conteúdo de CH₄ no biogás; ^d produção volumétrica de H₂; ^e produção volumétrica de metano; ^frendimento de hidrogênio.

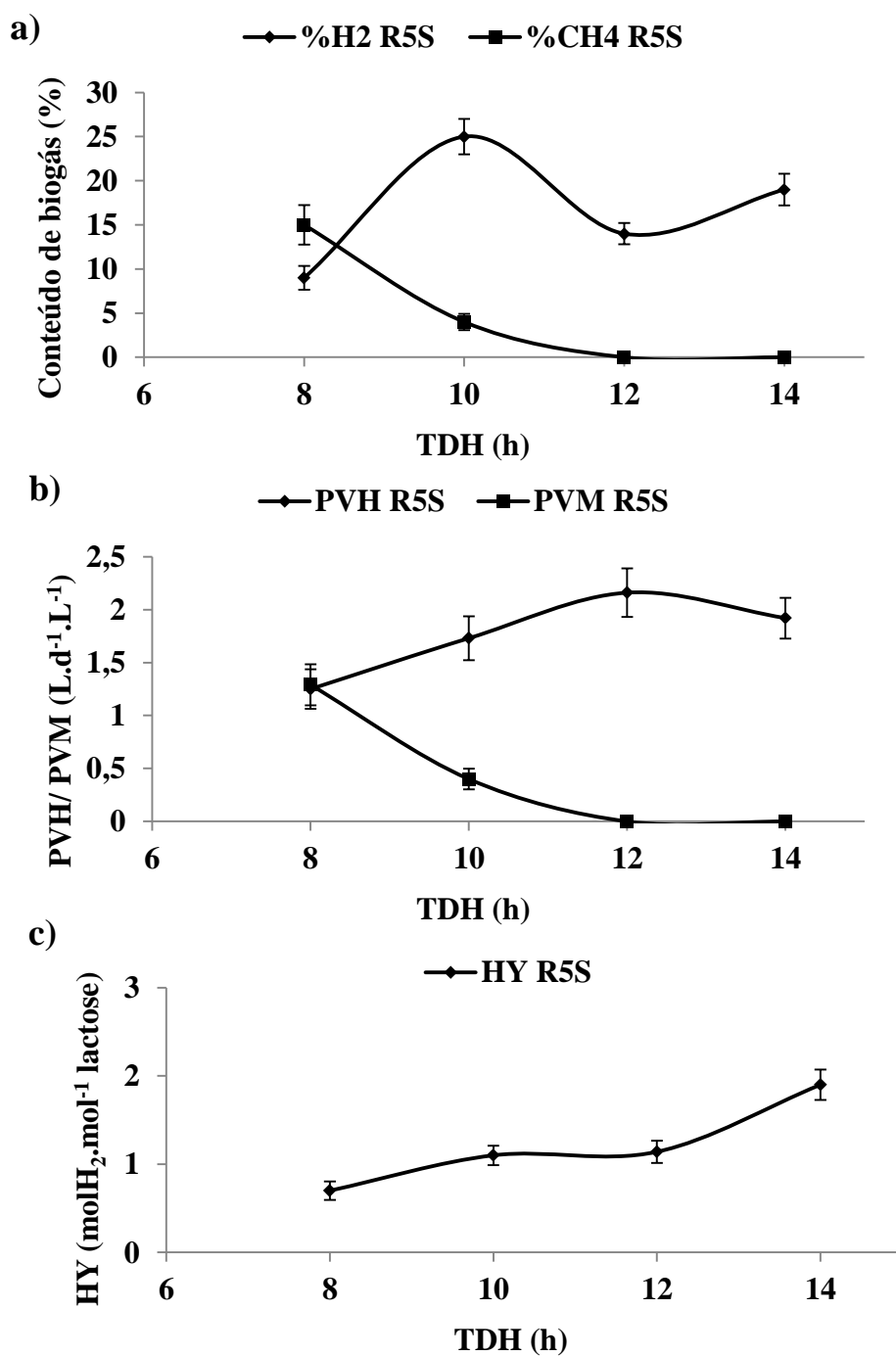


Figura 4.19- Comportamento da produção de H₂ para o reator R5S : a) Conteúdo de hidrogênio; b) Produção volumétrica de hidrogênio; c) Rendimento de hidrogênio.

A partir da redução do TDH de 14 para 10 h, o conteúdo de hidrogênio no biogás para o R5S aumentou de 19 para 25%, caindo para 9% com TDH de 8 h. Com o TDH de 10 e 8 h, também houve o aparecimento de metano, com conteúdos de 4% e 15%, respectivamente.

Já a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 1,92 para 2,16 L.d⁻¹.L⁻¹ quando o TDH foi reduzido de 14 para 12 h. O aparecimento do metano teve produções médias de

0,40 L.d⁻¹.L⁻¹ e 1,29 L.d⁻¹.L⁻¹ (TDHs de 10 e 8 h, respectivamente) resultou em uma queda de PVH de 1,76 L.d⁻¹.L⁻¹ (10h) e 1,25 L.d⁻¹.L⁻¹ (8 h).

Já os valores de HY para o R5S foram máximos de 1,9 molH₂.mol⁻¹ lactose no maior TDH aplicado de 14 h. A partir da redução do TDH de 14 para 8 h houve a queda de HY de 1,9 para 0,7 molH₂.mol⁻¹ lactose. Observa-se que a estratégia de aumentar o TDH para o reator R5S teve um efeito positivo, já que com isso foram obtidos maiores HY (1,9 molH₂.mol⁻¹ lactose) quando comparado com o reator R3S (1,3 molH₂.mol⁻¹ lactose) que teve TDHs variando entre 6 a 1 h, resultando em um aumento de 50% de HY.

Na Tabela 4.7 são apresentados alguns estudos na literatura, que tiveram a produção de metano em reatores acidogênicos, assim como neste trabalho, a partir do uso de diferentes substratos como a vinhaça (Buitron e Carvajal, 2010), tapioca (Thanwised et al., 2012); resíduos de alimentos (Kobayashi et al., 2012), materiais celulósicos (Kumar e Lin, 2013); e outros substratos. Percebe-se que já é frequente na literatura a produção concomitante de hidrogênio e metano em condições ácidas, a partir do uso do soro de queijo como substrato (Azbar et al., 2009; Carrillo-Reyes et al., 2012; Castello et al., 2009; Yang et al., 2007), mostrando que a metanogênese foi se adaptando as condições ácidas dos reatores. Muitos destes trabalhos confirmam que o tratamento térmico não é eficaz para se eliminar as metanogênicas presentes no inóculo, assim como foi observado neste trabalho (Buitron e Carvajal, 2010; Carrillo-Reyes et al., 2012; Chu et al., 2009; Zhu et al., 2008; Zhu et al., 2009).

A produção concomitante de hidrogênio e metano também foi relatada por Carrillo-Reyes et al. (2012), quando avaliaram diferentes estratégias operacionais e estruturas de inóculo, utilizando um reator UASB com soro de queijo como substrato. A partir da aplicação de uma carga de 20 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ e uma diminuição gradual de TDH de 24 para 6 horas, os autores verificaram a presença de metano, para seu mais curtos TDH aplicados (10, 6 e 4 h), assim como foi verificado neste trabalho. Além disso, verificaram uma queda de produção de H₂ de 0,72 para 0,36 LH₂.d⁻¹.L⁻¹ . Segundo os autores, o atraso na produção de metano deste reator, quando comparado aos demais reatores de seu estudo, foi devido a aplicação de altas concentrações de substrato. As máximas produções de metano de 0,5 L.d⁻¹.L⁻¹ foram obtidas nos reatores com aplicação de TDH de 6 horas e carga variando de 5 gDQO.L⁻¹ a 20 g DQO.L⁻¹.

Tabela 4.7 Estudos com reatores acidogênicos na produção fermentativa de hidrogênio e metano.

Modo de operação/Reator	Substrato	Produção/conteúdo de H ₂	Produção de CH ₄	Referências
Batelada	Materiais celulósicos	0,48 LH ₂ . d ⁻¹ . L ⁻¹	0,0071 L. d ⁻¹ . L ⁻¹	Kumar et al. (2013)
ABR ^a	Água residual de tapioca	3,7%	11%	Thanwised et al. (2012)
UASB ^b	Soro de queijo	1,0 LH ₂ . d ⁻¹ . L ⁻¹	0,5 L. d ⁻¹ . L ⁻¹	Carrillo-Reyes et al. (2012)
Batelada	Resíduos de alimentos	3,1% 0,4 (LH ₂ . d ⁻¹ . L ⁻¹)	19,6% 0,084 L. d ⁻¹ . L ⁻¹	Kobayashi et al. (2012)
UASB ^b	Soro de queijo	13% 0,14 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	10%	Perna (2011)
ASBR ^c	Vinhaça de tequila	18,48 LH ₂ . d ⁻¹ . L ⁻¹	44%	Buitron e Carvajal, (2010)
Fermentador semi- contínuo	Glicose e resíduos de suínos	12%	18%	Zhu et al. (2009)
UASB ^b	Soro de queijo	1%	15-20%	Castelló et al. (2009)
CSTR ^d	Soro de queijo	7%	31%	Azbar et al. (2009)
CSTR ^d	Glicose	50%	22%	Chu et al. (2009)
Batelada	Soro de queijo	3%	27-40%	Yang et al. (2007)
RALF ^e	Soro de queijo	17,76 LH ₂ . d ⁻¹ . L ⁻¹ 13,0 LH ₂ . d ⁻¹ . L ⁻¹	11,28 LCH ₄ .d ⁻¹ .L ⁻¹ 16,32 LCH ₄ .d ⁻¹ . L ⁻¹	Este estudo

^a reator anaeróbio; ^b reator anaeróbio de manta de lodo; ^c reator anaeróbio sequencial batelada; ^d tanque agitado e contínuo; ^e reator anaeróbio de leite fluidizado.

Perna (2011) avaliou o efeito da taxa de carregamento orgânico sobre a produção de hidrogênio em um reator UASB e em reator de leito fixo, obtendo uma máxima produção volumétrica de hidrogênio de 0,96 L.d⁻¹.L⁻¹ (com maior carga aplicada de 3,51 g.L⁻¹.d⁻¹), rendimento máximo de 0,93 mol.mol⁻¹ lactose e conteúdo de biogás máximo de 26,4% no reator de leito fixo. Já para o reator UASB a autora verificou dias pontuais de metano (10%) afetando o desempenho do reator. O valor máximo de produção foi de 0,72 L.h⁻¹.L⁻¹ (carga de 33,6 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), conteúdo de H₂ de 10,3% e rendimento de 0,71 mol.mol⁻¹ ocorreram na fase com uma carga de 30g.L⁻¹.d⁻¹.

Azbar et al. (2009) avaliaram o efeito do TDH (1, 2 e 3,5 dias), da taxa de carregamento orgânico (21, 35 e 47 g DQO.L⁻¹.d⁻¹) sobre a produção de hidrogênio usando

soro de queijo, em um reator CSTR. Ao fixarem o TDH em 24 horas, os autores fizeram uma redução de carga orgânica, sendo que na carga de 47 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ obtiveram os menores valores de H₂ (0,1 a 13,2 L.d⁻¹) devido a presença do metano (1,6-41,2%). O máximo rendimento foi de 22 mmol.g DQO⁻¹ com carga aplicada de 40 gDQO.d⁻¹, no maior TDH de 3,5 dias.

Castelló et al. (2009) utilizando o soro de queijo em reator UASB, relataram que as bactérias não foram lavadas do reator, a pH baixo (5,0). Durante a operação do reator, metano foi produzido no biogás (até 20%), e as células presentes no reator hibridizado, indicaram a presença de metanogênicas. Os autores tiveram conteúdo de hidrogênio máximo de 20 a 30%, com um TDH de 12 horas e uma carga de 20 gDQO.gSV⁻¹.d⁻¹.

Yang et al. (2007) estudaram a produção de hidrogênio, em fermentações contínuas, com uma variação de TDH (12, 18 e 24 h) e tiveram a melhor taxa de hidrogênio de 0,96 L.d⁻¹.L⁻¹no TDH de 24h. Os autores também detectaram a produção de metano com pH abaixo de 5 e explicam que parâmetros, tais como a taxa de carga orgânica ou a TDH deve ser controlado para produzir um seletivo “wash-out” das archaea metanogênicas.

Para estes reatores R3S e R4S, o TDH de 4 h foi as mais favorável para de obter os maiores HY. Wang et al., (2013a) mostraram que o TDH de 5 horas foi o mais favorável para a produção de hidrogênio utilizando a vinhaça como substrato em reatores CSTR. Ao avaliarem o efeito do TDH (10-4 h) sobre a produção de hidrogênio, encontraram a máxima PVH de 12,3 mmol.h⁻¹.L⁻¹, afirmando que em mais curtos TDH não há tempo suficiente para as bactérias produtoras de hidrogênio converterem o substrato

4.4.3- Reatores R6S, R5M e R6M: Efeito da TCO sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás.

O efeito da TCO sobre a produção de hidrogênio foi avaliada a partir do uso de soro de queijo (R6S) e manipueira (R5M e R6M) como substrato. Para o reator R6M foi feito um aumento de TCO de 12 para 40 kg.m⁻³.d⁻¹. Já para o reator R5M foi feita uma variação de TCO de 4 a 12 kg.m⁻³.d⁻¹, enquanto para o reator R6M foi feita uma variação de carga orgânica de 14 a 30 kg.m⁻³.d⁻¹. Na Tabela 4.8 e na Figura 4.20 a-c é apresentado o efeito da TCO sobre a o conteúdo de biogás, sobre a PVH e HY para o reator R6S.

Tabela 4.8- Valores médios de conteúdo de H₂ e CH₄, Produção volumétrica de H₂ e CH₄, e rendimento de H₂ para o reator R6S.

TCO ^a (Kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	H ₂ ^b (%)	CH ₄ ^c (%)	PVH ^d (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	PVM ^e (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^f (mol.mol ⁻¹ lactose)	HY ^f (mmol.g ⁻¹ DQO)
12	17±1,7	0	3,17±0,25	0	2,3±0,20	3,2±0,37
20	15±1,2	0	4,73±0,42	0	1,2±0,16	2,7±0,27
28	17±2,0	4±0,78	2,70±0,32	0,7±21	0,7±0,12	1,2±0,16
40	5±0,7	8±1,12	0,70±0,10	1±0,25	0,2±0,04	0,2±0,04

^a taxa de carregamento orgânico teórica; ^b conteúdo de H₂ no biogás; ^c conteúdo de CH₄ no biogás, ^d produção volumétrica de H₂; ^e produção volumétrica de CH₄; ^f rendimento de hidrogênio.

O conteúdo de hidrogênio no biogás foi estável (15-17%) de acordo com o aumento da TCO de 12 para 28 kg.m⁻³.d⁻¹, porém caiu para 5% com o aumento da TCO para 40 kg.m⁻³.d⁻¹. Para as TCOs de 28 e 40 kg.m⁻³.d⁻¹ foi verificada a presença de metano com 4 e 8%, respectivamente. Já para a PVH, o aumento da TCO de 12 para 20 resultou em um aumento de PVH de 3,17 para 4,73 L.d⁻¹.L⁻¹, porém caiu para 0,7 L.d⁻¹.L⁻¹ na TCO de 40 kg.m⁻³.d⁻¹ devido a PVM (1 L.d⁻¹.L⁻¹). Em relação ao HY, com o aumento de TCO de 12 para 40 kg.m⁻³.d⁻¹, houve uma queda de HY de 2,3 molH₂.mol⁻¹ lactose para 0,2 molH₂.mol⁻¹ lactose, mostrando que o aumento da TCO inibiu a produção de hidrogênio.

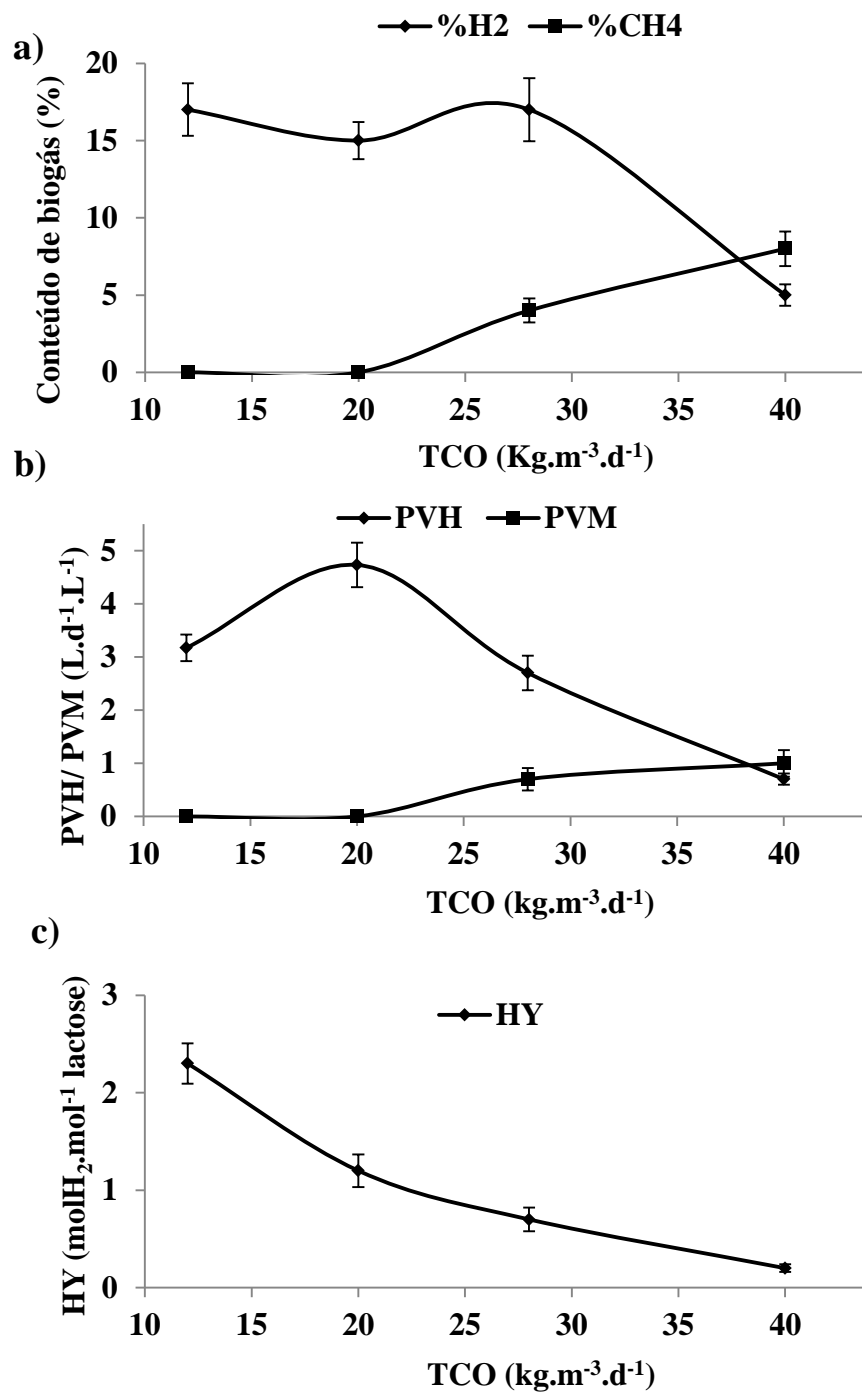


Figura 4.20- Comportamento da produção de H₂ para o reator R6S: a) Conteúdo de hidrogênio e metano; b) Produção volumétrica de hidrogênio e metano; c) Rendimento de hidrogênio.

Na Tabela 4.9 e na Figura 4.21 a-c é apresentado o efeito da TCO sobre a o conteúdo de biogás, para a produção volumétrica de hidrogênio (PVH), produção volumétrica de metano (PVM) e rendimento de hidrogênio (HY) para o reator R5M.

Tabela 4.9- Valores médios de conteúdo de H₂ e CH₄, Produção volumétrica de H₂ e CH₄, e rendimento de H₂ para o reator R5M.

Fases	TCO ^a real (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	H ₂ ^b (%)	CH ₄ ^c (%)	PVH ^d (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	PVM ^e (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^f (mmol.g ⁻¹ DQO)	HY ^f (mol.mol ⁻¹ glicose)
1	23	4±0,48	0	0,30±0,04	0	0,5±0,07	0,2±0,03
2	15	11±1,1	0	0,50±0,07	0	1,3±0,15	1,20±0,15
3	23	7±0,84	0	0,60±0,09	0	1,2±0,13	0,8±0,14
4	33	16±1,44	2±0,58	1,66±0,24	0,4±0,06	2,0±0,20	1,3±0,14
5	41	5±0,70	8±0,54	0,70±0,12	0,8±0,15	0,7±0,10	0,30±0,06

^a taxa de carregamento orgânico; ^b conteúdo de H₂ no biogás; ^c conteúdo de CH₄ no biogás, ^d produção volumétrica de H₂; ^e produção volumétrica de CH₄; ^f rendimento de hidrogênio.

O conteúdo de H₂ no biogás variou de 4-16%, sendo máxima na fase 4 (TCO de 10 kg.m⁻³.d⁻¹). Para as fases 4 e 5 foram encontrados metano no biogás com conteúdos de 2 e 8%, respectivamente. Já em relação à PVH, o aumento da TCO de 4 para 10 kg.m⁻³.d⁻¹ resultou em um aumento de PVH de 0,3 para 1,66 LH₂.d⁻¹.L⁻¹, caindo para 0,7 LH₂.d⁻¹.L⁻¹ na TCO de 12 kg.m⁻³.d⁻¹, devido ao aparecimento de metano (0,4 LCH₄.d⁻¹.L⁻¹).

A substituição total da glicose por manipueira hidrolisada teve um efeito positivo sobre o HY, aumentando de 0,5 para 1,3 mmol.g⁻¹DQO da fase 1 para a fase 2. A partir do uso exclusivo da manipueira como fonte de carbono, o máximo HY de 2,0 foi obtido na fase 4 (10 Kg.m⁻³.d⁻¹). Assim, a TCO de 10 kg.m⁻³.d⁻¹ foi considerada a TCO ótima, sendo possível se obter os maiores valores de HY e PVH a partir do uso da manipueira como substrato.

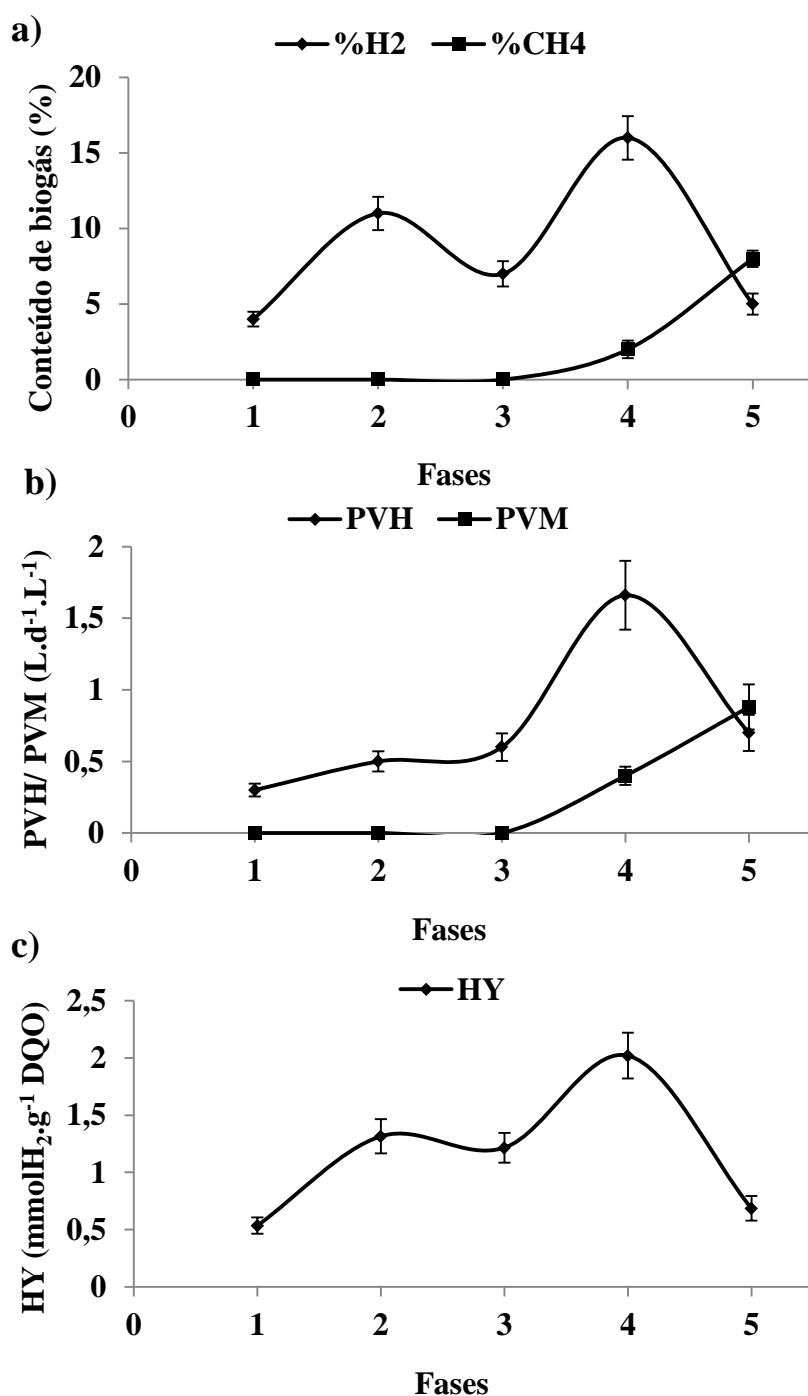


Figura 4.21- Comportamento da produção de H₂ para o reator R5M: a) Conteúdo de hidrogênio e metano; b) Produção volumétrica de hidrogênio e metano; c) Rendimento de hidrogênio.

Na Tabela 4.10 e na Figura 4.22 a-c é apresentado o efeito da TCO sobre a o conteúdo de biogás, PVH, PVM e HY para o reator R6M. O conteúdo de hidrogênio no biogás variou de 1 a 25%, sendo máximos na fase 2 (25%) e 3 (14%). Para as fases 4 e 5 foram encontrados

metano no biogás com conteúdos de 14 e 27%, respectivamente. Já em relação à PVH, a diminuição da TCO de 30 para 14 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (Fases 1 e 2 com 50% de glicose e 50% de manipueira) resultou em um aumento de 0,12 para 2,1 $\text{L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$. A partir do uso exclusivo de manipueira como substrato (Fase 3) O aumento da TCO resultou em uma queda de PVH de 1,1 para 0,03 $\text{LH}_2.\text{d}^{-1}.\text{L}^{-1}$, enquanto a PVM foi de 0,9 (fase 4) e 1,5 $\text{L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (fase 5). O máximo HY de 1,53 $\text{mmol.g}^{-1}\text{DQO}$ foi obtido na fase 2, onde se utilizava uma mistura de 50% de glicose e 50% de manipueira. A partir do uso exclusivo da manipueira como fonte de carbono (fases 3, 4 e 5), o aumento da TCO de 14 para 22 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ resultou em uma queda de HY de 0,8 a 0,01 $\text{mmol.g}^{-1}\text{DQO}$, mostrando que as maiores TCOs também inibiram a produção de hidrogênio.

Tabela 4.10- Valores médios de conteúdo de H₂ e CH₄, Produção volumétrica de H₂ e CH₄, e rendimento de H₂ para o reator R6M.

Fases	TCO ^a ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	H ₂ ^b (%)	CH ₄ ^c (%)	PVH ^d ($\text{L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$)	PVM ^e ($\text{L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$)	HY ^g ($\text{mmol.g}^{-1}\text{DQO}$)	HY ^g ($\text{mol.mol}^{-1}\text{glicose}$)
1	30	2±0,40	0	0,12±0,02	0	0,04±0,00	0,02±0,00
2	14	25±2,25	0	2,1±0,18	0	1,53±0,21	0,5±0,09
3	14	14±1,68	0	1,1±0,15	0	0,80±0,12	0,5±0,06
4	18	5±0,75	14±2,10	0,34±0,05	0,9±0,13	0,20±0,02	0,12±0,01
5	22	1±0,13	27±3,51	0,03±0,00	1,5±0,24	0,01±0,00	0,005±0,00

^a taxa de carregamento orgânico teórica; ^b conteúdo de H₂ no biogás; ^c conteúdo de CH₄ no biogás, ^d produção volumétrica de H₂; ^e produção volumétrica de CH₄; ^f rendimento de hidrogênio.

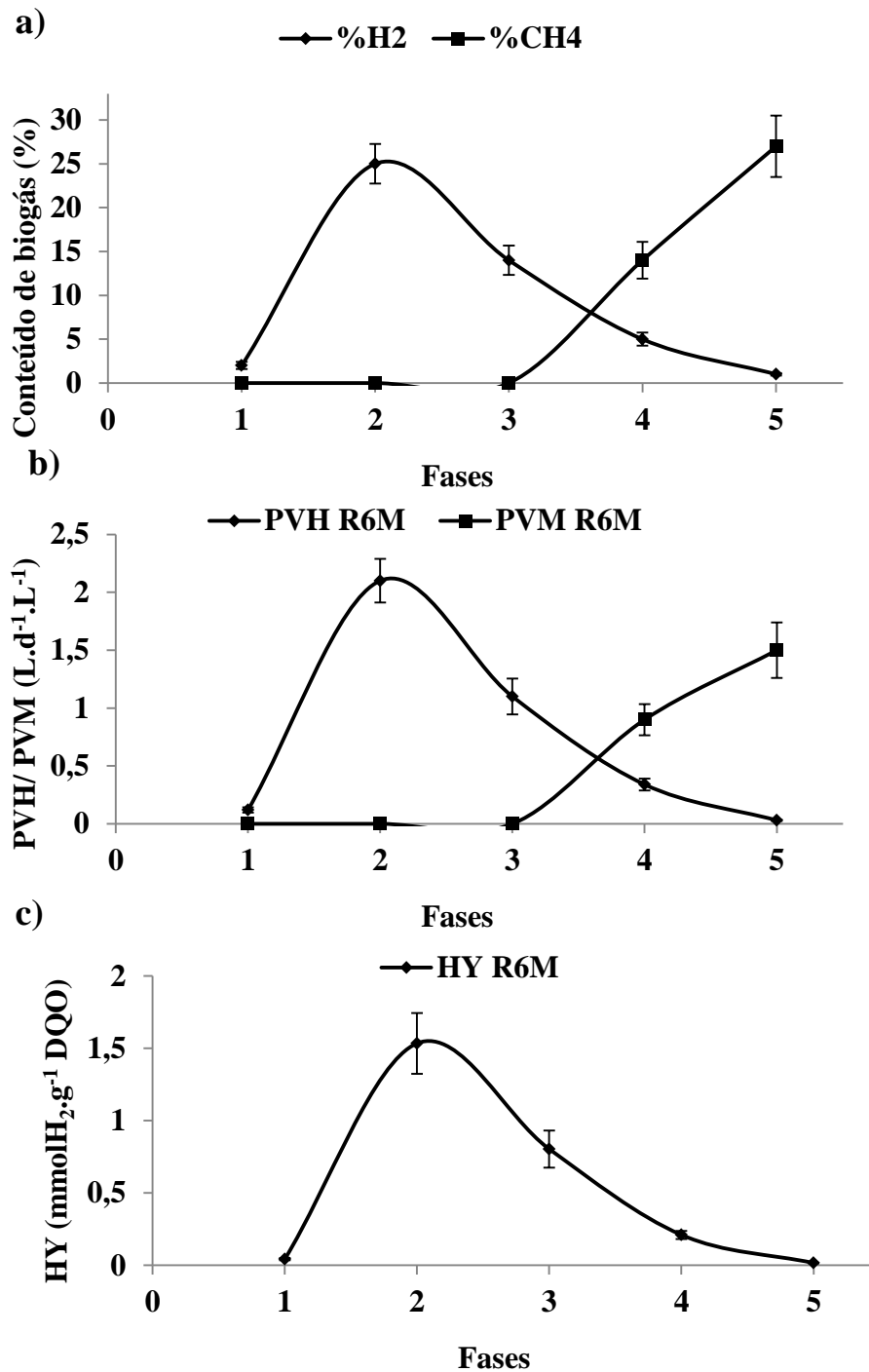


Figura 4.22- Comportamento da produção de H₂ para o reator R6M: a) Conteúdo de hidrogênio e metano; b) Produção volumétrica de hidrogênio e metano; c) Rendimento de hidrogênio.

Observou-se que para os reatores R6S e R6M, os máximos HY, foram obtidos nas menores TCOs. A possível causa para esta inibição seria a sobrecarga do sistema devido as maiores TCO aplicadas. A literatura relata que existe uma relação inversa entre TCO e

rendimento de hidrogênio e a utilização das maiores TCOs inibiriam o rendimento de hidrogênio a partir do uso de águas residuárias complexas (Akutsu et al., 2009a; Azbar et al., 2009; Davila-Vazquez et al., 2009; Van Ginkel e Logan, 2005; Yang et al., 2007).

Segundo Gioannis et al. (2013) existe uma discordância na literatura em relação ao efeito da TCO e rendimento de hidrogênio. Segundo estes autores, a TCO é afetada pelo acúmulo de ácido, mudanças no pH bem como variações na composição que conseqüentemente modificam as rotas metabólicas. Kraemer et al. (2007) alegam que além deste motivo, as altas TCO diminuíram o rendimento de hidrogênio pelos seguintes fatores: TCO pode afetar a atividade das acetogênicas, sob baixas TCO existe uma diminuição da concentração H_2 dissolvido eliminando assim a termodinâmica inibição da hidrogenase, e que as baixas TCO podem diminuir a inibição pelo CO_2 .

Na Tabela 4.11 são apresentados alguns estudos que utilizaram águas residuárias complexas como fonte de carbono e variaram a taxa de carregamento orgânico (TCO) pelo aumento na concentração de substrato, utilizando um TDH fixo. Em geral, vários tipos de substratos têm sido explorados e verificaram diferentes comportamentos da TCO e HY. Os estudos foram realizados a partir do uso da vinhaça (Chu et al., 2011; Searmsirimongkol et al., 2011), palha de arroz (Tawfik e Salem, 2012), óleo de palma (Singh et al., 2013b), soro de queijo (Azbar et al. 2009; Davila- Vasques et. al. 2009; Perna et. al. 2013) e amido (Akutsu et al. 2009). Para estes trabalhos houve uma variação de TCO de 1,6 a 750 $kg\ m^{-3}\ d^{-1}$. Alguns destes trabalhos relatam que o aumento da TCO favoreceu a produção de hidrogênio (Davila Vasquez et al. 2009; Singh et al. 2013; Tawfik e Salem 2012) enquanto outros trabalhos relatam que o aumento da TCO prejudicou o rendimento de hidrogênio (Chu et al.2011; Searmsirimongkol et al. 2011).

A maioria dos autores citados justifica a inibição da produção de hidrogênio devido ao acúmulo de ácidos (Azbar et al. 2009; Singh et al., 2013a). Segundo Singh et al. (2013a) o acúmulo destes ácidos podem causar um desequilíbrio no reator e prevenir a cultura de forma eficaz utilizando o substrato. Estes mesmos autores relatam que as baixas TCO têm sistemas deficientes de substratos e assim reduzem a atividade bacteriana, resultando em menores rendimentos de hidrogênio. Já Azbar et al. (2009) relatam que sua queda de rendimento acompanhada pelo aumento da TCO foi devido ao grande acúmulo de lactato e ácido propiônico.

Tabela 4.11 Comparação dos estudos a partir de águas residuárias complexas que avaliaram o efeito da TCO.

Referências	Substrato	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)		HY (mol H ₂ mol ⁻¹ substrato)		TDH
		menor	maior	Menor TCO	Maior TCO	
Maiores TCO favorecem a produção de H₂						
Davila- Vasquez et al. (2009)	Soro de queijo	92	138	2,1 mol H ₂ .mol ⁻¹ lactose	2,8 mol H ₂ .mol ⁻¹ lactose	6 h
Tawfik e Salem (2012)	Resíduos de palha de arroz	7,1	21,4	95	117 mmol.d ⁻¹	1,6 dias
Perna et al. (2013)	Soro de queijo	22	37	0,05 mol.mol ⁻¹ lactose	0,668 mol.mol ⁻¹ lactose	24h
Singh et al. (2013)	Óleo de palma	1,6	5,0	0,16LH ₂ .g ⁻¹ DQO removida	0,35LH ₂ .g ⁻¹ DQO removida	12 h
Menores TCO favorecem a produção de H₂						
Azbar et al. (2009)	Soro de queijo	21	47	9 mmol.g ⁻¹ DQO	3 mmol.g ⁻¹ DQO	24 h
Akutsu et al. (2009)	Amido	15	30	1,12 mol.mol ⁻¹ glicose	0,7 mol.mol ⁻¹ glicose	24 h
Searmsirimongkol et al. (2011)	Vinhaça	60	90	170 mL.g ⁻¹ DQO removida	40 mL.g ⁻¹ DQO removida	16 h
Chu et al.(2011)	Vinhaça	500	750	4,19 mmol.g ⁻¹ DQO	2,25 mmol.g ⁻¹ DQO	2 h
Este estudo	Soro de Queijo	12	40	3,6 mol.mol ⁻¹ lactose	0,2 mol.mol ⁻¹ lactose	6 h
	Manipueira	14	22	0,8 mmol.g ⁻¹ DQO	0,01 mmol.g ⁻¹ DQO	12 h

Azbar et al. (2009) tiveram o mesmo comportamento do reator R6S, utilizando também o soro de queijo como substrato. Os autores avaliaram o efeito da TCO (47, 35 e 21 kg.m⁻³.d⁻¹) sobre a produção de H₂, utilizando reatores CSTR, com TDH de 24 h, e verificaram uma relação inversa entre TCO e HY. Assim, os maiores HY de 9 mmol.g⁻¹ DQO foram encontrados na menor TCO aplicada. Em contrapartida com estes estudos, Perna et al. (2013) utilizaram diferentes TCO (22, 33 e 37 gDQO.L⁻¹.d⁻¹) com um TDH fixo em 24 h e obtiveram um aumento de rendimento de 0,2 para 0,6 molH₂.mol⁻¹ lactose a partir do aumento da TCO.

Aktusu et al. (2009) avaliaram o efeito da concentração de substrato sobre a produção de H_2 , utilizando amido como substrato. O aumento da TCO de 15 para $60 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ resultou em uma queda de 60 % de HY, mesmo comportamento verificado no reator R6M.

Para o reator R5M não foi verificada uma relação entre HY e TCO. A partir do uso exclusivo da manipueira (fase 2 e 3) o aumento da TCO não resultou mudanças de HY. Já na fase 4, a TCO de $10 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ resultou no máximo HY de $2 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$. A partir desta TCO houve queda de HY para $0,68 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$. Este mesmo comportamento com HY similares foi verificado por Thanwised et al. (2012). Os autores avaliaram o efeito da TCO ($16\text{-}130 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) sobre a produção de hidrogênio, utilizando águas residuárias de tapioca em reator anaeróbico. Em uma primeira fase, os autores utilizaram uma TCO de $16 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ com HY de $0,4 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$. Com o aumento da TCO para $22 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, o HY se manteve estável em $0,5 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$. A TCO ótima foi de $31 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com valores máximos de HY de $0,74 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$. A partir desta TCO, houve a queda de HY para $0,22 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$. Estes autores associam a queda rendimento de hidrogênio pode ser devido à competição de outras vias de fermentação em que foi usada para produzir outros produtos, tais como o etanol, acético e butírico ácidos em vez de hidrogênio.

Assim, a maior produção de hidrogênio está relacionada com a escolha de uma faixa adequada de TCO, mostrando que há um consenso de que o rendimento de hidrogênio é pela TCO. A dificuldade em se estabelecer uma faixa adequada de TCO é devido a complexidade de produção de hidrogênio, em termos de diferentes espécies bacterianas responsáveis pela produção de hidrogênio, o metabolismo dependendo das condições ambientais e sua coexistência com outros microrganismos no sistema.

4.4.5- Discussão sobre os reatores que utilizaram soro de queijo como substrato.

Na Tabela 4.12 são apresentados os principais estudos na literatura utilizando apenas o soro de queijo como substrato. O uso desta água residuária como fonte de carbono na produção de hidrogênio vem sendo estudado em reatores de Leito fixo (Perna et al., 2013), UASB (Carrillo-Reyes et al., 2012); CSTR (Azbar e Dokgoz, 2010; Davila-Vazquez et al., 2009) e batelada (Davila-Vazquez et al., 2011; Ferchichi et al., 2005). Diferentes parâmetros foram testados: a taxa de carregamento orgânico (Azbar et al., 2009; Davila-Vazquez et al., 2009; Perna et al., 2013); o efeito do TDH (Azbar et al., 2009; Davila-Vazquez et al., 2009), diferentes formulações de meio de crescimento das bactérias (Davila-Vazquez et al., 2011) e diferentes estruturas de inóculo (Carrillo-Reyes et al., 2012).

Tabela 4.12 Estudos comparativos na produção fermentativa de hidrogênio em utilizando soro de queijo como substrato.

Reator	Fonte de inóculo	YH ou PVHmax	TDH	Referência
Leito Fixo	Autofermentação	1,1 mol H ₂ .mol ⁻¹ lactose	24h	Perna et al.(2013)
UASB	Lodo de UASB de confeitaria	0,015 L H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹	6 h	Carrillo-Reyes et al. (2012)
CSTR	Lodo de UASB	5,1 mol H ₂ .mol ⁻¹ lactose consumida	24 h	Azbar et al. (2010)
CSTR	Lodo de digestor anaeróbio	22 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO	3,5 dias	Azbar et al. (2009)
CSTR	Lodo de UASB de confeitaria	2,4 mol H ₂ .mol ⁻¹ lactose	10h	Davila-Vasquez et al. (2009)
CSTR	Lodo de digestor municipal	2 mmol.g DQO ⁻¹	24 h	Yang et al.(2007)
RALF	Lodo de suíno (R3S)	1,3 mol.mol ⁻¹ lactose / 2,5 mmol.g ⁻¹ DQO	4 h	Este estudo
	Lodo de aves (R4S)	1,2 mol.mol ⁻¹ lactose / 2,2 mmol.g ⁻¹ DQO	4 h	
	Lodo de suíno (R5S)	1,9 mol.mol ⁻¹ lactose / 2,6 mmol.g ⁻¹ DQO	14 h	
	Lodo de suíno (R6S)	3,2 mol.mol ⁻¹ lactose / 2,3 mmol.g ⁻¹ DQO	6 h	

Os máximos HY neste estudo a partir do uso de soro de queijo, foram de 2,3 mol.mol⁻¹ lactose (R6S) e de 1,9 mol.mol⁻¹ lactose (R5S) . Estes resultados estão de acordo com os resultados relatados por Davila Vasquez et al. (2009). Ao utilizarem um CSTR, com aplicação de três TDH (10, 6 e 4 horas), os autores obtiveram o maior rendimento de 2,4 mol.mol⁻¹ lactose com o maior TDH aplicado, de 10 horas. Resultados semelhantes ao R3S e R4S foram obtidos por Perna et al. (2013), que obtiveram um rendimento de 1,1 mol.mol⁻¹ de lactose com TDH aplicado de 24 h. Yang et al. (2007) também obtiveram HY semelhantes as deste trabalho (2 mmol.g⁻¹ DQO).

Assim, os resultados são considerados comparáveis com os estudos anteriores referidos na literatura, o que demonstra o potencial do soro de queijo, como um substrato para a produção fermentativa de hidrogênio utilizando RALFs.

4.4.6- Reatores R1M, R2M, R3M e R4M: Efeito da hidrólise do amido e do TDH sobre a produção de hidrogênio e composição do biogás.

Para os reatores R1M (lodo de suínos) e R2M (lodo de aves) a partida foi dada com 100% de glicose (fase 1) para se ativar a produção de hidrogênio e, após a estabilização do

sistema, foi utilizado 50% de manipueira bruta, juntamente com 50% de glicose (fase 2) para se produzir hidrogênio, com um TDH fixo de 8 horas. Na figura 4.23 é apresentado o comportamento da PVH para os reatores R1M e R2M.

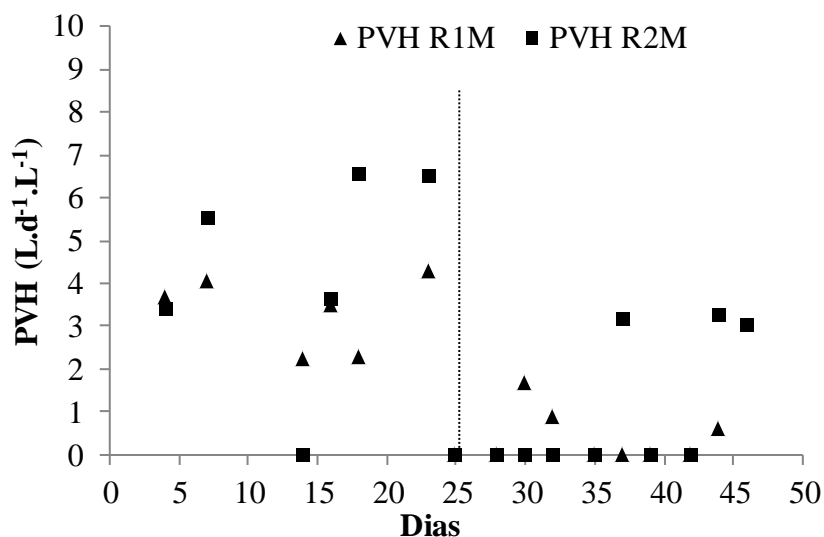


Figura 4.23- Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores R1M e R2M a partir da glicose (fase 1) e da mistura de glicose e manipueira bruta (fase 2).

Na fase 1 o sistema foi operado com apenas a glicose, a produção de H₂ foi estável e teve médias de 3,36 L.d⁻¹.L⁻¹ (R1M) e de 6,24 L.d⁻¹.L⁻¹(R2M). Com a introdução de 50% de manipueira, houve uma queda de PVH para 0,96 L.d⁻¹.L⁻¹ (R1M) e 3,12 6,24 L.d⁻¹.L⁻¹ (R2M), e não foi possível se alcançar a estabilidade do sistema.

Na Figura 4.24 é mostrado o comportamento do conteúdo do biogás para os dois reatores. Metano não foi detectado. O reator R1M teve uma média na fase 1 de 24% de H₂ no conteúdo de biogás, e caiu para 21% na fase 2. Já o R2M teve na fase 1 43% de H₂, e com uma queda mais brusca, teve 22% na fase 2.

Vários podem ser os motivos encontrados para a instabilidade na produção de hidrogênio. Um dos motivos seria a dificuldade da hidrólise do amido em carboidratos menores. Alguns trabalhos na literatura utilizam diferentes técnicas para ser realizada a hidrólise. Argun e Kargi (2010) Ozmihci e Kargi (2010) e Ozmihci e Kargi (2011) acidificaram e aquecem o amido por 1,5 horas para se obter uma hidrólise parcial. Outros trabalhos realizaram a hidrólise do amido com enzimas (Chen et al., 2008; Su et al., 2009).

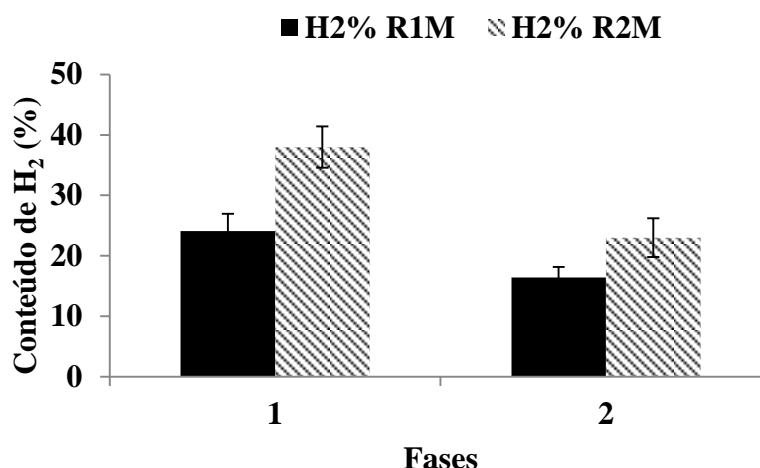


Figura 4.24- Conteúdo de hidrogênio para os reatores R1M e R2M com glicose e manipueira bruta.

Su et al. (2009) realizaram testes com amido de mandioca e alcançaram rendimentos de 1,74 mol.mol⁻¹ glicose e produção volumétrica de 84 mlH₂.L.h⁻¹. Ao aquecerem o amido a 112 °C por 15 minutos, obtiveram aumento no rendimento e na produção de 1,87 mol.mol⁻¹ glicose e de 172 mlH₂.L.h⁻¹, respectivamente. Os autores alcançaram o maior rendimento de 2 mol.mol⁻¹ glicose e produção volumétrica de 262 mlH₂.L⁻¹.h⁻¹ por meio da utilização de enzimas para a hidrólise. A quebra parcial do amido demonstra ser uma prática eficiente para a maior produção de hidrogênio. De certa forma, temperaturas elevadas poderiam auxiliar na redução dos carboidratos à açúcares. Neste contexto, Akutsu et al. (2009c) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas e concentrações de substrato e afirmam que a produção de hidrogênio com fontes ricas de amido são mais eficientes e estáveis sob temperaturas termófilas.

Outro possível motivo seria que a proporção de substrato utilizada entre a glicose e manipueira não seria a mais adequada para a produção de hidrogênio. Prakasham et al. (2009) afirmam que a produção de hidrogênio é dependente da proporção utilizada entre os resíduos. Os autores utilizaram glicose e xilose na fermentação de hidrogênio em diferentes proporções (10:0; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8; 0:10) e observaram uma diferença na produção de hidrogênio, com diferentes proporções, alcançando rendimentos máximos na proporção de 2:3.

Em outros trabalhos com co-susbtros, Ren et al. (2008) também avaliaram diferentes proporções entre glicose e xilose com concentrações de substrato de 10 g.L⁻¹. A medida que os autores foram aumentando a quantidade de xilose na proporção de substratos, foi havendo uma queda no rendimento de hidrogênio. O rendimento máximo foi de 2,42 mol.mol⁻¹ glicose,

com apenas glicose. Na proporção de 50% entre os substratos, a mesma utilizada neste trabalho, o rendimento foi de $2,32 \text{ mol.mol}^{-1}$ glicose.

Em estudos recentes foram obtidos bons resultados de produção de hidrogênio com glicose em reatores anaeróbios de leito fluidizado (Barros e Silva 2012; Reis e Silva 2011; Amorim et al. 2012; Shida et al. 2012). A glicose é um substrato mais simples de degradação, quando comparado com o amido, justificando assim partida dos reatores deste trabalho com apenas com glicose. Chen et al. (2008) relataram uma comparação sobre os principais motivos de inibição em digestão anaeróbia, propondo que para ocorrer uma melhor adaptação do meio microbiano antes de ser usado um substrato mais complexo seja colocado uma fonte de carbono mais simples até seu consumo total, aumentando a tolerância dos microrganismos ao choque de compostos tóxicos e aumentando assim a capacidade de biodegradação.

Assim como este trabalho, Buitrón e Carvajal (2010) também observaram um declínio na produção de hidrogênio quando substituíram o substrato glicose por vinhaça de tequila em reatores de bateladas sequenciais na produção de hidrogênio. Os autores iniciaram a operação dos reatores com apenas glicose (2g.L^{-1}), até a estabilização da produção de hidrogênio e alcançaram uma produção volumétrica máxima de $50,5 \text{ mL H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com um TDH de 12 horas e uma concentração de 3g.L^{-1} . Segundo os autores, a provável causa da inibição de hidrogênio seria a presença de compostos tóxicos na vinhaça.

Devido a instabilidade do sistema nos reatores R1M e R2M, para o experimento seguinte com os reatores R3M e R4M, a manípueira utilizada foi submetida a uma hidrólise ácida, a fim de se obter uma maior eficiência na quebra do amido em glicose. Buscando uma maior estabilidade do sistema, foi feita uma variação de TDH de 10 para 2 horas. Ozmihci et al. (2011) relatam que a hidrólise do amido em glicose e maltose, é dada pela equação 4.1:



Nas Figuras 4.25 é apresentado o conteúdo de biogás a partir da redução do TDH para os reatores R3M e R4M.

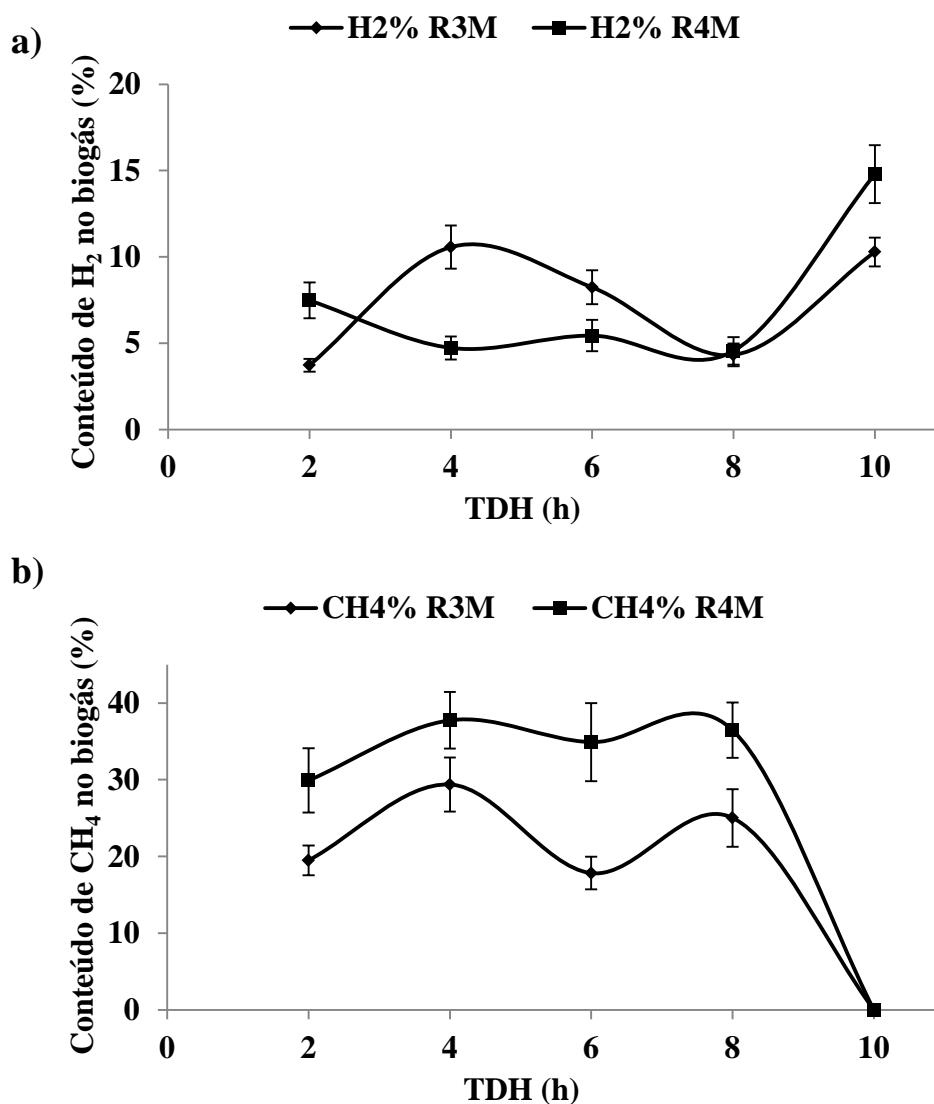


Figura 4.25- Comportamento do conteúdo de biogás para os reatores R3M e R4M: a) Conteúdo de hidrogênio; b) Conteúdo de metano.

H₂, CH₄ e CO₂ estavam presentes no conteúdo de biogás em ambos os reatores. Com o TDH de 10 horas, não houve metano, e o biogás foi composto de 10% (R3M) e 14% (R4M) de hidrogênio. A partir da redução do TDH nas etapas seguintes, houve o aparecimento do metano de 17 a 29% (R3M) e 29 a 38 % (R4M) que foi produzido concomitantemente com hidrogênio. Com isso, o conteúdo variou de 3-10% para o reator R3M e de 4- 7% para o R4M, a partir da redução do TDH de 8-2 h. O maior conteúdo de metano no R4M prejudicou o desempenho do reator, tendo uma queda mais acentuada de conteúdo de H₂, quando comparado com o R3M.

Na Figura 4.26 é apresentado o comportamento da produção de biogás. Com o TDH de 10 horas, a produção de H₂ foi de 0,57 LH₂.d⁻¹.L⁻¹ (R3M) e 1,03 LH₂.d⁻¹.L⁻¹(R4M). A

partir da produção concomitante de H_2 e CH_4 , com a redução do TDH, a produção máxima de metano foi de $5,13 \text{ LCH}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (R3M) e $9,68 \text{ LCH}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (R4M) no menor TDH aplicado. Este mesmo comportamento foi verificado para o H_2 , com produções máximas de $1,26 \text{ LH}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (R3M) e $2,08 \text{ LH}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ (R4M) no TDH de 2 horas.

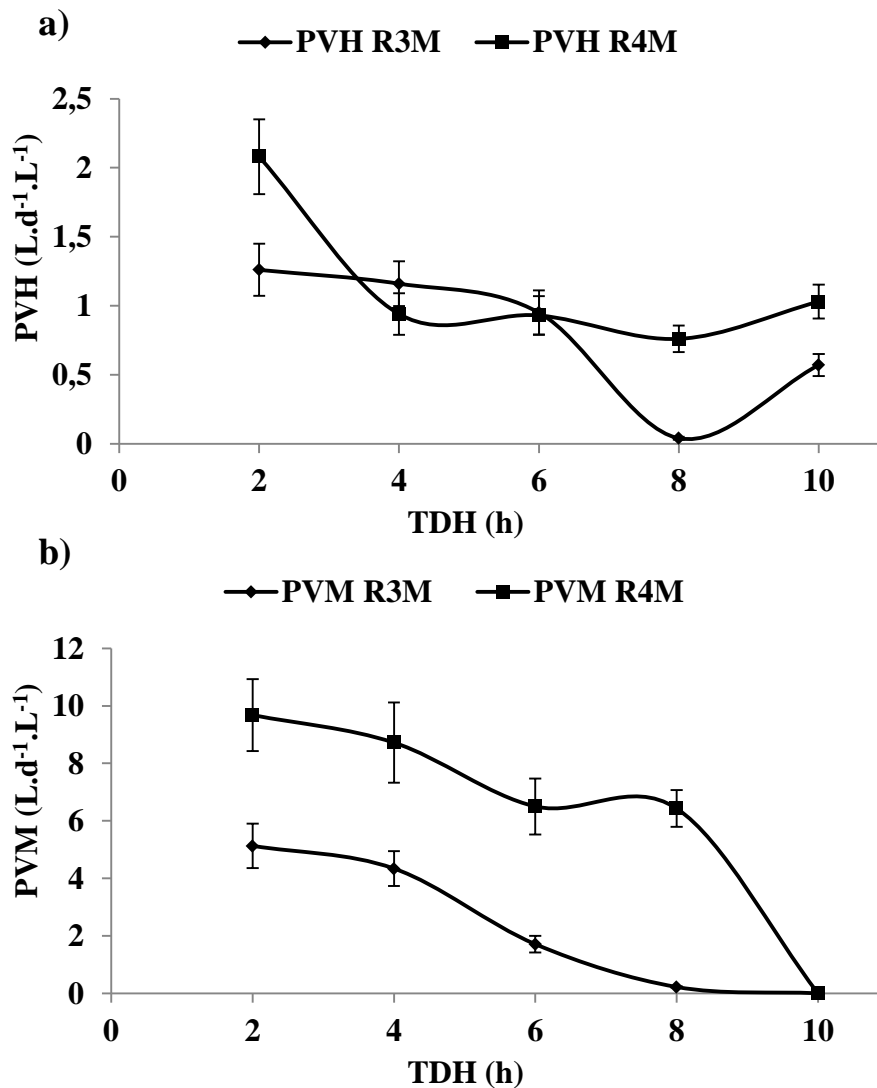


Figura 4.26- Comportamento da produção de biogás para os reatores R3M e R4M: a) Produção volumétrica de H_2 ; b) Produção volumétrica de CH_4 .

Na Figura 4.27 é mostrado o comportamento do rendimento de H_2 de acordo com a redução do TDH para os reatores R3M e R4M. Com um TDH de 10 horas não houve o aparecimento de metano, e assim foram obtidos os máximos valores de HY de $0,6 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R3M) e $1,0 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R4M). Com o aparecimento do metano (TDH 8 h) o reator R3M apresentou uma queda acentuada de HY para $0,03 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$, e o reator

R4M para $0,6 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$. Para os demais TDHs (6,4 e 2 h) os HY variaram entre $0,3-0,6 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R3M) e $0,4-0,6 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$. Assim, mostrando comportamentos diferenciados devido as diferentes origens dos inóculos, o R4M (lodo aves) apresentou o máximo HY de $1,0 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$, sendo também mais estável mesmo com o aparecimento do metano, quando comparado com o reator R3M (lodo de suínos).

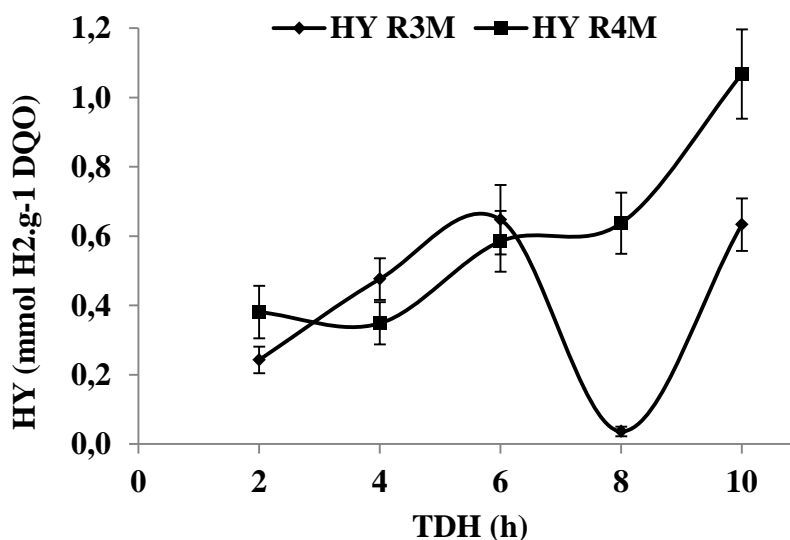


Figura 4.27- Comportamento do rendimento de H_2 para os reatores R3M e R4M.

Na Tabela 4.13 são mostrados os valores médios de produção volumétrica de H_2 e CH_4 , conteúdo de biogás e rendimento de hidrogênio para cada TDH aplicado nos dois reatores.

A aclimação das archaeas metanogênicas em baixos pHs explica a produção estável de metano nos reatores, alcançando produções superiores a de hidrogênio. Outros trabalhos também verificaram uma produção simultânea de hidrogênio e metano em condições ácidas (Tabela 4.7).

Zhu et al. (2009) investigaram a produção de hidrogênio utilizando esterco líquido de suínos e glicose como substratos. Os autores avaliaram diferentes TDHs (12, 16, 20 e 24 h) e pH (5,0 e 5,3) mostrando que o melhor TDH (16 h) e o melhor pH (5) resultaram em uma produção de $21,4 \text{ LH}_2 \cdot \text{d}^{-1}$. Os autores alcançaram em até 50% de metano no conteúdo de biogás, ao utilizarem um pH de 5,9, afirmando que para se manter a produção eficiente de hidrogênio, foi necessário para controlar o teor de metano inferior a 2%.

Tabela 4.13- Valores médios de conteúdo de H₂ e CH₄, Produção volumétrica de H₂ e CH₄, e rendimento de H₂ para os reatores R3M e R4M.

R3M (lodo suíno)					
TDH ^a (h)	H ₂ ^b (%)	CH ₄ ^c (%)	PVH ^d (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	PVM ^e (L.d ⁻¹ .L ⁻¹)	HY ^f (mmolH ₂ .g ⁻¹ DQO)
10	10±0,84	0	0,57±0,08	0	0,6±0,07
8	4±0,65	25±3,75	0,04±0,00	0,22±0,02	0,03±0,01
6	8±0,98	17±2,13	0,95±0,16	1,71±0,29	0,6±0,10
4	11±1,26	29±3,52	1,16±0,16	4,34±0,60	0,5±0,06
2	3±0,37	19±1,94	1,26±0,18	5,13±0,76	0,3±0,03
R4M (lodo de aves)					
10	15±1,68	0	1,03±0,12	0	1,0±0,12
8	5±0,80	36	0,76±0,09	6,43±0,64	0,7±0,08
6	6±0,91	35	0,93±0,13	6,50±0,97	0,6±0,08
4	5±0,67	38	0,94±0,15	8,72±1,39	0,3±0,06
2	8±1,04	30	2,08±0,27	9,68±1,25	0,4±0,07

^a tempo de detenção hidráulica; ^b conteúdo de H₂ no biogás; ^c conteúdo de CH₄ no biogás; ^d produção volumétrica de H₂; ^e produção volumétrica de CH₄; ^f rendimento de hidrogênio.

Buitron e Carvajal (2010) mostraram que a produção de metano aumentou em 30% quando o pH inicial foi reduzida de 7,0 para 4,5 devido uma aclimatação das archaeas metanogênicas em pH ácido. Com um TDH de 24 horas, metano (35-44%) foi produzido concomitantemente com hidrogênio. Os autores ainda afirmam que é possível que as archaea metanogênicas estivessem presentes na vinhaça e os ácidos orgânicos e H₂ produzidos foram metabolizados pelas archaea metanogênicas para a produção de CH₄.

Em estudos com fontes ricas em amido, Luo et al. (2010) afirmaram que o pré tratamento térmico não melhorou o rendimento de hidrogênio em reatores contínuos sob temperaturas mesófilas, assim como foi verificado neste estudo. Os autores demonstraram que a temperatura tem maior importância sobre a produção de hidrogênio quando comparada com o pré tratamento do lodo. Os autores aumentaram de 14 para 69,6 ml H₂.g⁻¹ SV quando mudaram de temperatura, passando de mesofílica para termofílica, devido à diminuição da concentração de propionato e inibição da homoacetogenese, quando utilizaram a vinhaça de mandioca como substrato na produção de hidrogênio.

Alguns trabalhos que utilizaram resíduos ricos em amido como fonte de carbono para a produção de hidrogênio avaliaram o efeito do TDH e relatam que a redução do TDH prejudicou o rendimento de hidrogênio, assim como o R4M (Akutsu et al., 2009a; Chu et al., 2011; Thanwised et al., 2012).

Argun e Kargi (2010) estudaram a fermentação do amido de trigo moído, e avaliaram o efeito de diferentes TDH (1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias) sobre a produção de H₂, utilizando uma concentração de substrato de 5 g.L⁻¹. Os maiores HY de 90 mL. g⁻¹ amido foram encontrados no maior TDH. Os autores justificam seus maiores HY nos maiores TDH devido a fermentação parcial dos ácidos pelo *Rhodobacters* sp.

Chu et al. (2011) estudaram a fermentação da vinhaça em reatores anaeróbios continuamente agitados, e também tiveram este mesmo comportamento de queda de HY. Ao realizarem a redução do TDH de 8 para 2 horas, os autores mostraram uma queda na produção de H₂ de 5,3 para 1,52 mmol H₂.g⁻¹ DQO.

A co-fermentação de resíduos orgânicos é uma tecnologia que está sendo cada vez aplicada para o tratamento simultâneo de vários resíduos sólidos e líquidos orgânicos, em que o teor de nutrientes pode ser equilibrado e o efeito de compostos tóxicos no processo de digestão pode ser diminuído dando um aumento do rendimento de gás (Dareioti et al., 2009). Na Tabela 4.14 são mostrados alguns estudos que utilizaram a co-fermentação a partir de diferentes subprodutos orgânicos, como vinhaça de mandioca e excesso de lodo (Wang et al., 2011; Wang et al., 2013b), resíduos de vacas e águas residuárias de leite (Lateef et al. 2012), amido e óleo de palma (Noparat et al., 2012), glicose e galactose (Rosales-Colunga et al., 2012), glicose e xilose (Hniman et al., 2011; Zhao et al., 2013); águas residuárias de fábrica de azeite e soro de queijo (Dareioti et al., 2009), aguapé e águas residuárias de cervejaria (Lay et al., 2013), glicose e glicerol (Trchounian e Trchounian, 2013), melão de beterraba e resíduos líquidos de suíno (Wu et al., 2013) e resíduos de alimentos, lodo ativado e lodo primário (Zhu et al., 2008). A maioria dos estudos foi realizada em processo bateladas (Hniman et al., 2011; Noparat et al., 2012; Rosales -Colunga e al., 2012; Zhu et al., 2008). Percebe-se que já é frequente na literatura o uso de mistura de substratos para a produção de hidrogênio.

Na co-fermentação com fontes ricas em amido, Wang et al. (2011) estudaram a produção de hidrogênio e metano utilizando diferentes proporções de vinhaça de mandioca (VM) e lodo de excesso de mandioca (LEM). Os autores relatam que a melhor condição para a produção de hidrogênio foi de 3:1 de VM :LEM, alcançando HY de 74 mL/g total SV adicionado, ressaltando que a fermentação da vinhaça de mandioca sozinha não é eficaz para se produzir hidrogênio.

Tabela 4.14 Estudos comparativos na produção fermentativa de hidrogênio utilizando mistura de substratos

Modelo\ Reator	Mistura	Produção de H ₂	Referências
CSTR	Vinhaça de mandioca e lodo de descarte de mandioca (7:1)	0,77 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	Wang et al. (2013)
ASBR	Melaço de beterraba e resíduos líquidos de suíno	2,19 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	Wu et al. (2013)
UASB	50% Glicose e 50% xilose	2,9 L. d ⁻¹ .L ⁻¹	Zhao et al. (2013)
BATCH	1,6 g água-pé e 2,4 g Águas residuais de bebidas	0,52 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	Lay et al. (2013)
BATCH	50% Glicose 50% Galactose	0,58 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	Rosales-Colunga et al. (2012)
CSTR	55% águas residuárias de azeite 5% Descartes líquidos de vaca 40% soro de queijo	0,46 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	Dareiotte et al. (2009)
RALF	50% glicose 50% manípueira	1,26 e 2,08 L.d ⁻¹ .L ⁻¹	Este estudo

Wang et al. (2013b) avaliaram a estratégia de aumentar a produção de hidrogênio utilizando a vinhaça de mandioca pela co-digestão com outros resíduos orgânicos. O efeito de diferentes co-substratos sobre a produção de hidrogênio foi avaliado, e a máxima PVH de 0,77 L.d⁻¹.L⁻¹ foi obtido a partir da co-fermentação da vinhaça de mandioca e o lodo de excesso de mandioca (7:1), sendo 45% a mais que a vinhaça de mandioca sozinha. Estes resultados são similares aos obtidos no TDH de 6 h (R3M) e 8 h (R4M).

A produção de hidrogênio a partir da co-fermentação de resíduos de bovino e águas residuárias do leite foi relatada por Lateef et al. (2012). Os autores avaliaram diferentes proporções das misturas (SV/SV de 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 0:100) e três diferentes TCO (20, 40 e 60 g SV.L⁻¹). A produção de hidrogênio aumentou com o aumento da TCO e o máximo HY de 59,5 mL.g⁻¹ SV adicionado foi obtido com uma carga de 40 g SV.L⁻¹ com uma mistura de 70:30 de resíduos de bovino e águas residuárias do leite.

Zhao et al. (2013) utilizaram uma mistura de 50% de glicose e 50% de xilose em reatores UASB e avaliaram o efeito do TDH (24-6 h). Com a redução do TDH de 24 para 12 horas, houve o aumento de PVH de 25,2 para 121 mL.h⁻¹.L⁻¹. Com a redução do TDH para 6 horas, houve uma queda para 49,5 mL.h⁻¹.L⁻¹. Assim, as mais altas PVH de 121 mL.h⁻¹.L⁻¹ e HY de 0,58 mol.mol⁻¹ hexose foram obtidos no TDH de 12 h (TCO de 41,3 kg DQO.m⁻³.d⁻¹).

Na comparação entre as duas fontes de inóculo, o lodo proveniente de lodo de abatedouro de aves (R4M), apresentou um maior potencial para a produção de hidrogênio e metano, com produções máximas de $2,08 \text{ LH}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ e $9,68 \text{ LCH}_4 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, quando comparada ao lodo proveniente de águas residuárias de suinocultura (R3M). Os reatores tiveram HY semelhantes.

Os resultados demonstraram que a manipueira bruta usada juntamente com a glicose (reatores R1M e R2M) como substratos provocou uma instabilidade do sistema para se produzir hidrogênio. Com a hidrólise da manipueira (reatores R3M e R4M) foi possível se obter a uma maior estabilidade, alcançando bons resultados demonstrando um potencial para se produzir hidrogênio já que o metano detectado nos reatores foi produzido a partir do consumo de 4 moles de hidrogênio.

4.5- Metabólitos solúveis produzidos

4.5.1 Reatores com mistura de soro de queijo: R1S e R2S

Na Figura 4.28 é mostrado o comportamento dos principais metabólitos solúveis encontrados nos reatores R1S e R2S. Metanol, etanol, ácido acético, butírico e propiônico predominaram nos dois reatores. Para o reator R1S os principais metabólitos foram etanol (0,45- 44%) metanol (23,81- 49,7%), ácido acético (8,31-21,87%), butírico (4,42-13,84%) e propiônico (1- 21,01%). Para o R2S, etanol (3,81-42,7%), metanol (22,60-53,56%), ácido acético (8,57-12,13%), butírico (3,76-9,61%) e propiônico (1,50-21,27%).

Com a introdução do soro de queijo (fase 2), houve a queda de etanol de 44% para 0,45 % (R1S) e de 41,8 para 3,81% (R2S). Porém, para as demais fases, os reatores se reestabeleceram e alcançaram 42% (R1S) e 47% (R2S) na fase 4 (100% de soro de queijo). Em contrapartida a queda de etanol na fase 2, houve um aumento de metanol de 49% (R1S) e 53% (R2S), caindo para 22% (R1S) e 23% (R2S) na fase 4.

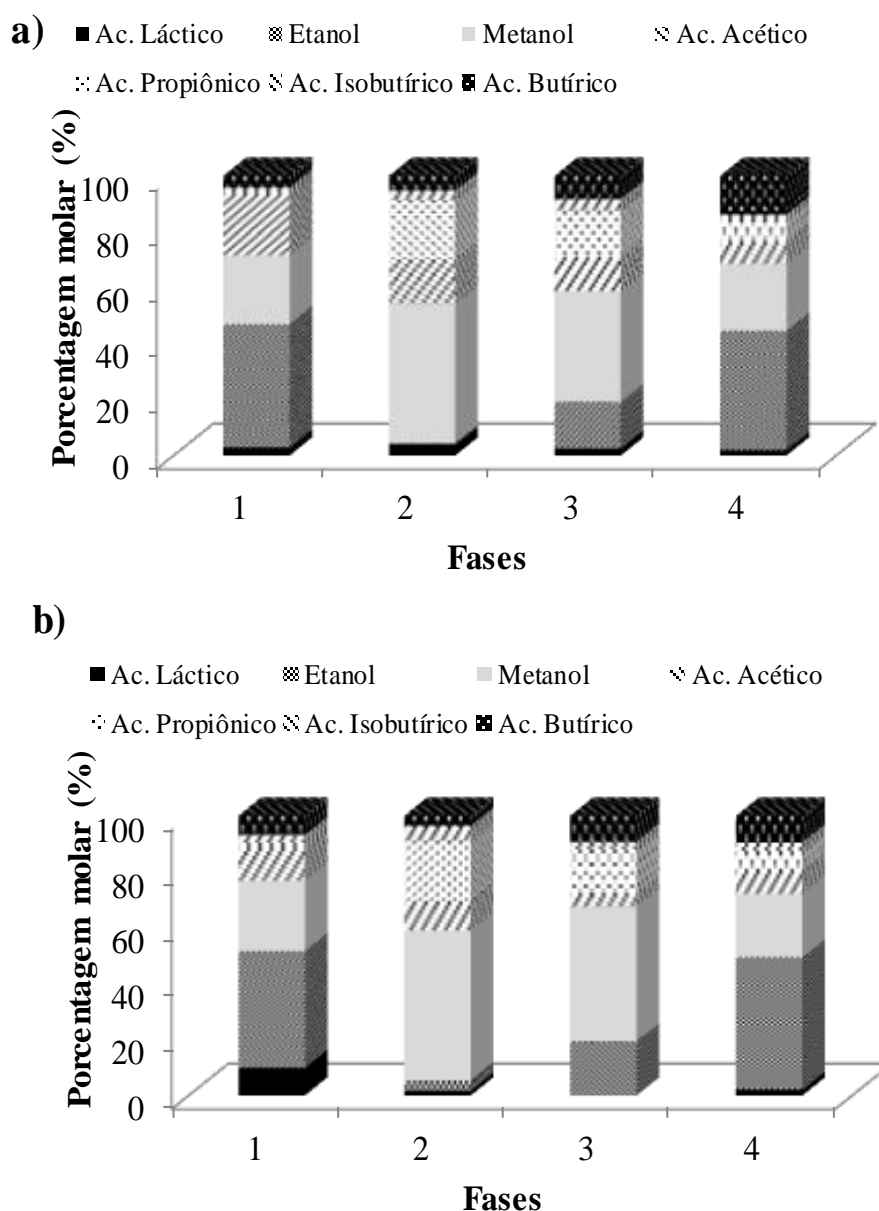


Figura 4.28 – Metabólitos solúveis produzidos em cada fase: a) R1S b) R2S.

Na Tabela 4.15 é mostrado os valores médios da porcentagem molar e na Tabela 4.16 os valores médios em termos de concentração (mg.L^{-1}) dos principais metabólitos solúveis encontrados nos reatores R1S e R2S, respectivamente.

Tabela 4.15 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para os reatores R1S e R2S.

Porcentagem molar (%) R1S (lodo de suínos)							
Fases	HA1 ^a	EtOH ^b	MetOH ^c	HAc ^d	HPr ^e	HIBu ^f	HBu ^g
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	2,9	44,0	24,4	21,8	1,0	1,1	4,4
2	3,0	0,4	49,7	15,9	21,0	3,5	5,3
3	2,5	16,6	39,6	12,3	16,1	4,2	8,3
4	1,9	42,6	23,8	8,3	8,2	1,3	13,8
R2S (lodo de aves)							
1	9,8	41,8	25,1	12,1	1,5	2,6	6,8
2	1,6	3,8	53,5	10,5	21,2	5,3	3,7
3	0	19,3	47,9	5,0	15,7	2,5	9,3
4	2,0	47,3	22,6	8,5	6,7	2,8	9,6

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido isso-butírico; ^gácido butírico

Tabela 4.16 – Concentração média (mg.L⁻¹) dos principais metabólitos solúveis para os reatores R1S e R2S.

Concentração média (mg.L ⁻¹) R1S (lodo de suínos)							
Fase	HA1	EtOH	MetOH	HAc	HPr	HIBu	HBu
s	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
1	46,9±3,3	369,3±26,7	142,7±11,4	238,9±19,6	14,2±1,1	18,9±1,4	70,8±5,7
2	78,5±6,5	4,60±0,6	350,7±38,6	211,0±24,6	342,5±28,5	68,4±5,5	103,3±9,6
3	63,9±5,9	214,9±0,1	355,8±27,5	208,8±26,3	336,6±29,4	104,7±11,5	207,4±19,3
4	58,8±4,4	651,3±7,2	253,2±22,7	163,4±13,9	202,4±18,7	39,3±2,6	404,9±33,9
Concentração média (mg.L ⁻¹) R2S (lodo de aves)							
1	189,2±14,7	410,5±45,7	171,8±16,5	155,4±21,6	23,7±1,9	49,9±4,2	129,5±11,5
2	47,4±3,5	56,5±4,8	551,4±43,7	204,1±19,5	506,4±48,2	151,5±13,8	106,5±8,4
3	0	284,2±33,5	490,4±37,4	96,2±9,5	371,5±33,2	71,3±9,1	263,0±22,7
4	67,2±69,6	793,5±67,3	263,7±29,5	191,5±17,4	182,9±15,6	92,6±11,5	308,4±31,8

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido isso-butírico; ^gácido butírico

Ao longo das fases, com a redução da glicose no meio de alimentação, a porcentagem de ácido butírico aumentou de 4% para 14% e de 7% para 10%, para os reatores R1S e R2S respectivamente, refletindo em um aumento crescente de HY para ambos os reatores. Em contrapartida, o ácido acético apresentou uma queda linear de 22% para 8% (R1S) e de 12% para 8% (R2S). O ácido propiônico teve um aumento de 21% com a introdução do soro de queijo (fase 2), porém reduziu para 8% (R1S) e 7% (R2S) na fase 4, refletindo em bons valores de HY nesta fase.

Para as fases 1,3 e 4, os principais produtos metabólitos nos dois reatores foram etanol e ácido acético. A rota aceto- alcoólica mostrada pela Equação 2.16 é uma possível rota favorável na produção simultânea de hidrogênio e de etanol. Com a introdução do soro de queijo, é possível afirmar que esta rota metabólica foi fortemente influenciada, ocorrendo uma redução na concentração de etanol. Porém, a configuração do sistema dos reatores, a estratégia de adição gradual do substrato e a aclimação da biomassa garantiu que a produção de etanol se restabelecesse nas fases seguintes com maiores porcentagens de soro de queijo, aumentando a concentração de etanol para 651,3 e 793, 5 mg.L⁻¹ para o reator R1S e R2S, respectivamente.

Na Figura 4.29 é mostrado o rendimento de etanol (EtOHY) ao longo das fases para os reatores R1S e R2S. Foram encontrados altos HY de 1,6 mmol EtOH.g⁻¹ DQO e de 1,78 mmol EtOH.g⁻¹ DQO na fase 1, para os reatores R1S e R2S. Porém, os maiores EtOHY de 2,8 mmol EtOH.g⁻¹ DQO e 3,5 mmol EtOH.g⁻¹ DQO foram obtidos na fase 4. A relação entre HY e EtOHY, ou seja, a seletividade, mostra que para as fases 1 (100% de glicose) e 4 (100% soro de queijo) a relação entre os rendimentos foi inferior a 1, resultando em um predomínio de EtOHY sobre HY. Em contrapartida, para as fases 2 e 3, com uma seletividade maior que 1, resultou no predomínio do HY sobre o EtOHY, sendo que para a fase 2, a seletividade chegou a 54 no R1S, devido as baixas produções de etanol nesta fase.

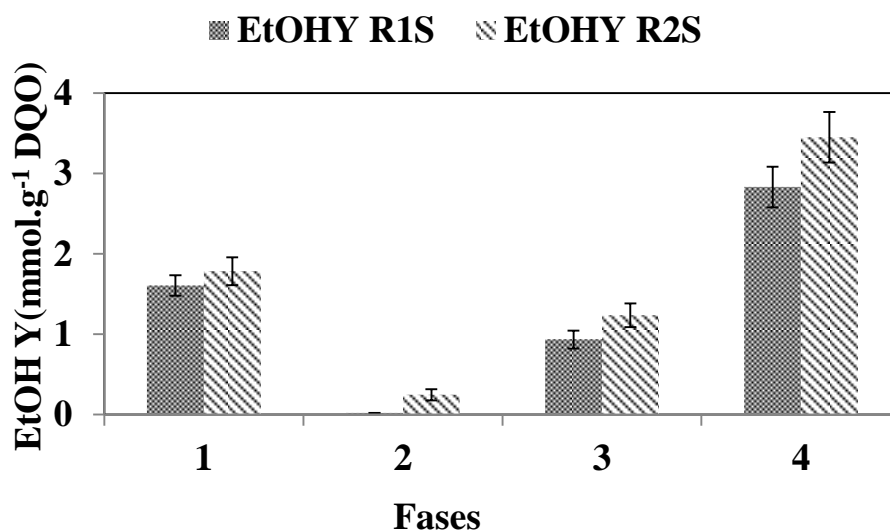


Figura 4.29 – Rendimento de etanol em cada fase para os reatores R1S e R2S.

4.5.2 Reatores com soro de queijo: R3S, R4S, R5S e R6S

Na Figura 4.30 são mostrados os principais metabólitos solúveis encontrados nos reatores R3S e R4S. Metanol, etanol, ácido acético, butírico e propiônico também predominaram nos dois reatores.

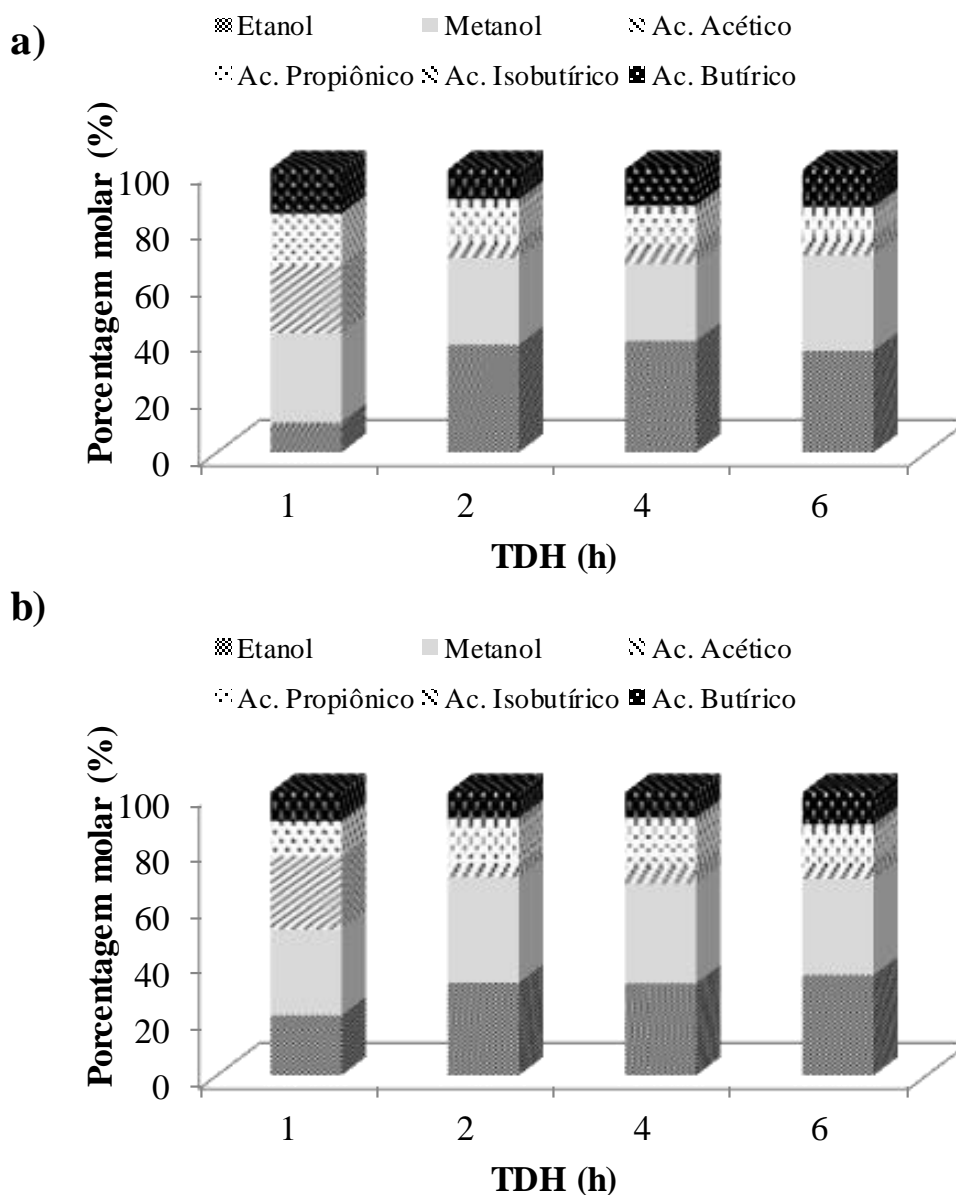


Figura 4.30 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH: a) R3S b) R4S.

Na Tabela 4.17 é mostrada a porcentagem molar média, e na Tabela 4.18 são mostradas as concentrações médias (mg.L^{-1}) dos principais metabólitos solúveis encontrados nos reatores R3S e R4S.

A partir da redução do TDH de 6 para 2 h, o etanol variou de 35% a 39% (R3S) e de 32% a 36% (R4S), mas com a redução de TDH para 1 hora, houve uma queda acentuada para 10% (R3S) e para 21% (R4S). Esta queda de etanol foi refletida no HY, que também teve uma diminuição acentuada. Já o metanol não sofreu grandes variações, com medias de 30% e de

34% para o R3S e R4S, respectivamente. O ácido butírico também se manteve estável com médias de 13% e de 10% para o reator R3S e R4S, respectivamente.

Tabela 4.17 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para os reatores R3S e R4S.

R3S (lodo de suínos)						
TDH	EtOH	MetOH	HAc	HPr	HIBu	HBu
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
6	35,9	33,6	6,2	9,2	1,6	13,2
4	39,3	27,2	6,9	12,1	1,4	12,8
2	37,9	30,5	5,5	13,5	1,5	10,5
1	10,5	31,5	23,9	18,2	0	15,7
R4S (lodo de aves)						
6	35,3	34,0	5,6	11,6	1,7	11,4
4	32,4	35,1	6,6	15,2	1,3	9,1
2	32,6	37,2	5,0	14,1	1,7	9,1
1	21,1	30,5	25,7	12,4	0	10,1

EtOH: etanol; MetOH: metanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIBu: ácido isso-butírico; HBu: ácido butírico

Tabela 4.18 – Concentração dos principais metabólitos solúveis para os reatores R3S e R4S.

R3S (lodo de suínos)						
TDH	EtOH	MetOH	HAc	HPr	HIBu	HBu
(h)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
6	571,3±45,8	372,9±33,7	129,3±14,8	237,4±21,7	49,2±3,8	404,5±45,7
4	505,5±43,6	243,8±29,4	116,1±9,4	250,5±16,4	35,2±2,7	316,1±35,8
2	486,2±51,7	273,0±29,1	98,2±13,2	279,0±11,6	38,2±4,8	259,3±28,4
1	86,0±10,4	179,3±19,7	255,0±289,4	239,4±15,7	0	245,3±22,7
R4S (lodo de aves)						
6	542,4±51,7	363,0±33,1	113,2±9,4	288,2±22,7	52,6±49,2	336,9±29,5
4	415,0±47,9	312,5±27,9	111,4±10,5	314,3±29,3	33,5±29,5	220,2±25,7
2	468,0±56,2	371,2±39,7	95,9±9,1	327,4±37,4	47,4±36,8	252,0±19,5
1	321,1±34,8	322,4±35,3	510,2±54,9	304,4±33,7	0	295,3±32,4

EtOH: etanol; MetOH: metanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIBu: ácido isso-butírico; HBu: ácido butírico

Para o TDH de 1 hora, houve um acúmulo de ácido propiônico (18,2%) para o R3S. Este mesmo comportamento não foi verificado no R4S, que teve pequenas oscilações de ácido propiônico (12-15%). Mesmo encontrando concentrações de ácido propiônico, possivelmente outras rotas metabólicas favoráveis a produção de hidrogênio como etanol, acetato e butirato, prevaleceram sobre a rota do propiônico, obtendo resultados de rendimento satisfatórios quando comparados com a literatura. Além disso, neste TDH, houve o acúmulo de ácido acético de 7 para 23,9% (R3S) e de 5 para 25,8% (R4S), prejudicando o desempenho dos reatores.

Os maiores HY foram obtidos no TDH de 4 horas, para ambos os reatores. Para este TDH foram encontrados altos valores de etanol, atribuindo este fato a predominância da rota aceto-alcoólica (Equação 2.16), assim como nos reatores R1S e R2S. Na Figura 4.31 é mostrado o rendimento de etanol (EtOHY) ao longo das fases para os reatores R3S e R4S. Foram encontrados rendimentos máximos de 1,6 mmol EtOH.mol⁻¹ lactose (2,5 mmol EtOH.g⁻¹ DQO) e de 1,7 mmol EtOH.mol⁻¹ lactose (2,4 mmol EtOH.g⁻¹ DQO) com um TDH de 6 horas, para os reatores R3S e R4S. Estes valores são superiores, mas semelhantes aos obtidos no TDH de 4 e 2 horas.

Para os TDH de 6, 4 e 2 h, a rota para a produção simultânea de hidrogênio e etanol foi favorável. Para o reator R3S a seletividade foi próxima a 1, mostrando valores semelhantes entre HY e EtOHY para estes TDHs. Em contrapartida, apenas o TDH de 1 hora não foi favorável à produção de etanol devido à queda deste metabolito para este TDH. Já o reator R4S apresentou uma seletividade maior que 1, ou seja, HY superiores ao de etanol, apenas no TDH de 4 horas, enquanto que para os demais TDHs, o EtOHY foram superiores ao YH.

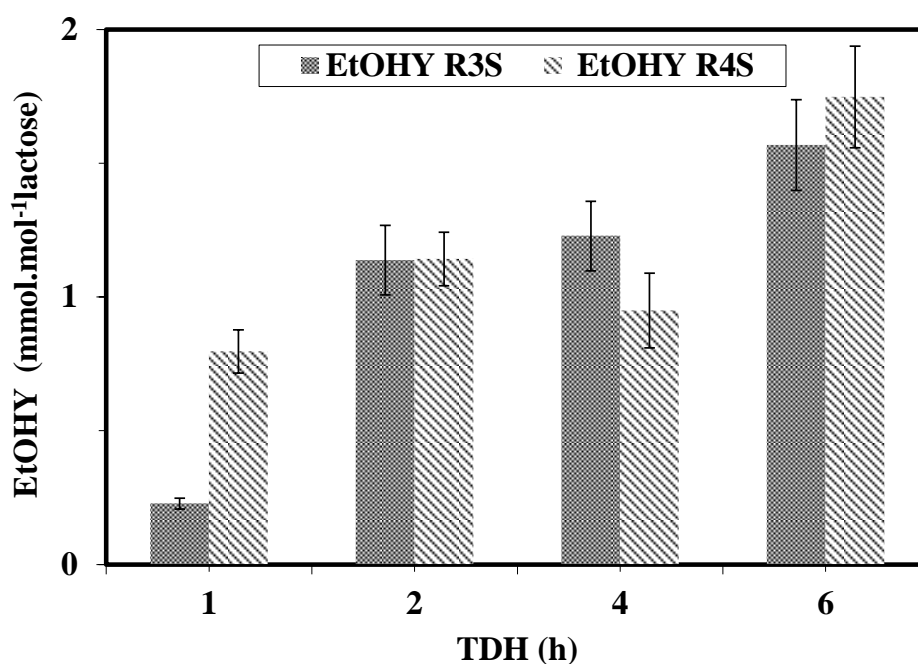


Figura 4.31 – Rendimento de etanol em cada TDH aplicado para os reatores R3S e R4S.

Na Figura 4.32 são mostrados os principais metabólitos solúveis encontrados nos reator R5S. A partir da redução do TDH de 14 para 10 h, o etanol variou de 20% a 29%, mas com a redução de TDH para 8 h, houve uma queda para 15%, resultando em uma queda no HY. O metanol e ácido butírico se mantiveram estável, variando de 17% a 21% e de 20% a 29%, respectivamente. Já o ácido acético teve uma queda de 31% para 17% a partir da redução do TDH de 14 para 12 h. Porém, para os demais TDHs houve um aumento com médias de 27%. Para o ácido propiônico, a redução do TDH de 14 para 8h, resultou em um acúmulo de HPr de 1% para 16%.

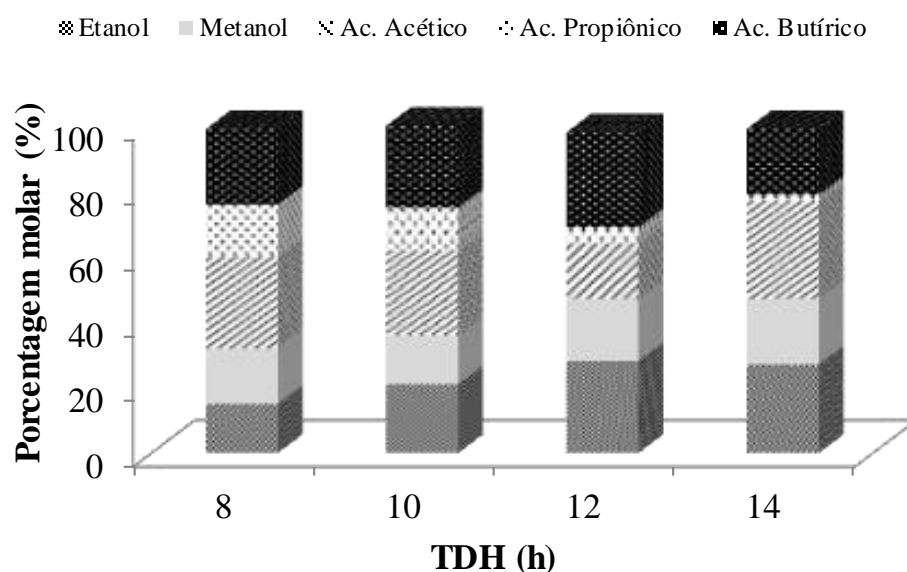


Figura 4.32 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH par o reator R5S.

Na Tabela 4.19 é mostrada a porcentagem molar média, e na Tabela 4.20 são mostradas as concentrações médias (mg.L^{-1}) dos principais metabólitos solúveis encontrado no reator R5S.

Tabela 4.19 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R5S.

TDH	EtOH (%)	MetOH (%)	HAc (%)	HPr (%)	HBu (%)
14	27,3	21,5	30,1	1,3	20,1
12	28,9	20,3	17,9	5,7	29,4
10	21,3	15,7	26,4	13,4	24,4
8	15,1	17,5	28,7	16,7	23,3

EtOH: etanol; MetOH: metanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico

Tabela 4.20 – Concentração dos principais metabólitos solúveis para o reator R5S.

TDH	EtOH (mg.L^{-1})	MetOH (mg.L^{-1})	HAc (mg.L^{-1})	HPr (mg.L^{-1})	HBu (mg.L^{-1})
14	298,2±22,5	157,6±12,9	436,1±39,4	23,6±1,6	426,9±39,4
12	329,6±29,5	162,4±14,7	266,4±22,5	98,4±7,5	653,5±55,1
10	260,5±21,2	130,9±11,4	429,4±38,3	261,77±1,9	582,6±39,5
8	161,4±11,6	127,7±19,4	391,3±31,6	278,4±2,2	478,2±38,8

EtOH: etanol; MetOH: metanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico

Na Figura 4.33 é mostrado o rendimento de etanol (EtOH_Y) ao longo das fases para o reator R5S. Para o TDH d 14 e 12 h, foram encontrados os máximos rendimentos de etanol de 0,65 mol.mol⁻¹ lactose (1,5 mmol EtOH.g⁻¹ DQO), sendo valores inferiores ao obtidos pelo R3S e R4S.

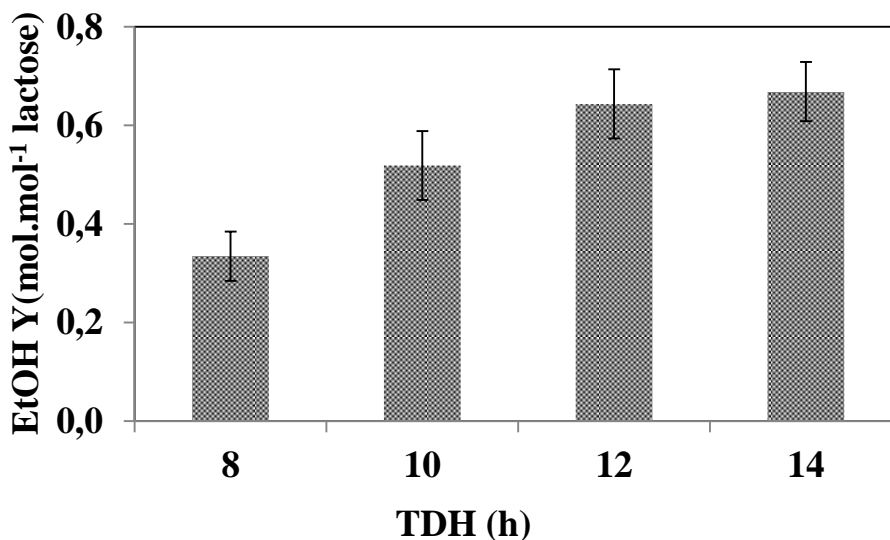


Figura 4.33 – Rendimento de etanol em cada TDH aplicado para o reator R5S.

Na Figura 4.34 são mostrados os principais metabólitos solúveis encontrados nos reator R6S. A partir do aumento da TCO de 12 para 40 kg.m⁻³.d⁻¹, houve uma queda de etanol de 38 para 12%, que foi acompanhada pela queda de HY. O metanol e ácido butírico variaram de 19% a 31% e de 14% a 19%, respectivamente. Já o ácido acético teve um acúmulo de 15 para 38% a partir do aumento da TCO de 12 para 40 kg.m⁻³.d⁻¹, prejudicando o desempenho do reator, assim como foi discutido anteriormente para o TDH de 1 h nos reatores R3S e R4S. Para o ácido propiônico, apenas na TCO de 12 kg.m⁻³.d⁻¹ os valores foram inferiores a 1%, sendo que para as demais TCOs variaram entre 10% a 14%.

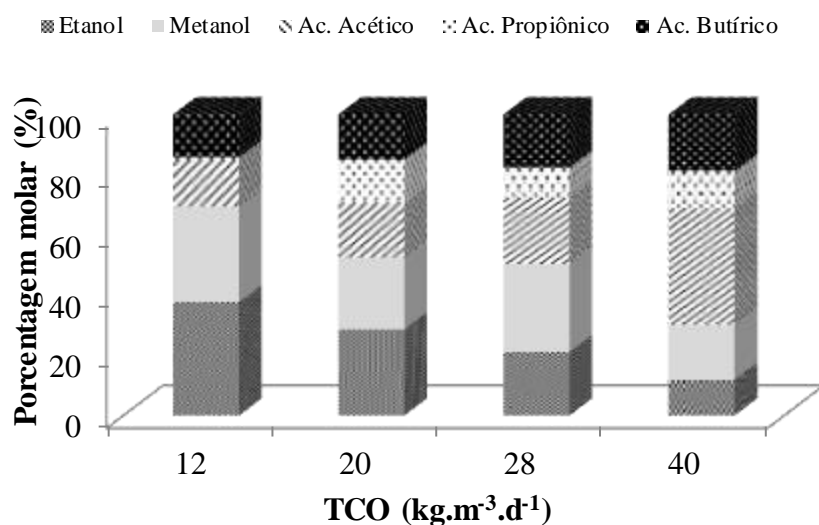


Figura 4.34 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH par o reator R6S.

Na Tabela 4.21 é mostrada a porcentagem molar média, e na Tabela 4.22 são mostradas as concentrações médias (mg.L⁻¹) dos principais metabólitos solúveis encontrado no reator R6S.

Tabela 4.21 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R6S.

TCO	EtOH (%)	MetOH (%)	HAc (%)	HPr (%)	HBu (%)
12	38,6	32,2	16,6	0,8	14,1
20	27,5	24,5	18,5	14,3	15,5
28	21,9	29,4	22,6	10,8	16,4
40	12,2	18,9	38,2	13,1	19,4

EtOH: etanol; MetOH: metanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico

Tabela 4.22 – Concentração dos principais metabólitos solúveis para o reator R6S.

TCO	EtOH (mg.L ⁻¹)	MetOH (mg.L ⁻¹)	HAc (mg.L ⁻¹)	HPr (mg.L ⁻¹)	HBu (mg.L ⁻¹)
12	452,5±39,9	265,6±29,9	245,3±21,6	16,4±2,2	327,4±30,5
20	465,4±41,4	268,4±21,4	387,3±33,6	374,2±32,5	466,9±43,2
28	305,6±29,1	296,6±33,4	416,9±39,5	263,8±21,4	489,8±4,4
40	240,2±23,3	260,8±23,6	413,2±35,7	413,1±42,2	729,6±5,8

EtOH: etanol; MetOH: metanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HBu: ácido butírico

Na Figura 4.35 é mostrado o rendimento de etanol (EtOH_Y) ao longo das fases para o reator R6S. O máximo EtOH_Y de 1,25 mol.mol⁻¹ lactose (3,28 mmol EtOH.g⁻¹ DQO), foram encontrados na menor TCO aplicada (12 kg.m⁻³.d⁻¹). Observa-se que as maiores TCOs inibiram tanto a produção de hidrogênio como a produção de etanol, e para a maior TCO aplicada (40 kg.m⁻³.d⁻¹) resultou em menor EtOH_Y de 0,33 mol.mol⁻¹ lactose (0,53 mmol EtOH.g⁻¹ DQO).

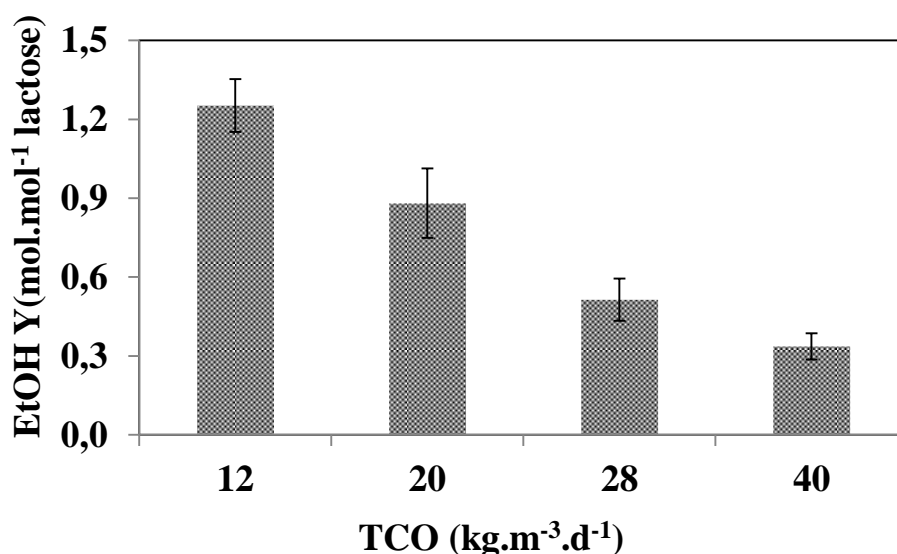


Figura 4.35 – Rendimento de etanol em cada TCO aplicada para o reator R6S.

Observa-se que a via metabólica da produção de hidrogênio e etanol, foi fortemente influenciada pela redução do TDH e/ ou aumento da TCO. Para os quatro reatores com soro de queijo, as maiores TCOs aplicadas, resultaram em uma inibição da produção de hidrogênio e etanol. Além disso, para os reatores R3S, R4S e R6S, nas maiores TCOs aplicadas houve

um acúmulo de HAc. Este acúmulo de ácidos afetou o rendimento de hidrogênio, assim como é relatado por outros autores (Searmsirimongkol et al., 2011; Singh et al., 2013a).

Van Ginkel e Logan (2005) relatam o efeito inibitório do ácido acético e butírico, adicionando 25 mM destes ácidos na alimentação do reator contínuo, tendo como substrato a glicose e verificaram a redução do rendimento de hidrogênio de 13% com ácido acético e 22 % ácido butírico, atribuindo esta diminuição de rendimento devido a este fato. Verificaram também que com os valores menores de concentração de glicose (10 a 30 g/L), a auto produção de ácidos voláteis era menos favorecida assim um melhor rendimento de hidrogênio, que foi constante na faixa de 2 mol H₂. mol⁻¹ glicose.

O acúmulo de acetato com o TDH de 1 h (R3S e R4S) e na TCO de 40 kg.m⁻³.d⁻¹ (R6S),ativou o metabolismo das bactérias homoacetogênicas, que são consumidoras de H₂, resultando nos menores rendimentos de hidrogênio. Segundo Siritwongrungron et al. (2007), o acetato formado na acetogênese pode ser um consumidor de hidrogênio, a partir da redução do H₂ a CO₂ (Eq. 4.2).



Assim como neste trabalho a homoacetogenese já foi observada, em RALF. Barros e Silva (2012) observaram um aumento de ácido acético e uma queda de produção de hidrogênio, quando passaram seu TDH para 1 hora com material suporte poliestireno, atribuindo o consumo de hidrogênio pelas bactérias homoacetogênicas.

4.5.3 Reatores com glicose e manipueira bruta: R1M e R2M

Na Figura 4.36 a-b é mostrado os principais metabólitos solúveis encontrados nos reatores R1M e R2M. Metanol, etanol, ácido acético, butírico e propiônico predominaram nos dois reatores.

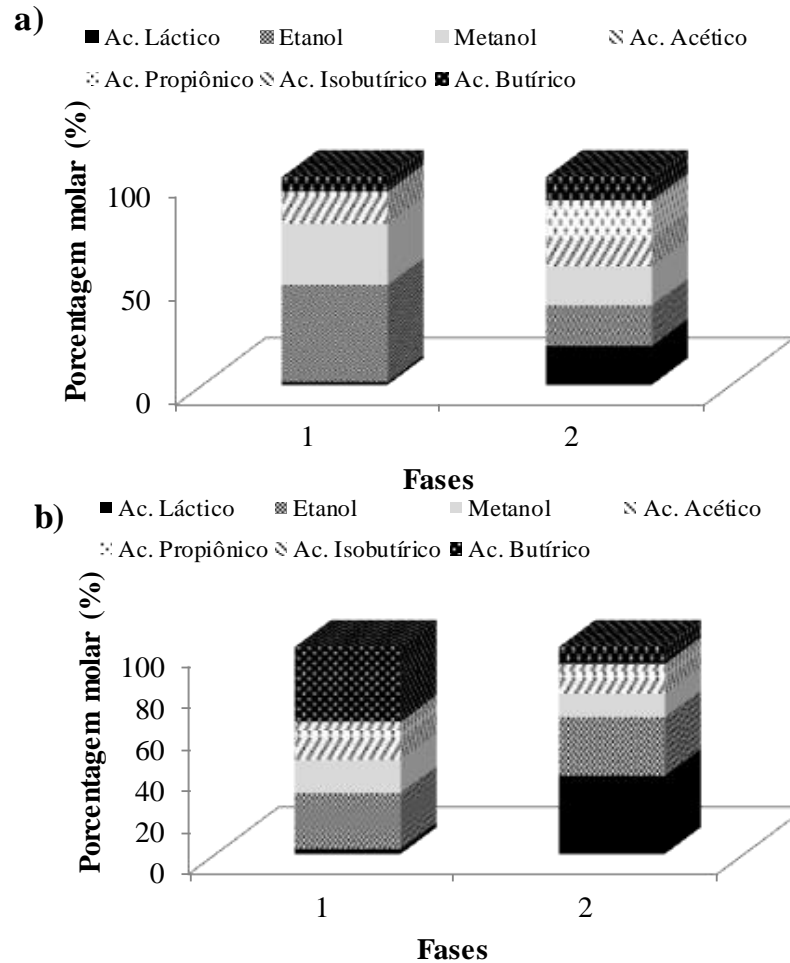


Figura 4.36 – Metabólitos solúveis produzidos em cada fase: a) R1M b) R2M.

Na Tabela 4.23 é mostrado a porcentagem molar e na Tabela 4.24 é mostrado em termos de concentração (mg.L^{-1}) dos principais metabólitos solúveis encontrados nos reatores R1M e R2M, respectivamente. Para o reator R1M na fase 1, os principais metabólitos foram: etanol (46%), metanol (30%), ácido acético e láctico (14%). Já na fase 2, com a introdução de 50% de manipueira bruta houve o predomínio de etanol, ácido láctico e metanol (todos com 18%), e ácido acético (13%).

Tabela 4.23 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para os reatores R1M e R2M.

Fases	HAl ^a	EtOH ^b	MetOH ^c	HAc ^d	HPr ^e	HIBu ^f	HBu ^g
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	1,4	46,6	29,3	14,3	0,4	0,8	6,9
2	18,7	19,4	18,8	13,5	17,0	1,1	11,1
R2M							
1	2,3	27,0	15,7	11,2	3,3	4,0	36,9
2	37,7	19,4	11,1	7,8	2,9	3,5	8,3

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido iso-butírico; ^gácido butírico

Tabela 4.24 – Concentração dos principais metabólitos solúveis (mg.L⁻¹) para os reatores R1M e R2M.

R1M							
Fases	HAl ^a	EtOH ^b	MetOH ^c	HAc ^d	HPr ^e	HIBu ^f	HBu ^g
1	23,4±2,1	390,5±46,3	170,9±22,1	156,1±18,7	5,7±1,1	13,5±2,4	110,9±11,2
2	379,6±37,3	199,2±21,8	134,3±9,3	181,7±25,3	280,6±25,2	22,4±3,1	218,5±26,2
R2M							
1	38,0±4,5	219,7±26,2	88,9±12,3	118,9±14,1	43,1±4,7	63,3±5,1	563,0±61,9
2	1242,2±99,3	478,8±71,8	130,9±14,3	172,5±13,7	80,9±9,7	115,0±12,6	267,8±32,1

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido iso-butírico; ^gácido butírico

Para o reator R2M na fase 1 houve o predomínio de ácido butírico (36%), etanol (27%), metanol (15%) e ácido acético (11%). Na fase 2 houve um predomínio de ácido láctico (37%), etanol (29%), metanol (11%), ácido acético e butírico (8%).

Para a fase 1, a rota alternativa para a produção de etanol e ácido acético, vem sendo uma possibilidade de rota para esta fase. Com a introdução da manipueira bruta (fase 2) não só a produção de hidrogênio foi afetada, mas houve um acúmulo de ácidos, e o aumento da quantidade de ácido láctico e a queda de etanol em ambos os reatores, prejudicou a produção de hidrogênio. Além disso, para o reator R1M a via do ácido propiônico parece ter sido prevalecida, resultando num consumo de 2 moles de H₂ para cada mol de ácido propiônico.

Na Figura 4.37 é mostrado o rendimento de etanol (EtOH_Y) ao longo das fases para os reatores R1M e R2M. Na fase 1 (100% de glicose), foram encontrados rendimentos máximos de 1,9 mmol EtOH.g⁻¹ DQO (R1M) e de 0,9 mmol EtOH.g⁻¹ DQO. Com introdução da manipueira bruta, os EtOH_Y foram de 1,0 e 2,1 mmol EtOH.g⁻¹ DQO, para os reatores R1M e

R2M, respectivamente. Observa-se que para o reator inoculado com lodo proveniente do abatedouro de aves (R2M), a introdução da manipueira ao meio de alimentação resultou em um efeito positivo sobre a produção de etanol, com um aumento de 2,3 vezes mais de EtOHY.

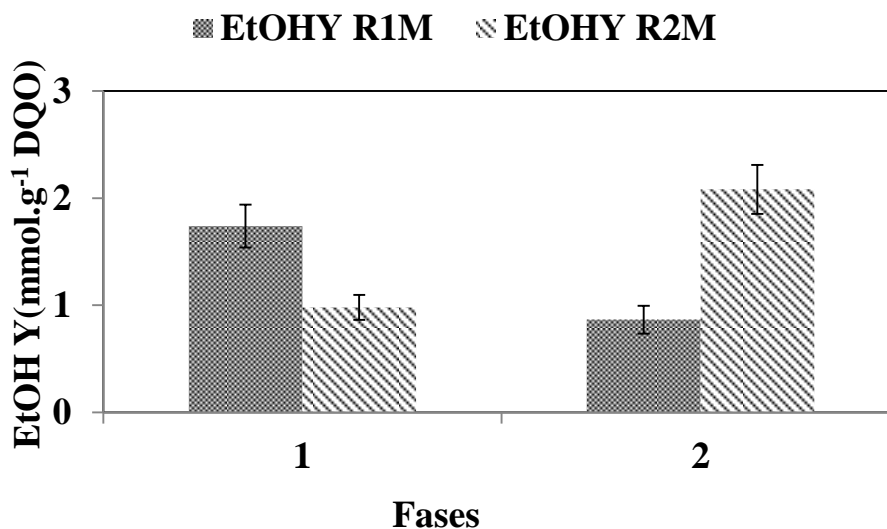


Figura 4.37 – Rendimento de etanol em cada fase para os reatores R1M e R2M.

4.5.4 Reatores com glicose e manipueira hidrolisada: R3M e R4M

Na Fig. 4.38 é mostrada a porcentagem molar de metabolitos solúveis produzidos para o R3M (Fig. 4.21a) e R4M (Fig. 4.21b). Metanol (0-22%; 0-26%), etanol (0-51%; 0-55%), ácido acético (3-12%; 4-17%), butírico (8-14%; 16-36%) e láctico (3-65%; 2-53%) predominaram nos dois reatores. De acordo com a redução do TDH 10-2h houve um aumento de ácido láctico de 3,2 para 65,93% (R3M) e de 2 para 53% (R4M) e uma queda de etanol de 42% para 0 (R3M) e de 22% para 0 (R4M). As porcentagens de ácido butírico (8-14%; 16-36%) foram superiores as concentrações de ácido acético (3-12%; 4-17%), para os reatores R3M e R4M, respectivamente. Ácido propiônico foi detectado com valores inferiores a 10%.

Para o reator R3M, a aplicação do TDH de 10 e 8 horas, indica que a principal rota metabólica foi a rota do etanol-acetado, assim como nos reatores com soro de queijo, com uma soma de etanol e acetado superior a 48% da soma dos metabolitos solúveis (SMP). Este mesmo comportamento ocorre no R4M, com a aplicação do TDH de 6 horas, e um SMP superior a 55% de etanol e acetato.

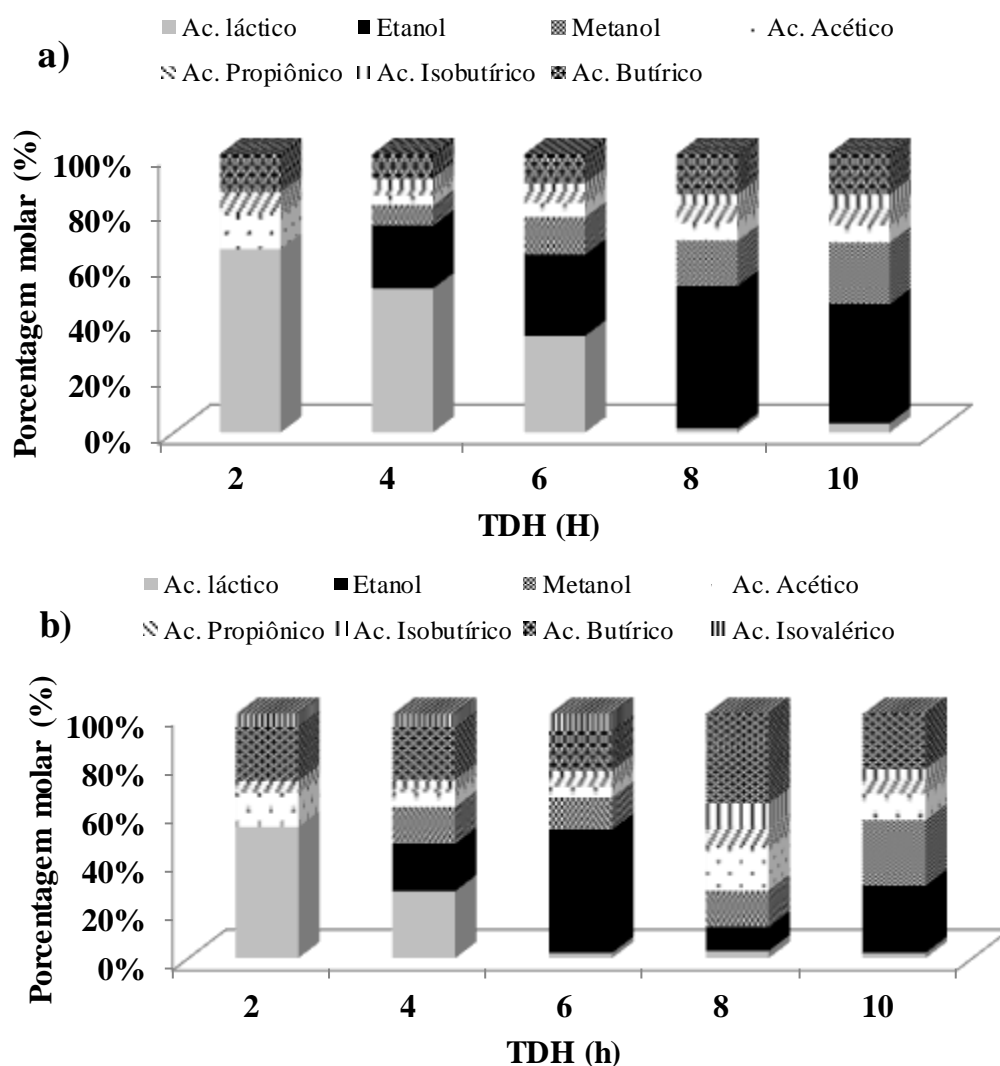


Figura 4.38– Metabólitos solúveis produzidos em cada fase: a) R3M b) R4M.

Na Tabela 4.25 são apresentadas as porcentagens molares e na Tabela 4.26 a concentração média ao longo das fases para os dois reatores. Os valores diferenciados de etanol nos TDHs 10, 8 e 6 horas foram determinantes para mostrar os diferentes comportamentos entre os lodos proveniente das águas residuárias de suinocultura (R3M) e do abatedouro de aves (R4M), resultando em diferentes comportamentos de HY. Enquanto a máxima concentração de etanol (493 mg.L^{-1}) do reator R3M foi obtida no TDH de 8 horas, para o reator R4M foi obtido o menor valor de etanol neste TDH. Além disso, o aparecimento do ácido isovalérico apenas para o R4M tornou ainda mais acentuada esta diferença.

Tabela 4.25 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para os reatores R3M e R4M.

R3M (lodo de suínos)								
TDH	HAl ^a	EtOH ^b	MetOH ^c	HAc ^d	HPr ^e	HIBu ^f	HBu ^g	HIVa ^h
(h)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
10	3,2	42,8	22,1	6,1	7,0	4,0	14,5	0
8	1,3	51,2	16,2	6,3	7,6	2,5	14,5	0
6	34,6	29,2	13,4	4,9	5,3	1,8	10,5	0
4	51,6	22,5	7,3	3,4	3,0	2,9	8,9	0
2	65,9	0	0	11,8	8,3	0	13,8	0
R4M (lodo de aves)								
10	2,0	27,6	26,9	10,6	7,0	3,0	22,7	0
8	2,8	9,8	14,9	17,3	9,2	9,0	36,6	0
6	2,0	55,1	13,2	4,2	5,1	1,3	16,3	7,1
4	27,3	19,4	15,0	5,8	3,2	1,7	21,7	5,5
1	53,6	0	0	14,0	5,0	0	22,0	5,4

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido iso-butírico; ^gácido butírico; ^hácido isovalérico

Comparando os desempenhos dos reatores R1M e R2M (com glicose e manipueira pura) com os reatores R3M e R4M (com glicose e manipueira hidrolisada) a diferença é bem acentuada em relação ao ácido láctico e etanol. Com um TDH aplicado de 8 horas, onde ambos os experimentos foram operados, o reator R3M a quantidade de ácido láctico e propiônico foram bem menores que quando comparados com a manipueira bruta, e isso favoreceu o desempenho deste reator. Este mesmo comportamento foi verificado no reator R4M para o ácido láctico, justificando assim o predomínio de rotas metabólicas favoráveis a produção de H₂, resultando em uma maior estabilidade do sistema para se produzir hidrogênio com a manipueira hidrolisada.

Tabela 4.26 – Concentração dos principais metabólitos solúveis para os reatores R3M e R4M.

R3M (lodo de suínos)								
TDH (h)	HAl ^a (mg.L ⁻¹)	EtOH ^b (mg.L ⁻¹)	MetOH ^c (mg.L ⁻¹)	HAc ^d (mg.L ⁻¹)	HPr ^e (mg.L ⁻¹)	HIBu ^f (mg.L ⁻¹)	HBu ^g (mg.L ⁻¹)	HIVa ^h (mg.L ⁻¹)
10	72,5±10,7	486,3±4,7	174,9±20,8	90,6±13,5	128,2±1 4,7	87,8±11,5	315,4±28, 9	0
8	25,2±4,5	493,7±4,9	108,7±12,9	80,0±7,3	118,7±1 0,2	47,5±6,4	267,5±29, 1	0
6	783,3±70,4	318,5±47, 7	101,5±9,2	70,9±11,4	93,3±11 ,1	37,8±5,5	219,1±32, 6	0
4	1261,5±100 ,8	282,0±42, 3	64,0±7,6	56,0±8,4	62,0±9, 5	70,0±9,6	213,5±19, 1	0
2	1239,1±111 ,5	0	0	149,0±23, 8	129,3±1 8,5	0	254,4±45, 7	0
R4M (lodo de aves)								
10	37,9±4,6	265,4± 39,8	179,7±16, 1	133,2±11 ,9	108,3±19 ,4	55,6±6,7	418,1±9,4	0
8	25,0±3,2	43,5±8, 6	45,7±8,2	100,0±30 ,3	65,6±	76,0±9,6	309,3±45, 9	0
6	49,4±9,8	684,3± 68,4	124,7±14, 8	75,5±8,2	90,2	34,8±5,5	422,3±54, 6	248,2±25,7
4	499,5±54,8	190,3± 38,4	102,6±14, 3	75,1±12, 4	82,6	33,2±7,5	406,6±45, 6	104,8±24,3
2	1007,2±11,0	0	0	176,3±28 ,1	99,1	0	414,5±54, 6	126,1±11,6

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido iso-butírico; ^gácido butírico; ^hácido isovalerico

Na Figura 4.39 é mostrada o EtOHY para cada TDH aplicado, nos dois reatores, exceto para o TDH de 2 horas onde não foi verificada a produção de etanol. A degradação da glicose foi convertida principalmente em etanol, que resultou em rendimentos máximos de 2,1 mmol EtOH.g⁻¹ DQO no TDH de 8 e 10 horas (R3M) e de 3,0 mmol EtOH.g⁻¹ DQO no TDH de 6 horas (R4M). O lodo do abatedouro de aves (R4M) apresentou um maior potencial para a produção de hidrogênio, tendo 38% a mais de etanol que o lodo proveniente de águas residuárias de suinocultura (R3M).

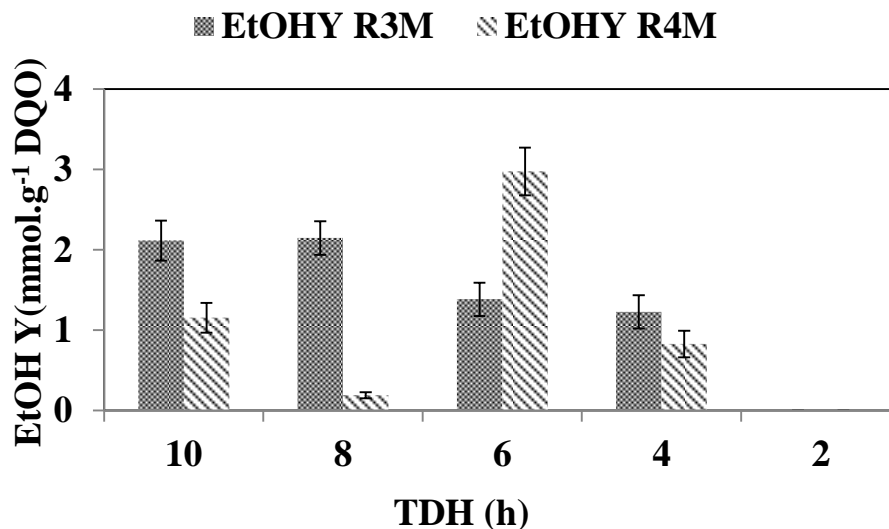


Figura 4.39 – Rendimento de etanol em cada TDH para os reatores R3M e R4M.

Na Fig. 4.40 é mostrada a seletividade, para os dois reatores de acordo com a variação do TDH. No reator R3M, apenas o TDH de 4 h favoreceu o HY, para os demais TDH foi favorável a produção de EtOH. Para o R4M os TDH de 10 e 8 foram favoráveis para o HY, e os HRT de 6 e 4 h foram favorável para o EtOH. Não foi verificada a produção de etanol em ambos os reatores para o TDH de 2 horas, e este fato prejudicou o HY, resultado em menores valores ($0.3 \text{ mmol H}_2\text{.g}^{-1} \text{ COD}$), inibindo a produção de hidrogênio.

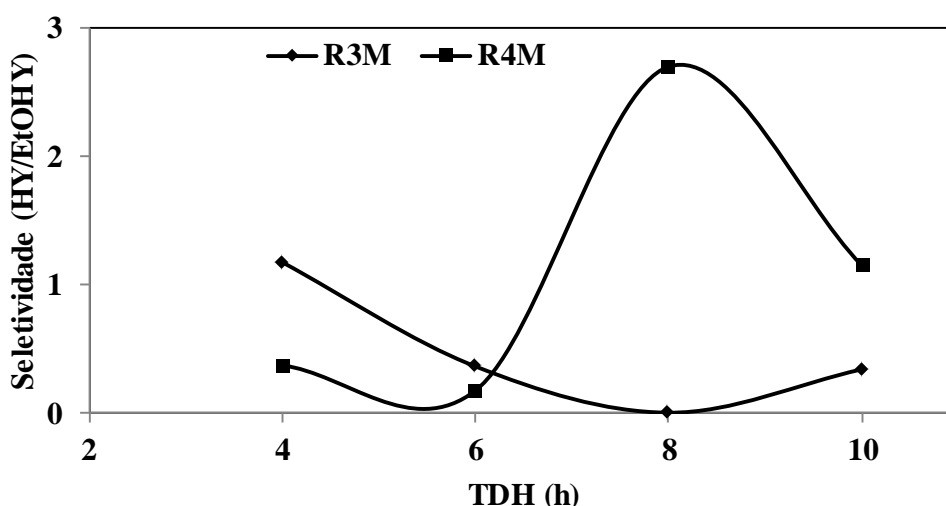


Figura 4.40 – Efeito do TDH sobre a seletividade para os reatores R3M e R4M.

Altos níveis de ácido láctico também foram obtidos a partir de misturas de vinhaça de mandioca e estrume de porco Wang et al. (2013b) de galactose e glicose (Rosales-Colunga et

al., 2012). Utilizando fontes ricas em amido, Arroj et al. (2008) também verificaram um aumento de ácido láctico (204 a 3263 mg.L⁻¹) com a redução de TDH (18 para 4 horas) quando avaliaram a produção de hidrogênio em reatores sequenciais bateladas, utilizando amido (20 g.L⁻¹) como substrato.

Akutsu et al. (2009a) ao avaliarem o efeito do TDH sobre a produção de hidrogênio em UASB, também obtiveram um aumento de ácido láctico de 0,1 a 46,4 mM quando abaixaram seu TDH de 48 para 6 horas, mostrando o mesmo comportamento deste estudo. Em outro trabalho, Akutsu et al. (2009 c) ao avaliarem a influência da concentração de amido como substrato na produção de hidrogênio, obtiveram com aplicação de 50 g.L⁻¹, etanol e o ácido láctico como principais metabólitos. Segundo os autores, a provável causa das altas concentrações de etanol foi o acúmulo de ácidos não dissociados.

4.5.5 Reatores com manipueira hidrolisada: R5M e R6M

Na Fig. 4.41 é mostrada a porcentagem molar de metabolitos solúveis produzidos para o R5M. Metanol (0-22%), etanol (15-46%), ácido acético (12-30%), butírico (12-23%), láctico (0-7%) e propiônico (5-15%) foram predominantes no reator. Para as fases de 1 a 4, o etanol e metanol se mantiveram estáveis, variando de 35- 40% e 14-17%, porém, na fase 5 reduziram para 15% e 8 %, respectivamente, refletindo também na queda de HY. Além disso, para a fase 5, fase com a maior TCO aplicada (12 kg.m⁻³.d⁻¹) foi verificada a presença de ácido valérico (18%) também prejudicando o desempenho dos reatores. O ácido láctico foi verificado apenas na fase 1, com 8%, não sendo mais detectado para as demais fases. As porcentagens de ácido acético (12-30%) foram superiores as concentrações de ácido butírico (12-24%). Ácido propiônico foi detectado com valores inferiores a 14%.

Na Tabela 4.27 são apresentadas as porcentagens molares e na Tabela 4.28 a concentração media ao longo das fases para o reator R5M. Para as fases de 1 a 4, a rota metabólica do etanol-acetado foi dominante, com uma soma de etanol e acetado de 65% da soma dos metabólitos solúveis (SMP).

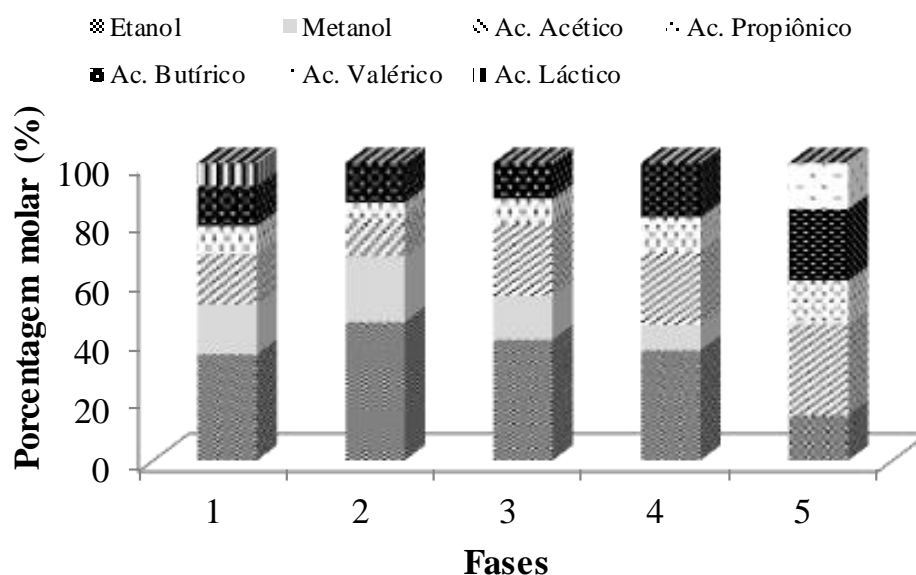


Figura 4.41 – Metabólitos solúveis produzidos em cada fase para o reator R5M.

Tabela 4.27 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R5M.

Fases	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	HAl ^a (%)	EtOH ^b (%)	MetOH ^c (%)	HAc ^d (%)	HPr ^e (%)	HBu ^f (%)	HVa ^g (%)
1	6	8,1	35,7	16,8	17,1	9,3	13,5	0
2	4	0	46,6	21,9	12,7	5,5	13,3	0
3	6	0	40,5	14,8	24,3	8,4	12,1	0
4	10	0	37,1	8,6	24,6	11,6	18,2	0
5	12	0	15,2	0	30,8	14,5	23,9	18

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido butírico; ^g ácido valérico.

Tabela 4.28 – Concentração dos principais metabólitos solúveis (mg.L⁻¹) para o reator R5M.

Fases	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	HAl ^a	EtOH ^b	MetOH ^c	HAc ^d	HPr ^e	HBu ^f	HVa ^g
1	6	160,4±11,4	378,8±3 1,6	123,5±18,3	237,4 ±22,4	160,3	273,4	0
2	4	0	250,2±2 19,4	146,2±11,3	160,3 ±11,5	85,2	244,1	0
3	6	0	383,5±3 3,5	97,3±10,5	299,4 ±	128,4	217,5	0
4	10	0	493,5±4 4,2	79,2±6,4	427,5	247,2	464,8	0
5	12	0	178,3±1 9,4	0	469,8	273,6	537,6	403,4

^aácido láctico; ^betanol; ^cmetanol; ^dácido acético; ^eácido propiônico; ^fácido butírico; ^g ácido valérico.

Na Figura 4.42 é mostrada o EtOHY para cada fase no reator R5M. O predomínio do etanol dentre todos os metabolitos solúveis, resultou em EtOHY máximos de 2,8 mmol.g⁻¹ DQO nas fases 1, 2 e 3. Na fase 5, onde foi aplicada a maior TCO, houve uma queda de EtOHY para 0,8 mmol.g⁻¹ DQO.

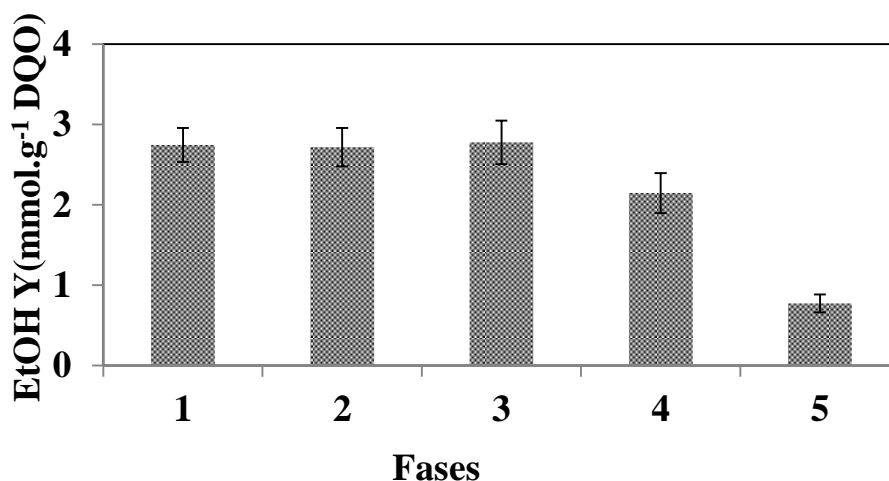


Figura 4.42 – Rendimento de etanol em cada fase para o reator R5M.

Na Fig. 4.43 é mostrada a porcentagem molar de metabolitos solúveis produzidos para o R6M. Etanol (0-54%), ácido acético (9-25%), butírico (0,6-37%), láctico (0-47%), valérico (0- 20%) e propiônico (2-21%) foram predominantes no reator. Com a redução de TCO da fase 1 para a fase 2, houve um aumento de 19 para 54% e de 0,6 para 11% de etanol e butírico, respectivamente. Também houve uma queda de 46 para 23% e de 19 para 2% de ácido láctico e propiônico, respectivamente. Com a retirada total da glicose do meio de alimentação (Fase 3), houve uma queda de etanol de 54 para 34%, e um aumento de 9 para 17% e de 10 para 20% de acético e butírico, respectivamente. Para as fases 4 e 5, as concentrações de ácido láctico e etanol chegaram a ser nulas, e houve o aparecimento do ácido valérico (14-19%).

⊗ Etanol ⊗ Ac. Acético ⊗ Ac. Propiônico ■ Ac. Butírico · Ac. Valérico ■ Ac. Lático

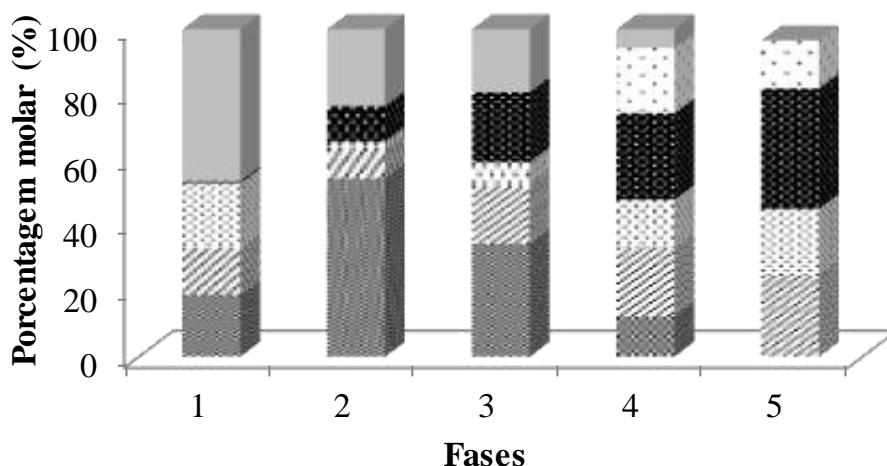


Figura 4.43 – Metabólitos solúveis produzidos em cada fase para o reator R6M.

Na Tabela 4.29 são apresentadas as porcentagens molares e na Tabela 4.30 a concentração média ao longo das fases para o reator R6M.

Tabela 4.29 – Porcentagem molar dos principais metabólitos solúveis para o reator R6M.

Fases	TCO ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	HAl ^a (%)	EtOH ^b (%)	HAc ^c (%)	HPr ^d (%)	HBu ^{te} (%)	HVa ^f (%)
1	30	46,4	18,9	14,3	19,6	0,6	0
2	14	23,5	54,3	9,3	1,9	10,8	0
3	14	21,2	34,5	17,4	7,4	21,4	0
4	18	6,1	12,2	21,1	14,7	26,3	19,8
5	22	0	6,1	24,7	20,5	36,7	14,5

^aácido láctico; ^betanol; ^cácido acético; ^dácido propiônico; ^eácido butírico; ^fácido valérico.

Tabela 4.30 – Concentração dos principais metabólitos solúveis (mg.L^{-1}) para o reator para o reator R6M.

Fases	TCO ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	HAl ^a	EtOH ^b	HAc ^c	HPr ^d	HBu ^e	HVa ^f
1	30	2227±198,4	486,4±4,4	480,8±42,8	808±64,6	30,3±28,4	0
2	14	1146±98,4	1354±126,6	305,4±29,4	76,7±5,5	518,5±45,6	0
3	14	857,3±90,4	787,6±72,5	518,6±55,7	271,6±2,1	936,7±90,1	0
4	18	120,4±10,4	248,8±29,4	557,5±59,5	480,3±39,4	1024±97,4	893,2±74,9
5	22	0	0	501,5±47,5	513,5±44,6	1093±98,9	501,5±49,7

^aácido láctico; ^betanol; ^cácido acético; ^dácido propiônico; ^eácido butírico; ^fácido valérico.

Para os reatores R5M e R6M, mesmo com as diferentes estratégias operacionais, ambos tiveram a presença do ácido valérico. Segundo Saady et al. (2013), o ácido valérico pode diminuir o rendimento de hidrogênio durante a fermentação no escuro, utilizando cultura mista. Segundo os autores, a Equações 4.3 mostra a formação do ácido valérico, a partir do consumo de hidrogênio, justificando assim, os baixos valores de HY na fase 5 do reator R5M (0,68 mmol.g⁻¹ DQO) e nas fases 4 e 5 do reator R6M (0,2 e 0,01 mmol.g⁻¹ DQO).



Na Figura 4.44 é mostrada o EtOHY para cada fase no reator R6M. O predomínio do etanol na fase 2 resultou em um máximo EtOHY de todo o trabalho (4,2 mmol.g⁻¹ DQO). Apesar da queda de EtOHY na fase 3, os resultados ainda são satisfatórios, com EtOHY de 2,5 mmol.g⁻¹ DQO. O aumento da TCO de 14 para 22 kg.m⁻³.d⁻¹ (Fases 2-5) resultou em uma queda acentuada de etanol, chegando a ser nulo na fase 5. Hafez et al. (2010) também verificaram a presença do ácido valérico em seus reatores, ao avaliarem o impacto da TCO sobre a produção de hidrogênio. Em suas maiores TCOs (154 e 206 kg.m⁻³.d⁻¹), houve a presença de 10 e 172 mg.L⁻¹ deste ácido, resultando em uma queda de 2,8 mol.mol⁻¹ para 1,2 mol.mol⁻¹.

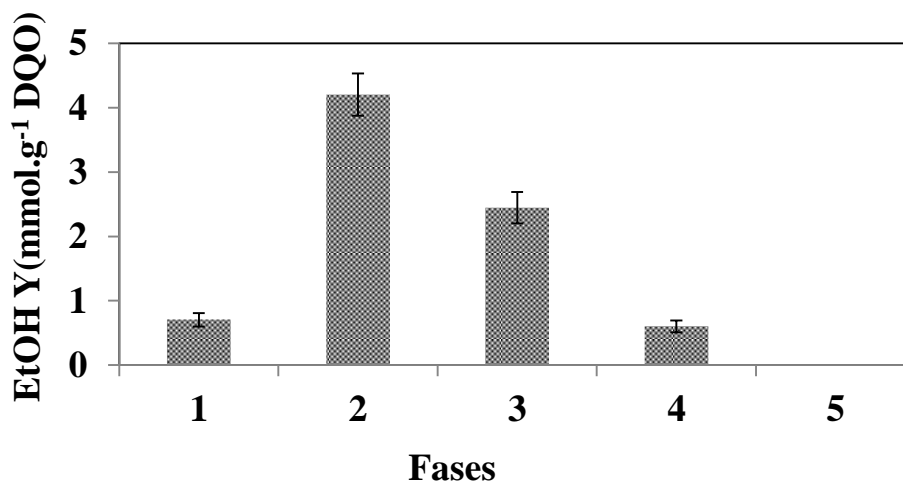


Figura 4.44 – Rendimento de etanol em cada fase para o reator R6M.

Na Fig. 4.45 é mostrada a seletividade, para os dois reatores R5M e R6M ao longo das fases operacionais. Nota-se que para todas as fases, a seletividade foi menor que 1, ou seja, as a operação dos reatores foram favoráveis para a produção de etanol, quando comparada a produção de hidrogênio. No reator R5M, as fases 4 e 5 ainda mostraram um equilíbrio entre

produção de hidrogênio e etanol. Em contrapartida, o reator R6M se mostrou favorável para a produção de etanol em todas as fases.

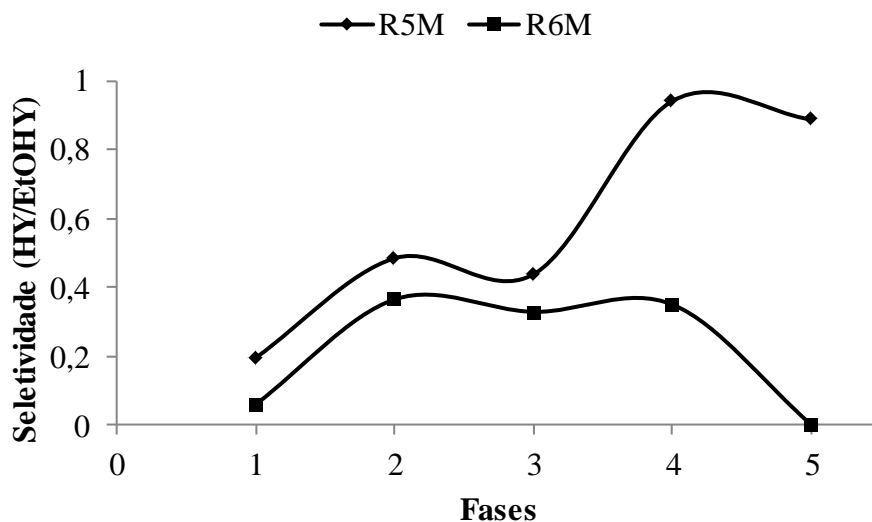


Figura 4.45 – Seletividade ao longo das fases operacionais para os reatores R5M e R6M.

4.6 Discussão sobre as melhores condições operacionais e fonte de carbono para a produção de hidrogênio e etanol.

Na Figura 4.46 é mostrada uma comparação entre os maiores HY para cada reator, a partir da mistura de glicose e soro de queijo (R1S e R2S), de soro de queijo (R3S, R4S, R5S e R6S), mistura de glicose e manipueira hidrolisada (R3M e R4M) e manipueira hidrolisada (R5M e R6M). Os maiores HY de $3,2 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ e $2,6 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ foram obtidos pelos reatores R6S (TCO de $12 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, TDH de 6 h) e R5S (TCO de $8,5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, TDH de 14h). O reator R4S teve HY de $2,5 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$, sendo superiores aos reatores R5M e R6M, que tiveram HY de 2 e $1,5 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$. Os maiores HY obtidos pelo uso do soro de queijo como substrato, pode ser explicado devido a complexidade da manipueira usada como fonte de carbono, quando comparada ao soro de queijo. Porém, todos estes HY são comparáveis com a literatura.

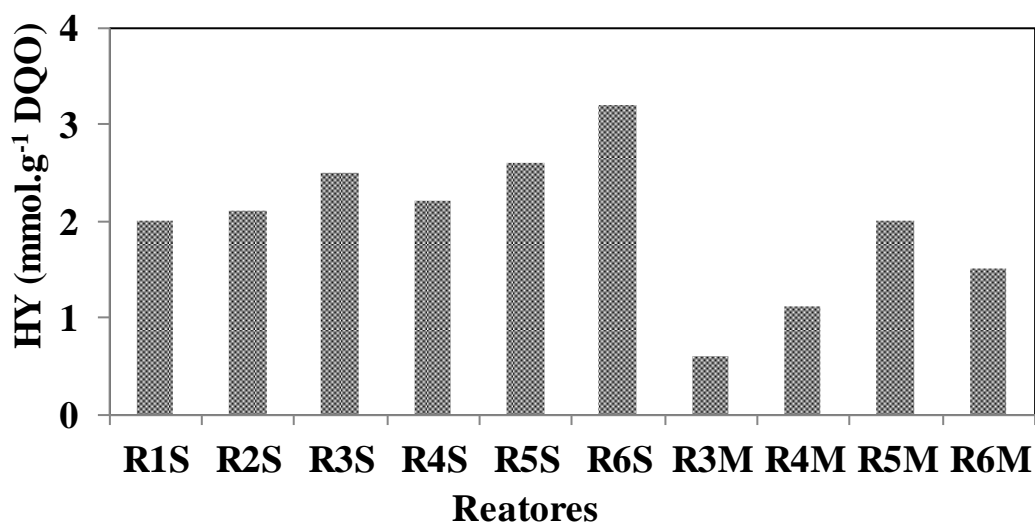


Figura 4.46 Comparação entre as melhores condições de cada reator para a produção de hidrogênio.

Na Tabela 4.31 são mostrados alguns estudos comparativos que utilizaram resíduos agroindustriais, como a água do processamento da maçã (Van Gilkel et al. 2005); águas residuárias de moinho de azeite (Eroglu et al., 2006), soro de queijo (Azbar et al., 2009; Yang et al., 2007), vinhaça (Guo et al., 2008; Ozkan et al., 2010), óleo de palma (Chong et al., 2009), melão condensado (Chu et al., 2011; Hsiao et al., 2009); águas residuárias de tapioca (Thanwised et al. 2012), entre outros. Para estes trabalhos, houve uma variação de HY de 0,54 a 6,12 mmol.g⁻¹ DQO, sendo que a maioria dos estudos utilizaram processo bateladas (Chong et al. 2009; Eroglu et al., 2006; Lay et al. 2013; Oskan et al. 2010; Shi et al. 2010; Van Gilkel et al. 2005).

Em trabalhos com soro de queijo, Yang et al. (2007) obtiveram HY de 3,2 mmol H₂. g⁻¹ DQO, semelhantes a este estudo, em TDH de 24 h, operando um reator CSTR. Ao avaliarem o efeito de diferentes TCO sobre a produção de H₂, os autores tiveram a detecção de metano, a mesma situação deste trabalho, e verificaram a queda de HY.

Lee et al. (2010) verificaram valores de HY de 1,7 mmol H₂. g⁻¹DQO (semelhantes ao R5M e R6M), em reator CSTR alimentado com resíduos vegetais de cozinha, com uma TCO aplicada de 28 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. Hsiao et al. (2009) obtiveram em fermentador de hidrogênio de fluxo contínuo até 2,0 mmol H₂. g DQO⁻¹ a partir de melão condensado, em concentração superior a deste estudo, ou seja, de 40 g COD.L⁻¹.

Chu et al. (2011) verificaram uma queda de HY de 5,3 para 1,52 mmolH₂.g⁻¹ DQO a partir da redução do TDH de 8 para 2 horas, utilizando uma concentração de 40g.L⁻¹ de melação condensado, em um biorreator anaeróbio continuamente agitado, resultados similares a este estudo.

Tabela 4.31 Produção de H₂ a partir de diferentes fontes de substratos, em comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

Água residuária	Reator/modo de operação	TCO (kg COD.m ⁻³ .d ⁻¹)	TDH (h)	HY (mmol.g ⁻¹ DQO)	Referência
Água do processamento da maçã	Batelada	-	-	4,08	Van Ginkel et al. (2005)
Águas residuárias de moinho de azeite	Batelada	-	-	0,54	Eroglu et al. (2006)
Soro de queijo	CSTR	14	24	3,21	Yang et al. (2007)
Vinhaça	EGSB	120	6-1	-	Guo et al., (2008)
Óleo de palma	Batelada	-	-	1,30	Chong et al. (2009)
Soro de queijo	CSTR	47, 35 e 21	24	9	Azbar et al. (2009)
Melaço condensado	fermentador de hidrogênio de fluxo contínuo	-	8	2	Hsiao et al. (2009)
resíduos vegetal de cozinha	CSTR	28	4 dias	1,7	Lee et al. (2010)
Vinhaça	Batelada	-	-	0,74	Ozkan et al. (2010) Lee 2010
Águas residuárias de cervejaria	Batelada	-	-	6,12	Shi et al., (2010)
Melaço desaçucarado	UASB	-	24	-	Kongjan et al. (2011)
Melaço condensado	biorreator anaeróbio continuamente e agitada	-	8-2h	5,3	Chu et al., (2011)
Água residuária de Tapioca	Reator anaerobio	16-130	24-3 h	0,74	Thanwised et al. (2012)
Tofu	Batelada	-	-	2,62	Lay et al. (2013)
Soro de queijo	RALF	12	6	3,2	Este estudo

Thanwised et al. (2012) utilizaram águas residuárias de tapioca para a produção de hidrogênio. Ao reduzirem o TDH de 24 para 12 horas, tiveram um aumento de HY de 0,40 mmol.g⁻¹ DQO para 0,74 mmol.g⁻¹ DQO, porém o HY caiu para 0,22 mmol.g⁻¹ DQO devido ao aparecimento do metano, assim como neste trabalho. Estes HY estão de acordo com os obtidos com o R3M, R4M e R5M que também utilizaram fontes ricas em amido.

Na Figura 4.47 é mostrada uma comparação entre os maiores EtOHY para cada reator, a partir da mistura de glicose e soro de queijo (R1S e R2S), de soro de queijo (R3S, R4S, R5S e R6S) e da mistura de glicose e manipueira hidrolisada (R3M e R4M). Os maiores EtOHY de 4,2 mmolEtOH.g⁻¹DQO e 3,45 mmolEtOH.g⁻¹DQO foram obtidos pelos reatores R6M e R2S, respectivamente.

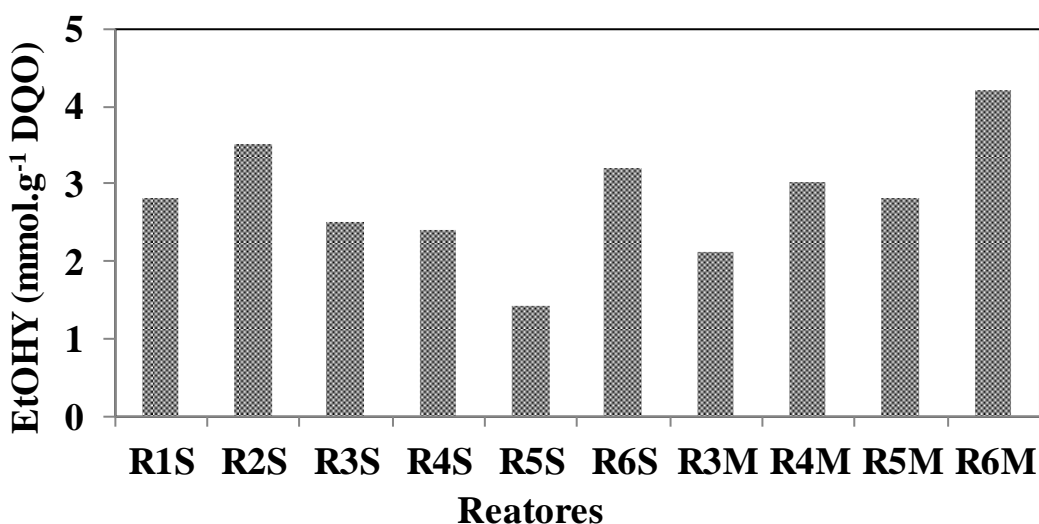


Figura 4.47 Comparação entre as melhores condições de cada reator para a produção de etanol.

A partir do uso de 50% de manipueira hidrolisada e 50% de glicose, com uma TCO de 14 kg.m⁻³.d⁻¹ (fase 2), o reator R6M apresentou o maior EtOHY do trabalho. Possivelmente, a redução de TCO de 30 para 14 kg.m⁻³.d⁻¹ favoreceu a produção de etanol. Já para o reator R2S, os elevados EtOHY de 3,45 mmolEtOH.g⁻¹DQO (1,98 mol.mol⁻¹ lactose) podem ser atribuídos a estratégia da introdução gradativa da soro de queijo. Com isso a biomassa presente, pode ter se adaptado melhor as novas condições impostas e isso favoreceu a produção de etanol. Além disso, os reatores R2S e R4M que tiveram os maiores EtOHY, foram inoculados com lodo proveniente do abatedouro de aves, mostrando um maior potencial para a produção de etanol, quando comparado com o lodo proveniente de águas residuárias de suinocultura.

Sistemas fermentativos que produzem uma quantidade significativa de gás e de biocombustíveis, como H₂ e etanol, são avaliados em termos da conversão energética derivada da combinação dos dois biocombustíveis (Han et al., 2012a) e embora a formação de álcoois consumidores de elétrons livres derivados do NADH estejam relacionados à produção desfavorável de hidrogênio, pode ser viável permitir um balanço de produção de ambos por meio da operação adequada da fermentação, seja a partir da glicose, ou a partir de resíduos agropecuários.

Altas concentrações de etanol concomitantes com a produção efetiva de hidrogênio também foram encontradas a partir do melão (Guo et al., 2008; Han et al., 2012a), celulose (Lin e Hung, 2008), batata doce (Lay et al., 2012b) e glicose (Barros e Silva, 2012; Karadag e Puhakka, 2010). A parte da produção de hidrogênio via rota metabólica da produção de etanol, a presença deste metabólito pode ainda reduzir a acidez em excesso no reator pela elevada quantidade de AVT, levando a um aumento na eficiência na produção de H₂ (Guo et al., 2008).

Karadag e Puhakka (2010) estudaram a produção de hidrogênio e etanol em reatores CSTR, a partir da glicose e tiveram um rendimento máximo de etanol de 0,67 mol EtOH.mol⁻¹ glicose, sendo estes valores de rendimentos sempre inferiores aos rendimentos de hidrogênio. Em reatores RALF, Barros e Silva (2012) obtiveram rendimentos próximos de 1,9 mol EtOH.mol⁻¹ a partir do uso do poliestireno, quando avaliaram o efeito de diferentes materiais suportes sobre a produção de hidrogênio.

A potencialidade do uso do soro de queijo para a produção de etanol já vem sendo relatada na literatura por Ozmihci e Kargi (2008) ao avaliaram a influência do TDH (17,6 a 64,4 h), sobre a produção de etanol verificaram um aumento linear da concentração de etanol e do TDH aplicado, até o limite de 50 h e obtiveram rendimentos máximos de 0,54 g EtOH.g⁻¹ substrato. Carrilo-Reyes et al. (2012) também obtiveram o etanol como seu maior metabólito solúvel, a partir do uso de soro de queijo como substrato.

4.7- Efeito do TDH sobre a comunidade microbiana

A análise de DGGE para a amplificação do gene RNAr 16S foi utilizado para comparar os perfis das comunidades bacterianas (Figura 4.48 a) e archaea (Figura 4.48b) nos reatores R3S e R4S durante 101 dias de operação, com os TDH aplicados de 4, 2 e 1 hora.

De maneira geral, foi possível distinguir dois grandes agrupamentos no gel de DGGE, sendo o primeiro relacionado com os perfis de bandas presentes nos inóculos, que tiveram

apenas 48% (correlação de Pearson) de similaridade em relação ao perfil de bandas presentes na comunidade bacteriana dos reatores. Este fato evidencia que ocorreram mudanças significativas na comunidade bacteriana ao longo da operação dos reatores RALFs mostrando que a biomassa presente no lodo sofreu grandes mudanças.

O segundo grupo, está relacionado com os perfis de bandas presentes na comunidade bacteriana dos reatores para os TDHs de 4, 2 e 1 hora. O reator R3S teve 86% de similaridade entre todos os TDH aplicados, enquanto o reator R4S teve 82%, mostrando que a comunidade bacteriana não sofreu grandes alterações com as mudanças no TDH a partir do uso de soro de queijo como substrato. Este fato pode ser explicado pela estabilidade de HY (1,1-1,3 mol. mol⁻¹ lactose) e de PVH (0,23-0,50 L.d⁻¹.L⁻¹) para os reatores R3S e R4S, respectivamente.

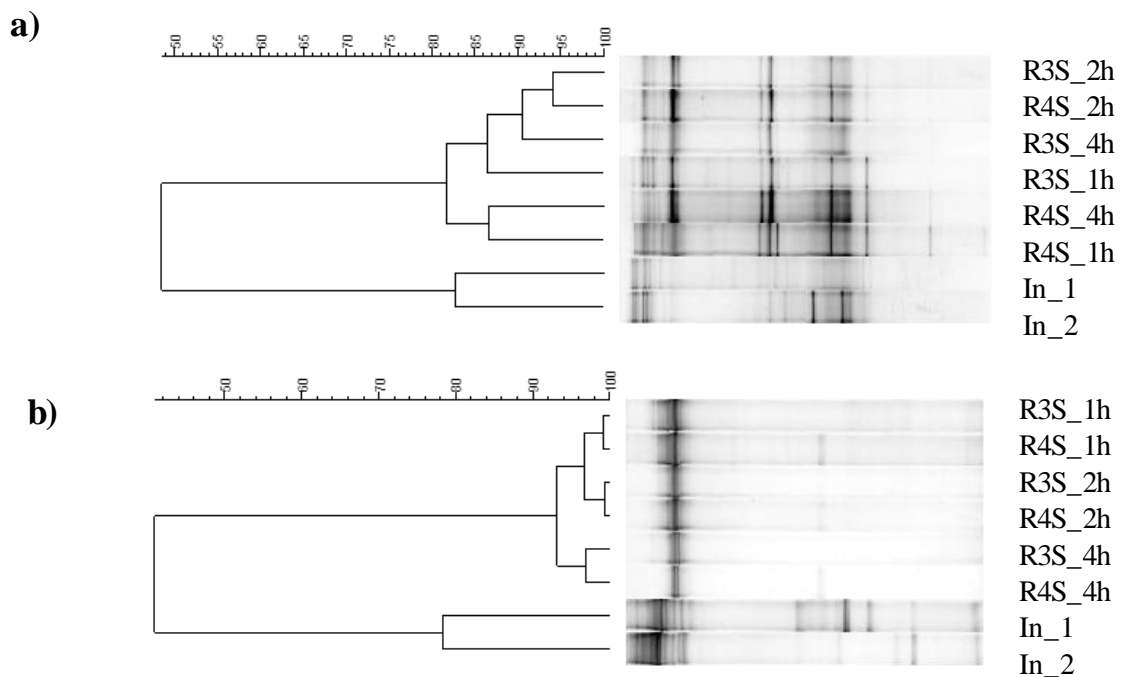


Figura 4.48 Análise do dendrograma (DGGE) mostrando a influência do TDH nos reatores R3S e R4S: a) comunidade das bactérias b) comunidade das archaea.

Para o perfil de banda das archaea (Figura 4.48 b) no reator R3S existiu 93% de similaridade através as aplicação dos TDHs (4, 2 e 1 h). Este mesmo comportamento e coeficientes de similaridades foram verificados no reator R4S, mostrando que para a comunidade das archaea o agrupamento dos reatores foi realizado de acordo com o TDH aplicado. Isso justifica que as archaea necessitam de um maior tempo de adaptação e foram

mais estáveis no TDH de 1 hora devido ao aparecimento do metano (16%) e ao maior tempo de operação dos reatores. Na comparação das amostras de biomassa dos reatores com as amostras de biomassa dos inóculos 41% de similaridade foi obtida, e para este caso, existiram grandes mudanças na comunidade da archaea através da operação dos reatores. Na Fig.4.49 é apresentado o perfil das bandas da comunidade das bactérias (Fig.4.49a) e archaea (Fig. 4.49b), e de acordo que se alcançava o estado estacionário, as amostras de biomassa dos reatores R3M e R4M foram avaliadas, para os TDH aplicados de 6, 4 e 2 horas.

A análise comparativa realizada a partir da banda obtida no inóculo foi apenas 21% similar as bandas observadas ao longo dos TDHs de 6, 4 e 2 horas, para os reatores R3M e R4M. Nesse sentido, ocorreram mudanças significativas na comunidade bacteriana ao longo da operação dos reatores RALFs, frente à utilização de manipueira hidrolisada e glicose como fonte de substrato orgânico para a produção de hidrogênio.

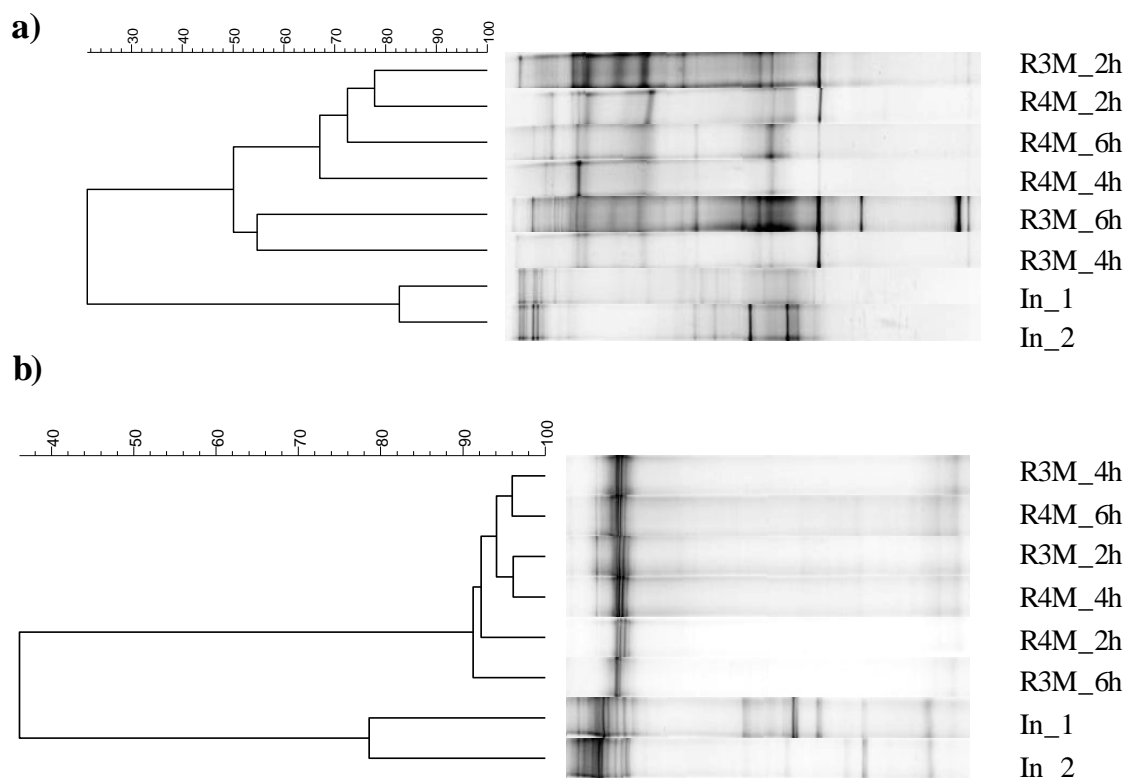


Figura 4.49 Análise do dendrograma (DGGE) mostrando a influência do TDH nos reatores R3M e R4M: a) comunidade das bactérias b) comunidade das archaea.

No perfil de bandas da comunidade bacteriana para o reator R3M, o coeficiente de correlação (correlação de Pearson) foi de 50% de similaridade entre os TDH aplicado de 4 e 2

horas, enquanto que no TDH de 6 hora foi de 55% em relação aos demais. Já o reator R4M teve 68% de similaridade entre os TDH de 6, 4 e 2 h. Dessa maneira, nestas correspondentes fases ocorreram modificações significativas do perfil de bandas com a mudança do TDH, refletindo na produção de hidrogênio.

Para o reator R3M com aplicação TDH de 6 e 4 horas resultou em HY semelhantes ($0.5 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$) mostrando que a diversidade bacteriana nestes TDHs foram mais favoráveis para se obter maiores valores de HY, quando comparado com o TDH de 2 horas, que teve valores de $0,2 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ COD}$. Em contrapartida, para o reator R4M as maiores porcentagens e produções de H_2 foram com o TDH de 2 horas, justificando assim a maior diferença entre os perfis de bandas com TDH de 2 h quando comparado aos perfis de bandas com TDH de 6 e 4 h.

O perfil de banda de DGGE referente as archaeas apresentou uma diversidade menor quando comparada com o perfil de banda das bactérias. Foram encontradas altas similaridades (acima de 90%) para os reatores de acordo com cada TDH aplicado, mostrando que a comunidade de archaeas não sofreu grandes alterações de acordo com a redução do TDH, resultando em um comportamento diferente da comunidade bacteriana. O perfil de banda da comunidade do inóculo e o perfil de bandas das fases operacionais tiveram similaridade de 54%, evidenciando que ocorreram mudanças significativas na comunidade archaeas ao longo da operação reatores RALFs, assim como na comunidade bacteriana.

As análises de dendograma mostraram que para o uso de diferentes substratos como o soro de queijo, e a mistura de glicose e manipueira hidrolisada, as comunidades microbianas tiveram comportamentos diferenciados. O perfil de bandas da comunidade bacteriana presente nos reatores com soro de queijo (R3S e R4S) obtiveram altas similaridades entre os perfis de banda do reator para cada TDH aplicado. Já para o perfil de banda dos reatores com a mistura de glicose e manipueira (R3M e R4M), mostrou uma maior diferença em relação ao perfil de banda da biomassa para os diferentes TDHs aplicados. Este fato reforça que para os reatores R3M e R4M as alterações na comunidade microbiana foram mais sensíveis com a mudança do TDH, quando comparada com os reatores R3S e R4S.

4.7.1 – O efeito de diferentes origens de inóculos sobre a produção de hidrogênio e etanol

O perfil das bandas observadas entre os dois tipos de inóculo (In_1 e In_2) tiveram 83% e 78% de similaridade para o domínio bactéria e archaea, respectivamente, mostrando que existe diferença entre a comunidade microbiana devido as diferentes origens dos inóculos.

A produção de hidrogênio se mostrou dependente em relação ao tipo de inóculo e as mudanças no TDH, e de maneira geral, os dois lodos utilizados tiveram um bom desempenho para a produção de hidrogênio.

No caso de produção de hidrogênio, ambos os reatores inoculados com os dois lodos tiveram HY semelhantes, e no caso dos reatores com soro de queijo, tiveram comportamento semelhantes em relação a redução de TDH, obtendo os maiores HY de 2,5 e 2,2 mmol.g⁻¹ DQO no TDH de 4 horas, para os reatores R3S e R4S, respectivamente. Em contrapartida, os reatores com manipueira hidrolisada e glicose (R3M e R4M), tiveram HY diferenciado, de 0,6 e 1,0 mmol.g⁻¹ DQO foram obtidos no TDH de 10 horas para o R3M e R4M.

Em relação a produção de etanol, tanto para o uso de soro de queijo ou manipueira e glicose, o lodo proveniente do abatedouro de aves apresentou um maior potencial, quando comparado com o lodo proveniente de águas residuárias de suinocultura. Sendo assim, os maiores EtOHY foram obtidos pelo 3,5 mmol.g⁻¹ DQO e 3,0 mmol.g⁻¹ DQO foram obtidos pelos reatores R2S e R4M.

Segundo Sinha e Pandey (2011) uma grande variedade de pesquisas está sendo realizada a partir de culturas mistas de microrganismos como fontes de inóculos originadas a partir de águas residuárias, lodos e solos para a produção de hidrogênio, uma vez que a diversidade da biomassa pode apresentar, após métodos de pré-tratamento para inibição das consumidoras de H₂, maior eficácia na produção de hidrogênio quando comparadas às culturas puras.

Ao investigarem o comportamento fermentativo de uma ampla variedade de fontes de biomassa para a produção de hidrogênio, Akutsu et al. (2009b), Akutsu et al. (2008) e Lay et al. (2012a), obtiveram estabilidade na produção do gás, assim como neste estudo, e observaram que a origem do inóculo afeta o desempenho do reator, assim como a via dos produtos metabólitos. Nos estudos citados, os melhores resultados foram alcançados por meio da utilização de lodo proveniente do tratamento de águas residuárias, demonstrando que a diversidade da comunidade microbiana presente nessa fonte de inóculo é essencial para a seleção de uma biomassa eficiente para processos fermentativos. Modificações nos perfis de degradação em reatores anaeróbios podem ser alcançadas por meio de estratégias escolhidas na partida dos sistemas fermentativos para a produção de H₂, como o pré-aquecimento de grânulos metanogênicos provenientes de reatores UASB utilizados no tratamento de águas residuárias de cervejaria (Abreu et al., 2010).

4.8- Identificações da comunidade bacteriana e archaea

4.8.1 Identificação microbiana para o domínio bactéria

A principal razão para o aparecimento de metano a curtos TDHs foi investigada, a partir da clonagem do gene RNAr 16S para a comunidade das bactéria e das archaeas no reator R4S com o TDH de 1 hora, e no reator R3M com um TDH de 2 horas. As amostras sequenciadas foram analisadas pela NCBI e RDP.

Na Tabela 4.32 é mostrada a composição da comunidade bacteriana para o reator R4S. Através da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S, um total de 78 clones foram agrupados em 17 unidades taxonômicas operacionais (UTOs), mostrando que os clones foram afiliados em 3 família: Veillonellaceae (85% de abundância relativa), Streptococcaceae (6,4% de abundância relativa) e Clostridiaceae (7,6% de abundância relativa), sendo todas pertencentes ao filo Firmicutes.

Houve o predomínio do gênero *Selenomonas* pertencente a família Veillonellaceae, da ordem Selenomonadales, sendo que uma maior porcentagem foi atribuída a espécie de *Selenomonas lacticifex strain DSM20757* (UTO 7 e 16), representando 69% de todas as sequências. As espécies *Selenomonas* são bacterias não formadoras de esporos, cujos produtos metabólicos finais consistem principalmente de ácido acético, propiônico e láctico. *Selenomonas* têm sido detectada em outros estudos com efeito positivo sobre a produção de hidrogênio (Luo et al., 2008; Mariakakis et al., 2011). Luo et al. (2008) avaliaram o efeito da TCO sobre a comunidade bacteriana, utilizando glicose como substrato. Os autores mostraram que para as menores TCOs (0,5 g DQO L⁻¹h⁻¹) foram obtidos os maiores HY (2,8 mol.mol⁻¹ glicose) atribuindo este fato a presença do gênero *Selenomonas* sp. Em RALFs, Shida et al. (2012) também encontraram o predomínio da classe Veillonellaceae em seu reator com adição de tampão, para um TDH de 2 horas, onde foram obtidos os maiores rendimentos do trabalho (1,9 mol H₂mol⁻¹ glicose).

Tabela 4.32 Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria no reator R4S.

UTOs	Família	Número de sequências	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	nº de acesso
1	Veillonellaceae	3	Uncultured bacterium clone hoa5_08c07	88	EU748432.1
2	Veillonellaceae	2	Uncultured bacterium clone RL179_aao54c07	91	DQ796771.1
3	Streptococcaceae	2	Uncultured bacterium clone ECH_aai38e02	92	EU460804.1
4	Veillonellaceae	1	Uncultured bacterium clone NED4B10	84	EF445239.1
5	Veillonellaceae	2	<i>Selenomonas</i> sp. G31	88	AB730802.1
6	Clostridiaceae	1	<i>Clostridium</i> sp. BL-22	92	DQ196626.2
7	Veillonellaceae	17	<i>Selenomonas lactificex</i> strain DSM20757	98	AF373024.1
8	Veillonellaceae	1	Uncultured bacterium clone BFV01_160	91	GU098042.1
9	Veillonellaceae	3	Uncultured bacterium clone hoa5_06d10	94	EU748354.1
10	Clostridiaceae	2	<i>Clostridium</i> sp. FA3/2	92	AY188848.1
11	Clostridiaceae	3	<i>Clostridium</i> sp. BL-22	99	DQ196626.2
12	Streptococcaceae	2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 strain IL1403	99	NR_103918.1
13	Streptococcaceae	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403 strain IL1403	98	NR_103918.1
14	Veillonellaceae	1	Uncultured bacterium	91	AB486393.1
15	Veillonellaceae	1	Uncultured Veillonellaceae bacterium clone BLUC-E	97	DQ196614.1
16	Veillonellaceae	35	<i>Selenomonas lactificex</i> strain DSM20757	99	AF373024.1
17	Veillonellaceae	1	Uncultured bacterium clone hoa5_08c07	91	EU748432.1

O segundo grupo dominante das bactérias no reator R4S foi da família Clostridiaceae, do gênero *Clostridium* (92 e 99% de similaridade), que são espécies produtoras de hidrogênio. Em trabalhos com soro de queijo, Yang et al. (2007) encontraram apenas 9% do gênero *Clostridium*, ao avaliarem o efeito de diferentes TCOs, com um TDH de 24 horas. Os autores tiveram HY de 2,2 molH₂.g⁻¹ DQO, similares ao deste trabalho.

Similaridade com *Lactococcus* e bactérias não cultivadas, da família Streptococcaceae da ordem Lactobacillales também foram encontradas no reator R4S. Porém, ainda não está claro se espécies de Streptococcaceae são capazes de produzir hidrogênio.

A árvore filogenética, mostrada na Figura 4.50, apresenta a população bacteriana e os agrupamentos filogenéticos entre as UTOs e as sequências advindas do NCBI para o reator R4S.

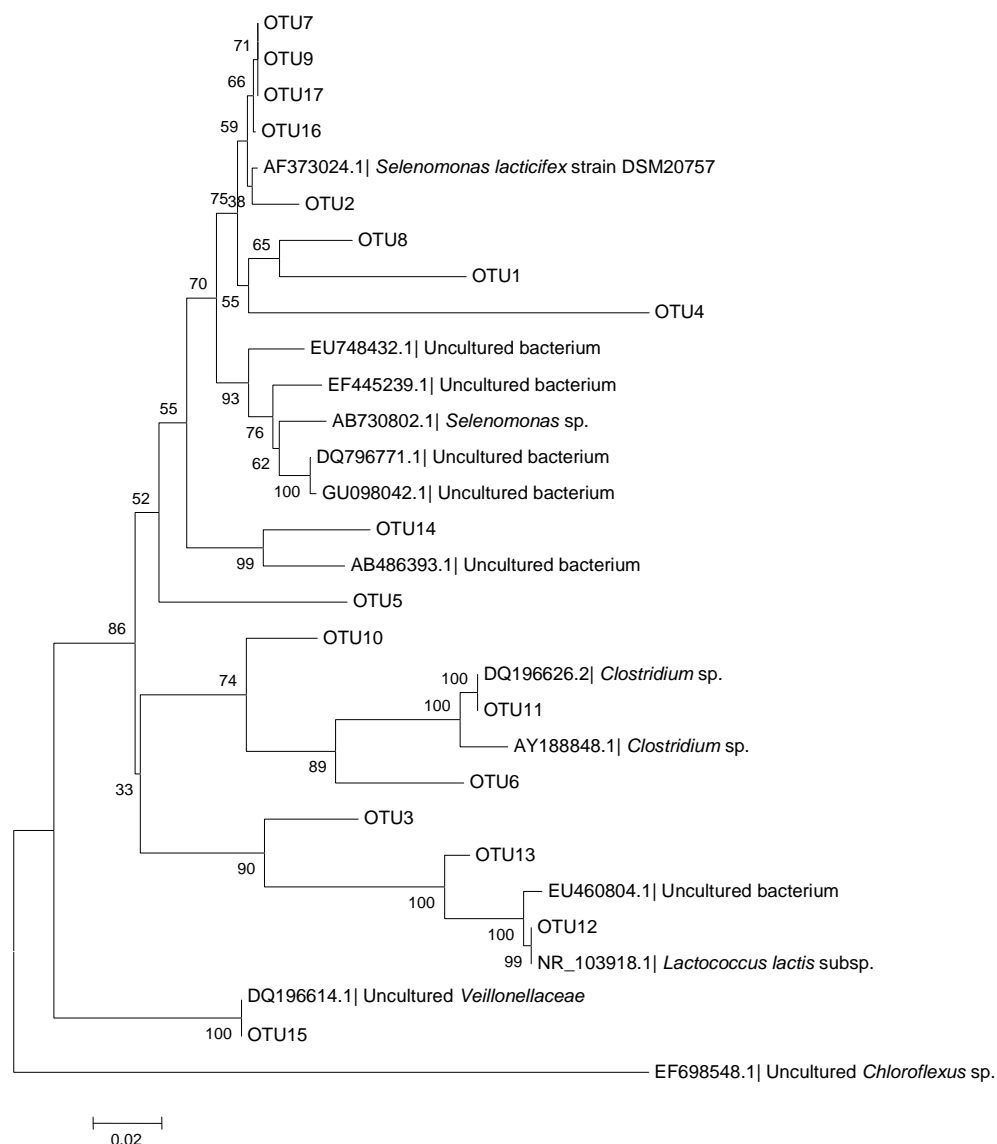


Figura 4.50: Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R4S com a aplicação do TDH de 1 hora para o domínio bactéria. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas. *Chloroflexus* foi usado como grupo externo.

A composição da comunidade bacteriana do gene RNAr 16S foi também avaliada para o reator R3M com um TDH aplicado de 2 horas. Um total de 56 clones foram classificados em 12 unidades UTOs sendo que 96% dos clones foram afiliados ao gênero *Lactobacillus* sp. pertencentes a família Lactobacillaceae (Tabela 4.33). Baixas porcentagens (inferiores a 2%) foram atribuídas as famílias Streptococcaceae e Veillonellaceae.

Tabela 4.33 Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria no reator R3M.

UTOs	Família	Número de sequências	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	nº de acesso
1	Lactobacillaceae	22	<i>Lactobacillus</i> sp.	99	Y17500-1
2	Lactobacillaceae	10	Uncultured bacterium	98	GU808382.1
3	Lactobacillaceae	6	<i>Lactobacillus nagelii</i>	98	NR_041007.1
4	Lactobacillaceae	8	<i>Lactobacillus paracasei</i>	94	KC836602.1
5	Lactobacillaceae	2	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	96	AB194126.1
6	Lactobacillaceae	2	<i>Lactobacillus</i> sp.	94	AB016864.1
7	Lactobacillaceae	1	<i>Lactobacillus</i> sp.	97	GU808420.1
8	Lactobacillaceae	1	<i>Lactobacillus</i> sp. TAB-31	98	GU808422.1
9	Lactobacillaceae	1	<i>Lactobacillus perolens</i>	95	Y19168.1
10	Lactobacillaceae	1	Uncultured bacterium clone bat_aaj08d12	94	EU772368.1
11	Streptococcaceae	1	<i>Lactococcus fujiensis</i>	97	AB485959.1
12	Veillonellaceae	1	Uncultured bacterium	96	GQ082178.1

Lactobacillus sp. são bactérias produtores de ácido láctico, a partir de açúcares, explicando as altas concentrações de ácido láctico para este TDH (1239 mg.L⁻¹). Alguns estudos vêm mostrando efeitos positivos do *Lactobacillus* para a produção de hidrogênio (Li et al., 2010; Yang et al., 2007) explicando a produção de hidrogênio verificada neste estudo. Yang et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes TCO, com um TDH de 24 horas, e observaram que o gênero *Lactobacillus* sp. dominou o reator (50%) com a presença das espécies de *Clostridium* sp. (5%), resultando em máximos HY de 2,3 mmol.g⁻¹ DQO. De maneira similar, Li et al. (2010) avaliaram o efeito do TDH utilizando amido e peptona como substrato, e o máximo HY de 412 mmolH₂.L⁻¹.d⁻¹ foi encontrado no TDH de 3 horas,

mostrando que 52% da população microbiana foi do gênero *Lactobacillus sp.* neste TDH aplicado.

Castelló et al. (2009) também atribuíram a produção biológica de hidrogênio (15 mL H₂.h⁻¹.L⁻¹) aos gêneros *Lactobacillus sp.* e *Megasphaera sp.* Assim como neste estudo, não detectaram a presença do gênero *Clostridium sp.*, sugerindo que a capacidade deste consórcio microbiano em produzir H₂ deverá ser reavaliada.

O'Sullivan et al. (2002) relatam que as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) podem inibir em bactérias produtoras de H₂ por meio da excreção de bacteriocinas, incluindo as bactérias do gênero *Clostridium*. Possivelmente este foi o motivo pelo qual não foram encontrado *Clostridium* na operação dos reatores.

Na Figura 4.51 é mostrada a árvore filogenética, que apresenta a população bacteriana e os agrupamentos filogenéticos entre as UTOs e as seqüências advindas do NCBI para o reator R3M.

O uso de águas residuárias complexas para a produção de hidrogênio, vem mostrando que é possível produzir este gás a partir de outras bactérias. Wang et al. (2013b) utilizaram vinhaça de mandioca como substrato e associaram seus bons HY pelo predomínio da bactéria *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticu*. Já Carrillo-Reyes et al.(2012) e Yang et al. (2007) associam sua produção de H₂ pela presença do gênero *Lactobacillus* ao utilizarem soro de queijo como substrato.

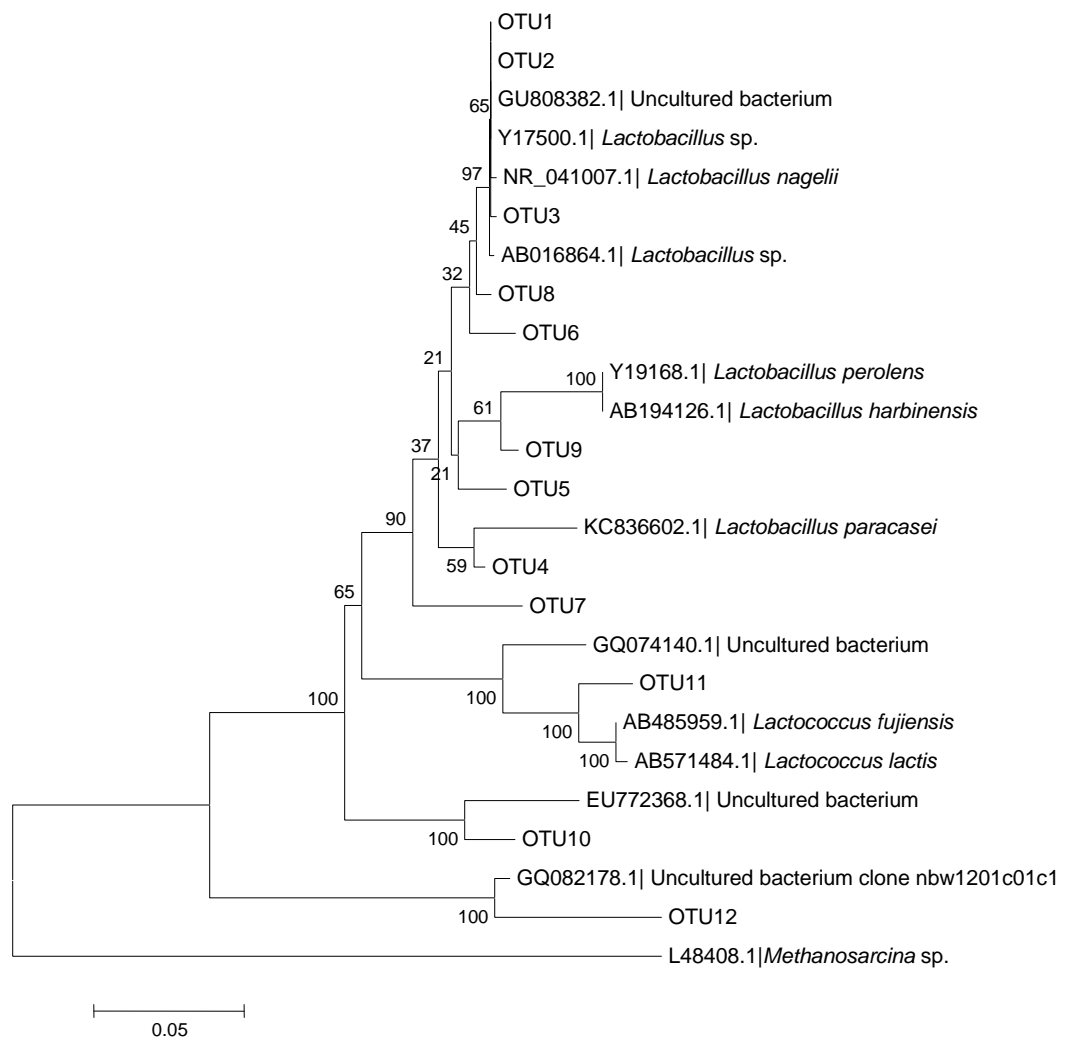


Figura 4.51: Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R3M com a aplicação do TDH de 2 horas para o domínio bactéria. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas. *Methanosarcina* foi usado como grupo externo.

4.8.2 Identificação microbiana para o domínio archaea

Na Tabela 4.34 é mostrada a composição da comunidade das archaea para o reator R4S, com um TDH de 1 hora. Através da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S, um total de 68 clones foram agrupados em 5 UTOs, mostrando que os clones foram afiliados ao gênero *Methanobacterium*. Este gênero pertence à família Methanobacteriaceae, da ordem Methanobacteriales e do filo Euryarchaeota.

Tabela 4.34 Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Archaea no reator R4S.

UTO	Número de sequências	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	nº de acesso
1	1	Uncultured archaeon clone BA8-EN5221N-LBR30	97	EU447673.1
2	62	<i>Methanobacterium</i> sp. MB4	97	DQ677518.1
3	2	Uncultured <i>Methanobacterium</i> sp.	97	KC533586.1
4	1	<i>Methanobacterium congolense</i> C	98	NR_028175.1
5	2	Uncultured <i>Methanobacterium</i> sp.	95	JX576132.1

Na Tabela 4.35 é apresentada a caracterização da população das archaea no reator R3M com um TDH de 2 horas. Através da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S um total de 41 clones foram obtidos, agrupados em 6 UTOs representativas. As condições de operação do reator R3M também favoreceram a presença do gênero *Methanobacterium*, sendo que 92,5% das sequências (OTU 1, 2 e 6) foram similares a *Uncultured Methanobacterium*. Também foram encontradas altas similaridades com *Methanobacterium* com 2,5% das sequências (OTU 3) e *Uncultured archaeon* (OTU 4 e 5) com 5% das sequências.

O gênero *Methanobacterium* são archaea hidrogenotróficas, ou seja, utilizam hidrogênio como substrato (Horn et al., 2003). Isso explica os menores HY de 1,0 mmol.g⁻¹DQO e de 0,3 mmol.g⁻¹ DQO obtidos nos reatores R4S e R3M, respectivamente.

A maioria das archaea metanogênicas crescem a pH mais elevados, porém, algumas espécies acidófilas do gênero *Methanobacterium* crescem a em condições ácidas. Alguns estudos na literatura relatam que isolaram o este gênero, relatam que estas archaea têm a capacidade de crescer e produzir metano em pHs inferiores a 5 sendo altamente adaptáveis (Horn et al., 2003; Kotsyurbenko et al., 2007).

Tabela 4.35 Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio *archaea* no reator R3M.

UTO	Número de sequências	Afiliação filogenética	Similaridade (%)	nº de acesso
1	26	<i>Uncultured Methanobacterium</i> sp	98	KC533586.1
2	11	<i>Uncultured Methanobacterium</i> sp	99	JX456452.1
3	1	<i>Methanobacterium</i> sp.	99	GU112764.1
4	1	<i>Uncultured archaeon</i>	98	EU447673.1
5	1	<i>Uncultured methanogenic archaeon</i>	97	GQ453584.1
6	1	<i>Uncultured Methanobacterium</i> sp	89	EU888011.1

Horn et al. (2003) relataram que o hidrogênio é um substrato importante para as metanogênicas tolerantes em condições ácidas e que estas metanogênicas são membros filogenéticos da família Methanobacteriaceae, a mesma encontrada neste estudo. O sequenciamento do gene RNAr 16S realizada pelos autores indicaram que o gênero *Methanobacterium* e *Methanomicrobiales* foram os organismos contribuintes para a produção de metano em baixos pHs.

Kotsyurbenko et al. (2007) avaliaram o efeito do pH sobre a produção de metano e a comunidade das archaea. Os autores relataram que uma das características do gênero *Methanobacteriaceae* é crescer em baixos valores de pH (3,8), sendo estes altamente adaptáveis a condições extremas.

Taconi et al. (2007) ao avaliarem a produção de metano com diferentes pHs, relatam um aumento de 30% na atividade metanogênica, ao diminuírem o pH de 7 para 4,5, mostrando a adaptação das archaea metanogênicas a baixos pHs.

Yang et al. (2008) avaliaram o efeito da temperatura sobre a eficiência de biodegradação dos resíduos contendo glicerol, com um pH de 5,4. Assim como neste trabalho, a clonagem molecular de sequências de genes de RNAr 16S indicou que os clones da população das archaea no reator termofílico foram filiado ao genero *Methanobacterium*, com 85% de abundancia relativa.

Muitos trabalhos também verificaram a metanogênese em condições ácidas, porém não realizaram a identificação dos microrganismos (Ver Tabela 4.7). Neste estudo, a partir do soro de queijo e da co-fermentação da manipueira e glicose, foi mostrado ter um potencial para a produção de hidrogênio, porém este gás foi usado como substrato para as *archaea* do gênero *Methanobacterium* representando um importante grupo de archaea com 98,5% e 95 % do numero de sequências para os reatores R4S e R3M, respectivamente.

Na Figura 4.52 é mostrada a árvore filogenética com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R4S, e na Figura 4.53 é mostrada a árvore filogenética com UTOs advindas da biomassa do reator R3M, ambas para o domínio archaea.

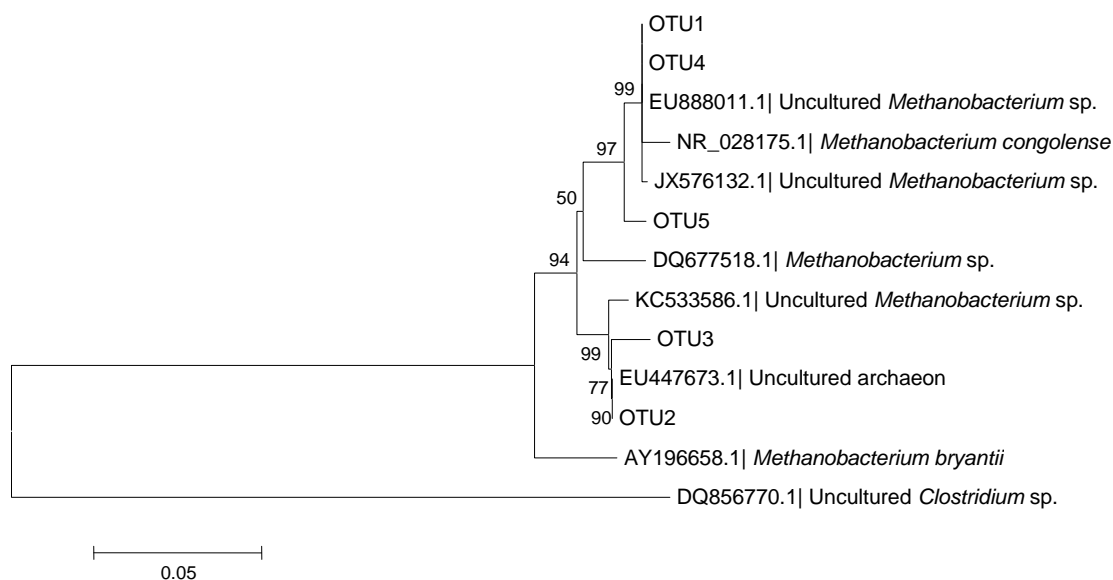


Figura 4.52: Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R4S com a aplicação do TDH de 1 hora para o domínio *archaea*. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas. Uncultured *Clostridium* foi usado como grupo externo.

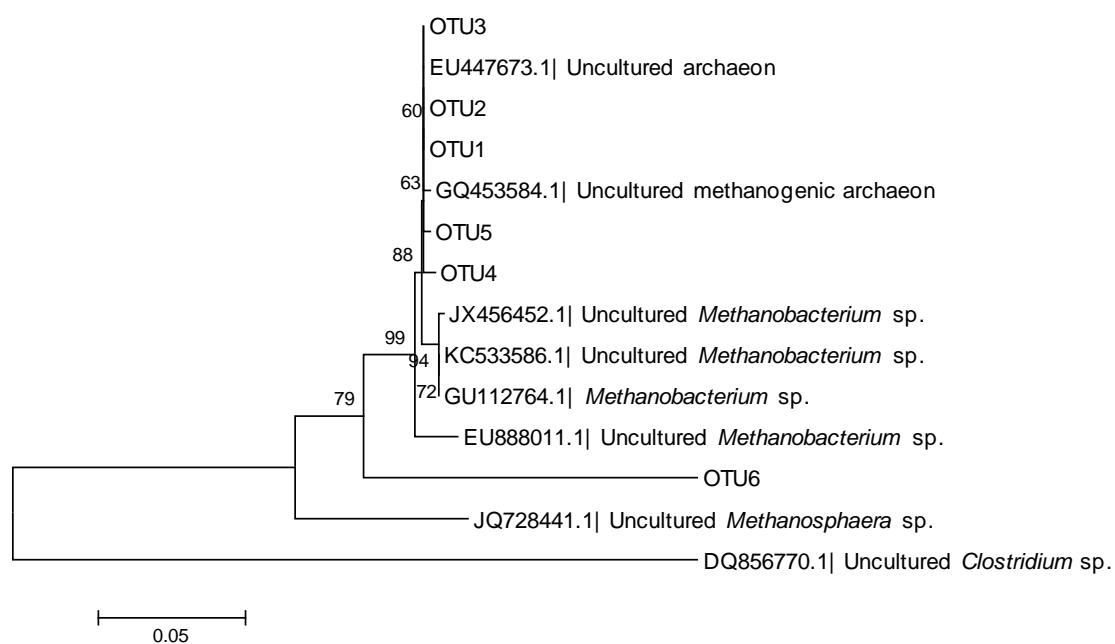


Figura 4.53: Árvore filogenética realizada com UTOs advindas da biomassa aderida no reator R3M com a aplicação do TDH de 2 horas para o domínio archaea. A árvore foi construída utilizando o método neighbor-joining, e baseia-se na comparação do gene de RNAr 16S. Números em nós representam valores percentuais de 1000 réplicas. Uncultured *Clostridium* foi usado como grupo externo.

CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou a viabilidade de reatores anaeróbios de leite fluidizado utilizado para a produção de hidrogênio a partir de diferentes fontes de carbono. Os resultados deste estudo demonstram a importância das diferentes origens dos inóculo para os padrões de fermentação na produção de hidrogênio, assim como o efeito da modificação de diferentes proporções de substratos utilizados, o efeito do TDH e da TCO.

A partir do uso de diferentes proporções utilizadas entre glicose e soro de queijo, houve um aumento de HY de acordo com o aumento da proporção de soro de queijo ao meio de alimentação, alcançado um valor máximo de $2,0 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R1S) e $2,2 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R2S), com 100% de soro de queijo.

Os maiores HY do trabalho $2,3 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ lactose}$ (R5S) e $2,6 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ lactose}$ (R6S) foram obtidos a partir do uso individual do soro de queijo como substrato.

A partir da hidrólise ácida da manipueira, foi possível se alcançar a estabilidade do sistema, com HY de $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R3M) e $1,0 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R4M), no menor TDH aplicado (10 h).

A partir do aumento da TCO, houve a queda de HY pra os reatores R6S e R6M, sendo que os maiores rendimentos de $2,3 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ lactose}$ e $0,8 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ foram obtidos na menor TCO aplicada. Em contrapartida, com o uso da manipueira como único substrato, o aumento da TCO resultou em um aumento de HY para $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (R5M).

O método de enriquecimento do inóculo não se mostrou eficiente, pois foi detectada presença de metano no biogás.

Metanol, etanol, ácido acético, ácido butírico, ácido láctico e propiônico estiveram entre os principais metabólitos solúveis produzidos. Altas concentrações de etanol concomitantes com a produção efetiva de hidrogênio também foram encontradas em todos os reatores. Os maiores EtOH de $4,2$ e $3,45 \text{ mmolEtOH} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ foram obtidos pelos reatores R6M e R2S.

As análises de dendograma (DGGE), o perfil de bandas da comunidade bacteriana presente nos reatores com soro de queijo (R3S e R4S) não tiveram alterações de acordo com a redução de TDH, mas em contrapartida, o perfil de banda dos reatores com a mistura de glicose e manipueira (R3M e R4M) tiveram grandes mudanças nos perfis de acordo com as alterações no TDH. Para os perfis de bandas das archaea foram encontrados altos coeficiente de similaridade entre cada TDH aplicado, para dos dois tipos de substratos utilizados.

Através da clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S do reator R4S no TDH de 1 hora, foram encontradas altas similaridades com *Selenomonas*, *Lactococcus*, *Clostridium*, e *Methanobacterium*

A composição da comunidade microbiana do gene RNAr 16S no reator R3M com um TDH aplicado de 2 horas, tiveram elevadas similaridades com *Lactobacillus sp.* e *Methanobacterium*.

CAPÍTULO 6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Objetivando contribuir para futuros estudos de produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado, sugere-se:

- a) Estudar a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado sob condições termofílicas utilizando soro de queijo e manipueira como substratos;
- b) Estudar a produção de hidrogênio utilizando soro de queijo e manipueira com substratos em maiores concentrações de alimentação em reator anaeróbio de leito fluidizado;
- c) Aplicar outros tipos de águas residuárias reais para produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado;

CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.A., ALVES, J.I., PEREIRA, M.A., KARAKASHEV, D., ALVES, M.M., ANGELIDAKI, I. 2010. Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 101(24), 9577-9586.
- AKUTSU, Y., LEE, D.-Y., CHI, Y.-Z., LI, Y.-Y., HARADA, H., YU, H.-Q. 2009a. Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(12), 5061-5071.
- AKUTSU, Y., LEE, D.-Y., LI, Y.-Y., NOIKE, T. 2009b. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(13), 5365-5372.
- AKUTSU, Y., LI, Y.-Y., HARADA, H., YU, H.-Q. 2009c. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(6), 2558-2566.
- AKUTSU, Y., LI, Y.-Y., TANDUKAR, M., KUBOTA, K., HARADA, H. 2008. Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6541-6548.
- APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 th. Washington, 2012.
- AMORIM, E.L.C. 2007. Desempenho de Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado Operado sob Condições de Aumento Progressivo de Carga Orgânica no Tratamento de Fenol. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos.
- ANTONOPOULOU, G., STAMATELATOU, K., BEBELIS, S., LYBERATOS, G. 2010. Electricity generation from synthetic substrates and cheese whey using a two chamber microbial fuel cell. *Biochemical Engineering Journal*, 50(1-2), 10-15.

- ARGUN, H., KARGI, F. 2011. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443-7459.
- ARGUN, H., KARGI, F. 2010. Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(12), 6170-6178.
- AROOJ,M.F.; HAN, S.; Kim,S.; Kim,D.; Shin H. Continuous biohydrogen production in CSTR using starch as substrate. *International journal of hydrogen energy*,33, 3289-3294, 2008.
- AZBAR, N., DOKGOZ, F.T.C. 2010. The effect of dilution and L-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10), 5028-5033.
- AZBAR, N., DOKGOZ, F.T.C., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M. 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7441-7447.
- BARROS, A. R. 2009. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidizado. São Carlos. Dissertação (Mestrado) DEQ-UFSCar.
- BARROS, A.R., SILVA, E.L. 2012. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 61, 59-65.
- BERTIN, L., GRILLI, S., Spagni, A., Fava, F. 2013. Innovative two-stage anaerobic process for effective codigestion of cheese whey and cattle manure. *Bioresource Technology*, 128, 779-783.
- BUITRON, G., CARVAJAL, C. 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071-9077.

- CAKIR, A., OZMIHCI, S., KARGI, F. 2010. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13214-13218.
- CALLI, B.; KIM, S.; VANBROEKHOVEN, K.; DIELS, L. 2008. Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose—Effects of on-line pH control. *Internacional journal of hydrogen energy*, 33, 522-530.
- CAPPELLETTI, B.M., REGINATTO, V., AMANTE, E.R., ANTONIO, R.V. 2011. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, 36(12), 3367-3372.
- CARRILLO-REYES, J., CELIS, L.B., ALATRISTE-MONDRAGON, F., RAZO-FLORES, E. 2012. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5591-5601.
- CARVALHO, F., PRAZERES, A.R., RIVAS, J. 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445, 385-396.
- CASTELLO, E., GARCIA Y SANTOS, C., IGLESIAS, T., PAOLINO, G., WENZEL, J., BORZACCONI, L., ETCHEBEHERE, C. 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674-5682.
- CHEN, A.C., OHASHI, A., HARADA, H. 2003. Acetate synthesis from H₂/CO₂ in simulated and actual landfill samples. *Environmental Technology*, 24(4), 435-443.
- CHEN, Y., CHENG, J.J., CREAMER, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044-4064.
- CHERNICHARO, C. A. L., 1997. *Reatores Anaeróbios – Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Vol. 5, 2ª Ed.* Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG.

- CHONG, M.-L., RAHIM, R.A., SHIRAI, Y., HASSAN, M.A. 2009. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 764-771.
- CHONG, P.S., JAHIM, J.M., HARUN, S., LIM, S.S., ABD MUTALIB, S., HASSAN, O., NOR, M.T.M. 2013. Enhancement of batch biohydrogen production from prehydrolysate of acid treated oil palm empty fruit bunch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(22), 9592-9599.
- CHU, C., EBIE, Y., INAMORI, Y., KONG, H. 2009. Effect of hydraulic retention time on the hydrogen yield and population of *Clostridium* in hydrogen fermentation of glucose. *Journal of Environmental Sciences-China*, 21(4), 424-428.
- CHU, C.-Y., WU, S.-Y., HSIEH, P.-C., LIN, C.-Y. 2011. Biohydrogen production from immobilized cells and suspended sludge systems with condensed molasses fermentation solubles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14078-14085.
- DAREIOTI, M.A., DOKIANAKIS, S.N., STAMATELATOU, K., ZAFIRI, C., KORNAROS, M. 2009. Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. *Desalination*, 248(1-3), 891-906.
- DAVILA-VAZQUEZ, G., ALATRISTE-MONDRAGON, F., DE LEON-RODRIGUEZ, A., RAZO-FLORES, E. 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989-4997.
- DAVILA-VAZQUEZ, G., BERENICE COTA-NAVARRO, C., MANUEL ROSALES-COLUNGA, L., DE LEON-RODRIGUEZ, A., RAZO-FLORES, E. 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296-4304.

- DAVILA-VAZQUEZ, G., DE LEON-RODRIGUEZ, A., ALATRISTE-MONDRAGON, F., RAZO-FLORES, E. 2011. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass & Bioenergy*, 35(7), 3174-3181.
- DE GIOANNIS, G., MUNTONI, A., POLETTINI, A., POMI, R. 2013. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, 33(6), 1345-1361.
- DING, H.-B., WANG, J.-Y. 2008. Responses of the methanogenic reactor to different effluent fractions of fermentative hydrogen production in a phase-separated anaerobic digestion system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(23), 6993-7005.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. 1956. COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SUGARS AND RELATED SUBSTANCES. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- EROGLU, E., EROGLU, I., GUNDUZ, U., TURKER, L., YUCEL, M. 2006. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), 1527-1535.
- EMPRAPA, 2012. Acesso em agosto de 2013, www.emprapa.br.
- FERCHICHI, M., CRABBE, E., GIL, G.H., HINTZ, W., ALMADIDY, A. 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*, 120(4), 402-409.
- GELEGENIS, J., GEORGAKAKIS, D., ANGELIDAKI, I., MAVRIS, V. 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renewable Energy*, 32(13), 2147-2160.
- GRIFFITHS, R.I., WHITELEY, A.S., O'DONNELL, A.G., BAILEY, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of

ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5488-5491.

GUO, W.-Q., REN, N.-Q., WANG, X.-J., XIANG, W.-S., MENG, Z.-H., DING, J., QU, Y.-Y., ZHANG, L.-S. 2008. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4981-4988.

GUO, X.M., TRABLY, E., LATRILLE, E., CARRERE, H., STEYER, J.-P. 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660-10673.

HAFEZ, H., NAKHLA, G., EL NAGGAR, M.H., ELBESHBISHY, E., BAGHCHEHSARAEI, B. 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 81-92.

HAN, W., CHEN, H., JIAO, A., WANG, Z., LI, Y., REN, N. 2012a. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 843-847.

HAN, W., WANG, B., ZHOU, Y., WANG, D.-X., WANG, Y., YUE, L.-R., LI, Y.-F., REN, N.-q. 2012b. Fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. *Bioresource Technology*, 110, 219-223.

HNIMAN, A., PRASERTSAN, P., O-THONG, S. 2011. Community analysis of thermophilic hydrogen-producing consortia enriched from Thailand hot spring with mixed xylose and glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14217-14226.

HORN, M.A., MATTHIES, C., KUSEL, K., SCHRAMM, A., DRAKE, H.L. 2003. Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 74-83.

- HSIAO, C.-L., CHANG, J.-J., WU, J.-H., CHIN, W.-C., WEN, F.-S., HUANG, C.-C., CHEN, C.-C., LIN, C.-Y. 2009. Clostridium strain co-cultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7173-7181.
- HUSSY, I., HAWKES, F.R., DINSDALE, R., HAWKES, D.L. 2003. Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 619-626.
- HWANG, M.H., JANG, N.J., HYUN, S.H., KIM, I.S. 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 297-309.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2011. Acesso <http://www.ibge.gov.br/>.
- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, v.38, p. 569-582.
- KARADAG, D., PUHAKKA, J.A. 2010. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10245-10251.
- KI, O.L., KURNIAWAN, A., LIN, C.X., JU, Y.H., ISMADJI, S. 2013. Bio-oil from cassava peel: A potential renewable energy source. *Bioresource Technology*, in press.
- KIM, D.-H., HAN, S.-K., KIM, S.-H., SHIN, H.-S. 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2158-2169.
- KOBAYASHI, T., XU, K.-Q., LI, Y.-Y., INAMORI, Y. 2012. Effect of sludge recirculation on characteristics of hydrogen production in a two-stage hydrogen-methane fermentation process treating food wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5602-5611.

- KOSKINEN, P.E.P., KAKSONEN, A.H., PUHAKKA, J.A. 2007. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 742-758.
- KOTSYURBENKO, O.R., FRIEDRICH, M.W., SIMANKOVA, M.V., NOZHEVNIKOVA, A.N., GOLYSHIN, P.N., TIMMIS, K.N., CONRAD, R. 2007. Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobacterium* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2344-2348.
- KRAEMER J. T. E BAGLEY D. M. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letter*, 29, 685–695.
- KUMAR, G., LIN, C.-Y. 2013. Bioconversion of de-oiled Jatropha Waste (DJW) to hydrogen and methane gas by anaerobic fermentation: Influence of substrate concentration, temperature and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1), 63-72.
- LAI, D.Y.F. 2009. Methane Dynamics in Northern Peatlands: A Review. *Pedosphere*, 19(4), 409-421.
- LATEEF, S.A., BENERAGAMA, N., YAMASHIRO, T., IWASAKI, M., YING, C., UMETSU, K. 2012. Biohydrogen production from co-digestion of cow manure and waste milk under thermophilic temperature. *Bioresource Technology*, 110, 251-257.
- LAY, C.-H., KUO, S.-Y., SEN, B., CHEN, C.-C., CHANG, J.-S., LIN, C.-Y. 2012a. Fermentative biohydrogen production from starch-containing textile wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(2), 2050-2057.
- LAY, C.-H., LIN, H.-C., SEN, B., CHU, C.-Y., LIN, C.-Y. 2012B. Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 27, 155-164.

- LAY, C.-H., SEN, B., CHEN, C.-C., WU, J.-H., LEE, S.-C., LIN, C.-Y. 2013. Co-fermentation of water hyacinth and beverage wastewater in powder and pellet form for hydrogen production. *Bioresource Technology*, 135, 610-615.
- LAY, J.J. 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 269-278.
- LEANO, E.P., BABEL, S. 2012. Effects of pretreatment methods on cassava wastewater for biohydrogen production optimization. *Renewable Energy*, 39(1), 339-346.
- LEE, Z.-K., LI, S.-L., KUO, P.-C., CHEN, I.C., TIEN, Y.-M., HUANG, Y.-J., CHUANG, C.-P., WONG, S.-C., CHENG, S.-S. 2010. Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13458-13466.
- LEVIN, D.B., PITT, L., LOVE, M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173-185.
- LI, S.-L., WHANG, L.-M., CHAO, Y.-C., WANG, Y.-H., WANG, Y.-F., HSIAO, C.-J., TSENG, I.C., BAI, M.-D., CHENG, S.-S. 2010. Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 61-70.
- LIN, C.-N., WU, S.-Y., CHANG, J.-S. 2006. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2200-2210.
- LIN, C.-Y., HUNG, W.-C. 2008. Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(14), 3660-3667.
- LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., WANG, W., ZHOU, Q., SHIM, H. 2010. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor

- (CSTR) under high organic loading rate (OLR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(21), 11733-11737.
- LUO, Y., ZHANG, H., SALERNO, M., LOGAN, B.E., BRUNS, M.A. 2008. Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6566-6576.
- MARIAKAKIS, I., BISCHOFF, P., KRAMPE, J., MEYER, C., STEINMETZ, H. 2011. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during biohydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17), 10690-10700.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Acesso <http://www.mme.gov.br/mme>, maio de 2012.
- MOHAN, S.V., BHASKAR, Y.V., KRISHNA, P.M., RAO, N.C., BABU, V.L., SARMA, P.N. 2007. Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(13), 2286-2295.
- MOHAN, S.V., MOHANAKRISHNA, G., SARMA, P.N. 2008. Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(9), 2156-2166.
- MUÑOS, K.P, STEINMETZ, H. 2012. Evaluation of pre-treatment on the first stage of an anaerobic digester for enhancing bio-hydrogen production and its associated energy balance. *Energy Procedia*, 29, 469 – 479.
- NOPARAT, P., PRASERTSAN, P., O-THONG, S. 2012. Potential for using enriched cultures and thermotolerant bacterial isolates for production of biohydrogen from oil palm sap and microbial community analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(21), 16412-16420.

- NUBEL, U., ENGELEN, B., FELSKA, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R.I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5636-5643.
- O'SULLIVAN, L., ROSS, R.P., HILL, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604.
- OBAZU, F.O., NGOMA, L., GRAY, V.M. 2012. Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H₂, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5579-5590.
- OZKAN, L., ERGUDER, T.H., DEMIRER, G.N. 2010. Investigation of the effect of culture type on biological hydrogen production from sugar industry wastes. *Waste Management*, 30(5), 792-798.
- OZMIHCI, S., KARGI, F. 2011. Dark fermentative bio-hydrogen production from waste wheat starch using co-culture with periodic feeding: Effects of substrate loading rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(12), 7089-7093.
- OZMIHCI, S., KARGI, F. 2010. Effects of starch loading rate on performance of combined fed-batch fermentation of ground wheat for bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(3), 1106-1111.
- OZMIHCI, S., KARGI, F. 2008. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 180-185.
- PERNA, V. 2011. Producción de biohidrógeno a partir de residuos. Dissertação de mestrado, Universidad de la República Facultad de Ciências.

- PERNA, V., CASTELLO, E., WENZEL, J., ZAMPOL, C., FONTES LIMA, D.M., BORZACCONI, L., VARESCHE, M.B., ZAIAT, M., ETCHEBEHERE, C. 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1), 54-62.
- PRAKASHAM, R.S., BRAHMAIAH, P., SATHISH, T., RAO, K.R.S.S. 2009. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(23), 9354-9361.
- PRAZERES, A.R., CARVALHO, F., RIVAS, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- ROSA, P.R.F. Produção de probióticos com *Lactobacillus* imobilizados em alginato de cálcio empregando soro de queijo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- REN, N., CAO, G., WANG, A., LEE, D.-J., GUO, W., ZHU, Y. 2008. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6124-6132.
- REN, N., GUO, W., LIU, B., CAO, G., DING, J. 2011. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 365-370.
- REIS, C.M., SILVA, E.L. 2011. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 28-36.
- RIBAS, M.M.F. 2003. Comparação da Estabilização da manipueira com calcário e NaOH na fase acidogênica da biodigestão anaeróbia e uso do biofertilizante. Botucatu. 84p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- RICHARDS, N.S.P.S. 2002. Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. *Food Ingredients*, 3, 17, 20-27.

- ROSALES-COLUNGA, L., RAZO-FLORES, E., DE LEON RODRIGUEZ, A. 2012. Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on hydrogen production. *Bioresource Technology*, 111, 180-184.
- ROSALES-COLUNGA, L., RAZO-FLORES, E., ORDONEZ, L.G., ALATRISTE-MONDRAGON, F., DE LEON-RODRIGUEZ, A. 2010. Hydrogen production by *Escherichia coli* Delta hycA Delta lacI using cheese whey as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(2), 491-499.
- SAADY, N.M. 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International journal of hydrogen energy*, 38, 13172-13191.
- SEARMSIRIMONGKOL, P., RANGSUNVIGIT, P., LEETHOCHAWALIT, M., CHAVADEJ, S. 2011. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(20), 12810-12821.
- SHI, X.-Y., JIN, D.-W., SUN, Q.-Y., LI, W.-W. 2010. Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *Renewable Energy*, 35(7), 1493-1498.
- SHIDA, G.M., BARROS, A.R., DOS REIS, C.M., CAVALCANTE DE AMORIM, E.L., RISSATO ZAMARIOLLI DAMIANOVIC, M.H., SILVA, E.L. 2009. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(9), 3679-3688.
- SHIDA, G.M., SADER, L.T., CAVALCANTE DE AMORIM, E.L., SAKAMOTO, I.K., MAINTINGUER, S.I., SAAVEDRA, N.K., AMANCIO VARESCHE, M.B., SILVA, E.L. 2012. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(22), 16925-16934.

- SHOW, K.Y., LEE, D.J., TAY, J.H., LIN, C.Y., CHANG, J.S. 2012. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15616-15631.
- SINGH, L., SIDDIQUI, M.F., AHMAD, A., RAHIM, M.H.A., SAKINAH, M., WAHID, Z.A. 2013A. Application of polyethylene glycol immobilized *Clostridium* sp LS2 for continuous hydrogen production from palm oil mill effluent in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 158-165.
- SINGH, L., WAHID, Z.A., SIDDIQUI, M.F., AHMAD, A., AB RAHIM, M.H., SAKINAH, M. 2013B. Application of immobilized upflow anaerobic sludge blanket reactor using *Clostridium* LS2 for enhanced biohydrogen production and treatment efficiency of palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(5), 2221-2229.
- SINHA, P., PANDEY, A. 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7460-7478.
- SIRIWONGRUNGSON, V., ZENY, R.J., ANGELIDAKI, I. 2007. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Research*, 41(18), 4204-4210.
- SHIDA, G.M. 2008. Produção de Hidrogênio e Ácidos Orgânicos por Fermentação Ácidogênica em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos – SP.
- SU, H., CHENG, J., ZHOU, J., SONG, W., CEN, K. 2009. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(4), 1780-1786.
- SUN, L., WAN, S., YU, Z., WANG, Y., WANG, S. 2012. Anaerobic biological treatment of high strength cassava starch wastewater in a new type up-flow multistage anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, 104, 280-288.

- TACONI, K.A., ZAPPI, M.E., FRENCH, W.T., BROWN, L.R. 2007. Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution. *Bioresource Technology*, 98(8), 1579-1585.
- TANG, G.-L., HUANG, J., SUN, Z.-J., TANG, Q.-Q., YAN, C.-H., LIU, G.-Q. 2008. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation temperature and pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1), 80-87.
- TAWFIK, A., EL-QELISH, M. 2012. Continuous hydrogen production from co-digestion of municipal food waste and kitchen wastewater in mesophilic anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technology*, 114, 270-274.
- TAWFIK, A., SALEM, A. 2012. The effect of organic loading rate on bio-hydrogen production from pre-treated rice straw waste via mesophilic up-flow anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, 107, 186-190.
- THANWISED, P., WIROJANAGUD, W., REUNGSANG, A. 2012. 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). *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15503-15510.
- TRCHOUNIAN, K., TRCHOUNIAN, A. 2013. Escherichia coli hydrogenase 4 (hyf) and hydrogenase 2 (hyb) contribution in H₂ production during mixed carbon (glucose and glycerol) fermentation at pH 7.5 and pH 5.5. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(10), 3921-3929.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I., RIOS-LEAL, E., CARMONA-MARTINEZ, A., MUNOZ-PAEZ, K.M., POGGI-VARALDO, H.M. 2006. Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environmental Science & Technology*, 40(10), 3409-3415.

- VAN GINKEL, S., LOGAN, B.E. 2005. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental Science & Technology*, 39(23), 9351-9356.
- VENETSANEAS, N., ANTONOPOULOU, G., STAMATELATOU, K., KORNAROS, M., LYBERATOS, G. 2009. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*, 100(15), 3713-3717.
- VISSERS, E., BODELIER, P.L.E., MUYZER, G., LAANBROEK, H.J. 2009. A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from fresh water samples. *FEMS Microbiol Lett*, 298, 193–198.
- WANG, B., LI, Y., REN, N. 2013A. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(11), 4361-4367.
- WANG, J., WAN, W. 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799-811.
- WANG, W., XIE, L., CHEN, J., LUO, G., ZHOU, Q. 2011. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. *Bioresource Technology*, 102(4), 3833-3839.
- WANG, W., XIE, L., LUO, G., ZHOU, Q. 2013B. Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by co-digestion: The effects of different co-substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(17), 6980-6988.
- WANG, W., XIE, L., LUO, G., ZHOU, Q., LU, Q. 2012. Optimization of biohydrogen and methane recovery within a cassava ethanol wastewater/waste integrated management system. *Bioresource Technology*, 120, 165-172.

- WOSIACKI, G.E.; CEREDA, M. P. 2002. Valorização de resíduo de processamento de mandioca. Publicações UEPG- Ciências Exatas e da terra- Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, 8, 27-43.
- WU, S.Y., LIN, C.N., CHANG, J.S. 2003. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. *Biotechnology Progress*, 19(3), 828-832.
- WU, X., LIN, H., ZHU, J. 2013. Optimization of continuous hydrogen production from co-fermenting molasses with liquid swine manure in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 136, 351-359.
- XIA, Y., CAI, L., ZHANG, T., FANG, H.H.P. 2012. Effects of substrate loading and co-substrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(18), 13652-13659.
- XU, J.-F., REN, N.-Q., WANG, A.-J., QIU, J., ZHAO, Q.-L., FENG, Y.-J., LIU, B.-F. 2010. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13467-13474.
- YANG, P., ZHANG, R., MEGARVEY, J.A., BENERNANN, J.R. 2007. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4761-4771.
- YANG, Y., TSUKAHARA, K., SAWAYAMA, S. 2008. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 43(4), 362-367.
- ZHANG, Z.-P., TAY, J.-H., SHOW, K.-Y., YAN, R., LIANG, D.T., LEE, D.-J., JIANG, W.-J. 2007. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 185-191.

- ZHAO, C., LU, W., WANG, H. 2013. Simultaneous hydrogen and ethanol production from a mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles II: Effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(22), 9131-9136.
- ZHAO, Q.-B., MU, Y., WANG, Y., LIU, X.-W., DONG, F., YU, H.-Q. 2008. Response of a biohydrogen-producing reactor to the substrate shift from sucrose to lactose. *Bioresource Technology*, 99(17), 8344-8347.
- ZHU, H., PARKER, W., BASNAR, R., PRORACKI, A., FALLETTA, P., BELAND, M., SETO, P. 2008. Biohydrogen production by anaerobic co-digestion of municipal food waste and sewage sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(14), 3651-3659.
- ZHU, H., PARKER, W., BASNAR, R., PRORACKI, A., FALLETTA, P., BELAND, M., SETO, P. 2009. Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. *Bioresource Technology*, 100(21), 5097-5102.

CAPÍTULO 8- APÊNDICES - Produção bibliográfica

Esta tese de Doutorado, em parceria com outros projetos de pesquisa considerando a utilização de águas residuárias complexas para a produção biológica de H₂, deu origem, até o momento, aos seguintes trabalhos:

Artigos completos publicados em periódicos:

1. ROSA, P.R.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen production and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 1288-1296, 2014.
2. SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. In: *Bioresource Technology*, *in press*, 2014.
3. 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. In: *Bioresource Technology*. Submitted article, December, 2013.
4. SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. In: *International Journal of Hydrogen Energy*. Submitted article, October, 2013.
5. SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Hydrogen production from sugarcane stillage under thermophilic anaerobic conditions using different substrate concentrations: diluted and raw wastewater. In: *International Journal of Hydrogen Energy*. Submitted article, February, 2014.

Artigos completos publicados em anais de congressos:

1. ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Influence of organic loading rate on the simultaneous production of hydrogen and ethanol from cheese whey. In: 13° World Congress on Anaerobic Digestion, Santiago de Compostela, Espanha, 2013.
2. ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Simultaneous production of hydrogen and methane by co-digestion of cassava processing wastewater and glucose in anaerobic fluidized-bed reactor. In: 13° World Congress on Anaerobic Digestion, Santiago de Compostela, Espanha, 2013.
3. SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SILVA, E.L. Thermophilic hydrogen production in anaerobic fluidized bed reactor from stillage as organic substrate. In: 13° World Congress on Anaerobic Digestion, Santiago de Compostela, Espanha, 2013.
4. ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Influência de diferentes proporções da mistura de glicose e soro de queijo sobre a produção de hidrogênio e etanol em reatores anaeróbios de leite fluidizado. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz do Iguaçu, 2013.
5. SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Produção contínua de hidrogênio a partir da fermentação de vinhaça em um reator anaeróbio de leite fluidizado termofílico. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz do Iguaçu, 2013.
6. ROSA, P.R.F.; SILVA, E.L. Hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor fed with Cheese Whey. In: 19 th World Hydrogen Energy Conference, Toronto 2012.
7. ROSA, P.R.F.; SILVA, E.L. Fermentative hydrogen production from Cassava stillage wastewater using anaerobic fluidized bed reactor. In: 19 th World Hydrogen Energy Conference, Toronto 2012.

Artigos completos submetidos para publicação em periódicos:

1. ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Simultaneous production of hydrogen and methane from cassava processing wastewater and glucose mixture in anaerobic fluidized-bed reactor.

Artigos completos a serem submetidos para publicação em periódicos:

1. ROSA, P.R.F.; FERNANDES, B.S.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Influence of organic loading rate on Hydrogen Production from cheese whey in anaerobic fluidized bed reactors.
2. FERNANDES, B.S; ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Biotechnological potential of lactic acid bacteria isolated in AFBR from cassava processing wastewater.