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

**Influência da relação C/N e C/P na produção de hidrogênio em
reator anaeróbio de leito fluidificado**

MARIANA FRONJA CAROSIA

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

MARIANA FRONJA CAROSIA

**Influência da relação C/N e C/P na produção de hidrogênio em
reator anaeróbico de leito fluidificado**

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

SÃO CARLOS

2014

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

CC292i
i Carosia, Mariana Fronja
Influência da relação C/N e C/P na produção de
hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado /
Mariana Fronja Carosia; orientador Edson Luiz Silva.
São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Etanol. 2. Nitrogênio. 3. Fósforo. 4.
Ethanoligenens sp.. 5. DGGE. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **MARIANA FRONJA CAROSIA**.

Título da tese: "Influência da relação C/N na produção de hidrogênio e etanol em reator anaeróbico de leito fluidificado".

Data da defesa: 14/08/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Edson Luiz Silva (Orientador)**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Associado **Marcelo Zaiat**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Prof. Dr. **Marcelo Loureiro Garcia**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Rio Claro)

APROVADA

Profa. Dra. **Sandra Imaculada Maintinguer**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

Aprovada

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná UNIOESTE)

Aprovada

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

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

**Dedico este trabalho à minha mãe
Sueli Fronja pelas boas energias
que me mandou, ao meu pai
Ademir Carosia e minha irmã
Marília, com amor e gratidão pelo
carinho e por sempre acreditarem
em mim!**

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida!

Embora cética muitas vezes, agradeço a minha mãe que partiu durante meu doutorado e que me iluminou e me acompanhou “lá de cima”. Por, com a perda, ter-me permitido amadurecer e melhorar como pessoa.

À minha irmã e melhor amiga, Marília, que esteve ao meu lado, ainda que distante, durante todo o meu doutorado e que participou dos meus bons e maus momentos, sempre me ajudando nos momentos de fraqueza.

Ao meu pai, Ademir, que nunca economizou palavras de otimismo e valorizou todo o meu esforço e persistência desde que me iniciei na pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Edson (Tinho) pela orientação e por me permitir crescer e evoluir como pessoa.

À minha co-orientadora Profa. Bernadete por me ajudar durante a elaboração deste trabalho e pelas sugestões que foram feitas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro durante meu doutorado (Processo nº 2011/02347-2).

Ao Oscar que ajudou demais com a manutenção dos reatores, sempre com seu bom humor.

À Isabel Sakamoto, que me auxiliou nas técnicas de Biologia Molecular. Muito obrigada pela amizade, pelas sugestões, pela paciência e carinho.

À Janja, Inês e Carol pela paciência e ajuda no laboratório de cromatografia e de análises.

Ao Júlio pela ajuda nas análises no laboratório de Saneamento.

Aos professores Marcelo Zaiat e Eugênio Foresti pelas sugestões e momentos agradáveis nos cafés e confraternizações.

Aos funcionários SHS: Juliana Custório, Silvana Celestini, Fernando Moura, Rose, Pavi, Sá, Helô, Antônio e Antônio.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química da UFSCar: Leandro e Patrícia pelo carinho e amizade.

Ao Pedro Bertarini, por sempre me incentivar durante meu doutorado, pelas boas sugestões, pela paciência em me ouvir e dar força sempre que precisei.

Às flores que alegraram vários dos meus dias no DEQ: Samantha, Cris, Paulete, Jana, Morgs, Livia e Carol. A ajuda de vocês foi muito essencial para finalizar este trabalho. Muito obrigada pela ajuda dentro e fora do laboratório, pela amizade, pelo carinho e palavras de conforto.

Aos amigos de infância: Karina, Fábio, Luiz Gustavo, Rapha, Wilsinho e Nino. Muito obrigada pelos divertidos momentos e pela amizade de muitos anos.

As amigas da faculdade Feliz e Silvia ainda que longes, pela amizade e carinho.

As boas amizades que fiz em São Carlos e que quero carregar sempre! A Milena, pelo carinho e confiança. As parceiras durante a república Jambalaia, e ainda depois que a república desmanchou: Sol, Paty, Fillipa, Ise. E as parceiras da república dos Transportes: Marcela e Monique.

A todos os amigos do LPB pelas agradáveis tardes de café e pelos momentos hilários regados com paródias e imitações: Mara Rúbia, Theo Syrto, Lucas-Anú-Branco, Dago Okada, Drica, Thiago IQSC, Ju Kawanish, Fabrício Motteran, Eduardo Penteado, Livia Botta, Carla Diniz, Carol Gil, Paulo Clairmont, Marcus Vinicius, Kiemi Murata, Rodrigo Carneiro, Laís Américo, Samuel Aquino, Tiago Palladino, Priscila Camiloti, Simone Dasmaceno, Tiago Martins, Rachel Biancalana, Bruna Carrer, Thaís Macedo, Rogério Vilela, Camila Abreu, Sandra Maintinguer, Regiane Ratti, Rafael Bazola, Guilherme Vuitik, Guilherme Oliveira, Inaê Alves, Vanessa Silva, Clara Faria, Daniel Pimenta, Vinicius Masquetti e Vivian Carminato.

Aos amigos do SHS pelos bons momentos em São Carlos: Lucas Quati, Eloá, Filipe Vasconcelos, Taís, Poty, Djalma, Fernanda Peiter, Cebola, Mateus Tetinha, Monstro, Anne, Seu Jorge, Marcus Galbetti, Quixera, Pauleta, Ju Nóbrega, Rodrigo Martins, Marjô, Bdjei, Narumi, Vitória.

Às minhas tias Marinês e Cidinha, e minhas primas Francine e Marina pela força, otimismo, orações e boas energias antes e durante meu doutorado!

À minha psicanalista Cris Mattos, pela ajuda psicológica durante meu doutorado.

À todo o pessoal do Projeto Conhecendo o Choro da UFSCar, pelos bons momentos.

Muito obrigada a todos! A conclusão desse trabalho só foi possível porque pude contar com o apoio e amizade de todos vocês, dentro e fora do laboratório!

RESUMO

CAROSIA, M.F. **Influência da relação C/N e C/P na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da relação carbono/nitrogênio (C/N) e carbono/fósforo (C/P) na produção de hidrogênio (H_2) em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF), contendo pneu triturado como material suporte para adesão microbiana. Foi utilizado substrato sintético contendo glicose (5.000 mg L^{-1}) como fonte de carbono, com pH efluente de $\pm 3,7$. Foram operados quatro reatores com relações C/N=100 em R1, C/N=150 em R2, C/N=200 em R3 e C/N=250 em R4, sob condições mesofílicas. Os reatores foram operados por 18 meses e o experimento foi dividido em três fases: na 1ª Fase a relação C/P foi mantida no valor de 300 e o tempo de detenção hidráulica (TDH) foi variado em 8, 6, 4, 2 e 1 h; na 2ª Fase, o TDH foi mantido em 2 h e a relação C/P foi variada nos valores de 300, 500, 700, 900 e 1100; e na 3ª Fase, o TDH foi mantido em 8 h e a relação C/P variada novamente nos valores de 300, 500, 700, 900 e 1100. Os maiores valores de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foram obtidos no R3 (C/N=200), TDH de 2 h e relação C/P=700 ($0,70 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) e estiveram relacionados às rotas fermentativas de produção de etanol e ácido acético. Os maiores valores de rendimento de hidrogênio (YH) foram obtidos no TDH de 8 h, R3 (C/N=200) e relação C/P=300 ($1,758 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicose}^{-1}$) e estiveram relacionados às rotas de produção de etanol, ácido butírico e ácido acético. O maior valor de rendimento de etanol (YEtOH) do estudo ($1,8 \text{ mol EtOH} \cdot \text{mol glicose}^{-1}$) foi obtido na 2ª fase. A partir de análises de DGGE maior similaridade foi encontrada entre C/P=700 e C/P=900 para R1 (87%), R2 (97%) e R3 (92%) na 2ª fase. Por meio de afiliação filogenética do gene rRNA 16S de amostras das etapas de maior produção de H_2 foram obtidos clones relacionados a espécie produtora de H_2 e etanol *Ethanoligenens* sp., seguida da espécie produtora de ácido láctico *Lactobacillus* sp. e da espécie produtora de ácido acético e butírico *Clostridium* sp..

Palavras-chave: etanol, nitrogênio, fósforo, *Ethanoligenens* sp., DGGE

ABSTRACT

CAROSIA, M.F. **Influence of C/N and C/P ratio in hydrogen production in anaerobic fluidized bed reactor.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The aim of this study was to evaluate the influence of the carbon/nitrogen (C/N) and carbon/phosphorus (C/P) ratio in hydrogen (H_2) production in anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) containing grounded tire as support material for microbial adhesion. Synthetic substrate containing glucose ($5,000 \text{ mg L}^{-1}$) was used as the carbon source, and the effluent pH remained ± 3.7 . Four reactors were operated with C/N=100 (R1), C/N=150 (R2), C/N=200 (R3) and C/N=250 (R4), under mesophilic conditions. The reactors were operated for 18 months and the experiment was divided into three phases: in the 1st Phase, the C/P ratio was maintained at the value of 300 and hydraulic retention time (HRT) was varied in 8, 6, 4, 2 and 1 h; in the 2nd phase, the HRT was kept at 2 h and the C/P ratio was varied in 300, 500, 700, 900 and 1100; and in the 3rd Phase, the HRT was kept at 8 h and C/P ratio varied in the values of 300, 500, 700, 900 and 1100. The highest values of hydrogen production (HPR) were obtained in R3 (C/N=200), HRT of 2 h and C/P=700 ($0,70 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$) and they were related to fermentative pathways of ethanol and acetic acid production. The highest values of hydrogen yield (HY) were obtained in HRT of 8 h, R3 (C/N=200) and C/P=300 ($1,758 \text{ mol H}_2.\text{mol glucose}^{-1}$) and they were related to fermentative pathways of ethanol, butyric and acetic acid production. The highest value of ethanol yield (EtOHY) ($1,8 \text{ mol EtOH. mol glucose}^{-1}$) was obtained in the 2nd Phase. By means of DGGE analyses was found highest similarity between C/P=700 and C/P=900 for R1 (87%), R2 (97%) and R3 (92%) in the 2nd Phase. Through phylogenetic affiliation of the 16S rRNA gene taken from samples of stages of highest H_2 production it were obtained clones of hydrogen and ethanol producing specie related to *Ethanoligenens* sp., followed by the lactic acid bacteria *Lactobacillus* sp. and of the acetic and butyric acid producing *Clostridium* sp..

Keywords: ethanol, nitrogen, phosphorus, *Ethanoligenens* sp., *Clostridium* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipo de produção de biohidrogênio e os microrganismos envolvidos em cada processo	6
Figura 2. Processos de digestão anaeróbia	8
Figura 3. Esquema geral dos experimentos realizados em reator de leito fluidificado.....	26
Figura 4. Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.....	27
Figura 5. reatores anaeróbios de leito fluidificado: (a) Porção superior do reator R2; (b) Reator de leito fluidificado R3; (c) Reator de leito fluidificado R2 contendo biomassa suspensa e imobilizada em material suporte; (d) Reator de leito fluidificado R4	29
Figura 6. Partículas de pneu triturado para utilização como suporte para imobilização da biomassa	31
Figura 7. Média de conversão da glicose em R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 1ª fase de operação	42
Figura 8. Variação do YH em função do TDH para quatro relações C/N aplicadas, durante a 1ª fase de operação.....	47
Figura 9. Variação do YH em função da relação C/N para cinco TDH aplicados.....	49
Figura 10. Variação da PVH em função do TDH para as quatro relações C/N aplicadas	50
Figura 11. Variação da PVH em função da relação C/N para cinco TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação.....	51
Figura 12. Concentração dos metabólitos solúveis e EtOHY no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função do TDH.....	56
Figura 13. Valores percentuais dos metabólitos solúveis no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função do TDH, durante a 1ª fase de operação.....	57
Figura 14. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) and the UPGMA clustering method, a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às populações de bactérias dos reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) durante as etapas com TDH de 8, 6, 4, e 2h, durante a 1ª fase de operação	62

- Figura 15.** Árvore filogenética da OTU obtidos a partir do material suporte do reator R3 e TDH=8h, da 1ª fase de operação, construído usando o método neighbor-joining, baseado na comparação do gene rRNA 16S. Números nos nós representam valores de bootstrap (percentagens of 1000 repetições). Bar, 95% substituições nas sequencias dos nucleotídeos. Outgroup: *Methanosarcina acetivorans* 67
- Figura 16.** Efeito da relação C/P na conversão da glicose nos RALF R1 (C/N= 100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação 70
- Figura 17.** Variação do YH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250) 77
- Figura 18.** Variação do YH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação 78
- Figura 19.** Variação da PVH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação 79
- Figura 20.** Variação da PVH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação 81
- Figura 21.** Concentração dos metabólitos solúveis e EtOHY no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função das relações C/P aplicadas 83
- Figura 22.** Valores percentuais dos metabólitos solúveis no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função da relação C/P, durante a 2ª fase de operação 84
- Figura 23.** Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e método de agrupamento UPGMA, a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do reator R1, R2 e R3 com relação com relação C/P=500, 700, 900 e 1100, durante a 2ª fase de operação 87
- Figura 24.** Árvore filogenética da OTU obtidos a partir do material suporte do reator R3 e C/P=700, da 2ª fase de operação, construído usando o método neighbor-joining, baseado na comparação do gene rRNA 16S. Números nos nós representam valores de bootstrap (percentagens of 1000 repetições). Bar, 95% substituições nas sequencias dos nucleotídeos. Outgroup: *Methanosarcina acetivorans* 94
- Figura 25.** Efeito da relação C/P na conversão da glicose nos RALF R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 3ª fase de operação 97

Figura 26. Variação do YH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 3ª fase de operação.....	101
Figura 27. Variação do YH em função da relação C/N para as relações C/P aplicadas=300, 500, 700, 900 e 1100, durante a 3ª fase de operação	103
Figura 28. Variação da PVH em função da relação C/P para as relações C/N aplicadas: C/N=100 (R1), C/N=150 (R2), C/N=200 (R3) e C/N=250 (R4), durante a 3ª fase de operação	104
Figura 29. Variação da PVH em função da relação C/N para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação.....	105
Figura 30. Concentração dos metabólitos solúveis e EtOHY no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função das relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação	107
Figura 31. Valores percentuais dos metabólitos solúveis no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função da relação C/P, durante a 3ª fase de operação	108
Figura 32. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e método de agrupamento UPGMA a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do reator R1, R2 e R3 com relação C/P=500, 700, 900 e 1100, durante a 3ª fase de operação.....	110
Figura 33. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e método de agrupamento UPGMA a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas das etapas de maiores e menores valores de PVH e YH das três fases de operação	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbio de leito fluidificado	23
Tabela 2. Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidização para as partículas utilizadas.....	30
Tabela 3. Parâmetros utilizados nos reatores de leito fluidificado	31
Tabela 4. Composição da água residuária sintética utilizada no meio Del Nery (1987) adaptado	32
Tabela 5. Etapas referentes a primeira fase de operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado.....	33
Tabela 6. Etapas referentes a segunda fase de operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado.....	34
Tabela 7. Etapas referentes a terceira fase de operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado.....	34
Tabela 8. Resultados médios de pH obtidos para cada faixa de TDH aplicado no R1 (C/N=100), no R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e no R4 (C/N=250), durante a 1ª fase de operação.....	39
Tabela 9. Valores médios de DQO afluente, efluente e porcentagem removida para R1, R2, R3 e R4 nos TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação.....	40
Tabela 10. Concentração de sólidos suspensos totais e voláteis do efluente obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4, durante a 1ª fase de operação.....	44
Tabela 11. Valores médios de porcentagem de H ₂ no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 para os TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação	45
Tabela 12. Valores médios de YH e PVH obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4 para os TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação.....	46
Tabela 13. Estudo comparativo de PVH e YH para diferentes relações C/N e C/P em reatores em bateladas e reatores de fluxo contínuo.....	54
Tabela 14. Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria, referentes a 1ª fase de operação	66
Tabela 15. Resultados médios de pH obtidos para cada relação C/P aplicada no R1 (C/N=100), no R2 (C/N=150), no R3 (C/P=200) e no R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação.....	68

Tabela 16. Valores médios de DQO afluente e efluente e porcentagem removida para R1, R2, R3 e R4 nas relações C/P aplicadas, durante a 2ª fase de operação.....	69
Tabela 17. Concentração de sólidos suspensos totais e voláteis efluente obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4, durante a 2ª fase de operação.....	72
Tabela 18. Valores médios da porcentagem de H ₂ no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 2ª fase de operação	73
Tabela 19. Valores médios de HY e PVH obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 2ª fase de operação	75
Tabela 20. Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria, referentes a 2ª fase de operação.....	92
Tabela 21. Estudo comparativo dos produtos de fermentação dos microrganismos encontrados na etapa de maior rendimento de hidrogênio durante a 2ª fase de operação.....	93
Tabela 22. Resultados médios de pH obtidos para cada C/P aplicada em R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 3ª fase de operação	95
Tabela 23. Valores médios de DQO afluente, efluente e porcentagem removida para R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação.....	96
Tabela 24. Concentração de sólidos suspensos totais e voláteis efluente obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4, durante a 3ª fase de operação.....	98
Tabela 25. Valores médios de porcentagem de H ₂ no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação	99
Tabela 26. Valores médios de YH e PVH obtidos nos reatores R1, R2 R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFBR - anaerobic fluidized bed reactor
APBR - reator anaeróbio de leito empacotado
ATP – trifosfato de adenosina
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
C/N - carbon/nitrogen
C/N – carbono/nitrogênio
C/P - carbon/phosphorus
C/P – carbono/fósforo
CO₂ - gás carbônico
DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis
DGGE - eletroforese em gel com gradiente desnaturante
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DQO - Demanda Química de Oxigênio
EtOH - etanol
EtOHY - ethanol yield
H₂ - hidrogênio
HAc - ácido acético
HBu - ácido butírico
HfO - ácido fórmico
HLa - ácido láctico
HPLC - High-Performance Liquid Chromatography
HPr - ácido propiônico
HPR - hydrogen production
HRT - hydraulic retention time
HY - hydrogen yield
MeOH - metanol
MSP - metabólitos solúveis produzidos
N – nitrogênio
NADH - dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NH₄⁺ - íon amônio

OUT - Unidades Taxonômicas Operacionais

P – fósforo

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PET – politereftalato de etileno

pH - potencial hidrogeniônico

PVH – produção volumétrica de hidrogênio

RALF – reator anaeróbio de leito fluidificado

RCTA - reator contínuo de tanque agitado

RCTA – reator contínuo de tanque agitado

RDP - Ribossomal Database Project

RNAr - Ácido Ribonucleico ribossômico

SEP – extracelulares poliméricas

SEP - substâncias extracelulares poliméricas

SST - sólidos suspensos totais

SSV - sólidos suspensos voláteis

TCO – taxa de carga orgânica

TDH – tempo de detenção hidráulica

UASB - upflow anaerobic sludge blanket reactor

YEtOH - rendimento de etanol

YH – rendimento de hidrogênio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xi
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxiii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Produção de Hidrogênio	5
3.2. Subprodutos da produção fermentativa de hidrogênio	7
3.3. Parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio e metabólitos	11
3.3.1. Influência dos macronutrientes fósforo e nitrogênio e das relações C/N e C/P na produção fermentativa do hidrogênio.....	12
3.4. Influência da relação C/N na produção de substâncias extracelulares poliméricas	17
3.5. Produção de H ₂ em reatores anaeróbios de leite fluidificado e microrganismos envolvidos.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Reator de leite fluidificado	27
4.2. Material suporte	30
4.3. Água residuária.....	32
4.4. Inóculo	32
4.5. Operação dos reatores aneróbios de leite fluidificado.....	33
4.6. Análise da composição dos gases e quantificação da produção de hidrogênio.....	34
4.7. Análises físico-químicas.....	35
4.8. Determinação de ácidos voláteis e alcoóis	35
4.9. Cálculo dos principais parâmetros.....	35

4.10. Análises de biologia molecular da comunidade microbiana.....	36
4.10.1. Extração do ácido nucléico, PCR e DGGE.....	36
4.10.2. Clonagem e determinação da sequência RNAr 16S	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Primeira fase de operação dos RALF	38
5.1.1. pH, DQO, conversão da glicose e sólidos suspensos.....	38
5.1.2. Efeitos do TDH e relação C/N na produção de hidrogênio	44
5.1.3. Produção de ácidos orgânicos e alcoóis.....	55
5.1.4. Caracterização molecular da diversidade microbiana.....	61
5.2. Segunda fase de operação dos RALF: Análise do efeito da relação C/P e C/N na produção de hidrogênio na condição de máxima produtividade.....	68
5.2.1. pH DQO, conversão da glicose e sólidos suspensos.....	68
5.2.2. Efeito da relação C/N e C/P na produção de hidrogênio	72
5.2.3. Produção de ácidos orgânicos e etanol	82
5.2.4. Caracterização Molecular da diversidade microbiana	87
5.3. Terceira fase de operação dos RALF: Análise do efeito da relação C/P e C/N na produção de hidrogênio na condição de máximo rendimento	95
5.3.1. pH, DQO, conversão da glicose e sólidos suspensos.....	95
5.3.2. Efeitos da relação C/P e C/N na produção de hidrogênio.....	98
5.3.3. Produção de ácidos orgânicos e etanol	106
5.4. Comparação da comunidade microbiana das principais condições de produção e rendimento de H ₂	112
5.5. Considerações Finais.....	114
CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS.....	117

INTRODUÇÃO

Os processos fermentativos de produção de H_2 a partir de compostos orgânicos envolvem uma variedade de reações bioquímicas e engloba uma grande diversidade de bactérias (Azwar et al., 2014). A produção de hidrogênio por meio da fermentação de glicose pode ocorrer por três vias metabólicas diferentes: (a) tipo propiônico, (b) tipo butírico e (c) tipo etanol, gerando como subprodutos principais ácido propiônico, ácido butírico e etanol, respectivamente (Hwang et al., 2004).

Uma vez que os substratos utilizados afetam diretamente a comunidade microbiana, e, por conseguinte as vias metabólicas, é necessário investigar as características metabólicas desses grupos possibilitando a manipulação de tais comunidades, favorecendo a produção de hidrogênio e solventes, como etanol. Vários microrganismos já foram verificados em estudos de produção de hidrogênio por processos fermentativos, tais como *Clostridium* spp. e *Klebsiella pneumoniae* na fermentação da xilose em ensaios em bateladas (Maintinguer et al., 2011), *Enterobacter* sp. em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) usado na fermentação da glicose (Shida et al., 2012), *Clostridium* sp. e *Enterobacter* sp. na fermentação de sacarose em experimentos em bateladas (Song et al., 2012), co-cultura de *Clostridium acetobutylicum* e *Ethanoligenens harbinense* na fermentação de celulose microcristalina (Wang et al., 2008).

Além do substrato, alguns estudos já relataram a importância da variação da temperatura, tempo de detenção hidráulica (TDH), fonte de carbono, meio suporte, pH, dentre outros, na produção biológica de H_2 através da fermentação em ensaios em bateladas ou reatores de fluxo contínuo (Wang e Wan, 2009). No entanto, os parâmetros nutricionais relacionados à otimização da produção de hidrogênio, bem como os microrganismos envolvidos devem ser mais explorados.

Kothari et al. (2012) ressaltaram que a disponibilidade de nutrientes é de relevante importância na produção biológica de hidrogênio, uma vez que os nutrientes são necessários

para o metabolismo, crescimento e atividade bacteriana. Dentro deste contexto, o nitrogênio (N) é necessário para a formação de ácidos nucleicos, componentes de parede celular e proteína (Lengeler et al., 1999). O fósforo (P) é utilizado na síntese de ATP usado nos processos celulares e também é requerido para a formação de ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, lipídeos e açúcares (Thompson et al., 2006).

Estudos avaliando a influência das relações carbono/nitrogênio (C/N) na produção de hidrogênio já foram realizados em experimentos em bateladas sob condições termofílicas (O-Thong et al., 2008), em ensaios em bateladas sob condições mesofílicas (Lin e Lay, 2004, Argun et al., 2008, Oztekin et al., 2008), na fotofermentação em ensaios em bateladas (Androga et al., 2011) e em reatores mesofílicos de fluxo contínuo, com leite fixo e sacarose como fonte de carbono (Rojas et al., 2010). Dentre estes, somente Argun et al. (2008), Oztekin et al. (2008) e O-Thong et al. (2008) avaliaram simultaneamente a relação C/N e C/P em seus experimentos em bateladas. Considerando as pesquisas aqui mencionadas, destacam-se a investigação de Lin e Lay (2004), na qual obtiveram rendimento de H_2 (YH) de 4,8 mol H_2 .mol-sacarose⁻¹ e produção volumétrica de H_2 (PVH) de 270 mmol- H_2 .L⁻¹.d⁻¹ para relação C/N=47 em reatores em bateladas; a pesquisa de Rojas et al. (2010), na qual verificaram valores máximos de YH (3,5 mol H_2 .molsacarose⁻¹) e PVH (162,5 mL- H_2 .h⁻¹.L⁻¹) em relação C/N=140, em reator de leite fixo e o estudo de Argun et al. (2008) no qual obtiveram valor de 281 mL H_2 g⁻¹ amido em C/P=1000 e C/N=200 em experimentos em bateladas. Dentre os estudos relacionados a rendimento de etanol (YE_{EtOH}) destaca-se os resultados de Barros e Silva (2012) cujos valores foram superiores a 2 mol EtOH.mol glicose⁻¹ em TDH de 2 h, na fermentação da glicose em RALF.

Nesse contexto, a fim de se verificar as melhores condições para a produção de hidrogênio e etanol em reatores de fluxo contínuo e caracterizar os microrganismos e as possíveis rotas metabólicas relacionadas, foi avaliada a influência de cinco relações C/P em quatro reatores de leite fluidificado, cada um contendo uma relação C/N diferente. Objetivou-se também verificar em qual condição se obtém melhores valores de produção volumétrica e rendimento de hidrogênio e etanol através da fermentação da glicose (5.000 mg.L⁻¹), com tempo de detenção hidráulica (TDH) variando de 8 a 1h. Ademais, a melhor condição para rendimento e produtividade de hidrogênio foi eleita para afiliação filogenética do gene RNA 16S e análise da comunidade microbiana por meio de PCR-DGGE.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da relação C/N e C/P na produção de hidrogênio utilizando água residuária sintética contendo glicose como única fonte de carbono, em reator anaeróbio de leito fluidificado.

Os objetivos específicos dessa pesquisa foram:

- Avaliar a influência do TDH, variando de 8 a 1 hora, na produção de hidrogênio;
- Avaliar a comunidade microbiana por meio de técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) para as condições de produção de H₂ mais relevantes;
- Caracterizar a comunidade microbiana por meio de clonagem, sequenciamento e afiliação filogenética do gene RNAr 16S das condições de maior produção de H₂.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados os fundamentos teóricos utilizados para a realização desse trabalho. Primeiramente, será destacada a importância do H_2 como fonte de energia alternativa não poluente e sua obtenção por vias biológicas, com ênfase nas principais rotas fermentativas e os subprodutos relacionados à produção de H_2 . A seguir, serão abordados os principais parâmetros e condições relevantes para a produção biológica de hidrogênio, com ênfase naqueles que foram avaliados nesse trabalho, tais como, relação C/N e relação C/P. Posteriormente, serão apresentados alguns trabalhos importantes referentes à produção de H_2 em reator de leito fluidificado e alguns microrganismos envolvidos.

3.1. Produção de Hidrogênio

Devido aos desafios relacionados ao requerimento de alta demanda energética e à necessidade de sanar a problemática da consequente poluição ambiental, várias pesquisas estão avançando em direção ao desenvolvimento de fontes de energia alternativa renovável e não poluente (Elsharnouby et al., 2013; Cheng et al., 2011). Nesse contexto, o hidrogênio tem apresentado potencial para substituir as tecnologias de produção de energia atuais que dependem de combustíveis fósseis, uma vez que esse gás é ambientalmente favorável e seguro. Ademais, o hidrogênio é considerado o recurso de energia renovável mais promissor, pois além de não prejudicar o meio ambiente apresenta elevada eficiência de conversão de energia utilizável (Cheng et al., 2011; Sinha e Pandey, 2011).

O hidrogênio pode ser produzido por processos termoquímicos, eletroquímicos ou por processos biológicos (Chen et al., 2006). Nos processos biológicos, a produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio da biofotólise de água, por fotofermentação de compostos orgânicos ou através da fermentação a partir de compostos orgânicos e sistemas híbridos, como estão expostos na Figura 1 (Sinha e Pandey, 2011).

Figura 1. Tipo de produção de biohidrogênio e os microrganismos envolvidos em cada processo

Fonte: Sinha e Pandey (2011)

Uma vez que diferentes grupos de microrganismos realizam tais processos biológicos de produção de H_2 mencionados, estes apresentam peculiaridades, requerimentos, vantagens e desvantagens. Os processos de fermentação têm sido atrativos por não requererem luz solar, e apresentar operação simples em comparação à produção fotossintética de H_2 . Possui a desvantagem da maior parte da fração orgânica permanecer como subprodutos solúveis da fermentação, mas por outro lado é possível a recuperação de tais subprodutos. Embora o processo fermentativo apresente baixos rendimentos de H_2 , rápidas taxas de produção de H_2

podem ocorrer. Somado a isso, apresenta a possibilidade de geração de energia simultânea ao tratamento de resíduos orgânicos, além da possibilidade de utilizar ampla variedade de fontes de carbono. No processo fermentativo de geração de H_2 sob condições anóxicas, os elétrons provenientes da degradação de substratos orgânicos precisam ser eliminados para manter neutralidade elétrica. Assim, prótons podem atuar como receptor de elétrons para produzir H_2 molecular na presença de enzima hidrogenase (Sinha e Pandey, 2011).

3.2. Subprodutos da produção fermentativa de hidrogênio

Durante o processo de fermentação de carboidratos para produção de hidrogênio, ocorre simultaneamente formação de dióxido de carbono e ácidos voláteis orgânicos, principalmente ácido acético e butírico, pelas bactérias acidogênicas. Através da fermentação da glicose também podem ser formados como subprodutos: metanol, etanol, acetona, butanol, ácido láctico, ácido propiônico, dentre outros (Figura 2).

Figura 2. Processos de digestão anaeróbia

Fonte: Saady (2013)

Dentro do contexto de produção de hidrogênio via fermentação de glicose, a rota de formação de ácido acético é bastante conhecida e a mais eficiente, uma vez que para cada mol de glicose são gerados 4 mols de H_2 (Equação 1).

O ácido acético também pode ser gerado através da acetogênese e homoacetogênese. Através do processo de acetogênese microrganismos heterotróficos oxidam ácidos orgânicos tais como os ácidos propiônico, butírico, valérico e álcoois formando acetato e produzindo H₂ e gás carbônico (CO₂) (Parawira et al., 2004). Por outro lado, no processo de homoacetogênese, acetato é gerado por microrganismos acetogênicos autotróficos através da redução de CO₂ com H₂, ou seja, com o consumo de H₂ (Drake, 1994).

Assim como a rota de produção de ácido acético, a produção de H₂ pela rota de formação de ácido butírico também é bastante conhecida e favorece a produção de H₂ uma vez que para cada mol de glicose fermentado 2 mols de H₂ são gerados (Equação 2).

Embora as rotas de produção de hidrogênio pelas vias ácido acético e butírico sejam as mais conhecidas, rotas alternativas para a produção desse biogás têm sido propostas.

Por outro lado, existem rotas, como a de produção de ácido propiônico, que desfavorece a produção de H₂, devido ao consumo de 2 moles de H₂ (Eq. 3) (Saady et al., 2013).

Há também situações na quais se tem verificado mudança na rota metabólica para a solventogênese, ou seja, geração de acetona, metanol, etanol, propanol, butanol, lactato (Guo et al. 2010). Dentre as rotas de geração de etanol como metabólito da fermentação da glicose, tem sido proposta a equação (4), na qual não ocorre produção nem consumo de hidrogênio e a equação (5), que, em contrapartida, ocorre simultaneamente a produção de hidrogênio e etanol (Hwang et al, 2004; Zhu et al., 2009).

Dentro do contexto de solventogênese, tem sido proposta também a equação (6) de geração de lactato a partir da fermentação da glicose. Nessa rota não ocorre consumo nem

geração de H_2 e ocorre geração de 2 moles de lactato. Segundo Saady et al. (2012), alta pressão parcial de hidrogênio pode levar o sistema a formar ácido láctico.

Embora na literatura disponível em produção biológica de hidrogênio pouco se relata sobre possíveis rotas de produção de metanol, Giaconia et al. (2007) sugerem uma rota de produção de metanol a partir da conversão de gás sintético (Eq. 7).

Valdez-Vasquez et al. (2006) afirmam que o início da produção de hidrogênio pelas vias da solventogênese está relacionado à alta concentração de ácidos orgânicos e baixos pHs. De maneira contrária, Fan et al. (2006) observaram a ocorrência de solventogênese em valores de pH superiores a 6,5, a partir da fermentação de resíduos de cervejaria, enquanto em pH igual ou inferior a 6,0 os principais subprodutos foram acetato e butirato. Situação semelhante já havia sido observada por Fang e Liu (2002) utilizando faixas de pH entre 4,0 e 7,0, com predominância de butirato e acetato em baixos pHs, enquanto etanol, lactato, propionato e caproato foram predominantes em condições de maiores valores de pH.

Temudo et al. (2008) também estudaram a influência da variação de pH sobre as vias metabólicas, bem como a diversidade microbiana associada as diferentes faixas de pH a partir da glicose, xilose e glicerol. Seus resultados confirmaram que em valores reduzidos de pH (<6), havia principalmente butirato e acetato na composição dos subprodutos. Todavia, sob pH elevado, houve deslocamento para a via acetato-etanol. As espécies encontradas tanto em condições de pH baixo quanto alto pertenciam ao gênero *Clostridium*, enquanto em faixas intermediárias de pH, as mudanças nas rotas metabólicas estiveram associadas a alta diversidade microbiana.

Baghchehsaraee et al. (2009) demonstraram o efeito do ácido láctico na produção de hidrogênio. Seus estudos foram realizados em reatores em bateladas, nos quais houve adição de quatro metabólitos, sendo eles, etanol, ácido láctico, ácido butírico e ácido acético em um meio contendo amido. Foi observado que o ácido láctico teve um efeito positivo sobre a produção máxima de hidrogênio e taxa de produção hidrogênio, sendo que a adição de 10 mM de ácido láctico contendo amido levou a um aumento da produção volumétrica de hidrogênio

de 4,31 para 8,23 mL.h⁻¹ e do rendimento de hidrogênio de 5,70 para 9,08 mmol H₂.g amido⁻¹. O aumento da produção e rendimento de hidrogênio foi atribuído à mudança na rota de formação do ácido acético e etanol para formação de ácido butírico como o metabólito predominante. Segundo os autores, o aumento do rendimento de hidrogênio deveu-se, provavelmente, ao aumento do dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida (NADH) residual disponível para a produção de hidrogênio.

Kim et al. (2012) utilizaram o ácido láctico como co-substrato, cuja concentração variou de 4 e 8 g/L, e verificaram que as concentrações de ácido láctico final foram menores que as iniciais. Os autores obtiveram rendimento máximo de 1,72 mol.mol glicose⁻¹ na concentração de 8g.L⁻¹ de ácido láctico. Assim, sugerindo possível rota metabólica por meio de ácido láctico na produção de hidrogênio.

3.3. Parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio e metabólitos

Existem alguns parâmetros que influenciam o processo de formação de hidrogênio, ácidos orgânicos e solventes, tais como pH, temperatura, tipo de inóculo, fonte de carbono, TDH, meio suporte e configuração de reator. No entanto, ainda não há um consenso em relação a condição ótima de determinados fatores na produção biológica de hidrogênio (Wang e Wan, 2009).

A produção biológica de hidrogênio também pode ser significativamente afetada pela concentração de macronutrientes (fósforo, nitrogênio e enxofre) e micronutrientes, (ferro, cobalto, níquel, molibdênio, selênio, riboflavina e vitamina B12) (Chernicharo, 1997).

Dentre os estudos acerca da influência de micronutrientes na produção de hidrogênio, tem-se o estudo de Lee et al. (2001), realizado em experimentos em batelada sob condições mesofílicas por microflora anaeróbia no-fotossintética, avaliando os efeitos do aumento da concentração de ferro; Lin e Lay (2005), que estudaram o requerimento de 11 metais traço na produção de hidrogênio; e Li e Fang (2007), no qual foram investigados os efeitos de inibição de seis metais pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Zn e Pb) na produção de H₂ de águas residuárias contendo sacarose por lodo granular em experimentos bateladas. Dependendo da sua concentração, os metais pesados podem ser inibitórios, estimulatórios ou até tóxicos em reações bioquímicas, uma vez que se ligando a enzimas podem levar a interrupção de suas atividades. Todavia, é necessária uma quantidade traço para ativação e manutenção de muitas enzimas e co-enzimas. (Vallee e Ulmer, 1972).

3.3.1. Influência dos macronutrientes fósforo e nitrogênio e das relações C/N e C/P na produção fermentativa do hidrogênio

De relevante importância na produção biológica de hidrogênio, a disponibilidade dos nutrientes nitrogênio e fósforo está relacionada ao metabolismo, crescimento e atividade bacteriana (Kothari et al., 2012). Nitrogênio é necessário para a formação de proteínas, componentes de parede celular e ácidos nucleicos (Lengeler et al., 1999). Fósforo é relevante para o sistema de geração de energia (ATP), além de ser um importante componente químico de ácidos nucleicos, açúcares, ácidos orgânicos e lipídeos.

O nitrogênio é considerado o nutriente inorgânico requerido em maiores concentrações para o crescimento dos microrganismos, sendo que nitrogênio nas formas de nitrato e nitrito não se encontra disponível para crescimento bacteriano em condições anaeróbias, uma vez que este é reduzido a nitrogênio gás e liberado na atmosfera. Assim, as principais fontes de nitrogênio utilizadas pelos microrganismos são amônia e a porção de nitrogênio orgânico liberado durante a degradação.

Sabe-se que os esgotos domésticos geralmente possuem todos os tipos necessários de nutrientes em concentrações adequadas, assim proporcionando as condições ideais para o crescimento de microrganismos sem limitações para o processo de digestão anaeróbia. Contrariamente, as águas residuárias industriais possuem composições mais específicas, e, na maioria das vezes, necessitam de suplementação de nutrientes para uma degradação ótima (Chernicharo, 1997).

Algumas águas residuárias podem ser ricas em termos de carboidratos e deficientes de outros nutrientes, tais como, N, P e sais minerais. Contudo, considerando a digestão anaeróbia em geral, os requerimentos de nitrogênio podem variar, sendo considerada a necessidade bacteriana em despejos contendo grandes quantidades de carboidratos, cerca de até 6 vezes superiores que crescimento microbiano em despejos a base de ácidos voláteis. Tal requerimento se deve ao aumento da síntese das bactérias fermentativas (Chernicharo, 1997). Embora a estimativa dos requisitos de nutrientes, com base na concentração do esgoto, não seja a mais indicada, a bibliografia especializada geralmente referencia a suplementação de nutrientes com base na demanda química de oxigênio DQO (Chernicharo, 1997). Considerando que os nutrientes presentes no esgoto estejam em formas disponíveis para os microrganismos, Lettinga et al. (1996) sugerem as seguintes relações para serem aplicadas:

(a) DQO:N:P = 1000:5:1 e C:N:P= 330:5:1 em situações na qual a biomassa apresenta baixo coeficiente de produção celular ($Y \sim 0,05 \text{ g SSV.g}^{-1}\text{DQO}$), como no caso de degradação de ácidos graxos voláteis e DQO:N:P = 350:5:1 e C:N:P= 130:5:1 quando a biomassa possui elevado coeficiente de produção celular ($Y \sim 0,15 \text{ g SSV.g}^{-1}\text{DQO}$), como ocorre no caso de degradação de carboidratos.

Em relação à importância do fósforo em comunidades anaeróbias, sua incorporação por microrganismos na digestão anaeróbia tem sido considerada aproximadamente 1/5 a 1/7 daquela estabelecida para o nitrogênio. Geralmente, os microrganismos utilizam o ortofosfato inorgânico, uma vez que este pode ser incorporado pelas células em crescimento, através da mediação de enzimas denominados fosfatases (Chernicharo, 1997). No entanto, os efeitos da suplementação de N e P ou da relação C/N e C/P sobre o rendimento e taxa de formação de hidrogênio ainda foram pouco relatados na literatura (Wang e Wan, 2009).

Os parâmetros utilizados para avaliar a influência das relações C/N/P sobre a produção de hidrogênio são o conteúdo deste gás no biogás produzido, seu rendimento e a produção volumétrica deste gás. Baixas ou elevadas concentrações de determinados nutrientes além de causarem baixo rendimento e reduzidas velocidades de produção de hidrogênio, podem atuar como fator limitante, mudando as rotas metabólicas, reduzindo a atividade biológica, causando efeitos inibitórios, interferindo nas culturas microbianas dominantes e nos produtos da fermentação (Oztekin et al. 2008).

Variando-se a disponibilidade de nitrogênio, é provável que ocorra diferentes direcionamentos da energia obtida no catabolismo. Em condições com excesso de nitrogênio (baixas relações C/N), a energia pode ter sido principalmente utilizada para assimilação e crescimento celular, assim, levando a menores produções de hidrogênio. Contudo, em condições com limitação da disponibilidade de nitrogênio (aumento da relação C/N), a deficiência nutricional provavelmente impede a utilização de energia para crescimento, levando a um efeito benéfico na produção de hidrogênio. Quedas na produção e rendimento de hidrogênio para relações C/N elevadas podem então serem atribuídas a deficiências nutricionais graves, indicando que existe uma relação C/N ótima para o processo (Rojas, 2010).

Trabalhos estudando a influência da relação C/N na produção de hidrogênio foram realizados por Lin e Lay (2004) em reatores em batelada com agitação. Os autores aplicaram relações C/N entre 40 e 130, utilizando sacarose como substrato (20 g DQO.L^{-1}) e lodo proveniente de estação de tratamento de esgoto como inóculo, o qual foi aquecido a 100°C

por 45 minutos para inibir arqueias metanogênicas. Os resultados obtidos mostraram que a relação C/N=47 foi a que apresentou maior YH ($4,8 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol sacarose}^{-1}$) e PVH ($270 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Para a relação C/N=40, o rendimento e a produção de H_2 foram reduzidos em 55% e 80%, respectivamente. Para a relação C/N de 98, o rendimento foi 55% menor, entretanto a produção volumétrica se manteve.

Objetivando demonstrar a influência da concentração de macronutrientes sobre a produção de hidrogênio, Van Ginkel et al. (2005) utilizaram água residuária doméstica e de processamento de alimentos. Para isso, realizaram análises preliminares sobre as concentrações de nitrogênio ($\text{NH}_3\text{-N}$) e fósforo (P-PO_4^{-3}). O potencial de cada água residuária, com e sem a adição de nutrientes (N, P e metais traço), foi avaliado para a produção de hidrogênio a fim de determinar a necessidade de suplementação. De acordo com os resultados obtidos, a água residuária proveniente da indústria de balas ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de DQO) apresentou aumento de 0,02 para $0,10 \text{ L H}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ de DQO com a adição de nutrientes. Contudo, não ocorreu alteração na produção de hidrogênio dessa mesma água residuária com $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de DQO, mesmo com a adição de nutrientes. Assim, sugere-se que é necessário um balanceamento entre a fonte de carbono e os macronutrientes.

Embora a relação C/N/P seja importante no crescimento microbiano, poucos estudos existem em relação ao efeito dessas relações no desenvolvimento de biofilme bacteriano. Em um meio nutriente bem conhecido (formulação Endo), Thompson et al. (2006) testaram os efeitos da variação da relação C:N:P na formação de biofilme de *Enterobacter cloacae* Ecl e *Citrobacter freundii* Cf1, tanto em biofilme com espécie única quanto com espécie binária. Os autores verificaram que as relações dos nutrientes presentes no sistema influenciaram na formação do biofilme tanto para espécie única quanto binário, e não somente os componentes individuais. Assim, o estudo destas relações pode maximizar seu desenvolvimento tanto reatores em bateladas quanto em reatores de leito fluidificado.

Em reatores em batelada sob agitação, Cheong e Hansen (2007) compararam a produção de hidrogênio de lodo obtido de estação de tratamento de esterco de gado com e sem pré-tratamento. O pré-tratamento consistiu em choque térmico por 20 minutos a 95°C . Água residuária sintética a base de glicose ($25.000 \text{ mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) e pH de 5, 6 e 7 foram utilizados. As relações C/N aplicadas foram de 12,5 e 30, todavia ao longo dos experimentos não foi observado efeito significativo em relação ao teor de nitrogênio, uma vez que a produção volumétrica de hidrogênio acumulado com pH igual a 7 e relação C/N de 30 foi de 69 mL de H_2 para ambos os inóculos. Utilizando lodo com e sem pré-tratamento, a produção

volumétrica manteve-se na mesma faixa de valores para a relação C/N de 12,5, sendo 68 e 72 mL de H₂, respectivamente. Para a relação C/N de 30, pH igual a 5 e inóculo pré-tratado, foi observada máxima produção volumétrica específica de hidrogênio de 25 mL H₂.h⁻¹.g⁻¹.

Em reatores em batelada, Argun et al. (2008) aplicaram relação de C/N entre 20 e 200 e C/P entre 50 e 1000, com pH entre 6 e 7, sob condições mesofílicas. Como substrato foi utilizada solução de trigo em pó (20 g.L⁻¹) e como inóculo lodo proveniente de estação de tratamento de águas residuárias de empresa de levedura. Os autores observaram que para elevadas concentrações de nitrogênio (C/N < 46) e aumento da relação C/P (50 a 950), a produção volumétrica específica de hidrogênio decresceu devido a limitações causadas por baixas concentrações de fósforo, quando o nitrogênio estava em excesso. Todavia, em baixas concentrações de nitrogênio (C/N > 46) a produção volumétrica específica de hidrogênio melhorou na medida em que a relação C/P aumentava, indicando baixos requerimentos de fósforo quando a concentração de nitrogênio foi baixa, sendo, neste caso, o nitrogênio o substrato limitante. Os resultados mostraram que na relação C/N=200 e C/P=1000 o melhor rendimento de hidrogênio foi de 23 mg H₂.g amido⁻¹ e a maior produção volumétrica específica de hidrogênio de 8,0 mg H₂.g biomassa⁻¹.h⁻¹.

Xu et al. (2008) estudaram uma nova cepa de bactéria produtora de hidrogênio (*Ethanoligenens* sp. B49) devido a sua capacidade de produção de H₂ utilizando glicose como única fonte de carbono e verificaram que a concentração de fermento em pó e fosfato usado no meio sintético afetou significativamente a produção de H₂ por esse microrganismo. Nesse estudo, após a fase média de crescimento exponencial (cerca de 8 a 16 horas), foi observada rápida evolução na produção de H₂, cujos valores de rendimento de H₂ máximo e produção volumétrica de hidrogênio máximo específico estimados foram 2,26 mol H₂.mol glicose⁻¹ e 27,74 mmol H₂.g célula⁻¹ h, respectivamente. As concentrações ótimas de fermento em pó e fosfato foram 0,3–0,5 g.L⁻¹ e 100–150 mmol.L⁻¹, respectivamente.

Amorim (2009) avaliou o efeito da concentração da glicose em 4 RALFs contendo argila expandida como material suporte. As concentrações de glicose foram de 2000, 4000, 10000 e 25000 mg.L⁻¹. Os reatores foram inoculados com lodo pré-tratado termicamente e mantidos sob condições mesofílicas. O TDH aplicado foi decrescente de 8 a 1 h. Amorim (2009) utilizou meio proposto por Del Nery (1987), e, a partir dos valores de glicose utilizados por Amorim (2009), bem como os valores de uréia, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico foram calculadas as relações C/N e C/P utilizadas em cada reator. Assim, para as concentrações de glicose 2000, 4000, 10000 e 25000 mg.L⁻¹, foram

obtidos os valores de relação C/N 14, 28, 69 e 172. A PVH máxima obtida foi de $1,58 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, para o reator operado com 10000 mg.L^{-1} de glicose, ou seja, para a relação C/N de 69. O YH máximo obtido foi de $2,52 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose para o reator operado com 4000 mg.L^{-1} de glicose, ou seja, para a relação C/N 28. O conteúdo de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 para 1 h em ambos os reatores, sendo que o reator operado com 4000 mg.L^{-1} de glicose (C/N 28) apresentou a distribuição mais favorável dos metabólitos solúveis para a produção de hidrogênio, havendo predominância dos ácidos acético e butírico.

O efeito da relação C/N na produção biológica de hidrogênio foi avaliado por Rojas (2010) usando água residuária sintética a base de sacarose. Para isso foram utilizados reatores de leito fixo e fluxo ascendente, com polietileno de baixa densidade reciclado para adesão da biomassa, cujo TDH de 2 h e temperatura de 25°C . As relações C/N analisadas foram 40, 90, 140 e 190 e foi utilizada a sacarose e a uréia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Para YH, os valores médios obtidos foram de $0,57 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol sac}^{-1}$, $1,30 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol sac}^{-1}$, $2,16 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol sac}^{-1}$, e $1,67 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol sac}^{-1}$, para os reatores operados com relações C/N iguais a 40, 90, 140 e 190, respectivamente. O valor ótimo foi obtido para a relação C/N de 137, o qual resultou em YH de $3,5 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol sac}^{-1}$, valor esse igual ao alcançado na relação C/N de 140. O biogás produzido foi composto de H_2 e CO_2 , principalmente, com valores médios percentuais para H_2 de 53%, 49%, 61% e 52% para a relação C/N de 40, 90, 140 e 190, respectivamente.

Srrethawong et al. (2010) estudaram o efeito da variação das relações DQO:N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (ASBR) sob condições mesofílicas. Foram utilizadas as relações de 100:2,2; 100:3,3 e 100:4,4 em água residuária de processamento de mandioca. Os resultados mostraram que a maior relação DQO: N (100:2,2) resultou em uma produção de gás de $2,3 \text{ L.h}^{-1}$ e 40,6% de H_2 no biogás. Em relação aos substratos foram obtidas as concentrações de aproximadamente 500 mg.L^{-1} de ácido acético, 100 mg.L^{-1} de ácido propiônico, 1100 mg.L^{-1} de ácido butírico e 200 mg.L^{-1} de ácido valérico. Para a menor relação DQO:N (100:4,4) foi obtida uma velocidade de produção de hidrogênio de $2,1 \text{ L.h}^{-1}$, com 27,2% de seu conteúdo no biogás. As concentrações de subprodutos obtidas foram de aproximadamente 300 mg.L^{-1} de ácido acético, 310 mg.L^{-1} de ácido propiônico, 4500 mg.L^{-1} de ácido butírico, 2500 mg.L^{-1} de ácido valérico e 10.300 mg.L^{-1} de etanol. Os autores sugeriram que a presença excessiva de nitrogênio no meio pode mudar as vias metabólicas dos microrganismos direcionados para a produção de hidrogênio, assim causando o crescimento dos mesmos ao invés de direcionar para a produção de H_2 . Tal

condição leva ao aumento da geração de compostos menos reduzidos, que, por sua vez, aprisionam o hidrogênio em cadeias de ácidos orgânicos e solventes impedindo a sua liberação como biogás.

De acordo com os estudos já realizados referentes à influência da concentração de nutrientes na produção fermentativa de hidrogênio, a relação C/N e C/P influencia significativamente. No entanto, a maioria das pesquisas foi realizada em reatores em batelada típica, com pequeno volume e com alta concentração de carboidratos. Apenas o trabalho de Rojas (2010) foi realizado em reator contínuo variando quatro relações C/N e usando sacarose como substrato. Considerando que há uma lacuna no conhecimento em relação à influência conjunta das relações C/N e C/P na produção de hidrogênio em reatores contínuos, a verificação das condições ótimas dessas relações que maximizem a produção de hidrogênio em reatores contínuos é sugerida.

3.4. Influência da relação C/N na produção de substâncias extracelulares poliméricas

Ressalta-se também que além da influência da relação C/N na produção de H₂, outra relação que pode ser inferida refere-se a disponibilidade de nitrogênio e as substâncias extracelulares poliméricas (SEP). A matriz de SEP é formada por polissacarídeos sintetizados e excretados por alguns microrganismos (Margaritis e Pace, 1986). Variações na relação C/N podem interferir na fisiologia microbiana e, por conseguinte, afetar o tipo e o conteúdo da SEP do lodo (Ye et al., 2011).

As matrizes de SEP têm importância na estabilização da estrutura do biofilme, adesão a superfícies e sorção de compostos orgânicos exógenos para a acumulação de nutrientes a partir do ambiente (Laspidou e Rittmann, 2002). A quantidade de carbono do substrato convertido para polímero pelos microrganismos depende da composição do meio de crescimento das condições do meio (Margaritis e Pace, 1986). De acordo com Mengistu et al. (1994), a deficiência de nitrogênio pode limitar o crescimento celular, direcionando a energia do carbono em excesso para a biossíntese de polissacarídeo. De acordo com Puñal et al. (2000), a relação C/N afeta a formação de biofilme significativamente, além de influenciar na produção de SEP. Seus resultados mostraram que a falta de nitrogênio na partida do reator pode aumentar a adesão de biomassa, uma vez que sua limitação causa aumento da produção

de SEP. No entanto, limitação prolongada desse nutriente resultou em baixo crescimento de biomassa.

3.5. Produção de H₂ em reatores anaeróbios de leito fluidificado e microrganismos envolvidos

Dentre as configurações de reatores estudados nos processos de digestão anaeróbia, tem sido intensamente pesquisado o RALF, uma vez que ele apresenta boas características de mistura, bem como permite alta velocidade de agitação na fase líquida favorecendo o desprendimento do biogás. Além disso, essa configuração possui várias características positivas que contribuem para a eficiência do processo de leito fluidificado, sendo elas (Hickey e Owens, 1981; Denac e Dunn, 1988; Buffière et al., 1995; Zhang et al., 2007):

- a) ocorrência de máximo contato entre o líquido e o meio suporte, assim melhorando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos;
- b) mínima resistência difusional do filme líquido atribuída ao movimento da partícula e velocidade do líquido;
- c) possibilidade de controlar e aumentar a espessura do biofilme;
- d) menor ocorrência de problemas de canais preferenciais, empacotamento e retenção de gás, que comumente ocorrem em reatores de leito fixo;
- e) material suporte de pequenas dimensões pode ser utilizado, resultando em altas superfícies específicas para o desenvolvimento bacteriano;
- f) possui maior estabilidade e eficiência de remoção de DQO, quando comparado com o reator anaeróbio de manta de lodo (UASB);
- g) necessita menores áreas;
- h) suporta elevadas taxas de carga orgânica (TCO), sendo que as taxas de degradação são proporcionais à concentração do efluente;
- i) possibilidade de aplicação de baixos TDH.

Em reatores de leito fluidificado, algumas pesquisas em produção de hidrogênio têm sido realizadas devido a essas vantagens conferidas pela fluidificação do meio (Zhang et al., 2007; Reis e Silva, 2011; Muñoz-Páez et al., 2012; Santos et al. 2014).

Amorim et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio em RALF com argila expandida como material suporte para aderência da biomassa. O TDH aplicado variou de 8 a 1 h e água residuária a base de glicose foi utilizada no reator. Para essas condições, os autores obtiveram um aumento no YH de 1,41 para 2,49 mol H₂.mol glicose⁻¹ quando o TDH diminuiu de 8 para 2 h. Contudo, houve uma pequena diminuição do rendimento para 2,41 mol H₂.mol glicose⁻¹ quando o TDH aplicado foi de 1 h. O conteúdo de H₂ do biogás aumentou de 8% a 35% quando o pH diminuiu. Ácido acético e butírico foram os principais metabólitos solúveis produzidos. Os resultados obtidos demonstraram a boa aplicabilidade da argila expandida como material suporte para a produção de hidrogênio em RALF.

Shida et al. (2009) estudaram a estabilidade de produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em RALF contendo argila expandida como material suporte. Como substrato foi utilizada glicose (2000 mg L⁻¹) e o reator foi inoculado com lodo pré-tratado termicamente. No reator foi aplicado TDH decrescente de 8 a 1 h e foi mantido o pH por volta de 3,8, sob condições mesofílicas. O valor máximo de PVH foi obtido em TDH de 1 h (1,28 L h⁻¹L⁻¹). O YH alcançou um valor máximo de 2,29 mol of H₂.mol glicose⁻¹ sob um TDH de 2 h e um conteúdo máximo de H₂ de 37% no biogás. Ácido acético e butírico foram os principais metabólitos solúveis produzidos. O reator apresentou desempenho estável, provavelmente devido ao adequado tratamento térmico do inóculo, meio suporte e às satisfatórias condições ambientais aplicadas no sistema. Os autores tiveram produção de ácidos orgânicos e hidrogênio estável durante um período de 178 dias no RALF.

Tendo em vista que um dos principais fatores que influenciam o desempenho do tratamento de efluentes em reatores RALF é o tipo de material suporte, Barros et al. (2010) estudaram a influência de diferentes materiais suporte de imobilização para a produção de hidrogênio em RALF. Acredita-se que a boa escolha do material suporte empregado tenha grande influência na aplicabilidade dos sistemas de crescimento aderido para a produção de hidrogênio. Assim, os autores estudaram a aplicabilidade de poliestireno e argila expandida. Água residuária sintética na concentração de 4000 mg.L⁻¹ de glicose foi utilizada. Foi observado que as partículas de argila expandida foram mais eficazes para a produção de hidrogênio, cujos valores máximos foram 1,21 L.h⁻¹.L⁻¹ e 2,59 mol H₂.mol glicose⁻¹, para a PVH e YH, respectivamente. Segundo os autores, as características físicas da partícula de argila expandida, tal como maior porosidade e superfície rugosa, permitiu a boa adesão dos microrganismos produtores de hidrogênio.

Objetivando estudar a influência da velocidade de fluxo ascendente na produção de hidrogênio, Reis e Silva (2011) utilizaram dois RALF (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. Os melhores resultados para a produção de hidrogênio a partir da fermentação da glicose (5 g.L^{-1}) foram obtidos no reator R124, o qual 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 PVH para TDH de 1 h, e melhor YH 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.

Em reator fluidificado de leito granular, Ngoma et al (2011) verificaram que a produção de biohidrogênio foi fortemente dependente da temperatura e taxas de reciclagem de efluente. A 45°C , a taxa de reciclagem de efluente foi aumentada de 1,3 a $3,5 \text{ L.min}^{-1}$, sendo que o total de H_2 da saída para o biorreator aumentou de 10,6 a $43,2 \text{ L.h}^{-1}$. A PVH também aumentou de 2,1 para $8,7 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. A 70°C a PVH aumentou de 2,8 para $14,8 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. Em 45°C a porcentagem de H_2 foi de 45% e atingiu 67% a 70°C . O YH a 45°C foi $1,24 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$ e a 70°C foi $2,2 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$.

Barros e Silva (2012) também compararam a eficiência da produção de hidrogênio e etanol em reatores de leito fluidificado contendo diferentes materiais suporte (poliestireno, pneu triturado e PET). Os reatores contendo glicose como fonte de carbono foram operados com TDH de 8 a 1 h, sob condições mesofílicas. Neste estudo, o reator contendo pneu triturado também foi o que apresentou melhor desempenho para YH ($2,11 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$), 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 de biomassa. Em todos os reatores ácido acético, ácido butírico, ácido láctico e etanol foram os subprodutos predominantes, sendo que no reator contendo pneu triturado foi verificada maior produção de ácido acético e butírico.

Obazu et al. (2012) verificaram elevados valores de PVH ($231,3 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e YH ($3,55 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$) com o aumento da temperatura para 70°C e pela redução do volume total do sistema do biorreator para 5,74 L, bem como aumentando a taxa de reciclagem de efluentes libertos para $3,2 \text{ L.m}^{-1}$. Os bioprocessos envolveram a reciclagem de efluentes desgaseificado a uma taxa de fluxo elevada através de um pseudo-estacionário leito granular fluidificado. Neste processo a taxa de remoção física de H_2 preso em massa na fase líquida ao redor dos grânulos fluidificados reduziu as restrições termodinâmicas impedindo o

alcanço simultâneo de elevadas PVH e YH no biorreator anaeróbio de leito granular. Análise de balanço de energia mostrou que com o calor da reciclagem o sistema do biorreator poderia atingir um ganho adicional de energia de $11,76 \text{ W.L}^{-1}$ com uma eficiência de 49,3%.

Muñoz-Páez et al. (2012) compararam a produção de hidrogênio em RALF operados em temperatura ambiente e a 35°C e cargas orgânicas volumétricas de 5 e 8 g sacarose. $\text{L}^{-1}.\text{d}$, mantendo TDH de 1 dia. Segundo os autores, o desempenho dos reatores melhorou com o aumento da concentração de 5 para 8 g sacarose. $\text{L}^{-1}.\text{d}$. Na etapa cuja carga orgânica volumétrica foi 8 g sacarose. $\text{L}^{-1}.\text{d}$, a concentração e PVH dos reatores operados a temperatura ambiente foi excepcionalmente maior que aqueles operados sob condições mesofílicas, com valores 1,8 e 2,2 vezes maiores para esses parâmetros, respectivamente. Outra vantagem verificada pelos autores nos reatores operados sob condições de temperatura ambiente foi a ausência de metano, o qual esteve presente nos reatores operados sob condições mesofílicas. Tal comportamento foi atribuído a temperatura de 35°C ser considerada ótima para o crescimento de microrganismos metanogênicos.

Shida et al (2012) utilizaram dois RALF para avaliar os efeitos da TCO (19 a 141 Kg de DQO. $\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) a partir da fermentação da glicose, sendo que em um reator não continha solução tampão e o outro reator continha (bicarbonato de sódio). Os reatores sem e com solução tampão apresentaram máximo YH de 2,45 e 1,90 $\text{mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ glicose (TCO de 84 Kg de DQO. $\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), respectivamente. Nos reatores sem e com solução tampão as maiores taxas de PVH obtidas foram de 0,95 e 0,76 $\text{L.H}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (TCO de 141 Kg de DQO. $\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), respectivamente. No reator sem solução tampão de pH, as condições de operação favoreceram a presença da espécie *Clostridium*, enquanto no reator contendo solução tampão, as bactérias encontradas incluíram *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Veillonellaceae*, *Chryseobacterium*, *Sporolactobacillus*, e *Burkholderiaceae*.

Santos et al. (2014) avaliaram o efeito de TCO variando de 60,0 a 480,00 kg COD. $\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ na produção de hidrogênio em dois RALF termofílicos a partir de vinhaça de cana-de-açúcar (15000 e 20000 mg COD. L^{-1}). De acordo com os autores, a diminuição do TDH ocasionou em aumento da PVH, cujo valor máximo obtido foi $1,49 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. O valor máximo de YH ($2,23 \text{ mmol.g COD}^{-1}$) foi obtido no AFBR1 (15000 mg.COD. L^{-1}). Neste estudo, ácido láctico e ácido butírico foram os metabólitos predominantes e os microrganismos encontrados em maior abundância foram bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* e bactérias produtoras de hidrogênio do gênero *Megasphaera* sp.

Alguns trabalhos relevantes referentes a produção biológica de hidrogênio em reator de leito fluidificado contendo as suas respectivas condições de operação estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbio de leito fluidificado

Autores	Material suporte	Água residuária	PVH (L.h⁻¹.L⁻¹)	YH (mol H₂.mol⁻¹ glicose)	TDH (h)	Conteúdo de H₂ no biogás (%)	Inóculo / Pré- tratamento
Zhang et al. (2008)	carbono ativado granular	Esgoto sintético – glicose = 10 g/L	0,32	1,66–1,88	0,25 – 12	-	estação de tratamento de águas residuais / tratamento térmico e ácido
Barros et al. (2010)	poliestireno	Esgoto sintético - glicose = 4000 mg/L	0,95	1,90	8 – 1	16–47	UASB suinocultura / tratamento térmico
	argila expandida		1,21	2,59		22–51	
Barros et al. (2011)	Pneu	Esgoto sintético – glicose = 4000 mg/L	0,19 a 0,96	2,15	8 – 1	12,7 – 53,0	UASB suinocultura / tratamento térmico
	PET		0,23 a 1,07	1,87		12,3 – 47,1	
Reis e Silva (2011)	argila expandida	Esgoto sintético - glicose = 5000 mg/L	2,21	2,55	8 – 1	40,53 – 67,57	UASB suinocultura / tratamento térmico
Barros e Silva, (2012)	poliestireno, pneu triturado e PET	Esgoto sintético - glicose = 4000 mg/L	0,52	2,11	8 – 1	60	UASB suinocultura / tratamento térmico

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse 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 fluidificado para produção de hidrogênio.

Serão mostradas as condições operacionais aplicadas a cada reator de leito fluidificado e em cada fase de operação com variação do TDH, relação C/N e relação C/P. Assim, possibilitando a comparação da variação do rendimento e produção volumétrica de hidrogênio em função dos parâmetros estudados.

Na Figura 3 estão sintetizadas as condições operacionais de cada fase desta pesquisa, bem como as análises de hidrogênio, físico-químicas e moleculares realizadas.

Figura 3. Esquema geral dos experimentos realizados em reator de leito fluidificado

4.1. Reator de leito fluidificado

Foram utilizados quatro reatores de leito fluidificado de acrílico com altura de 190 cm e diâmetro interno de 5,3 cm, totalizando um volume de trabalho de 4192 cm³. A Figura 4 ilustra o esquema da instalação piloto do reator anaeróbico de leito fluidificado que foi utilizado nesse trabalho e a Figura 5 refere-se as imagens dos reatores de leito fluidificado operados nesta pesquisa.

Figura 4. Esquema da instalação do reator anaeróbico de leito fluidificado

O distribuidor é do tipo placa perfurada, e na parede do reator estão instaladas tomadas de amostra. A temperatura foi mantida a 30 ± 2 °C por meio de encamisamento do reator em banho ultratermostatizado.

A água residuária foi transportada através de bomba dosadora para o reator de leito fluidificado. A vazão ascensional total utilizada correspondeu a 1,3 vez a vazão mínima de fluidificação, e a maior parte do efluente foi recirculado para assegurar a fluidificação das partículas no reator.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 5. Reatores anaeróbios de leito fluidificado: (a) Porção superior do reator R2; (b) Reator de leito fluidificado R3; (c) Reator de leito fluidificado R2 contendo biomassa suspensa e imobilizada em material suporte; (d) Reator de leito fluidificado R4

4.2. Material suporte

Pneu triturado foi utilizado como material suporte para os microrganismos devido a necessidade de baixa taxas de fluidificação e maior aderência microbiana.

As condições fluidodinâmicas dos reatores, tais como velocidade de mínima fluidização e vazão de recirculação para os suportes foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga. As características como dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidização são apresentadas na Tabela 2 e a Figura 6 ilustra as partículas de pneu inservível triturado.

Tabela 2. Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidização para as partículas utilizadas

Partícula	D_p (mm)	ρ_p (g.cm ⁻³)	V_{mf} (cm.s ⁻¹)	Rugosidade (%)
Pneu triturado	2,8 – 3,35	1,14	1,18	18

Figura 6. Partículas de pneu triturado para utilização como suporte para imobilização da biomassa

A Tabela 3 mostra os parâmetros utilizados nos reatores anaeróbios de leito fluidificado durante a etapa de inoculação.

Tabela 3. Parâmetros utilizados nos reatores de leito fluidificado

Partícula	Q_t (L.h ⁻¹)	m (g)	H _o (cm)	H _f (cm)	C _g (mg.L ⁻¹)
Pneu triturado	121,8	621,00	50	92	5000

Em que: Q_t : vazão total;

m : massa de partículas usadas nos reatores;

H_o : altura correspondente a massa de partículas em leito fixo;

H_f : altura correspondente à massa de partículas em leito fluidificado;

C_g : concentração de glicose no inóculo.

4.3. Água residuária

A água residuária sintética utilizada foi composta por glicose como principal fonte de carbono e preparada de acordo com Del Nery modificado (1987). As características desta água residuária estão apresentadas na Tabela 4. A concentração de glicose foi mantida fixa durante toda a operação (5000 mg L^{-1}). As relações C/N e C/P aplicadas foram calculadas a partir da massa de carbono, nitrogênio e fósforo dos compostos glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), respectivamente. Ácido clorídrico (30% - $0,38 \text{ mL L}^{-1}$) e bicarbonato de sódio ($0,4 \text{ g L}^{-1}$) foram adicionados para tamponar o afluente e evitar alterações no pH.

Tabela 4. Composição da água residuária sintética utilizada no meio Del Nery (1987) adaptado

Compostos	Concentração Del Nery (1987) (mg.L^{-1})
Glicose	5.000
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

4.4. Inóculo

O lodo utilizado como inóculo foi proveniente de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) usado no tratamento de água residuária de avicultura, fornecido pela Avícola Dacar – Tietê/SP. O inóculo continha 45 g.L^{-1} de sólidos voláteis (SV).

O lodo foi previamente submetido ao pré-tratamento térmico, conforme a metodologia proposta por Maitinguer et al. (2008), adaptado de Kim et al. (2006). O método de tratamento térmico foi utilizado para obter-se culturas produtoras de hidrogênio e inativar arqueias metanogênicas (não formadoras de endóporos).

4.5. Operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado

O início da operação dos reatores anaeróbios foi efetuado mediante a adaptação da biomassa à glicose. O sistema foi mantido em recirculação entre o barrilete e cada reator (modo batelada), durante 3 dias em todos os reatores operados para aderência dos microrganismos ao material suporte. Nesse período, foram retiradas amostras periódicas para análise da concentração de glicose e, à medida que a glicose era consumida, adicionava-se solução para atingir concentração correspondente a 5 g.L⁻¹ de glicose no barrilete de alimentação.

Posteriormente, o sistema foi aberto e operado em modo contínuo com TDH inicial de 8 h.

Para avaliar a influência da relação C/N foram utilizados quatro reatores de leito fluidificado cujas relações C/N foram mantidas fixas durante todo o período de operação, sendo C/N=100 no Reator 1 (R1), C/N=150 no Reator 2 (R2), C/N=200 no Reator 3 (R3) e C/N=250 no Reator 4 (R4).

Na primeira fase de operação, foi mantida relação C/P=300 e o TDH foi diminuído de 8 h para 6, 4, 2 e 1 hora (Tabela 5). Nessa fase, foram obtidos os maiores valores de YH no TDH de 1 h e os maiores valores de PVH no TDH de 8 h. Assim, na segunda fase de operação, o TDH foi mantido fixo em 2 horas (uma vez que no TDH de 1 h poderia ocorrer desprendimento do biofilme do material suporte) e a relação C/P foi aumentada de 300 para 500, 700, 900 e 1100 (Tabela 6). Posteriormente iniciou a terceira fase, cujo TDH foi mantido em 8 h e a relação C/P foi aumentada de 300 para 500, 700, 900 e 1100 (Tabela 7).

Tabela 5. Etapas referentes a primeira fase de operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado

Fase	TDH (h)	Relação C/P	Relação C/N
I	8	300	R1=100
	6		R2=150
	4		R3=200
	2		R4=250
	1		

Tabela 6. Etapas referentes a segunda fase de operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado

Fase	TDH (h)	Relação C/P	Relação C/N
II	2 h	300	R1=100
		500	R2=150
		700	R3=200
		900	R4=250
		1100	

Tabela 7. Etapas referentes a terceira fase de operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado

Fase	TDH (h)	Relação C/P	Relação C/N
III	8 h	300	R1=100
		500	R2=150
		700	R3=200
		900	R4=250
		1100	

4.6. Análise da composição dos gases e quantificação da produção de hidrogênio

A determinação do gás hidrogênio foi efetuada por meio da retirada de 0,1 mL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa “gas tight” com trava. Para isso, foi utilizado cromatógrafo a gás (GC-2010, Shimadzu, Japan), equipado com detector de condutividade térmica e coluna Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m x 0,53 mm diâmetro interno). O gás de arraste usado foi argônio sob fluxo de 21,9 cm.s⁻¹ e as temperaturas do forno, da coluna e do detector foram 30, 200 e 230° C, respectivamente. A produção de biogás foi mensurada por meio do MilliGas-counter da Ritter (Tipo: MGC-1).

4.7. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram efetuadas de três vezes a cinco vezes por semana. Os parâmetros pH, DQO, sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram mensurados de acordo com Standard Methods (APHA, 1998).

As determinações da concentração de glicose no afluente e efluente dos reatores foram realizadas pelo método colorimétrico (Dubois et al. 1956).

4.8. Determinação de ácidos voláteis e alcoóis

As concentrações de ácidos orgânicos voláteis foram determinados por high-performance liquid chromatography (HPLC) equipado com uma bomba 10ADVP LC, amostrador automático SIL e 20A HT, um forno CT e 20A, dois detectors conectados em série: um detector de ultravioleta de díodos (UV) (modelo SCL e M10 AVP) e um detector índice de refração (RID e 10A), e um controador SCL e 10 AVP. Foi usada uma coluna AMNEX HPX-87H (300 mm 7,8 mm; Bio-Rad) e o programa Class e VP program (SHIMADZU) foi usado para analisar os resultados. Os ácidos orgânicos foram detectados usando o detector SDP e M10 AVP UV. As condições de operação da coluna foram uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min e temperature de 43° C (Penteado et al., 2013).

A concentração de álcool foi realizada por meio de cromatografia gasosa (GC 2010 Shimatzu, Japan), equipado com detector de ionização de chama e sistema de introdução da amostra no headspace COMBI-PAL (modelo AOC 5000 e coluna HP-INNOWAX de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme), de acordo com a metodologia proposta Maintinguer et al. (2008).

4.9. Cálculo dos principais parâmetros

A partir dos resultados obtidos nas análises foram calculados os valores médios e desvio padrão dos seguintes parâmetros:

- YH: Rendimento de hidrogênio = (quantidade (mol) de H₂ produzido)/(quantidade (mol) de glicose consumida);

- PVH: Produtividade volumétrica de H_2 = (quantidade (L) de H_2 produzido)/(tempo (h))/(volume (L) de trabalho do reator);
- Conversão da glicose = $100 \times (\text{glicose afluente} - \text{glicose efluente})/(\text{glicose afluente})$.

4.10. Análises de biologia molecular da comunidade microbiana

Análises moleculares foram realizadas para as condições mais relevantes de produção de H_2 para avaliar as comunidades bacterianas. Assim, para análises de DGGE foram coletadas amostras do material suporte com biomassa aderida dos reatores R1(C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) ao final das etapas cujo TDH foi 8, 6, 4, e 2 h, e final das etapas cuja relação C/P foi de 500, 700, 900 e 1100. Para caracterização microbiana foram utilizadas amostras do biofilme do material suporte das condições de maior rendimento de H_2 da primeira e segunda fase de operação, ou seja, R3 (C/N=200), TDH= 8 h e C/P=300, e R3, C/P=700 e TDH= 2 h, respectivamente.

4.10.1. Extração do ácido nucléico, PCR e DGGE

O DNA genômico foi extraído por lise celular com pérolas de vidro, fenol, clorofórmio e tampão fosfatado, utilizando procedimento experimental modificado de acordo com Griffiths et al. (2000). A amplificação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com set primer 968FGC – 1401R para Domínio Bacteria (Nubel et al., 1996) sintetizados pela Invitrogen. Os fragmentos amplificados de DNA foram separados pela técnica de Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) de acordo com Muyzer et al. (1993). O gel foi realizado com 45 – 65% de gradiente de desnaturação linear (100% denaturante de 7 M uréia e 40% (v/v) formamida deionizada). Os géis correram a 75 V e 60 °C por 16 h em tampão TAE 1X. O perfil de bandas do DGGE foi visualizado em aparelho Eagle Eye TM III (Stratagene), em UV de 254 nm, conectado ao computador e software Eagle Sight. O perfil de bandas do DGGE foi analisado por meio do Bionumerics software 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). O cálculo de similaridade foi baseado no coeficiente da correlação de Pearson.

4.10.2. Clonagem e determinação da sequência RNAr 16S

Os produtos da PCR foram obtidos com set de primer 27F e 1100R (Lane, 1991), e foram purificados com kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare). O vetor usado foi *pGEM® Easy Vector System* (Promega) e transformados em células competentes de *Escherichia coli* para a formação da biblioteca de clones. A recuperação do fragmento de interesse foi realizada pela PCR por meio dos primers M13F e M13R (Chun, 1995). Os produtos da PCR foram encaminhados a Macrogen Inc® para a análise das sequências de nucleotídeos. A similaridade das sequências foi obtida através do *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Para pesquisa dos clones relacionados ao presente estudo foi usado o banco de dados de sequências *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), e as sequências com pelo menos 95% de similaridade foram selecionadas para nível taxonômico de gênero e espécie. A árvore filogenética para cada amostra foi feita usando *MEGA software Version 4.0*. Análises de *Bootstrap* para 1000 replicates foram realizadas para estimar a confiança das topologias das árvores. Foram selecionadas as sequências representando cada *Unidade Taxonômica Operacional (UTO)* (*D-replicate Sequence*). Para a classificação taxonômica das sequências representativas de cada UTO foi utilizado o *RDP-Classfier*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos de acordo com as três fases de operação dos RALF, sendo abordando primeiramente os resultados das análises físico-químicas. Em seguida foram apresentados os resultados de produção e rendimento de H_2 em função dos parâmetros variados e, a seguir, os metabólitos produzidos em cada etapa. Posteriormente, foram apresentados os resultados referentes a caracterização microbiana das condições de produção de H_2 mais relevantes.

5.1. Primeira fase de operação dos RALF

A primeira fase operacional foi caracterizada pela variação do TDH em 8, 6, 4, 2 e 1 h nos quatro reatores de leito fluidificado, contendo as relações C/N=100 em R1, C/N=150 em R2, C/N=200 em R3 e C/N=250 em R4, mantendo fixa a relação C/P=300.

5.1.1. pH, DQO, conversão da glicose e sólidos suspensos

Após a inoculação dos reatores, estes foram mantidos em sistema fechado com pH variando entre 4 e 5,5, com médias de 4,6, 4,1, 4,2, e 4,6 em R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), respectivamente.

Durante todo o período de operação, o pH efluente variou entre 3,1 e 4,4 em R1, 3,0 e 4,3 em R2, 3,1 e 4,5 em R3 e 3,2 e 4,6 em R4, cujas médias foram 3,7, 3,6, 3,6 e 3,9 para R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

As médias do pH afluente e efluente nos TDH empregados para os quatro reatores durante a etapa de operação em sistema aberto são apresentadas na Tabela 8.

Não houve variação significativa no pH efluente ao longo do experimento, indicando as boas condições tampão existentes. A redução do TDH não influenciou significativamente no pH efluente dos quatro reatores.

Tabela 8. Resultados médios de pH obtidos para cada faixa de TDH aplicado no R1 (C/N=100), no R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e no R4 (C/N=250), durante a 1ª fase de operação

TDH	R1		R2		R3		R4	
(h)	pH Aflu	pH Eflu	pH Aflu	pH Eflu	pH Aflu	pH Eflu	pH Aflu	pH Eflu
8	5,67	3,71	5,57	3,60	5,59	3,70	6,33	4,00
6	6,53	3,54	6,45	3,51	6,39	3,64	5,44	3,74
4	6,67	3,77	6,54	3,63	6,47	3,64	5,38	3,67
2	5,86	3,65	5,79	3,42	6,09	3,63	6,45	4,03
1	6,39	4,00	6,54	3,60	6,57	3,85	5,71	3,87

Os valores de pH efluente encontrados nos quatro reatores estiveram com valores inferiores aos encontrados na literatura. Amorim (2009) obteve pH variando entre 5,09 e 5,54 para C/N=14 (2000 mg.L⁻¹ de glicose), entre 4,92 e 5,69 para C/N=28 (4000 mg.L⁻¹ de glicose), entre 5,00 e 5,58 para C/N=69 (10000 mg.L⁻¹ de glicose), e entre 4,96 e 5,42 para C/N=172 (25000 mg.L⁻¹ de glicose). No estudo realizado por Reis e Silva (2011) o pH foi mantido entre 4,5 a 5, utilizando argila expandida como material suporte em RALF. Em reator de leito fixo preenchido com polietileno de baixa densidade, Rojas (2010) também obteve valores de pH efluente próximos a 4,5 para as 4 relações C/N aplicadas (40, 90, 140 e 190), com um pH de entrada de 6,5. Em contrapartida, no estudo de Barros et al. (2012) os valores de pH também foram reduzidos (entre 3,43 e 3,98) no reator cujo material suporte o mesmo do presente estudo (pneu triturado), ou seja, manteve-se dentro da faixa ideal para os microrganismos acidogênicos.

Os valores médios de DQO afluente e efluente e suas respectivas eficiências de degradação para cada TDH aplicado nos quatro reatores estão apresentados na Tabela 9. Os valores de DQO afluente correspondem à glicose e a matéria carbonácea da uréia adicionada na água residuária. A DQO efluente corresponde à glicose remanescente e aos subprodutos da fermentação da glicose (ácidos orgânicos, alcoóis e outros intermediários). Assim, os valores

percentuais de eficiência de degradação da DQO corresponde à matéria carbonácea que foi convertida a gás carbônico.

Os valores médios de DQO de entrada foram 5024 mg.L⁻¹ no R1, 5067 mg.L⁻¹ no R2, 5046 mg.L⁻¹ no R3 e 5484 mg.L⁻¹ no R4.

Tabela 9. Valores médios de DQO afluyente, efluente e porcentagem removida para R1, R2, R3 e R4 nos TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação

	TDH (h)	DQO afluyente (mg.L ⁻¹)	DQO efluente (mg.L ⁻¹)	Eficiência (%)
R1 (C/N=100)	8	5353	4343	19
	6	5106	3545	31
	4	4929	4080	17
	2	4871	4043	17
	1	4861	4586	6
R2 (C/N=150)	8	5354	4301	20
	6	5097	3677	28
	4	5057	3800	25
	2	4859	4046	16
	1	4966	4578	8
R3 (C/N=200)	8	5319	4239	20
	6	4960	3667	26
	4	4945	4027	19
	2	4884	4157	15
	1	5124	4625	10
R4 (C/N=250)	8	4974	3891	22
	6	5809	3634	37
	4	5122	4663	9
	2	5882	4624	22
	1	5634	4872	14

Os quatro reatores apresentaram comportamento similar em relação as médias e variação temporal de concentração de DQO afluyente, efluente e suas respectiva eficiência de

remoção. Nos RALF R1, R2, e R3 houve aumento da remoção de DQO quando o TDH variou de 8 para 6 h e redução da remoção quando o TDH diminuiu de 6 para 1 h. Os valores de eficiência de remoção de DQO encontrados por Amorim (2009) também variaram com a diminuição do TDH de 8 para 1 h. Contudo, menor variação desses valores foram observados no estudo de Amorim (2009) em relação ao presente estudo. Além disso, no TDH de 1 h os reatores desse estudo apresentaram valores inferiores de remoção de DQO quando comparados ao trabalho de Amorim (2009), provavelmente devido as diferentes condições aplicadas (materiais suporte e inóculo).

Os resultados do consumo de glicose pelos microrganismos ao longo do período no qual os reatores foram operados em sistema fechado de recirculação (modo batelada) mostraram valores alcançando 88, 86, 72 e 83% de conversão de glicose no segundo dia de recirculação nos reatores R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

Os valores médios de glicose de entrada foram 5238 mg L⁻¹ em R1, 5502 mg.L⁻¹ em R2, 5380 mg.L⁻¹ em R3 e 5267 mg.L⁻¹ em R4 durante todo o período de operação. A conversão da glicose variou entre 54 e 95% em R1, entre 58 e 97% em R2, entre 57 e 95% em R3 e entre 47 e 86% em R4 (Figura 7). Os resultados de remoção de glicose obtidos demonstram alta atividade microbiana.

Durante a operação, houve um aumento da conversão de glicose do TDH de 8 h para o TDH 6 h, principalmente em R1, R2 e R3 (C/N=100, 150 e 200, respectivamente), ocorrendo poucas oscilações com a variação do TDH para 1 h. Queda de na conversão da glicose foi observada na relação C/N=250 (R4), cujos valores foram inferiores aos demais reatores. Assim, pode-se inferir que as variações nos valores de conversão de glicose devem-se tanto ao TDH quanto a relação C/N.

Figura 7. Média de conversão da glicose em R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 1ª fase de operação

No estudo de Zhang et al. (2007) os valores de conversão de glicose (10000 mg.L^{-1}) no TDH de 4 h foram superiores (99,47%), ocorrendo queda no TDH de 0,5 h (71,44%) também em RALF utilizando carvão ativado granular como material suporte. Shida et al. (2009) também obtiveram valores superiores de conversão, variando entre 92 e 98% para 2000 mg.L^{-1} de glicose em RALF contendo argila expandida como material suporte. No estudo de Amorim (2009) menores valores de conversão de glicose foram obtidos quando se aplicou relação C/N=172: 27, 54, 52, 26 e 20%, para os TDH de 8, 6, 4, 2, e 1 h respectivamente. A relação C/N=172 utilizada no estudo de Amorim (2009) foi a que mais se aproximou das relações C/N aplicadas no presente estudo (C/N=150). No entanto, para se obter a relação C/N desejada, Amorim aumentou concentração de glicose (25000 mg.L^{-1}) enquanto no presente estudo foi diminuída a concentração dos compostos fosfatados.

Reis e Silva (2011) obtiveram conversão de mais de 80% nos reatores R188 ($V_{mf}=1,88 \text{ cm s}^{-1}$) e R124 ($V_{mf}=1,24 \text{ cm s}^{-1}$), sendo atingido máximo de 94,3% sob um TDH de 6 h (C/N=40). Os autores também observaram que a conversão manteve-se relativamente constante até a etapa de TDH de 2 h, enquanto no presente estudo ocorreram oscilações desses valores. Barros et al. (2012) obtiveram valores de conversão de glicose de aproximadamente 80% nos TDH de 8 e 6 h para 3500 mg.L^{-1} de glicose (C/N=28) em RALF

com pneu triturado. Todavia, houve queda no TDH de 4 h, seguido de aumento para cerca de 75% no TDH de 2 h e diminuição novamente no TDH de 1 h. Destaca-se que no presente estudo, comportamento inverso foi verificado a partir do TDH de 4 h.

Argun et al. (2008) obtiveram valores significativamente superiores de conversão de amido ($19,4 \text{ g.l}^{-1}$), correspondendo a 89% de conversão depois de 150 h de fermentação em reatores em bateladas. Todavia, parte do amido degradado foi convertido em glicose.

Os valores de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do efluente obtidos nessa fase são apresentados na Tabela 10.

Grande variação dos valores de SST e SSV foi verificada, uma vez que ocorreu desprendimento de polímeros aderidos na porção superior e das mangueiras de saída dos reatores. Embora no TDH de 1 h, os valores tenha sido inferiores as demais etapas, foi observado visualmente maior produção de polímeros nesse TDH, provavelmente devido às condições de stress causadas aos microrganismos dos reatores, relacionadas a dificuldade da adesão microbiana a elevadas vazões (TDH de 1 h).

Tabela 10. Concentração de sólidos suspensos totais e voláteis do efluente obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4, durante a 1ª fase de operação

Reator	TDH (h)	SST (mg.L ⁻¹)	SSV (mg.L ⁻¹)
R1 (C/N=100)	8	214±129	176±131
	6	107±61	96±53
	4	104±138	108±139
	2	33±12	29±9
	1	30±22	28±20
R2 (C/N=150)	8	125±40	109±34
	6	57±35	44±27
	4	48±23	71±30
	2	45±74	39±68
	1	20±4	18±5
R3 (C/N=200)	8	101±26	82±27
	6	54±28	52±34
	4	68±34	59±24
	2	33±19	29±17
	1	61±64	194±47
R4 (C/N=250)	8	278±233	260±219
	6	165±154	150±141
	4	183±119	167±107
	2	60±49	56±46
	1	42±14	39±13

5.1.2. Efeitos do TDH e relação C/N na produção de hidrogênio

Na Tabela 11 são apresentadas as médias de porcentagem de H₂ no conteúdo do biogás para todos TDH e relação C/N aplicados.

Em todas as etapas o biogás produzido foi composto de CO₂ e H₂, sendo que no TDH de 8 h foram verificados os maiores valores percentuais de H₂ nos RALF R1, R2 e R3, ou seja, 40, 49, 47% respectivamente. De maneira diferente, no RALF R4, o maior valor percentual de H₂ no biogás foi obtido no TDH de 4 h (52%).

No R1 (C/N=100), a porcentagem de H₂ no biogás variou entre 16 e 64%, no R2 (C/N=150), entre 26 e 70%, no R3 (C/N=200) entre 25 e 68% e no R4 (C/N=250) entre 32 e 57% no TDH de 8 horas. Nos demais TDH houve diminuição da porcentagem de H₂ no biogás, sendo que valores acima de 60% foram obtidos somente no TDH de 8 horas para R1, R2 e R3. Em R4 foram verificados valores de porcentagem de H₂ no biogás acima de 50% para os TDH de 6, 4, e 2 h. A relação C/N=250 (R4) mostrou-se a mais favorável para conteúdo de H₂ no biogás para os TDH de 6, 4, e 2h, apresentando valores superiores que as demais relações C/N. Diferentemente, no TDH de 8 h, o RALF R2 (C/N=150) apresentou os maiores valores percentuais de H₂ no biogás (49%), enquanto no TDH de 1 h, o RALF R1 apresentou os maiores valores para este parâmetro (37%).

Tabela 11. Valores médios de porcentagem de H₂ no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 para os TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação

Média % H ₂				
TDH (h)	R1	R2	R3	R4
	(C/N=100)	(C/N=150)	(C/N=200)	(C/N=250)
8	40,1±15,1	49,1±11,1	46,9±10,6	48,0±8,1
6	20,8±10,2	32,3±9,1	32,9±8,9	49,9±9,6
4	25,7±10,1	33,0±11,8	26,4±9,6	50,9±12,7
2	21,8±8,2	26,4±10,5	25,7±10,1	48,1±15,0
1	36,8±3,2	31,8±8,9	33,5±4,0	33,6±6,5

Em reatores em bateladas, Lin e Lay (2004) aplicaram relações C/N menores que o presente estudo e obtiveram valores de conteúdo de H₂ no biogás superiores: 55, 55, 52 e 55% para as relações C/N de 40, 47, 98 e 130, respectivamente. Em RALF, os maiores valores encontrados por Amorim (2009) para relação C/N=172 (25000 mg L⁻¹ de glicose) foram verificados no TDH de 1 h (57%). Nos TDH de 8, 6, 4 e 2 h as porcentagens médias de H₂ no biogás foram de 10, 13, 15 e 55%, respectivamente. Assim como no presente estudo, as variações ocorridas foram atribuídas ao TDH. Todavia, o conteúdo de H₂ no biogás aumentou com a redução do TDH de 8 para 1 h no estudo de Amorim (2009).

Em reatores de leito fixo e TDH de 2 h, Rojas (2010) obteve valores de médias percentuais de H_2 significativamente maiores que o presente estudo para a maior relação C/N aplicada pelo autor (C/N=140), correspondendo a 61%. Tal valor difere-se do presente estudo, no qual foi obtida média de 26% para a relação C/N=150 e TDH de 2 h, ressaltando que os maiores valores foram encontrados na relação C/N=250 e TDH de 6 e 4 h (52 e 51%, respectivamente), ou seja, para maior relação C/N aplicada nesse estudo.

Na Tabela 12 são expostos os valores médios de rendimento de hidrogênio (YH) e produtividade volumétrica de hidrogênio (PVH) obtidos no R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R4 (C/N=250) para os TDH aplicados na 1ª fase de operação. A Figura 8 ilustra a comparação dos YH para cada mol de glicose em diferentes TDH em R1, R2, R3 e R4 a Figura 9 mostra o efeito da relação C/N no YH para cada TDH aplicado.

Tabela 12. Valores médios de YH e PVH obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4 para os TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação

Rendimento ($\text{mol } H_2.\text{mol gli}^{-1}$)				
TDH (h)	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
8	1,44±0,97	1,66±0,62	1,76±0,51	1,50±1,15
6	0,22±0,35	0,48±0,31	0,76±0,67	1,36±0,28
4	0,27±0,54	0,50±0,26	0,50±1,00	0,74±0,88
2	0,25±0,36	0,32±0,60	0,36±0,33	0,55±0,26
1	0,36±0,15	0,26±0,12	0,30±0,16	0,19±0,12
Produtividade ($\text{L.h.}^{-1}.\text{L}^{-1}$)				
TDH (h)	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
8	0,20±0,13	0,20±0,09	0,28±0,11	0,21±0,11
6	0,08±0,19	0,19±0,19	0,22±0,18	0,29±0,04
4	0,12±0,27	0,21±0,21	0,25±0,24	0,32±0,33
2	0,23±0,38	0,24±0,39	0,39±0,55	0,37±0,16
1	0,47±0,58	0,35±0,15	0,57±0,60	0,27±0,11

Durante a operação dos reatores pôde-se constatar que o YH foi maior na etapa cujo TDH foi de 8 h em todos os reatores. Nas etapas consecutivas houve diminuição gradual do rendimento de hidrogênio, em consequencia da diminuição do TDH.

Dentro do intervalo de C/N aplicado, variando de 100 e 250, ocorreu variação do YH, sendo verificado um ápice na relação C/N=200 quando o TDH foi de 8 h, condição essa na qual foi obtido no maior valor dessa fase operacional ($1,758 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol gli}^{-1}$). Contudo, para os TDH de 6, 4 e 2 h, os maiores valores de YH foram verificados na relação C/N=250 (R4). Na etapa cujo TDH foi 1 h, o maior valor de YH foi obtido na relação C/P=100 (R1).

Figura 8. Variação do YH em função do TDH para quatro relações C/N aplicadas, durante a 1ª fase de operação

Nas Figuras 10 e 11 são comparados os valores médios de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) nos quatro reatores nos diferentes TDH utilizados ao longo dos dias de operação em função do TDH e da relação C/N, respectivamente. Em relação a variação do TDH, os maiores valores de PVH foram verificados no TDH de 1 h nos RALF R1, R2 e R3, e no TDH de 2 h no R4.

O aumento da produção volumétrica de hidrogênio com a redução do TDH também foi observado nas pesquisas de Wu et al. (2003) em reator de leito fluidificado de três fases, Lin et al. (2006) em reator de leito fluidificado alimentado com glicose, Shida (2008) e Amorim et al. (2009) ambos em RALF.

Figura 9. Variação do YH em função da relação C/N para cinco TDH aplicados

Figura 10. Variação da PVH em função do TDH para as quatro relações C/N aplicadas

Figura 11. Variação da PVH em função da relação C/N para cinco TDH aplicados, durante a 1ª fase de operação

De maneira semelhante ao YH, a relação C/N ótima para PVH foi 200 (R3). Argun et al. (2008) também obtiveram comportamento semelhante ao presente estudo no que se refere a verificação de um valor ótimo de PVH na relação C/N=200. Em reatores bateladas, os autores observaram que quando mantinha-se elevada a concentração de nitrogênio ($C/N < 46$) e aumentava a relação C/P (50 a 950) havia um decréscimo da PVH. Todavia, em baixas concentrações de nitrogênio ($C/N > 46$), havia um aumento da PVH à medida que se a relação C/P aumentava.

Ressalta-se que na maioria dos estudos o valor ótimo de C/N foi inferior ao presente estudo. Lin e Lay (2004) obtiveram maior YH ($4,8 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol-sacarose}^{-1}$) e PVH ($270 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) para relação C/N=47 em reatores em bateladas, quando variaram a relação C/N entre 40 e 130.

Em RALF, Amorim (2009) encontrou valor ótimo de PVH ($1,58 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) e YH ($2,52 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$) em relação C/N=69 e C/N=28, respectivamente. Contudo, para essas relações, o autor aplicou o dobro de glicose que o presente estudo para se obter a relação C/N desejada (10000 e 4000 mg.L^{-1} de glicose).

Em reator de leito fixo, Rojas et al. (2010) também obtiveram valor ótimo para YH ($3,5 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol-sac}^{-1}$) e PVH ($162,5 \text{ mL H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) em relação C/N inferior ao presente estudo (C/N=140). Rojas et al. (op cit) relataram que quando elevou-se a relação C/N de 40 para 140 o YH aumentou 3,5 vezes, ou seja, a diminuição da concentração de nitrogênio favoreceu a produção de H_2 . Segundo os autores, o aumento do YH foi proporcional à diminuição da disponibilidade de N nessa variação.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos, houve influência significativa do TDH no YH e PVH, uma vez que o valor de P foi menor que 0,05, bem como o valor de F foi maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$.

Todavia, a relação C/N não influenciou significativamente o rendimento e produtividade de H_2 ($P > 0,05$ e $F < F_{\text{crítico}}$).

Ademais, pode-se afirmar que tanto em reatores de leito fixo quanto leito fluidificado, o YH e a PRH atingiram um valor ótimo com o aumento da relação C/N, sugerindo que a variação da disponibilidade de nitrogênio pode alterar o direcionamento da energia obtida no catabolismo.

Da mesma maneira, Oztekin et al. (2008) afirmam que a concentração de nutrientes podem atuar como fator limitante, alterar as rotas metabólicas ou atividades biológicas, causar efeitos inibitórios, interferir nas culturas microbianas dominantes e nos produtos da

fermentação. Alta disponibilidade de N (baixa relação C/N) ocasiona menores produções de H_2 , uma vez que a energia pode ser usada principalmente para crescimento celular da biomassa. Todavia, com a deficiência nutricional devido ao aumento de C/N as células podem ter evitado o uso de energia para crescimento, ocasionando em maiores produções de H_2 . Com o aumento de C/N, ou seja, com a diminuição da disponibilidade de N os microrganismos sofrem deficiência nutricional, produzindo menos H_2 (Rojas et al., 2010).

Lin & Lay (2004) também afirmam que sugeriram que baixas concentrações de N provavelmente não são suficientes para o crescimento celular. Miqueleto et al. (2010) observaram que houve uma diminuição do crescimento diário da população de microrganismos ($Y_{TVS/day}$) quando aumentou a relação C/N do substrato. Mengistu et al. (1994) ainda especificaram que a deficiência de N além de limitar o crescimento celular, pode direcionar a energia do carbono em excesso para a biossíntese de polissacarídeo. De acordo com Laspidou e Rittmann (2002), a relação C/N afetar a formação de biofilme, uma vez que a limitação de N na partida do reator pode aumentar a adesão de biomassa, devido ao aumento da produção de EPS. Por outro lado, limitação prolongada desse nutriente resulta em baixo crescimento de biomassa (Puñal et al., 2000).

Na Tabela 13 são expostos alguns trabalhos nos quais foram realizadas variações nas relações C/N na produção de H_2 .

Tabela 13. Estudo comparativo de PVH e YH para relações C/N e C/P em reatores em bateladas e fluxo contínuo

Referências	Inóculo/ Substrato	Material suporte	TDH (h)	Relação C/N	PVH (L.h ⁻¹ .L ⁻¹)	YH (mol H ₂ .mol ⁻¹ hexose)
Lin e Lay (2004)	Estação de tratamento municipal/ Sacarose	Crescimento suspensão	-	40	0,05*	2,3
				47	0,27*	4,8
				98	0,27*	2
				130	0,22*	1,8
Argun et al. (2008)	Estação de tratamento de empresa de levedura/ amido	Crescimento suspensão	-	20 (C/P=525)	2,27**	7,82***
				46 (C/P=861)	2,21**	6,95***
				46 (C/P=189)	2,32**	10,94***
				110 (C/P=50)	3,19**	9,41***
				110 (C/P=100)	1,77**	6,42***
				173 (C/P=861)	5,62**	17,87***
				173 (C/P=189)	2,06**	8,37***
Amorim (2009)	UASB de tratamento de água residuária de suinocultura/ Glicose	Argila expandida	8	200 (C/P=525)	5,53**	14,25***
				14 (C/P=345)	0,12	0,96
				28 (C/P=690)	0,25	1,51
				69 (C/P=1724)	0,12	0,48
				172 (C/P=4310)	0,06	0,44
			6	14 (C/P=345)	0,13	1,13
				28 (C/P=690)	0,35	1,95
				69 (C/P=1724)	0,25	1,02
				172 (C/P=4310)	0,43	0,49
			4	14 (C/P=345)	0,21	1,78
				28 (C/P=690)	0,51	2,22
				69 (C/P=1724)	0,49	1,24
				172 (C/P=4310)	0,53	0,58
			2	14 (C/P=345)	0,62	1,90
				28 (C/P=690)	0,80	2,52
				69 (C/P=1724)	0,95	1,32
				172 (C/P=4310)	0,84	0,63
			1	14 (C/P=345)	0,76	1,24
				28 (C/P=690)	1,29	1,84
				69 (C/P=1724)	1,58	1,04
				172 (C/P=4310)	0,68	0,56
Rojas et al. (2010)	Natural de acordo com Leite et al. (2008)/ Sacarose	Polietileno de baixa densidade	2	40	0,03	0,6
				90	0,06	1,3
				140	0,10	2,7
				190	0,08	1,7
Presente pesquisa	Tratamento processamento de aves	Pneu triturado	8	100	0,20	1,44
				150	0,20	1,66
				200	0,28	1,76
				250	0,21	1,50
			6	100	0,08	0,22
				150	0,19	0,48
				200	0,22	0,76
				250	0,29	1,36
			4	100	0,12	0,27
				150	0,21	0,50
				200	0,25	0,50
				250	0,32	0,74
			2	100	0,23	0,25
				150	0,24	0,32
				200	0,39	0,36
				250	0,37	0,55
			1	100	0,47	0,36
				150	0,35	0,26
				200	0,57	0,30
				250	0,27	0,19

Unidades: mol H₂.L⁻¹.dia⁻¹/**mg H₂.gbm⁻¹.L⁻¹/***/mg H₂.g amido⁻¹

5.1.3. Produção de ácidos orgânicos e alcoóis

Durante a fermentação da glicose foram produzidos os metabólitos: metanol (MeOH), etanol (EtOH), ácido láctico (HLa), ácido butírico (HBu), ácido acético (HAc), ácido fórmico (HFO) e ácido propiônico (HPr). A concentração dos metabólitos produzidos e o rendimento de etanol (EtOHY) estão apresentados na Figura 12. Na Figura 13 são expostos os valores percentuais para cada metabólito.

Produção dos ácidos málico, succínico, cítrico, isobutírico, isovalérico também foi verificada em algumas etapas. Todavia, os valores encontrados foram inferiores ao limite de detecção da curva.

Durante o TDH de 8 h, os metabólitos produzidos em maiores concentrações foram ácido butírico, etanol e metanol em R1, R2 e R3. Contudo, produção de ácido láctico e acético também foi bastante significativa.

A concentração de ácido butírico obtida em nas relações C/N=100 (R1), (C/N=150) R2 e R3 (C/N=200) no TDH de 8 h foi 305, 558 e 472 mg.L⁻¹, respectivamente. Durante a 1ª fase, no TDH de 8 h foram encontrados os melhores valores tanto de conteúdo de hidrogênio quanto de YH. Nesta fase, para as relações C/N=100, 150 e 200, ácido butírico foi o metabólito predominante. Uma vez que tal metabólito favorece a produção de H₂, as altas taxas encontradas nesse TDH podem ter sido favorecidas pela elevada produção de ácido butírico. Porém, a partir da redução do TDH de 8 para 6 h, houve uma queda bastante significativa da concentração deste metabólito (96, 52 e 59 mg.L⁻¹ em R1, R2 e R3, respectivamente) e continuou reduzindo até o TDH de 1 h (68, 16 e 15 mg.L⁻¹, respectivamente).

Embora no RALF R4 (C/N=250) a rota de ácido butírico não tenha sido a preferencial em nenhum TDH, a concentração deste metabólito também diminuiu de 106 mg.L⁻¹ no TDH de 8 h para 65 mg.L⁻¹ no TDH de 6 h, e reduziu até o valor de 23 mg.L⁻¹ no TDH de 1 h. Diferente dos RALF R1, R2 e R3, no R4, as principais rotas metabólicas foram de produção de etanol e ácido acético em todos os TDH aplicados.

Figura 12. Concentração dos metabólitos solúveis e EtOHY no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função do TDH

Figura 13. Valores percentuais dos metabólitos solúveis no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função do TDH, durante a 1ª fase de operação

Bastante significativa, a concentração de etanol foi 372, 260, 430 e 837 mg. L⁻¹ em R1, R2, R3 e R4, respectivamente, no TDH de 8 h. A partir do TDH de 6 h, significativo aumento da concentração desse solvente ocorreu em R1, R2 e R3, cujos valores foram 697, 569 e 555 mg. L⁻¹. A produção de etanol também aumentou com a diminuição do TDH para 1 h, alcançando valores de 986, 772 e 914 mg. L⁻¹ em R1, R2 e R3, respectivamente. No RALF R4, o comportamento foi diferente para produção de etanol. No TDH de 8 e 6 h os valores foram aproximadamente 835 mg.L⁻¹, no TDH de 4 h reduziu para 572 mg.L⁻¹ e elevou-se novamente para concentração de 609 mg.L⁻¹ no TDH de 1 h. Neste reator, etanol foi o metabólito predominante nos TDH de 8, 6, 2 e 1 h. Neste estudo, provavelmente ocorreu a rota de produção simultânea de etanol e hidrogênio (Hwang et al, 2004).

Os valores de rendimento de etanol (Y_{EtOH}) variaram de 0,44 a 1,08 mol EtOH.mol glicose⁻¹ em R1, 0,31 a 0,57 mol EtOH.mol glicose⁻¹ em R2, 0,44 a 0,74 mol EtOH.mol glicose⁻¹ em R3 e 0,62 a 0,88 mol EtOH.mol glicose⁻¹ em R4. Os maiores valores de Y_{EtOH} foram obtidos no TDH de 1 h nos RALF R1, R2 e R3. Em R4 os maiores valores foram obtidos no TDH de 6h. Os valores aqui apresentados foram inferiores aos encontrados na literatura por Barros et al. (2012) na fermentação da glicose em RALF. Os autores obtiveram valores máximos de EtOHY (> 2 mol EtOH.mol glicose⁻¹) em TDH de 2 h.

Embora não tenha sido a rota preferencial em R1, R2 e R3, a produção de ácido acético também foi significativa. Dentre da faixa de TDH de 8 e 2 h, no RALF R1 a concentração de ácido acético variou entre 132 e 172 mg.L⁻¹, no R2 variou entre 166 e 215 mg.L⁻¹, e no R3 variou entre 131 e 190 mg.L⁻¹. No entanto, com a diminuição do TDH para 1 h, a concentração deste metabólito foi maior que o dobro encontrado noutros TDH, ou seja, 445 mg.L⁻¹ em R1, 406 mg.L⁻¹ em R2 e 460 mg.L⁻¹ em R3.

No RALF R4, os valores de concentração de ácido acético foram elevados, variando entre 463 e 611 mg.L⁻¹ durante toda fase. Enquanto no RALF R4, ácido acético foi um dos metabólitos principais, no R1, R2 e R3 os valores de concentração obtidos foram menores. Entretanto, a rota metabólica deste metabólito leva a formação de hidrogênio e sua geração contribuiu com a produção de H₂ tanto em R4 quanto R1, R2 e R3.

Produção de metanol foi verificada nos reatores R1, R2 e R3, cujas concentrações máximas foram obtidas no TDH de 8 h, ou seja, 313, 374 e 353 mg.L⁻¹, respectivamente. A partir do TDH de 6 h, ocorre uma queda dos valores aproximadamente pela metade nos três RALF, cujos valores foram 147 mg.L⁻¹ em R1, 168 mg.L⁻¹ em R2 e 139 mg.L⁻¹ em R3. Com a diminuição do TDH para 1 h, ocorre queda significativa da concentração desse metabólito para

valores inferiores a 25 mg.L^{-1} em R1, R2, e R3. Diferentemente, no RALF R4 produção de metanol não foi verificada em nenhum TDH. A ausência de metanol na relação C/N=250 demonstra que limitações na disponibilidade de nitrogênio provocaram alterações relevantes na comunidade microbiana e/ou nas rotas de produção de metabólitos a partir da fermentação da glicose.

Embora, metanol tenha sido produzido em elevadas concentrações no presente trabalho durante o TDH de 8 h, a literatura disponível em produção biológica de hidrogênio pouco relata sobre possíveis causas para a produção de metanol. Giaconia et al. (2007) sugerem uma rota de produção de metanol a partir da conversão de gás sintético (Eq. 5). No entanto, os resultados mostraram que apesar do metanol ter sido representativo no TDH de 8 h, nessa condição foi verificado maior YH de toda fase.

No presente estudo, a produção de ácido fórmico durante a primeira etapa (TDH de 8h) ficou abaixo de 20 mg.L^{-1} em todos RALF. Contudo, no TDH de 6 h os valores aumentaram para 130 mg.L^{-1} em R1, 113 mg.L^{-1} em R2 e 107 mg.L^{-1} em R3. De maneira diferente no RALF R4 os valores permaneceram em torno de 20 mg.L^{-1} . A partir do TDH de 4 h, novamente foi observada queda da concentração de ácido fórmico em R1, R2 e R3 (32 , 34 e 68 mg.L^{-1} , respectivamente), enquanto no RALF R4 a produção desse metabólito não sofreu alterações significativas

A produção de ácido láctico também foi significativa, e sua concentração aumentou de 86 , 274 , e 234 mg.L^{-1} em R1, R2 e R3, no TDH de 8 h para 929 , 710 e 812 mg.L^{-1} em R1, R2, e R3, respectivamente, no TDH de 6 h. Neste TDH foram obtidos os maiores valores de ácido láctico. Com a diminuição do TDH para 1 h, a produção deste metabólito reduz para 333 , 374 e 291 mg.L^{-1} em R1, R2 e R3, respectivamente. No RALF R4, os valores de ácido láctico aumentou de 24 para 283 mg.L^{-1} com a redução do TDH de 8 para 4 h, manteve-se estável com a variação do TDH para 2 h e alcançou valores máximos de concentração no TDH de 1 h (316 mg.L^{-1}).

A concentração de ácido propiônico aumentou de valores próximos a 15 mg.L^{-1} para valores de aproximadamente 60 mg.L^{-1} nos RALF R1, R2 e R3, com a variação do TDH de 8 para 6 h. Aumento deste AGV também foi verificado no R4, cuja concentração foi 25 e 124 mg.L^{-1} nos TDH de 8 e 6 h, respectivamente. Neste TDH foi obtido o valor máximo de ácido propiônico em R4. Maior produção deste metabólito foi verificada no TDH de 4 h no R1 (128 mg.L^{-1}), no TDH de 2 h no R2 (96 mg.L^{-1}) e no TDH de 2 h no R3 (165 mg.L^{-1}).

Os resultados apresentados mostram que a produção de hidrogênio ocorreu preferencialmente pela rota de ácido butírico no TDH de 8 h, além das rotas de produção de etanol e ácido acético terem contribuído com a produção deste biogás, uma vez que nesse TDH houve um ápice de YH. Todavia, a partir do TDH de 6 h, o comportamento de distribuição de metabólitos e rotas metabólicas preferenciais sofreram alterações relevantes em R1, R2 e R3. Além da redução significativa de ácido butírico, ocorreu aumento da produção de ácido láctico. Ademais, ocorre diminuição de metanol e aumento de etanol.

Com a redução de ácido butírico e aumento da produção de ácido láctico a partir do TDH de 6 h, houve diminuição do conteúdo de hidrogênio no biogás e do rendimento de hidrogênio. A alta concentração de hidrogênio verificada no TDH de 8 h pode ter causado o deslocamento de hidrogênio de modo a equilibrar o sistema. Além disso, houve aumento da concentração de ácido propiônico a partir do TDH de 6 h em todos os reatores.

Comparando as relações C/N aplicadas nos reatores, verificou-se que diferenças relevantes nos valores de metabólitos produzidos começaram a ocorrer a partir da relação C/N=250 (R4). Provavelmente, em condições de disponibilidade de nitrogênio limitada (alta relação C/N) os microrganismos alterem suas rotas metabólicas ou alguns grupos sejam beneficiados em detrimento de outros.

Assim como no presente estudo, Lin e Lay (2004) verificaram os ácidos acético, butírico, propiônico e lácticos durante o processo de fermentação dos açúcares. Ácido butírico foi o componente principal, no entanto, a fração de butirato diminuiu gradualmente de 51% a 39% quando a relação C/N aumentou de 40 para 130, comportamento este diferente do presente estudo, no qual não houve variação significativa da concentração de ácido butírico entre as relações C/N. Em RALF, a composição de metabólitos verificadas no estudo de Amorim (2009) foi semelhante a do presente estudo, com presença de metanol, ácido acético e butírico, predominância de etanol em todos TDH (8–1 h) e presença de metanol somente nos TDH de 6 e 4 h e 2 h. Tais metabólitos foram encontrados por Amorim (2009) para relação C/N semelhante a do presente estudo, ou seja, C/N=172 (25000 mg L⁻¹ de glicose). O autor verificou que as maiores relações C/N aplicadas (69 e 172), assim como o presente estudo, favoreceram rotas metabólicas de produção de solventes, como o etanol e metanol.

Enquanto altas relações C/N favoreceram a produção de solventes RALF, em reator de leito fixo, Rojas et al. (2010) verificaram que independente da relação C/N aplicada, a composição dos metabólitos foi similar. Ademais, a produção de H₂ máxima esteve relacionada a predominância de HAC e HBU, além de EtOH. Também se verificou presença de

HBr e MetOH. Contrariamente ao presente estudo, Rojas et al. (op. cit.) relataram predominância de ácido acético e butírico nas 4 relações C/N aplicadas (40, 90 140 e 190).

5.1.4. Caracterização molecular da diversidade microbiana

Foram realizadas análises de DGGE para amostras dos reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) e TDH aplicados de 8, 6, 4, e 2 h. Tais etapas foram selecionadas por apresentarem variação mais significativa nos valores de produção e rendimento de hidrogênio. Por meio da análise da estrutura da comunidade de bactérias analisada pelo PCR-DGGE foram observadas diferenças nos perfis de bandas tanto em relação a variação de TDH quanto diferenças nos perfis de bandas entre as três relações C/N aplicadas (Figura 14).

Verificou-se para o TDH de 8 h na comparação do perfil de banda dos reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) verificou-se maior coeficiente de similaridade, ou seja, de 93% entre R2 e R3. Para TDH de 6 h observou-se coeficiente de similaridade de 82% entre R2 e R3. Quando o TDH aplicado foi de 2 h, o maior coeficiente de similaridade (90%) também ocorreu entre os reatores R2 e R3. De maneira diferente, quando o TDH aplicado foi 4h, o maior coeficiente de similaridade (88%) foi verificado entre R1 e R3. Face ao exposto, pode-se afirmar que para a maioria dos TDH aplicados verificou-se que as maiores similaridades entre as populações foi para as relações C/N =150 (R2) e C/N=200 (R3) e menor para C/N=100 (R1).

Em relação ao TDH de 4 e 2h verificou-se 88% de similaridade para R1. Além disso, foi verificado coeficiente de similaridade de 85% entre as populações da etapa cujo TDH foi 8 e 6h. Verificou-se similaridade de 76% entre as populações para TDH de 8h, 4h e 2h. A partir dos dados aqui apresentados, pode-se afirmar que o TDH influenciou na distribuição das populações de bactérias, uma vez que para elevados TDH (8 e 6h) foi observada maior similaridade entre si. Da mesma maneira, para TDH de 4h e 2h, também se observou elevada similaridade.

Por outro lado, em relação a variação de TDH, tanto em R2, quanto em R3 foi verificado menor coeficiente de similaridade (76%) para TDH de 8h em relação aos demais. Tal comportamento foi verificado também na composição de ácidos orgânicos voláteis, ocorrendo alterações com a diminuição do TDH de 8h para 6h, bem como, notável diminuição do rendimento de H₂ de 8h em relação aos demais TDH.

Por meio da distribuição de bandas no perfil de DGGE verificou-se que ocorreram alterações significativas nas populações de bactérias com a variação da disponibilidade de nitrogênio entre os três reatores, bem como em relação a variação do TDH. Para as maiores relações C/N (150 e 200) observou-se maior similaridade entre as populações, quando comparada com a menor relação C/N aplicada (100). Portanto, devido a disponibilidade de nitrogênio ocorreu seleção de algumas populações de bactérias em detrimento de outras. Além disso, o TDH também influenciou na distribuição de populações, uma vez que para TDH inferiores, as populações foram mais similares entre si, assim como para aqueles TDH elevados. Destaca-se que para as relações C/N=150 e 200, e TDH de 8h, verificou-se maior rendimento de H_2 , e menor similaridade entre as populações, em relação aos demais TDH. Provavelmente, elevado valor de TDH favoreceu populações de bactérias produtoras de H_2 , maior produção de etanol e ácido butírico, em relação aos demais TDH.

Figura 14. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) and the UPGMA clustering method, a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às populações de bactérias dos reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) durante as etapas com TDH de 8, 6, 4, e 2h, durante a 1ª fase de operação

As seqüências filogenéticas obtidas foram provenientes da biomassa de amostras do material suporte (pneu triturado) do reator R3 (relação C/N=200) e TDH de 8 h, uma vez que nessa etapa observou-se maior rendimento de todo período operacional ($1,76 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol } \text{gli}^{-1}$). Foram obtidas 108 seqüências que foram agrupadas em 10 unidades operacionais

taxonômicas (OTU), correspondendo aos Filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (Tabela 14).

A OTU 1 foi a mais abundante (27%) e 99% similar a *Ethanoligenens harbinense*. Xing et al. (2006) isolaram *E. harbinense* a partir de lodos ativados anaeróbios de tratamento de águas residuais de melaço em reator de tanque agitado contínuo. O crescimento ocorreu em 20 a 44°C e pH 3,5 a 9,0, ou seja, abrangeu as condições que foram aplicadas no reator amostrado no presente estudo. De acordo com Xing et al. (2006), tais microrganismos produziram H₂, CO₂, etanol e ácido acético a partir da fermentação da glicose. Também em reatores de tanque agitado contínuo, Ren et al. (2007) verificaram *Ethanoligenens* sp. na produção de H₂ a partir de águas residuais de melaço. Os autores atribuíram maior produção de H₂ na fermentação via etanol, cujo pH variou entre 4,0 e 4,5. Assim, a presença desse microrganismo no reator do presente estudo provavelmente esteve relacionada à produção de H₂, CO₂, etanol e ácido acético a partir da fermentação da glicose (Figura 15).

A OTU 2, compreendendo 22% do total de clones sequenciados, foi relacionada a *Clostridium* sp.. Kuhner et al. (2000) verificaram que *Clostridium* sp. produziu ácido acético, butírico, lático, H₂ e CO₂ a partir da fermentação da glicose. Além disso, de acordo com Schink and Zeikus (1980) algumas cepas de *Clostridium* sp. podem produzir metanol como principal subproduto em meio contendo pectina. Stöhlmacher (1995) afirma que metanol pode ser obtido por *Clostridium* a partir de fermentação. Assim, é possível que as *Clostridium* sp. identificadas no presente estudo tenham sido as responsáveis pela produção de metanol no RALF R3. Assim, além da produção de metanol, provavelmente membros de *Clostridium* sp. contribuíram com a produção de ácido acético, butírico, lático, H₂ e CO₂ no presente estudo.

A OTU 3 e OTU 10 foram relacionadas a *Lactobacillus ghanensis* e *Lactobacillus* sp., representando 23% do total de clones sequenciados. Segundo Edwards et al. (2000) *Lactobacillus* sp. é uma bactéria anaeróbia facultativa capaz de crescer em atmosfera enriquecida com CO₂. Seto et al. (2006) verificaram colônia formada por duas cepas bacterianas associadas a uma bactéria ácido acético produtora de celulose (*Glucoacetobacter* sp.) e uma bactéria ácido láctico (*Lactobacillus* sp.). Ressalta-se que no reator amostrado nesse estudo foram encontradas espécies pertencentes a esses dois gêneros, assim sugerindo a sua co-existência e provável relação de associação positiva mútua. Destaca-se que *Lactobacillus* spp. são bactérias que produzem ácido láctico como principal ou único produto de fermentação. Todavia, *Lactobacillus* spp. podem ser também heterofermentativos, ou seja, gerar outros produtos além do ácido láctico a partir da fermentação de açúcares, como etanol

e CO₂. Essas bactérias são comumente mais resistentes a condições ácidas que outros microrganismos lácticos, apresentando a capacidade de crescer em pH com valores abaixo de 4 (Madigan et al., 2010). Considerando que no presente estudo o RALF R3 foi mantido com pH entre 3,1 e 4,5, tais microrganismos tiveram boas condições para crescimento. A presença de glicose permitiu a produção de ácido láctico por esses microrganismos. Ademais, é possível que tais microrganismos também tenham contribuído com a produção de etanol e CO₂.

A OTU 4 foi relacionada a *Bifidobacterium* sp., cuja abundância foi de 18%. Bifidobactérias são bactérias benéficas predominantes na microbiota intestinal de humanos (Mitsuoka, 2000). Microrganismos desse gênero são sacarolíticos anaeróbios que produzem ácido acético e láctico a partir de carboidratos sem a geração de CO₂. O metabolismo de carboidratos por bifidobactérias é diferente das bactérias homofermentativas e heterofermentativas. Com efeito, a frutose-6-fosfoquetolase, uma enzima típica do gênero *Bifidobacterium*, é responsável pela degradação da glicose (Scardovi, V., 1986). A presença desse microrganismo no presente estudo provavelmente contribuiu com a produção de ácido acético e láctico a partir da fermentação da glicose no RALF R3.

A OTU 5 foi relacionada a *Sporolactobacillus* sp., incluídas entre as bactérias anaeróbias facultativas ou microaerófilas. Essas bactérias apresentam bom crescimento em meio contendo glicose e são capazes de produzir ácido láctico a partir da glicose por homofermentação (Ludwig et al., 2008). Assim como *Lactobacillus* sp., a presença de *Sporolactobacillus* sp. no RALF do presente estudo provavelmente esteve relacionada a produção de ácido láctico por meio da fermentação da glicose. Ademais, assim como no presente estudo, Romano et al. (2014) também encontraram microrganismos semelhantes a *Sporolactobacillus* em experimentos em bateladas de fermentando glicose, usados na produção de H₂.

A OTU 8 foi relacionada a *Klebsiella* sp. não cultivada. Varrone et al. (2012) encontraram tais microrganismos em lodo enriquecido, no qual houve conversão do glicerol bruto, única fonte de carbono, em hidrogênio. De acordo com os autores, houve alteração do produto final dominante a partir de 1,3 propanodiol em etanol, levando ao aumento do HY e HPR (cinco vezes maior) durante o enriquecimento. Lin et al. (2008) e Chen et al. (2006) também verificaram produção de hidrogênio relacionada a presença de *Klebsiella* spp. A OTU 6 também foi relacionada a *Klebsiella* sp. Lin et al. (2012) verificaram que enterobactérias fixadoras de nitrogênio (indigenous) têm o potencial de fixar N₂ em associação com roots of sugarcane, e encontraram estas bactérias pertencentes aos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*.

Embora os microrganismos pertencentes ao gênero *Klebsiella* sejam bastante versáteis, sua presença no RALF do presente estudo provavelmente esteve relacionada a produção de H₂ a partir da fermentação da glicose. Ademais, a habilidade de usar nitrogênio pode ter favorecido o crescimento de tais microrganismos.

A OTU 7 foi relacionada a *Gluconacetobacter* sp.. De acordo com Iino et al. (2012) *Gluconacetobacter* sp. são capazes de produzir ácido acético a partir do etanol e oxidar acetato e lactato. Microrganismos desse gênero são conhecidos por bactérias acéticas, capazes de realizar oxidação incompleta de alcoóis e açúcares, levando ao acúmulo de ácidos orgânicos como produtos finais. Tais microrganismos apresentam tolerância relativamente alta a condições ácidas, sendo capaz de crescer em valores de pH abaixo de 5 (Madigan et al., 2010), ou seja, nas condições aplicadas nos reatores do presente estudo. Provavelmente, a disponibilidade de etanol produzido por *Ethanoligenens* sp. no presente estudo favoreceu o crescimento de *Gluconacetobacter* sp. que converteu tal metabólito em ácido acético.

A OTU 9 foi relacionado a bactérias não cultivadas que crescem em condições sulfetogênicas. Zhao e colaboradores (2008) objetivaram demonstrar a relação entre bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias fermentativas acidogênicas (BFA), e suas contribuições para a degradação do lactato e redução de sulfato em reator de tanque de agitação contínua alimentados com água residuária sintética contendo lactato e SO₄⁻². Os autores verificaram que a eficiência de remoção de sulfato de 99%, e sulfeto e acetato foram os principais produtos finais após 20 dias de operação. Os microrganismos encontrados no reator do presente estudo podem ter contribuído tanto com a produção de ácido acético quanto com a redução de sulfato, uma vez que o meio Del Nery (1987) adicionado no reator tinha sulfato de níquel, sulfato ferroso e sulfato férrico. Ademais, microrganismos pertencentes ao gênero *Clostridium* foram encontrados no presente estudo, organismos estes capazes de reduzir sulfato (Bao et al., 2012).

Tabela 14. Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria, referentes a 1ª fase de operação

OTU	Número de sequencias	Afiliação do organism	Compriemento da sequencia (pb)	Identidade (%)	Filo	No acesso no GenBank	Abundância relativa
1	29	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	1003	99	Firmicutes	NR_042828.1	27%
2	24	<i>Clostridium</i> sp.	996	96	Firmicutes	FJ158032.1	22%
3	22	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	1027	99	Firmicutes	DQ867004.1	20%
4	20	<i>Bifidobacterium</i> sp.	1024	96	Actinobacteria	AB470327.1	18%
5	3	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	1056	96	Firmicutes	HQ285998.1	3%
6	4	<i>Klebsiella</i> sp.	1039	98	Proteobacteria	JN049596.1	4%
7	1	<i>Gluconacetobacter liquefacien</i>	991	99	Proteobacteria	AB648911.1	1%
8	1	<i>Klebsiella</i> sp. não cultivada	809	99	Proteobacteria	JX310754.1	1%
9	1	Bactéria não cultivada	947	96	Firmicutes	DQ444185.1	1%
10	3	<i>Lactobacillus</i> sp.	912	98	Firmicutes	Y17500.1	3%

Figura 15. Árvore filogenética da OTU obtidos a partir do material suporte do reator R3 e TDH=8h, da 1ª fase de operação, construído usando o método neighbor-joining, baseado na comparação do gene rRNA 16S. Números nos nós representam valores de bootstrap (percentagens of 1000 repetições). Bar, 95% substituições nas sequencias dos nucleotídeos. Outgroup: *Methanosarcina acetivorans*

5.2. Segunda fase de operação dos RALF: Análise do efeito da relação C/P e C/N na produção de hidrogênio na condição de máxima produtividade.

A segunda fase operacional foi caracterizada pela variação da relação C/P em 300, 500, 700, 900 e 1100 nos quatro reatores de leito fluidificado, contendo as relações C/N=100 em R1, C/N=150 em R2, C/N=200 em R3 e C/N=250 em R4, mantendo fixo o TDH em 2h. Para esta fase, o TDH de 2h foi escolhido uma vez que foi a condição de maior PVH na primeira fase operacional.

5.2.1. pH DQO, conversão da glicose e sólidos suspensos

Durante o período de operação dos reatores, o pH efluente foi mantido estável, com valores variando entre 3,5 e 4,4 em R1 (C/N=100), 3,3 e 4,1 em R2 (C/N=150), 3,5 e 4,1 em R3 (C/N=200), e 3,6 e 4,3 em R4 (C/N=250).

Os valores médios de pH efluente e afluente obtidos com a variação da relação C/P nos quatro reatores operados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados médios de pH obtidos para cada relação C/P aplicada no R1 (C/N=100), no R2 (C/N=150), no R3 (C/P=200) e no R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação

C/P	R1		R2		R3		R4	
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu	Aflu	Eflu
300	5,86	3,65	5,79	3,42	6,09	3,63	6,45	4,03
500	6,52	3,75	6,61	3,55	6,71	3,64	5,61	3,99
700	6,25	3,94	6,22	3,73	6,34	3,74	5,74	4,05
900	5,27	3,74	5,69	3,76	5,73	3,79	5,59	3,96
1100	6,34	3,73	6,26	3,79	6,22	3,80	6,19	3,92

Os valores de pH efluente mantiveram-se estáveis com a variação das relações C/N e C/P. Assim como na primeira fase de operação, os valores de pH efluente encontrado estiveram na

mesma faixa que os trabalhos de Lee et al. (2001), Barros e Silva (2012) e Shida et al. (2012). Contudo, os valores de pH encontrados neste estudo foram inferiores aos encontrados na maioria dos estudos relacionados a produção de hidrogênio (Lin e Lay, 2004; Amorim, 2009; Zong et al., 2009; Reis e Silva, 2011; Rojas, 2010; Lay et al., 2012; Ferraz Junior, 2013).

Os resultados de DQO média obtidos nas amostras de afluente e efluente para todas as relações C/P aplicadas são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores médios de DQO afluente e efluente e porcentagem removida para R1, R2, R3 e R4 nas relações C/P aplicadas, durante a 2ª fase de operação

Reatores	C/P	DQO Aflu (mg L ⁻¹)	DQO Eflu (mg L ⁻¹)	Eficiência (%)
R1	300	4871	4043	17
	500	4802	4420	8
	700	4939	4576	7
	900	4974	4311	13
	1100	5424	4113	23
R2	300	4859	4046	16
	500	4911	4581	7
	700	5143	4670	10
	900	5035	4415	13
	1100	5294	4276	19
R3	300	4884	4157	15
	500	4938	4032	19
	700	5342	4601	14
	900	5122	4758	7
	1100	5071	4330	15
R4	300	5882	4624	21
	500	6160	5379	13
	700	5527	4973	10
	900	6465	5176	20
	1100	5325	4317	19

Os valores de DQO de entrada nos RALF R1, R2, R3 e R4 foram 5002, 5048, 5071 e 5872 mg.L⁻¹, respectivamente. A partir dos valores amostrados, pode-se perceber que a remoção de DQO esteve abaixo de 20% para a maioria das etapas. Comparando tais valores com aqueles encontrados na primeira fase, percebe-se que houve uma diminuição da remoção de DQO.

O comportamento da conversão da glicose em função da relação C/P é apresentado na Figura 16.

Figura 16. Efeito da relação C/P na conversão da glicose nos RALF R1 (C/N= 100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação

A média da glicose de entrada usada foi 5277 mg.L⁻¹ em R1, 5411 mg.L⁻¹ em R2, 5383 mg.L⁻¹ em R3 e 5182 mg.L⁻¹ em R4. Em R1, a conversão da glicose aumentou de 82% para 91% quando a relação C/P foi elevada de 300 para 500. Os valores mantiveram-se estáveis (em torno de 90%) com o aumento da relação C/P de 500 para 1100. A conversão da glicose em R2 aumentou de 82 para 88%, com o aumento da relação C/P de 300 para 500. Com a elevação da relação C/P para 1100, a conversão da glicose caiu para 74%. Em R3, a conversão da glicose

aumentou de 81% para 88% quando a relação C/P foi elevada de 300 para 500. Reduziu-se a cerca de 80% em uma relação C/P igual a 700 e 900 e caiu novamente em C/P=1100 (77%). Em R4, com o aumento da relação C/P de 300 para 500 houve aumento da conversão de glicose de 70% para 91%. Com o aumento da relação C/P para 900, houve diminuição da conversão da glicose para 67% e aumento para 83% em C/P=1100. Ressalta-se que em todos os reatores, a conversão da glicose atingiu os valores máximos na relação C/P=500, cujos valores foram 91, 88, 88 e 91% em R1, R2, R3 e R4, respectivamente. Rojas et al. (2010) obtiveram comportamento mais estável dos valores de conversão de sacarose variando a relação C/N, cujos valores estiveram acima de 88%. Shida et al. (2012) e Zhang et al. (2007) encontraram valores superiores a 90% de conversão de glicose em RALF sob TDH de 2h.

Os valores de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do efluente obtidos nessa fase são apresentados na Tabela 17.

Embora não tenha sido quantificado nessa pesquisa, visualmente foi verificada grande produção de polímeros de coloração esbranquiçada e/ou acinzentada na porção superior do reator e nas mangueiras de saída do efluente dos reatores. A coloração acinzentada pode estar relacionada a pequenas partículas de pneu triturado. A maior produção de polímeros foi verificada em elevadas relações C/P (900 e/ou 1100), provavelmente devido às condições de stress causadas aos microrganismos dos reatores relacionadas a baixa disponibilidade de nutrientes nessas relações C/P.

Tabela 17. Concentração de sólidos suspensos totais e voláteis efluente obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4, durante a 2ª fase de operação

Reatores	C/P	SST (mg.L ⁻¹)	SSV (mg.L ⁻¹)
R1 (C/N=100)	300	33±12	29±9
	500	535±362	500±314
	700	209±106	189±100
	900	57±20	55±20
	1100	105±27	97±23
R2 (C/N=150)	300	45±74	39±68
	500	145±124	128±106
	700	118±44	102±30
	900	74±15	73±18
	1100	65±19	71±16
R3 (C/N=200)	300	33±19	29±17
	500	58±28	50±25
	700	64±29	64±32
	900	63±29	59±17
	1100	52±33	50±28
R4 (C/N=250)	300	60±49	56±46
	500	53±41	54±33
	700	85±45	94±60
	900	83±74	82±79
	1100	74±37	69±32

5.2.2. Efeito da relação C/N e C/P na produção de hidrogênio

Na Tabela 18 são apresentados os valores médios de porcentagem de H₂ no conteúdo do biogás em para todas relações C/P e C/N aplicadas.

Assim como a primeira fase, o biogás foi composto de CO₂ e H₂.

Tabela 18. Valores médios da porcentagem de H₂ no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 2ª fase de operação

Média % H ₂				
C/N	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
300	21,8±8,2	26,4±10,5	25,7±10,1	48,1±15,0
500	24,8±9,4	30,9±7,8	37,6±8,1	36,0±9,4
700	28,8±12,2	29,1±5,8	37,9±8,3	36,6±8,3
900	21,4±7,8	29,7±11,1	35,9±6,4	26,4±4,1
1100	26,3±12,4	27,6±6,8	32,1±9,4	36,4±9,1

No reator R1, o conteúdo de H₂ aumentou de 21% para 29% quando a relação C/P foi elevada de 300 para 700, caindo para 21% na relação C/P=900 e aumentando novamente com o aumento da relação C/P para 1100 (26%). No reator R2, para relação C/P=300, o conteúdo de H₂ foi de 26%, aumentando com a variação de C/P para 500. Durante o aumento gradativo da relação C/P para 1100, o conteúdo de H₂ manteve-se estável, por volta de 30%. No reator R3, houve aumento do conteúdo de H₂ de 26% para 38% quando C/P foi elevado de 300 para 500. Com o aumento para C/P=1100, o conteúdo de H₂ diminuiu gradativamente para 32%. Contrariamente, no reator R4, ele caiu de 48% para 36% com o aumento da relação C/P de 300 para 500, mantendo-se estável com a variação de C/P para 700. R4 alcançou os maiores valores de conteúdo de H₂ na relação C/P=300, atingido o valor máximo de 62%. Quando C/P foi elevado para 900, o conteúdo de H₂ diminuiu para 26% e aumentou novamente com a variação para C/P=1100 (36%).

Durante a operação, não foi verificado metano no biogás dos RALFs, indicando a não ocorrência/ausência de microrganismos metanogênicos sob todas as relações C/P. A influência da relação C/N também foi notável, com maior valor alcançado na relação C/N=250 (R4) quando C/P foi igual a 300. Valores de conteúdo de H₂ em torno de 37% foram verificados nas relações C/N=200 (R3), quando a relação C/P foi igual a 500, 700 e 900, e C/N=250 (R4), quando as

relações C/P foram 500, 700 e 1100. Essa tendência de aumento do conteúdo de hidrogênio com a elevação da relação C/N também foi relatada na literatura em RALFs.

Amorim et al. (2012) relataram comportamento inverso, ou seja, diminuição do conteúdo de H_2 de com o aumento da relação C/N de 28 para 172 (C/P=4310), sob TDH de 2h. Nessas condições, o conteúdo de H_2 foi superior ao presente estudo, com valores acima de 40%. Em reatores em bateladas, Lin e Lay (2004) obtiveram valores de conteúdo de H_2 superiores (acima de 50%) para relações C/N variando de 40 a 130. Com o aumento de C/N de 98 para 130, o conteúdo aumentou de 52% para 55%. Em reatores de leito fixo e TDH de 2 h, Rojas et al. (2010) também relataram valores maiores que o presente estudo, ou seja, acima de 45% para relações C/N variando de 40 a 190. O conteúdo aumentou de 49% para 61% quando C/N aumento de 90 para 140, cuja relação foi obtida o maior valor.

Na Tabela 19 são expostos os valores médios de YH e PRH para as relações C/P e C/N aplicadas na segunda fase de operação e nas Figuras 17 e 18 é apresentada a variação no YH para cada mol de glicose em função da relação C/P e C/N, respectivamente.

Tabela 19. Valores médios de HY e PVH obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 2ª fase de operação

Rendimento (mol H₂.mol⁻¹ glicose)				
C/P	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
300	0,25±0,97	0,32±0,62	0,36±0,51	0,50±1,15
500	0,27±0,10	0,39±0,11	0,57±0,18	0,50±0,12
700	0,49±0,27	0,46±0,15	0,76±0,38	0,50±0,13
900	0,26±0,12	0,42±0,20	0,37±0,16	0,30±0,10
1100	0,24±0,11	0,37±0,10	0,24±0,05	0,34±0,08
Produtividade (L.h⁻¹.L⁻¹)				
C/P	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
300	0,23±0,13	0,24±0,09	0,39±0,11	0,37±0,11
500	0,25±0,10	0,40±0,09	0,57±0,18	0,46±0,12
700	0,49±0,28	0,46±0,16	0,70±0,39	0,57±0,20
900	0,27±0,12	0,44±0,25	0,29±0,13	0,23±0,07
1100	0,24±0,14	0,40±0,11	0,24±0,01	0,26±0,07

A condição que apresentou o maior valor de YH foi relação C/N=200 (R3) e C/P=700 (0,76 mol H₂ mol⁻¹ glicose) (Figura 3). Em R1 (C/N=100) e R2 (C/N=150) e R4 (C/N=250), os maiores valores também foram obtidos na relação C/P=700. Em todos os reatores, com o aumento da relação C/P de 300 para 700 houve aumento do YH, de 0,25 mol H₂ mol⁻¹ glicose para 0,49 mol H₂ mol⁻¹ glicose em R1, de 0,32 mol H₂ mol⁻¹ glicose para 0,46 mol H₂ mol⁻¹ glicose em R2, de 0,36 mol H₂ mol⁻¹ glicose para 0,76 mol H₂ mol⁻¹ glicose em R3, e de 0,50 mol H₂ mol⁻¹ glicose para 0,55 mol H₂ mol⁻¹ glicose em R4. Posteriormente, com o aumento da relação C/P de 700 para 1100, o YH reduziu para 0,24 mol H₂ mol⁻¹ glicose, 0,37 mol H₂ mol⁻¹ glicose, 0,24 mol H₂ mol⁻¹ glicose e 0,30 mol H₂ mol⁻¹ glicose em R1, R2, R3 e R4, respectivamente. Este comportamento indica que alterações metabólicas podem ter ocorrido

quando a relação C/P aumentou de 300 para 1100, ou seja, como consequência da diminuição da disponibilidade de P.

Oztekin et al. (2008) também encontraram valor ótimo de C/P para YH, cujo valor máximo foi de $1,71 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose. Diferentemente, Amorim et al. (2012) não encontraram um ponto ótimo de C/P e relataram que a diminuição da concentração da glicose, ou seja, a redução de C/P ocasionou um aumento dos valores de YH. Além disso, a literatura apresenta valores de YH superiores ao presente estudo com a variação de C/P e C/N: $2,49 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose em relação C/P= 345, C/N=14 (2000 mg L^{-1} de glicose) em RALF sob TDH de 2h (Amorim et al., 2012); $3,5 \text{ mol H}_2 \text{ mol sacarose}^{-1}$ em C/N=140, em reator de leito fixo e TDH de 2h (Rojas et al., 2010), e $281 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1}$ amido em C/P=1000 e C/N=200 em experimentos em bateladas (Argun et al., 2008).

Figura 17. Variação do YH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250)

Figura 18. Variação do YH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação

Nas Figuras 19 e 20 são comparadas as produções volumétricas de hidrogênio (PVH) em função da relação C/P e C/N, respectivamente.

Figura 19. Variação da PVH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação

Assim como o YH, o comportamento da PVH com a variação da relação C/P houve aumento da PVH em todos os reatores com o aumento da relação C/P de 300 para 700. Nessa etapa foi atingindo o valor ótimo para todos os reatores, com maior valor de PVH de $0,70 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ no RALF R3 (C/N=200). Os valores de PVH diminuíram em todos os reatores com a elevação

da relação C/P de 700 para 1100, exceto em R4, onde os valores de PVH aumentaram novamente com a elevação de C/P de 900 para 1100. Os estudos realizados com variação de C/P relatam comportamento diferente. Argun et al. (2008) variaram C/P de 50 a 1000 e C/N de 20 a 200 e relataram que para $C/N < 46$ e aumento da relação C/P houve decréscimo da PVH. Todavia, em relações $C/N > 46$, ocorreu aumento da PVH à medida que se a relação C/P aumentava, atingindo valor ótimo de taxa de produção de hidrogênio específica nas relações $C/P=1000$ e $C/N=200$ ($98 \text{ mL g}^{-1} \text{ biomassa h}^{-1}$). O valor ótimo de PVH encontrado por Amorim et al. (2012) foi o dobro do valor encontrado no presente estudo ($1,46 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$) em relação $C/P=1724$ e $C/N=69$ (10000 mg L^{-1} de glicose) e TDH de 1 h em RALF. Rojas et al. (2010) obtiveram valor ótimo ($162,5 \text{ mL h}^{-1} \text{ L}^{-1}$) em $C/N=140$ em reator de leito fixo e TDH de 2 h.

Oztekin et al. (2008) afirma que a interação entre as concentrações de fósforo e nitrogênio tem um efeito fundamental no YH. Baixas concentrações de nitrogênio ocasionam em menores valores de produção de hidrogênio. Tendo em vista que o nitrogênio é utilizado para o crescimento microbiano e à síntese de enzimas, pode acontecer limitação de nutrientes (N e P) quando suas concentrações são menores (Argun et al., 2008). Contudo, de acordo com Oztekin et al. (op. cit.) o excesso desses nutrientes pode alterar o metabolismo das bactérias fermentativas para o crescimento celular em detrimento da produção de H_2 . Ademais, quando a relação C/N é elevada, a via de crescimento celular pode ser alterada em direção a produção de EPS pelos microrganismos, uma vez que o nitrogênio não é suficiente para a síntese de proteínas (Miqueleto et al., 2010).

De acordo com a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos no presente estudo, houve influência significativa da relação C/P tanto no YH quanto na PVH ($P < 0,05$ e $F > F_{\text{crítico}}$). Todavia, assim como na 1ª fase de operação, a relação C/N não influenciou significativamente o YH e PVH ($P > 0,05$ e $F < F_{\text{crítico}}$).

Figura 20. Variação da PVH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 2ª fase de operação

5.2.3. Produção de ácidos orgânicos e etanol

A Figura 21 e 22 mostram a concentração e valores percentuais de produtos microbianos solúveis (PMS) encontrados, ou seja, ácido acético (HAc), etanol (EtOH), ácido lático (HLa), ácido butírico (HBu) e ácido propiônico (HPr) além do rendimento de etanol (EtOHY) em função das relações C/P nos quatro reatores.

Em todas as etapas houve predominância de etanol e ácido acético. Em menores quantidades foi produzido ácido lático, ácido propiônico e ácido butírico. Etanol foi o metabólito encontrado em maiores quantidades em quase todas as relações C/P em R1, R2 e R3. Todavia, nos reatores R1 (C/N=100) e R3 (C/N=200) na relação C/P=1100, a rota de ácido acético foi a preferencial. No reator R4 (C/N=250), a rota de EtOH foi predominante em baixas relações C/P (300 e 500), enquanto a rota de HAc foi preferencial em altas relações C/P (700, 900 e 1100). Em R1, R2 e R3, a produção de H₂ na relação C/P de maior HY ocorreu preferencialmente pela via de formação de EtOH, já que a concentração desse metabólito foi mais expressiva. Todavia, em R4 a etapa de maior YH (C/P=700) a rota de HAc foi mais representativa que a via de formação de EtOH. A produção de etanol como metabólito da fermentação da glicose foi bastante vantajosa nesse estudo, uma vez que o aumento de produção e rendimento de H₂ ocorreu simultaneamente ao aumento de etanol. Assim, é provável que tenha ocorrido rota de geração concomitante de H₂ e etanol nesta fase (Hwang et al., 2004; Zhu et al., 2009).

Os valores de EtOHY também acompanharam o HY em R1, R2, R3. Enquanto o valor ótimo de EtOHY foi encontrado na relação C/P=700 em R1 e R3 (1,5 e 1,3 mol EtOH mol⁻¹ glicose, respectivamente). Em R2 o valor ótimo foi obtido na relação C/P=500 (1,3 mol EtOH mol⁻¹ glicose). Em R4, o comportamento foi contrário, com valores de EtOHY reduzindo da relação C/P=300 até C/P=700 e mantendo-se estáveis até a relação C/P=1100, cujo valor máximo foi obtido na relação C/P=300 (1,4 mol EtOH mol⁻¹ glicose).

Similar ao presente estudo, Barros et al. (2012) também relataram aumento do HY com o aumento de EtOHY na fermentação da glicose em RALF. O mesmo comportamento foi verificado por Rosa et al. (2014) na fermentação de soro de queijo, cujo valor máximo obtido foi 3,45 mmol EtOH g⁻¹ DQO. Lin e Hung (2008) verificaram que o comportamento de HY e EtOHY também foi semelhante com pico de EtOHY no pH 7,5 (5.8 mmol EtOH g⁻¹ celulose).

Figura 21. Concentração dos metabólitos solúveis e EtOHY no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função das relações C/P aplicadas

Figura 22. Valores percentuais dos metabólitos solúveis no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função da relação C/P, durante a 2ª fase de operação

A produção de HAc foi bastante significativa, sendo produzidos em grandes quantidades em todos os reatores. Assim como o etanol, nos reatores R1, R2 e R3 o aumento da relação C/P de 300 para 700 ocasionou um aumento na produção de HAc, de 161 para 945 em R1, 181 para 1060 em R2, 189 para 880 em R3, alcançando valores máximos nessa etapa. Com o aumento de C/P de 700 para 1100 houve diminuição de HAc para 701 e 775 em R1 e R2, respectivamente. Considerando que o ácido acético é um produto intermediário chave na produção de H₂ e AVG, uma vez que sua fermentação formara 4 mols de H₂, a presença de esse metabólito contribuiu com a produção de H₂.

Embora a produção de HBu também favoreça a produção de H₂, com a geração de 2 mols de H₂, a geração de ácido butírico não contribuiu significativamente, uma vez que não foram observados valores relevantes em todos os reatores, nem verificou-se variação deste ácido em função da relação C/P. Ou seja, sua concentração manteve-se estável, com valores variando de 19 a 62 mg L⁻¹ em R1, 18 a 55 mg L⁻¹ em R2, 13 a 35 mg L⁻¹ em R3, 31 a 64 mg L⁻¹ em R4.

O mesmo foi observado para ácido propiônico, cujos valores permaneceram entre 123 e 197 mg L⁻¹ em R1, 96 e 200 mg L⁻¹ em R2, 165 e 248 mg L⁻¹ em R3, e 78 e 153 mg L⁻¹ em R4. Alguns Clostridia, como *Clostridium propionicum* produzem principalmente ácido propiônico durante a fermentação. A rota de produção deste ácido desfavorece a produção de H₂, devido ao consumo de 2 moles de H₂ (Saady et al., 2013).

A concentração de ácido láctico permaneceu constante com a variação da relação C/P em todos os reatores, alcançando valores máximos de 378 mg L⁻¹ em R1 (C/P=700), 609 mg L⁻¹ em R2 (C/P=300), 389 mg L⁻¹ em R3 (C/P=1100) e 398 mg L⁻¹ em R4 (C/P=700). Saady et al. (2012) afirmam que alta pressão parcial de hidrogênio pode levar o sistema a formar ácido láctico. De acordo com via metabólica de formação de HLa a partir da fermentação da glicose não ocorre consumo de hidrogênio. Em reator de tanque agitado contínuo, Reungsang et al. (2013) atribuíram a alta concentração de HLa a elevada abundância de bactérias ácido láctico (LAB).

Argun et al. (2008) relataram que na condição de maior YH foram produzidos 9072 mg L⁻¹ TVFA. Dentre o total de metabólitos produzidos, 41% correspondeu a HAc, 18% a HBu, 17% a HPr e 12,5% a HLa. De acordo com os autores, a mistura de AVG produzidos ocasionou um rendimento de H₂ mais alto que o estimado de 2 mol H₂ mol⁻¹ açúcar.

O-Thong et al. (2008) atribuíram a alta produção de H_2 as vias metabólicas de produção de HAc e HBU, que representaram mais de 70% do total de metabólitos. Os autores encontraram na etapa ótima para conteúdo de H_2 (58-60%) predominância de HBU, HAc e HPr. Enquanto no presente estudo o aumento de HAc e EtOH foi simultâneo ao do YH, no estudo de O-Thong (op. cit.) o aumento de H_2 ocorreu concomitante ao de HAc e HBU, cujos valores máximos foram obtidos em C/P=559 e C/N=74 sob condições termofílicas.

Argun et al. (2008) encontraram predominância de ácido acético, butírico, propiônico e láctico fermentando amido. Comparando as diferentes relações C/N aplicadas nos reatores, verificou-se que não houve diferenças na distribuição de metabólitos produzidos. O mesmo comportamento foi verificado por Rojas et al. (2010) em reator de leito fixo. Embora no presente estudo, a composição de ácidos orgânicos e solventes tenha sido similar independente da C/N aplicada, foi verificada diminuição desses metabólitos com o aumento de C/N de 100 para 200.

Amorim et al. (2012) verificaram composição de metabólitos semelhante, no que se refere a predominância de EtOH e HAc com a variação da relação C/P. Todavia, os autores também observaram grande representatividade de metanol e HBU em algumas C/P, diferente do presente estudo. Ademais, o aumento da relação C/P levou ao aumento da porcentagem de etanol produzida, fazendo com que essa rota tenha sido preferencial nas maiores relações C/P.

No reator R3 (C/N=200), no qual foi obtida a melhor condição de produção de hidrogênio, a variação da relação C/P de 300 a 700 teve pouca influência na rota metabólica no que se refere a produção dos ácidos orgânicos propiônico, butírico e láctico. A variação de C/P=300 a C/P=700 teve impacto sobre a produção de ácido acético. Em relações C/P variando de 700 a 1100, porém, a produção de HAc diminuiu. O etanol foi a rota de produção de H_2 preferencial nesse reator. Assim como o YH, a concentração de EtOH aumentou até a relação C/P=700 e, posteriormente, diminuiu até a relação C/P=1100. Desta maneira, pode-se afirmar que houve um valor ótimo tanto para YH quanto para EtOH.

5.2.4. Caracterização Molecular da diversidade microbiana

O perfil de bandas dos DGGE foi obtido a partir das comunidades microbianas de amostras aderidas no material suporte em RALF R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) para as seguintes relações: C/P=500, 700, 900 e 1100 (Figura 23).

Figura 23. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e método de agrupamento UPGMA, a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do reator R1, R2 e R3 com relação com relação C/P=500, 700, 900 e 1100, durante a 2ª fase de operação

Verificou-se para relação C/P=500, na comparação do perfil de banda dos reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200) maior coeficiente de similaridade, ou seja, 67% entre R1 e R3. Quando a relação C/P aplicada foi 700, o maior coeficiente de similaridade (56%) também foi verificado entre R1 e R3. Para a relação C/P=900, coeficiente de similaridade de 56% foi observado entre R1 e R3. Entretanto, quando a relação C/P aplicada foi 1100, o maior coeficiente de similaridade (95%) ocorreu entre os reatores R1 e R2. A disponibilidade de nitrogênio afetou a distribuição das populações microbianas, uma vez que para valores de

excesso ou limitação de nitrogênio (reduzidas e elevadas relações C/N, respectivamente) houve maior similaridade quando comparadas com relações C/N intermediárias (C/N=150 em R2).

Em relação a variação das relações C/P, verificou-se valores de coeficiente de similaridade entre as relações C/P 500 e 700 de 67% em R1, 40% em R2 e 56% em R3, ou seja, o aumento da relação C/P de 500 para 700 resultou em alterações na comunidade microbiana, provavelmente favorecendo microrganismos produtores de H₂, uma vez que essa variação de C/P causou aumento na produção de H₂ (C/P=700). Por outro lado, para os reatores R1, R2 e R3 foram verificados maiores valores de coeficiente de similaridade entre a relação C/P 700 e 900 (87, 97 e 92%, respectivamente). Provavelmente, não ocorreram mudanças significativas com o aumento da relação C/P de 700 para 900. De maneira contrária, com o aumento da relação C/P de 900 para 1100 verificou-se novamente diminuição do coeficiente de similaridade nos três reatores, cujos valores foram 48% em R1, 91% em R2 e 71% em R3.

Considerando que reduzidos ou elevados valores de C/P levaram a menores valores de produção e rendimento de H₂, pode-se afirmar que excesso ou limitação da disponibilidade de fósforo provocou alterações significativas na comunidade bacteriana dos reatores R1, R2 e R3.

Na etapa na qual ocorreu maior rendimento e produtividade de H₂, (R3, C/P=700) foram obtidas 93 seqüências filogenéticas através da clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA. Estas seqüências foram agrupadas em 9 unidades taxonômicas operacionais (OTU) e corresponderam aos Filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (Tabela 20).

A árvore filogenética (Figura 28) foi construída com as seqüências obtidas a partir da análise dos fragmentos do gene 16S rRNA.

A OTU 1 foi a mais abundante compreendendo 53 clones ou seja, 57% do total de sequencias analisadas. Os representantes dessa OTU foram 99% similares a *Ethanoligenens harbinense*, bacilos móveis, Gram-positivo, obrigatoriamente anaeróbico e mesofílicos (Xing et al., 2006). De acordo com Xing et al. (op. cit.), duas cepas de *E. harbinense* foram isoladas de continuous stirred-tank reactor (CSTRs) anaeróbico alimentado com água residuária de melaço, sob condição mesofílica, cujos produtos da fermentação a partir da glicose foram H₂, CO₂, ácido acético e etanol (Tabela 21). Ren et al. (2007a) relataram que a partir da fermentação tipo etanol ocorreu maior produção de H₂, quando comparada a fermentação tipo propionato e etanol-butirato também em continuous stirred-tank reactors (CSTRs) fermentando água residuária de

melaço. De acordo com os autores, *Ethanoligenens* sp. contribuiu tanto para a produção de H₂ quanto etanol em pH de 4,0 a 4,5. Uma vez que *E. harbinense* é capaz de produzir altas taxas de H₂, essa espécie é considerada uma das mais promissoras bactérias produtoras de hidrogênio em processos fermentativos (Ren et al., 2007b). Devido a sua abundância no presente estudo, a maior porcentagem de H₂ produzida em R3 (C/N=200) e C/P=700 pode ser atribuída a *E. harbinense*. Além disso, *E. harbinense* pode ter contribuído com grande produção de etanol e ácido acético no processo de fermentação de glicose no reator.

Verificou-se 99% de similaridade a *Lactobacillus ghanensis* das bactérias pertencentes a OTU 2, a qual foi a segunda mais representativa na condição amostrada (15%). *Lactobacillus* spp. são microrganismos lácticos que tem seu crescimento restrito em meios que contém açúcares, uma vez que são capazes de obter energia somente a partir da fermentação desse substrato. Todavia, esses microrganismos tem maior habilidade em sobreviver sob condições ácidas (pH= 4, por exemplo) que outras bactérias lácticas. Além do ácido láctico, *Lactobacillus* spp. podem também produzir outros metabólitos, como etanol e CO₂, a partir da fermentação de açúcares em condições específicas (Madigan et al., 2010). Em estudo de fermentação alcoólica de vinhos, *Lactobacillus* sp. foi capaz de crescer em atmosfera enriquecida com CO₂ (Edwards et al., 2000). Nielsen et al. (2007) isolaram *Lactobacillus ghanensis* a partir da fermentação de cacau e não verificaram produção de gás a partir da glicose. Ademais, os autores verificaram bom crescimento dessa bactéria a 45° C e baixo crescimento em pH 3,9. A capacidade dessa bactéria em produzir ácido láctico, etanol e CO₂ a partir da fermentação da glicose justifica sua presença representativa no reator do presente estudo.

Ainda pertencente ao Filo Firmicutes foram obtidas a OTU 3 relacionada a *Clostridium pasteurianum* e OTU 6 relacionada a *Clostridium acidisoli*, compreendendo 13% do total de sequencias analisadas. Kuhner et al. (2000) relataram que *C. acidisoli* produziu ácido acético, butírico, láctico, H₂ e CO₂ a partir da fermentação da glicose e, que, em condições específicas, essa bactéria também é capaz de formar ácido fórmico. Dentre os microrganismos dominantes na produção de H₂ a partir da fermentação de amido (20 g/L de DQO), Lin et al. (2008) verificaram presença de *C. pasteurianum* em continuously stirred tank reactor (CSTR), sob TDH de 12, 8, 6 e 4 h. Luo et al. (2008) isolaram uma cepa microbiana a partir de reator de fluxo contínuo alimentado com substrato sintético contendo glicose (10 g.L⁻¹) e TDH de 10 h e verificaram que

tal microrganismo produtor de H_2 era *Clostridium* sp. Conhecida como produtora de ácido, *Clostridium pasteurianum* fermentam principalmente carboidratos produzindo ácido acético, butírico, CO_2 e H_2 (Gottschalk, 1986). Todavia, Dabrock et al (1992) afirmam que em condições específicas *C. pasteurianum* também são capazes de alternar a produção AVG para solventes. Os autores verificaram que em condições de limitação de P, houve principalmente produção de ácido acético e butírico a partir da fermentação da glicose, independente da taxa de crescimento e do pH verificado. Além disso, na presença de CO houve diminuição da produção de H_2 , levando as células a produzirem ácido láctico e solventes como etanol e butanol, enquanto a produção de ácido butírico e acético foi baixa. Tal comportamento foi atribuído à inibição de hidrogenase nessas bactérias na presença de CO.

Verificou-se para a OTU 8 similaridade a *Bifidobacterium subtile* e Uncultured *Bifidobacterium* sp. *Bifidobacterium* spp. são microrganismos que podem ser encontrados em fezes humanas (Shinohara et al., 2010), uma vez que são microrganismos benéficos ao homem e predominantes na microbiota intestinal (Mitsuoka, 2000). Diferentemente de bactérias homofermentativas e heterofermentativas, *Bifidobacterium* spp. realiza metabolismo de glicose devido a presença da enzima frutose-6-fosfoquetolase. Essas bactérias anaeróbias são capazes de fermentar carboidratos, gerando ácido láctico e acético. Todavia, não são capazes de produzir CO_2 (Scardovi, V., 1986). De acordo com Scardovi (1981), *Bifidobacterium* spp. não são capazes de produzir ácido propiônico e butírico. Cheng et al. (2008) relataram que *Bifidobacterium* sp. foi identificada em agitated granular sludge bed (AGSB) reactor com produção de H_2 sob condições de TDH abaixo de 2 h. De acordo com os autores, em TDH (0,5 h) de maior produtividade e rendimento de H_2 , 40-60% de células totais de Eubacteria foram relacionadas a *Bifidobacterium* sp. A presença desses microrganismos no RALF do presente estudo provavelmente esteve relacionada a produção de ácido láctico e acético, além de estarem envolvidos na produção de hidrogênio em consórcio com outros microrganismos.

A OTU 4 foi relacionada a *Sporolactobacillus* sp. com 94% de similaridade. A abundância relativa de *Sporolactobacillus* sp. foi de 4%. De acordo com Ludwig et al. (2008), *Sporolactobacillus* sp. são bactérias formadoras de endósporos capazes de realizar homofermentação da glicose em ácido láctico. Em RALF usado na produção de H_2 a partir da fermentação da glicose, Shida et al. (2012) também verificaram presença de *Sporolactobacillus*

sp. Assim como no presente estudo, Romano et al. (2014) também encontraram *Sporolactobacillus* sp. em experimentos em bateladas produzindo hidrogênio e etanol em substrato contendo glicose como fonte de carbono.

OTU 5 e OTU 9 foram relacionadas a *Acinetobacter* sp. e *Acinetobacter calcoaceticus*, respectivamente. Em meio mineral contendo ácido acético, butírico e propiônico, Jolicoeur e Morin (1987) verificaram uma cepa de *A. calcoaceticus* capaz de usar AGV como únicas fontes de carbono e de energia. De acordo com Baumann et al. (1968), além de AGV, há outros substratos que *A. calcoaceticus* pode usar como única fonte de carbono e energia, tais como carboidratos, álcoois alifáticos, aminoácidos, compostos aromáticos não-nitrogenados, dentre outros. Ademais, *Acinetobacter* sp. são organismos acumuladores de polifosfato (AOP) em ambientes facultativos (Martin et al., 2006). A porção superior do RALF (separador de fases) foi mantida aberta no presente estudo, ocorrendo provavelmente troca gasosa e mantendo ambiente facultativo. Em virtude dessas condições, os organismos acumuladores de fósforo (OAP) tiveram o desenvolvimento favorecido, principalmente, porque sob tais condições era adicionado fósforo no afluente do reator.

Representantes da OTU 7 foram 99% similares a *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella* spp. podem atuar como fixadoras de nitrogênio (nitrogen-fixing) (Lin et al., 2012), bem como, produtoras de hidrogênio (Lin et al., 2008). Chen et al. (2006) relataram que a produção de hidrogênio por *K. pneumoniae* através da fermentação de glicose estava associada com a atividade da nitrogenase. Por meio de análises de comunidade bacterianas por DGGE, foi observada presença de *Klebsiella pneumoniae* durante operação de agitated granular sludge bed (AGSB) reactor usado na produção de H₂ sob TDH de 12, 2, 1 e 0,5 h (Wu et al., 2008). Em RALF de produção de H₂, alta produção de EtOH ocorreu provavelmente devido a dominância de *Klebsiella* sp. (Amorim et al., 2012). Varrone et al. (2012) isolaram *Klebsiella* sp. usando glicerol como fonte única de carbono. Os autores verificaram que houve aumento de cinco vezes tanto no rendimento quanto na produção de H₂ durante o enriquecimento. Tal comportamento ocorreu devido a alteração do metabólito dominante a partir de 1,3 propanodiol em etanol.

Tabela 20. Resultados comparativos do sequenciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria, referentes a 2ª fase de operação

OTU	Afiliação do organismo	Identidade (%)	Filo	Nº de acesso no GenBank	Número de sequencias	Comprimento da sequencia (pb)	Abundância relativa (%)
1	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	99	Firmicutes	AY833426.1	53	1010	57
2	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	99	Firmicutes	NR_043896	14	982	15
3	<i>Clostridium pasteurianum</i>	97	Firmicutes	EF140983.1	6	1015	6
4	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	94	Firmicutes	JF312665.1	4	1015	4
5	<i>Acinetobacter</i> sp.	94	Proteobacteria	AY273199.1	1	1058	1
6	<i>Clostridium acidisoli</i>	95	Firmicutes	NR_028898.1	6	706	6
7	<i>Klebsiella</i> sp.	99	Proteobacteria	JX660699.1	1	943	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99		JF772079.1			
8	<i>Bifidobacterium subtile</i>	99	Actinobacteria	NR_029139.1	7	1038	8
	<i>Bifidobacterium</i> sp. não cultivada	98		HM113259.1			
9	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99	Proteobacteria	EU360111.1	1	699	1

Tabela 21. Estudo comparativo dos produtos de fermentação dos microrganismos encontrados na etapa de maior rendimento de hidrogênio durante a 2ª fase de operação

Afiliação do organism	Abundância relativa (%)	Produtos de fermentação	Produt H ₂ /EtOH	Substrato utilizado	Referência
<i>Ethanoligenens harbinense</i>	57	EtOH, HAc, H ₂ e CO ₂	+/+	Glucose	Xing et al., 2006
<i>Lactobacillus</i> spp.	15	HLa, EtOH, CO ₂	NV**/+	Glucose	Nielsen et al., 2007 Madigan et al., 2010
<i>Clostridium pasteurianum</i>	6	H ₂ , BuOH, EtOH, HLa, HAc, HBu, CO ₂	+/+	Glucose	Gottschalk, 1986 Dabrock et al., 1992
<i>Clostridium acidisoli</i>	6	HAc, HBu, HLa, H ₂ , CO ₂	+/-	Glucose	Kuhner et al., 2000
<i>Sporolactobacillus</i> sp.	4	HLa	-/-	Glucose	Kitahara and Suzuki. 1963 Romano et al., 2014
<i>Acinetobacter</i> spp.	2	NV**	NV**	Carboidratos e AGV	Jolicoeur e Morin, 1987
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1	H ₂ , EtOH	+/+	Glicose	Chen et al., 2006
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8	HLa e HAc	NC*/-	Glicose	Scardovi, 1981

*Não há consenso.

**Não verificado.

Figura 24. Árvore filogenética da OTU obtidos a partir do material suporte do reator R3 e C/P=700, da 2ª fase de operação, construído usando o método neighbor-joining, baseado na comparação do gene rRNA 16S. Números nos nós representam valores de bootstrap (percentagens of 1000 repetições). Bar, 95% substituições nas sequencias dos nucleotídeos. Outgroup: *Methanosarcina acetivorans*

5.3. Terceira fase de operação dos RALF: Análise do efeito da relação C/P e C/N na produção de hidrogênio na condição de máximo rendimento

A terceira fase operacional foi caracterizada pela variação da relação C/P em 300, 500, 700, 900 e 1100 nos quatro reatores de leito fluidificado, contendo as relações C/N=100 em R1, C/N=150 em R2, C/N=200 em R3 e C/N=250 em R4, mantendo fixo o TDH em 8 h. Para esta fase, o TDH de 8h foi escolhido uma vez que foi a condição de maior rendimento de H₂ na primeira fase operacional.

5.3.1. pH, DQO, conversão da glicose e sólidos suspensos

A média dos valores de pH afluente e efluente obtidos nas relações C/P aplicadas para os quatros reatores estão apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22. Resultados médios de pH obtidos para cada C/P aplicada em R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 3ª fase de operação

C/P	R1		R2		R3		R4	
	pH Aflu	pH Eflu	pH Aflu	pH Eflu	pH Aflu	pH Eflu	pH Aflu	pH Eflu
300	5,67	3,71	5,57	3,60	5,59	3,70	6,33	4,00
500	5,34	4,00	5,40	3,87	5,69	3,87	5,67	4,00
700	5,48	4,04	5,41	4,02	5,54	3,71	5,75	4,02
900	5,37	3,95	5,07	4,00	5,61	4,00	5,60	3,98
1100	5,80	3,97	6,10	4,02	6,49	4,11	6,57	4,24

Os valores de pH efluente variaram entre 3,1 e 4,3 em R1 (C/N=100), 3,2 e 4,3 em R2 (C/N=150), 3,2 e 4,3 em R3 (C/N=200) e entre 3,6 e 4,6 em R4 (C/N=250), valores estes semelhantes a 1ª e 2ª fase.

Os resultados de DQO afluente e efluente e sua eficiência de remoção podem ser observados na Tabela 23.

Tabela 23. Valores médios de DQO afluente, efluente e porcentagem removida para R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação

Reatores	C/P	DQO Aflu (mg L ⁻¹)	DQO Eflu (mg L ⁻¹)	Eficiência (%)
R1	300	5353	4343	19
	500	4915	4412	10
	700	4689	4243	9
	900	5071	4361	14
	1100	4903	3587	27
R2	300	5354	4301	20
	500	5053	4475	12
	700	5001	4125	17
	900	4866	4134	15
	1100	5108	3918	23
R3	300	5319	4239	20
	500	5316	4743	11
	700	4907	4134	16
	900	5073	4131	19
	1100	5023	4108	18
R4	300	4974	3891	22
	500	5015	4339	13
	700	5103	4473	12
	900	4979	4150	16
	1100	5030	4386	13

A DQO de entrada nos RALF R1, R2, R3 e R4 foram 4986, 5076, 5128 e 5020 mg.L⁻¹, respectivamente. Assim como na 2ª fase de operação, os valores de eficiência foram inferiores a 20% na maioria das etapas para todos os reatores.

Os resultados de conversão de glicose obtidos nos RALF R1, R2, R3 e R4 são apresentados na Figura 25.

Figura 25. Efeito da relação C/P na conversão da glicose nos RALF R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 3ª fase de operação

Os valores de glicose de entrada foram 4449, 4558, 4537 e 4851 mg.L^{-1} em R1, R2, R3 e R4, respectivamente. A conversão da glicose elevou com o aumento da relação C/P de 300 para as relações 500 e 700 e reduziu com o aumento para a relação C/P=1100.

Os valores de sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos totais (SST) são apresentados na Tabela 24.

Diante dos resultados obtidos percebe-se que assim como na 1ª e 2ª fase houve grande variação e instabilidade dos valores de SSV e SST.

Tabela 24. Concentração de sólidos suspensos totais e voláteis efluente obtidos nos reatores R1, R2, R3 e R4, durante a 3ª fase de operação

Reator	TDH (h)	SST (mg.L ⁻¹)	SSV (mg.L ⁻¹)
R1 (C/N=100)	300	214±129	176±111
	500	114±27	102±31
	700	202±142	192±140
	900	315±30	306±35
	1100	207±32	202±26
R2 (C/N=150)	300	125±40	109±34
	500	115±47	103±48
	700	263±64	257±69
	900	258±62	249±64
	1100	153±45	151±42
R3 (C/N=200)	300	101±26	82±26
	500	91±53	87±52
	700	140±27	131±25
	900	276±92	253±81
	1100	113±33	103±30
R4 (C/N=250)	300	278±233	260±219
	500	171±173	162±172
	700	283±27	273±25
	900	331±23	322±29
	1100	277±148	270±156

5.3.2. Efeitos da relação C/P e C/N na produção de hidrogênio

As médias percentuais de H₂ no conteúdo do biogás obtidos para as relações C/P e C/N são apresentadas na Tabela 25. A 3ª fase operacional também apresentou biogás composto de CO₂ e H₂.

Nessa fase, o comportamento de variação percentual de H₂ no conteúdo do biogás observado mostra que ocorreu redução da porcentagem de H₂ quando a relação C/P foi

aumentada de 300 para 500. No entanto, com o aumento para C/P=1100, houve aumento da porcentagem de H₂ no biogás.

Na Tabela 26 são apresentados os valores de HY e PVH obtidos para as relações C/P e C/N.

Tabela 25. Valores médios de porcentagem de H₂ no biogás dos reatores R1, R2, R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação

TDH (h)	Média %H ₂			
	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
300	40,1±15,1	49,1±11,1	46,9±10,6	48,0±8,1
500	29,3±7,3	25,3±10,4	28,2±3,7	25,5±12,4
700	40,6±18,1	23,0±11,3	28,8±8,3	28,1±6,0
900	48,4±5,2	24,6±10,8	36,5±4,7	34,9±7,2
1100	53,2±7,4	37,0±11,0	37,1±5,4	36,1±12,0

Tabela 26. Valores médios de YH e PVH obtidos nos reatores R1, R2 R3 e R4 para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação

YH (mol H₂.mol glicose⁻¹)				
C/P	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
300	1,44±0,36	1,66±0,60	1,76±0,33	1,50±0,26
500	0,64±0,15	0,37±0,22	0,52±0,11	0,56±0,28
700	1,10±0,37	0,37±0,27	0,78±0,23	0,91±0,52
900	0,83±0,23	0,28±0,17	0,54±0,19	0,87±0,33
1100	0,72±0,22	0,38±0,19	0,39±0,16	0,70±0,29
PVH (L.h⁻¹.L⁻¹)				
C/P	R1 (C/N=100)	R2 (C/N=150)	R3 (C/N=200)	R4 (C/N=250)
300	0,20±0,38	0,20±0,39	0,28±0,55	0,21±0,16
500	0,15±0,04	0,12±0,06	0,15±0,03	0,15±0,09
700	0,34±0,23	0,10±0,06	0,18±0,05	0,20±0,10
900	0,16±0,04	0,08±0,04	0,13±0,04	0,18±0,06
1100	0,17±0,06	0,11±0,06	0,11±0,06	0,18±0,09

A variação do YH para cada mol de glicose obtida em função da relação C/P e C/N é apresentada nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

Figura 26. Variação do YH em função da relação C/P para os reatores R1 (C/N=100), R2 (C/N=150), R3 (C/N=200) e R4 (C/N=250), durante a 3^a fase de operação

Como pode ser observado na Figura 26, foram verificados valores ótimos de YH nas relações C/P=300 e 700 em todos os quatro reatores, ou seja, assim, como no TDH de 2 h, no TDH de 8 h a relação C/P também influenciou a produção de H₂. Entretanto, o comportamento de YH na 2^a e 3^a fase (TDH=2 e 8 h, respectivamente) em função da variação de C/P foi diferente. Enquanto na 2^a fase foram verificados valores máximos de YH na relação C/P=700, na 3^a fase foram constatadas duas relações C/P ótimas para YH (C/P=300 e 700), cujo valor máximo foi obtido nas relações C/N=200 (R3) e C/P=300.

Além da influência da relação C/P no YH, também foi observado novamente que a relação C/N influenciou tal parâmetro, uma vez que houve redução do YH com o aumento de C/N de 100 para 150, e elevação quando C/N foi aumentada para 250. Com exceção da relação $C/P=300$, cujo pico de YH ocorreu na relação $C/N=200$, nas demais relações C/P foi verificado pico de YH nas relações $C/N=100$ e 250.

Figura 27. Variação do YH em função da relação C/N para as relações C/P aplicadas=300, 500, 700, 900 e 1100, durante a 3ª fase de operação

Nas Figuras 28 e 29 são apresentados os valores de PVH em função da relação C/P e C/N, respectivamente.

Figura 28. Variação da PVH em função da relação C/P para as relações C/N aplicadas: C/N=100 (R1), C/N=150 (R2), C/N=200 (R3) e C/N=250 (R4), durante a 3ª fase de operação

Da mesma maneira que os valores máximos de YH ocorreram nas relações C/P=300 e 700, os valores de PVH em função da relação C/P também tiveram esse comportamento em R1, R3 e R4. Contudo, não foi nitidamente verificado picos de PVH para C/P=700, uma vez que não ocorreu variação significativa dos valores ao longo da fase. Somente no RALF R1 (C/N=100) foi verificado pico de PVH em C/P=700, condição esta que foi alcançado o valor máximo para essa fase. Ademais, houve queda acentuada de PVH quando ocorreu elevação da relação C/P de 300 para 500, ou seja, quando a disponibilidade de P foi reduzida.

Figura 29. Variação da PVH em função da relação C/N para as relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação

Por outro lado, quando comparados os valores de PVH em cada reator, verificou-se que houve redução desse parâmetro com o aumento de C/N de 100 para 150 e elevação quando C/N foi aumentada para 250. Esse comportamento foi verificado quando a relação

C/P variou de 500 para 1100. Por outro lado, na relação C/P=300 ocorreu pico de PVH em C/N=200 (R3).

Diante do exposto, pode-se afirmar que a relação C/P influenciou de maneira diferente o YH e PVH quando aplicado o TDH de 8 e 2 h. Provavelmente, tais parâmetros sejam afetados não somente por uma variável, mas pelo conjunto de variáveis que caracteriza uma condição específica. Determinadas condições podem favorecer rotas metabólicas de produção de hidrogênio de grupos microbianos em detrimento de outros grupos ou outras rotas.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), houve influência significativa da relação C/P no YH ($P < 0,05$ e $F > F_{\text{crítico}}$). Todavia, em relação a PVH, a relação C/P não influenciou significativamente ($P < 0,05$ e $F > F_{\text{crítico}}$). Assim como a 1ª e 2ª fase, a relação C/N não influenciou significativamente o YH e PVH ($P > 0,05$ e $F < F_{\text{crítico}}$).

5.3.3. Produção de ácidos orgânicos e etanol

A concentração de PMS e o EtOHY obtidos em função das relações C/P nos quatro reatores são apresentadas na Figura 30, enquanto a Figura 31 expõe os valores percentuais de PMS. Nessa fase de operação foram encontrados: ácido acético (HAc), etanol (EtOH), ácido lático (HLA), ácido butírico (HBu) e ácido propiônico (HPr).

Na terceira fase de operação, houve predominância de ácido butírico na relação C/P=300 nos RALF R1 (605 mg.L⁻¹), R2 (558 mg.L⁻¹) e R3 (472 mg.L⁻¹), e etanol em R4 (837 mg.L⁻¹). Contudo, com o aumento da relação C/P de 300 para 500 houve queda acentuada da produção de ácido butírico em R1, R2 e R3.

Assim, nas demais relações C/P, as rotas de fermentação de glicose produziram principalmente etanol e ácido acético. Em menores quantidades foi produzido ácido lático, cujas médias variaram entre 32 e 282 mg.L⁻¹ em R1, 41 e 276 mg.L⁻¹ em R2, 48 e 274 mg.L⁻¹ em R3, e 24 e 345 mg.L⁻¹ em R4. Os valores de ácido propiônico aumentaram de 15, 16, 16 e 31 mg.L⁻¹ na relação C/P=300 para 531, 1146, 471 e 278 mg.L⁻¹ na relação C/P=500 (R1, R2, R3 e R4, respectivamente), atingindo nessa etapa as maiores concentrações nos RALF R1, R2 e R3.

O metabólito metanol foi verificado somente nos reatores R1, R2, e R2 na etapa cuja relação C/P foi de 300, cujas concentrações foram 313, 374 e 353 mg.L⁻¹, respectivamente.

Em todos os reatores, ácido acético foi o metabólito produzido em maiores quantidades para relação C/P=500, enquanto etanol foi predominante em todos os reatores durante a etapa cuja relação C/P foi 700, alcançando os maiores valores nessa relação (2035, 2238, 1712 e 1522 mg L⁻¹ em R1, R2, R3 e R4, respectivamente).

Figura 30. Concentração dos metabólitos solúveis e EtOHY no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função das relações C/P aplicadas, durante a 3ª fase de operação

Figura 31. Valores percentuais dos metabólitos solúveis no efluente dos reatores: (a) R1 (C/N=100), (b) R2 (C/N=150), (c) R3 (C/N=200) e (d) R4 (C/N=250) em função da relação C/P, durante a 3ª fase de operação

Para a relação C/P=900, ácido acético foi a rota preferencial em R1, R2 e R4, enquanto a rota de etanol foi preferencial em R3. De maneira semelhante, durante a etapa cuja relação C/P foi 1100, HAc foi preferencial em todos os reatores. É provável que tenha ocorrido predominância de microrganismos produtores de H₂ pelas vias de produção de HAc e EtOH. Ademais, assim como no segundo período operacional, provavelmente a relação C/P=700 favoreceu a produção de H₂, EtOH e HAc por esses microrganismos, com concentrações máximas de EtOH nesse período: 2035, 2238, 1712 e 1522 mg L⁻¹ em R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

Enquanto foi verificado picos de produção de EtOH na relação C/P=700 em todos os reatores, o pico de produção de HAc ocorreu na relação C/P=500 nos reatores R1 e R3, e na relação C/P=700 nos reatores R2 e R4. Na relação C/P de maior YH (300) além do ácido acético e etanol foi verificado presença de metanol como metabólitos da fermentação da glicose. A partir da relação C/P=500, a produção de EtOH e HAc variaram simultaneamente com a variação do HY, assim demonstrando que tais metabólitos foram bastante relevantes nesse estudo para a produção de H₂.

Como já foi mencionado na 1ª e 2ª fase, as rotas de HAc e HBU favorecem a produção de H₂, com a geração de 4 e 2 mols de H₂, respectivamente.

A presença de etanol como metabólito da fermentação da glicose também esteve relacionada a produção de H₂ (Hwang et al., 2004; Zhu et al., 2009). A partir dessa rota há geração simultânea de H₂ e etanol, assim justificando maiores valores de YH quando a geração desse metabólito é elevada.

Assim como no presente estudo, Guo et al. (2008) também atribuíram os altos valores de YH às altas concentrações de etanol em reator EGSB fermentando melaço. Ressalta-se também que, assim como na 2ª fase de operação, o EtOH/Y também apresentou picos na relação C/P=700, ou seja, os valores ótimos também foram obtidos simultaneamente aos valores máximos de YH. O EtOH/Y variou 0,5 a 1,7 mol EtOH mol⁻¹ glicose em R1; de 0,3 a 1,8 mol EtOH mol⁻¹ glicose em R2; de 0,6 a 1,5 mol EtOH mol⁻¹ glicose em R3; e de 0,6 a 1,5 mol EtOH mol⁻¹ glicose em R4.

Assim como foi verificado nas outras fases, na via metabólica de formação de HLa a partir da fermentação da glicose não ocorre consumo de hidrogênio. De maneira contrária, a rota de produção de ácido propiônico desfavorece a produção de H₂, devido ao consumo de 2 moles de H₂ (Saady et al., 2013).

Embora rotas de produção de H_2 via metanol ainda estejam esclarecidas, na relação C/P=300, na qual foram obtidos elevados valores de YH, houve presença significativa de metanol na composição dos subprodutos da degradação de glicose.

5.3.4. Caracterização Molecular da Diversidade Microbiana

Na Figura 32 é apresentado o perfil de bandas de DGGE contruídos a partir de amostras de biomassa aderida no material suporte para 12 condições selecionadas: relação C/P=500, 700, 900 e 1100 nos RALF R1 (C/N=100), R2 (C/N=150) e R3 (C/N=200).

Figura 32. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e método de agrupamento UPGMA a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do reator R1, R2 e R3 com relação C/P=500, 700, 900 e 1100, durante a 3ª fase de operação

Para as relações C/P=500, 700 e 1100, foi verificado maior coeficiente de similaridade (*Pearson correlation*) entre o perfil de bandas dos reatores R1 e R2 (61, 97 e 81%, respectivamente) quando comparados com o perfil de bandas do R3 (57, 87 e 57%, respectivamente). Em contrapartida, para a relação C/P=900 foi observado maior coeficiente de similaridade entre o perfil de bandas dos reatores R1 e R3 (87%) quando comparados com R2 (67%).

Outra análise em relação ao perfil de bandas de DGGE foi feita a partir da comparação das relações C/P para R1, R2 e R3 mostra que as relações C/P=700 e 900 tiveram maior

coeficiente de similaridades, com valores percentuais de 90, 67 e 91% para R1, R2 e R3, respectivamente.

No reator R1, os menores valores de coeficiente de similaridade foram obtidos entre o perfil de bandas das relações C/P=500 e 700; C/P=500 e 900; C/P=700 e 1100; e C/P=900 e 1100, cujo valor foi 57% para todas as condições.

De maneira semelhante, no reator R2, os menores valores foram observados para as comunidades microbianas da relação C/P=500 e 700; C/P=500 e 900; e C/P=900 e 1100. O valor de similaridade obtido entre essas condições foi de 57%.

Comportamento diferente foi obtido no reator R3, cujos menores valores de coeficiente de similaridade foram obtidos entre as relações C/P=1100 quando comparada a relação C/P=500, 700 e 1100 (67%). Valor de similaridade de 57% evidencia que mudanças significativas ocorreram com a variação da relação C/P nessa fase de operação. Provavelmente, em condições de excesso ou limitação de nutrientes, tenha ocorrido seleção mais rigorosa dos grupos de microrganismos. Por outro lado, condições semelhantes de disponibilidade de nutrientes favoreceu o crescimento de grupos microbianos semelhantes como foi observado entre o perfil de bandas das relações C/P=700 e 900.

5.4. Comparação da comunidade microbiana das principais condições de produção e rendimento de H_2

Na Figura 33 é apresentado o perfil de bandas de DGGE para as 8 condições mais relevantes do presente estudo, relacionadas aos maiores e menores valores de produtividade e rendimento de hidrogênio das três fases de operação dos reatores.

Figura 33. Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e método de agrupamento UPGMA a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas das etapas de maiores e menores valores de PVH e YH das três fases de operação

Para a primeira fase de operação, foram comparados o perfil de bandas das condições de maior produção volumétrica de H_2 (R3, TDH=2h e C/P=300) e maior rendimento de H_2 (R3, TDH= 8h e C/P=300) com a condição de menor PVH e YH (R1, TDH=6h e C/P=300). O coeficiente de similaridade entre a condição de menor PVH e YH com a condição de maior PRH foi 85%, todavia quando comparada com a condição de maior YH, o coeficiente de similaridade foi 92%. A diferença encontrada no perfil de bandas pode ser atribuída a um menor TDH na condição de maior PVH (2 h), no qual pode ter ocorrido desprendimento de alguns grupos microbianos.

Comparando o perfil de bandas das comunidades microbianas do reator R3, TDH=2h e C/P=700 (maior PVH e YH) com o perfil de comunidades de R1, TDH=2h e C/P=1100

(menor PVH e YH), referente à segunda fase de operação, foi verificado coeficiente de similaridade (correlação de *Pearson*) de 75%. Maior valor maior de similaridade (89%) foi observado entre o perfil de bandas de R3, TDH=2h e C/P=700 e R1, TDH=2h e C/P=1100 (menor PVH e YH), provavelmente por se tratar do mesmo reator. Foram escolhidas duas condições para comparar os menores valores de rendimento e produtividade de H₂, uma vez que na segunda fase de operação (TDH=2h), R1 e R3 apresentaram valores iguais, e, ambos na relação C/P=1100.

Na terceira fase foi comparado o perfil de bandas das condições de maior e menor produtividade e rendimento de H₂, ou seja R1, TDH=8h e C/P=700, e R2, TDH=8h e C/P=900, respectivamente, e foi verificado 75% de coeficiente de similaridade. Tais valores foram menores, provavelmente por se tratar de diferentes reatores e relação C/P.

Os valores de similaridade encontrados na 1ª fase de operação provavelmente foram maiores devido ao menor impacto causado nas comunidades microbianas com a variação do TDH quando comparado com as variações das relações C/P (2ª e 3ª fases).

5.5. Considerações Finais

Comparando as três fases de operação, é possível ver nitidamente predominâncias e mudanças nas rotas metabólicas e nos grupos microbianos dominantes.

O TDH de 8 h favoreceu a produção de ácido butírico, enquanto a diminuição do TDH ocasionou em reduzidas concentrações desse metabólito. Outra alteração que se destacou foi em relação a produção de metanol. Em condições de relação C/P e C/N reduzidas, metanol foi produzido, enquanto o aumento da relação C/P (2ª e 3ª fase) bem como relação C/N elevada (R4=250) levaram a ausência desse metabólito.

Dessa maneira, na 2ª e 3ª fase (TDH=2 e 8 h) quando a relação C/P aplicada foi 500, 700, 900 e 1100 foram verificadas baixas concentrações de ácido butírico e ausência de metanol. Da mesma maneira, no RALF R4 (C/N=250), metanol não produzido em nenhuma condição de TDH e relação C/P.

O comportamento referente a produção de metanol pode ser justificado pela reduzida disponibilidade dos nutrientes nitrogênio e fósforo nas elevadas relações C/N e C/P. Provavelmente, os microrganismos produtores de metanol alteraram a rota de produção de metabólitos ou foram inativados pela baixa disponibilidade de nutrientes.

Nas demais condições, ácido acético e etanol foram predominantes na distribuição de metabólitos produzidos a partir da fermentação da glicose. Além de também terem apresentado elevada concentração no TDH de 8h e relação C/P=300 (1ª fase).

As ferramentas de biologia molecular corroboraram a distribuição de metabólitos ao longo das etapas. A produção de ácido butírico, ácido acético, etanol e ácido láctico no R3, TDH=8h e C/P=300 (1ª fase) foi atribuída a microrganismos relacionados a *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Ethanoligenens* sp. e *Lactobacillus* sp., respectivamente. Na condição de maior rendimento de H₂ da segunda fase (R3, TDH=2h e C/P=700), a produção de etanol, ácido láctico e acético esteve relacionada a presença de *Ethanoligenens*, *Lactobacillus* e *Clostridium*, respectivamente. Assim, justificando a presença representativa de microrganismos como *Ethanoligenens* e *Clostridium* envolvidos na produção de H₂ pelas rotas de etanol, ácido acético e butírico, respectivamente.

Os gêneros *Ethanoligenens*, *Lactobacillus*, *Clostridium* e *Bifidobacterium* se mantiveram ao longo das etapas, uma vez que estiveram presentes tanto no TDH de 8 h (1ª etapa) quanto no TDH de 2h e relação C/P=700 (2ª etapa). Embora os quatro gêneros tenham apresentado proporções diferentes ao longo das etapas, não houve alteração nas populações.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e da discussão apresentada, pode-se afirmar que o presente trabalho conseguiu atingir os objetivos propostos com relação à avaliação da influência de diferentes relações C/N (100, 150, 200 e 250), C/P (300, 500, 700, 900 e 1100) e TDH (8, 6, 4, 2 e 1 h) na produção de hidrogênio a partir da fermentação da glicose. Ademais, os resultados dos metabólitos produzidos aliados às ferramentas de Biologia Molecular contribuíram com conhecimento acerca da produção anaeróbia de hidrogênio. Desta maneira, as conclusões obtidas durante a realização desta pesquisa foram:

- O TDH influenciou a produção volumétrica e o rendimento de hidrogênio em reatores anaeróbio de leito fluidificado utilizando glicose como fonte de carbono.
- Em todos os reatores, o rendimento de hidrogênio reduziu com a diminuição do TDH de 8 para 1 h.
- A relação C/N não influenciou significativamente o rendimento e a produção volumétrica de hidrogênio em nenhuma fase de operação.
 - A relação C/P influenciou o rendimento de hidrogênio na segunda e terceira fase de operação dos reatores. Todavia, a relação C/P influenciou a produção volumétrica de hidrogênio na segunda fase de operação, mas não influenciou significativamente na terceira.
- Na primeira fase operacional, no RALF contendo a relação C/N=200 e TDH de 8 h foi obtido o maior valor de YH ($1,758 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ glicose}$). O mesmo reator (C/N=200) com TDH de 1 h apresentou maior produção volumétrica de hidrogênio ($0,55 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \text{ L}^{-1}$).
- Fixando o TDH em 2 h, foi verificado valor máximo tanto para produção volumétrica quanto rendimento de hidrogênio na relação C/P=700 e nas relações C/N=150 e 200.

- Fixando o TDH em 8 h, foi verificada que na relação C/P=300 e 700 foram obtidos os maiores valores de rendimento de produção volumétrica de hidrogênio, enquanto para relação C/N os maiores valores foram obtidos em R2 e R3 (C/N=150 e 200, respectivamente), não ocorrendo variação significativa entre os dois reatores.
- Em elevados TDH, principalmente no TDH de 8 h, a produção de metanol e ácido butírico foi maior que em outros TDH.
- Etanol e ácido acético foram os subprodutos produzidos em maior quantidade na maioria dos reatores e, principalmente nas etapas de maior produção volumétrica de hidrogênio na primeira fase e maior produção volumétrica e rendimento de hidrogênio na segunda e terceira fase. Em menores quantidades também foi verificada produção de ácido butírico, acético e lático.
- A afiliação filogenética do gene rRNA 16S mostrou que mais de 50% das sequências analisadas na condição de maior rendimento de hidrogênio da 1ª fase (TDH=8, C/N=200 e C/P=300) e 2ª fase (TDH=2, C/N=200 e C/P=700) foram relacionadas a espécie *E. harbiense*. *Lactobacillus ghanensis* e *Clostridium* spp. também foram representativas nessas etapas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, E. L. C. DE; BARROS, A. R.; RISSATO, M. H. D. Z.; SILVA, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.783-790, 2009.
- AMORIM, E. L. C. DE; SADER, L.T.; SILVA, E.L. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. *Appl. Biochem Biotechnol*, v.166, p.1248-1263, 2012.
- AMORIM, E.L.C. *Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado*. 2009. Tese - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- ANDROGA, D.D.; ÖZGÜR, E.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M. Significance of carbon to nitrogen ratio on the long-term stability of continuous photofermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 15583-15594, 2011.
- APHA, AWWA, WPCF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18 th. Washington, 1998.
- ARGUN, H., KARGI, F., KAPDAN, F. K., OZTEKIN, R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1813-1819, 2008.
- AZWAR, M.Y.; HUSSAIN, M.A.; ABDUL-WAHAB, A.K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.31, p. 158-173, 2014.
- BAO, P.; HU, Z.; WANG, X.; CHEN, J.; BA, Y.; HUA, J.; ZHU, C.; ZHONG, M.; WU, C. Dechlorination of p,p'-DDTs coupled with sulfate reduction by novel sulfate-reducing bacterium *Clostridium* sp. BXM. *Environmental Pollution*, v. 162, p. 303-310, 2012.

BAGHCHEHSARAEI, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p. 2573–2579, 7443-7459, 2009.

BARROS, A. R.; ADORNO, M.A.T; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3840-3847, 2011.

BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C. de; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 3379-3388, 2010.

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

BAUMANN, P., DOUDOROFF, M., STANIER, R.Y. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95, 1520-1541, 1968.

BUFFIÈRE, P.; MOLETTA, R.; FONADE, C. Continuous Operations of a Fluidized Bed Bioreactor for Anaerobic Digestion: Residence Time Effect on Degradation Kinetics. *Biotechnol. Lett.* v. 17, n. 8, p. 833-838, 1995.

CHEN, X.; SUN, Y.; XIU, Z.; LI, X.; ZHANG, D. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v 31, p.539 – 549, 2006.

CHENG, C.; HUNG, C.; LEE, K.; LIAU, P.; LIANG, C.; YANG, L.; LIN, P.; LIN, C. Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 5242–5249, 2008.

CHEONG, D. Y. & C. L. HANSEN. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2229-2239, 2007.

CHERNICHARO, C.A.L. *Reatordes anaeróbios: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Belo Horizonte. DESA- UFMG. 246 p., 1997.

CHUN J. Computer assisted classification and identification of Actinomycetes. Ph.D. thesis. Newcastle upon Tyne, UK: University of Newcastle upon Tyne; 1995.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, v. 58, n. 4, p. 1233-1239, 1992.

DEL NERY, V. *Utilização de Lodo Anaeróbio Imobilizado em Gel no Estudo de Partida de Reatores de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo*. 1987. Dissertação - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.

DENAC, M.; DUNN, I.J. Packed- and Fluidized-Bed Biofilm Reactor Performance for Anaerobic Wastewater Treatment. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 32, p. 159-173, 1988.

DRAKE, H.L. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA “Wood-Ljungdahl” pathway: past and current perspectives. In: Drake, H.L. (Ed.), *Acetogenesis*. Chapman and Hall, New York, pp. 1-15, 1994.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., P, A. R., & Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 350-356, 1956.

EDWARDS, C.G.; COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; RODRIGUEZ, A.V. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 699–702, 2000.

ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M.H.E. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4945-4966, 2013.

FAN, K.; KAN, N.; LAY, J. Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresour. Technol.*; 97(1), p.84-89, 2006.

FANG H. H. P., LIU H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 87–93, 2002.

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N. *Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo*. Tese- Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

GIACONIA, A.; GRENA, R.; LANCHI, M.; LIBERATORE, R.; TARQUINI, P. Hydrogen/methanol production by sulfur–iodine thermochemical cycle powered by combined solar/fossil energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 469 – 481, 2007.

GOTTSCHALK, G. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag, New York. 1986.

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

GUO, L; LI, X.M.; BO X.; YANG, Q.; ZENG, G.M.; LIAO, D.X. Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3651–3658, 2008.

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

HICKEY, R.F. & OWENS, R.W. Methane generation from high-strength industrial wastes with the anaerobic biological fluidized bed. *Biotechnology. Bioengineering*, v. 23, p. 399-413, 1981.

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

IINO, T.; SUZUKI, R.; TANAKA, N.; KOSAKO, Y.; OHKUMA, M.; KOMAGATA, K.; UCHIMURA, T. *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, p. 1465–1469, 2012.

JOLICOEUR, P.; MORIN, A. Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* Strains Degrading the Volatile Fatty Acids of Swine Wastes. *Biological Wastes*, 19, 133-140, 1987.

KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of Substrate Concentration on Hydrogen Production and 16S Rdna-Based Analysis of the Microbial Community in a Continuous Fermenter. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 199–207, 2006.

KIM, T.H.; LEE, Y. CHANG, K.H.; HWANG, S.J. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource Technology*, 103 , 136–141, 2012.

KITAHARA, K.; SUZUKI, J. *Sporolactobacillus* nov. subgen. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 9, p. 59–71, 1963.

KOTHARI, R.; SINGH, D.P.; TYAGI, V.V.; TYAGI, S.K.; Fermentative hydrogen production –An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 2337– 2346, 2012.

KUHNER, C.H.; MATTHIES, C.; ACKER, G.; SCHMITTROTH, M.; GÖßNER, A.S.; DRAKE, H.L. *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov.: acid-tolerant, N₂-fixing clostridia isolated from acidic forest soil and litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 873–881, 2000.

LANE, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, (Eds.) E. Stackebrandt, M. Goodfellow, Wiley. Chichester, UK, pp. 115-175.

LASPIDOU, C.S., RITTMANN, B.E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, v.36, p. 2711-2720, 2002.

LEE, Y.J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 227-231, 2001.

LEITE, J.A.C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen energy*, v. 33, p. 579– 589, 2008.

LENGELER, J.W.; DREWS, G.; SCHLEGEL, H.G. *Biology of the Prokaryotes*. Stuttgart: Blackwell Science. 1999.

LI, C.L.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Env Sci Technol*, v. 37, p.1–39, 2007.

LIN, C.; CHANG, C.; HUNG, C. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International Journal of Hydrogen energy*, v. 33, p. 2445– 2453, 2008.

LIN, C.; HUNG, W. Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 3660-3667, 2008.

LIN, C. Y.; C. H. LAY. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 41-45, 2004.

LIN, C.N.; WU, S.Y.; CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 2200-2210, 2006.

LIN, C.Y.; LAY, C.H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30 (3), p. 285-292, 2005.

LIN, Y.; ZHENG, H.; JUAN, M. Biohydrogen production using waste activated sludge as a substrate from fructose-processing wastewater treatment. *Process. Safety and Environmental Protection*, v. 90, p. 221–230, 2012.

LUO, Y.; ZHANG, H.; SALERNO, M.; LOGAN, B.E.; BRUNS, M.A. Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen energy*, 33, 6566–6576, 2008.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. Revised roadmap to the phylum Firmicutes. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2008.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. C.; ADORNO, M. A .T.; VARESCHE, M. B. Fermentative Hydrogen Production by Microbial Consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4309 - 4317, 2008.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. C.; ADORNO, M. A .T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 13508-13517, 2011.

MARTIN, H. G.; IVANOVA, N.; KUNIN, V.; WARNECKE, F.; BARRY, K. W.; MCHARDY, A. C.; YEATES, C.; HE, S. M.; SALAMOV, A. A.; SZETO, E.; DALIN, E.; PUTNAM, N. H.; SHAPIRO, H. J.; PANGILINAN, J. L.; RIGOUTSOS, I.; KYRPIDES, N. C.; BLACKALL, L. L.; MCMAHON, K. D.; HUGENHOLTZ, P. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*, v. 24 (10), p. 1263–1269, 2006.

MARGARITIS, A., PACE, G.W., Microbial polysaccharides. In: Murrey, Mooyoung, (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. Pergamon, New York, p. 1005-1044, 1986.

MENGISTU, Y.; EDWARDS, C.; SAUNDERS, J.R. Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumonia* K1. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 76, p. 424 - 430, 1994.

MIQUELETO, A.P.; DOLOSIC, C.C.; POZZI, E.; FORESTI, E; ZAIAT, M. Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1324–1330, 2010.

MITSUOKA, T. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Biosci Microflora*; 19, 15-25, 2000.

MUÑOZ-PÁEZ, K.M.; RUIZ-ORDÁZ, N.; GARCÍA-MENA, J.; PONCE-NOYOLA, M.T.; RAMOS-VALDIVIA, A.C.; ROBLES-GONZÁLEZ, I.V.; VILLA-TANACA, L.; BARRERA-CORTEÉS, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35° C. *International Journal of Hydrogen Energy*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.09.172>, 2012.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G.. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700, 1993.

NIELSEN, D.S.; SCHILLINGER, U.; FRANZ, C.M. A. P.; BRESCIANI, J.; AMOA-AWUA, W.; HOLZAPFEL, W.H.; JAKOBSEN, M. *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1468–1472, 2007.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; RI, A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, v. 178, p. 5636-43, 1996.

OBAZU, F.O.; NGOMA, L.; GRAY, V.M. Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H², hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. [*Int J Hydrogen Energy*](#), v. 37(7), 5579-5590, 2012.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; INTRASUNGKGA, N.; DHAMWICHUKORN, S.; BIRKELAND, N.; Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1221-1231, 2008.

OZTEKIN, R.; KAPDAN, I.K.; KARGI, F.; ARGUN, H. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4083-4099, 2008.

PARAWIRA, W.; MURTO, M.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. *Renewable Energy*, v. 29, p. 1811–1823, 2004.

PENTEADO, E.D.; LAZARO, C.Z.; SAKAMOTO, I.K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 6137-6145, 2013.

PUNÄL, A.; TREVISAN, M.; ROZZI, A.; LEMA, J.M. Influence of C/N ratio on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors. *Water Research*, v.34 (9), p. 2614-2619, 2000.

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

A) REN, N.; XING, D.; RITTMANN, B.E; ZHAO, L.; XIE, T.; ZHAO, X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9 (5), 1112–1125, 2007.

B) REN, N.; LIN, H.; ZHANG, K.; ZHENG, G.; DUAN, Z.; LIN, M. Cloning, Expression, and Characterization of an Acetate Kinase from a High Rate of Biohydrogen Bacterial Strain *Ethanoligenens* sp. hit B49. *Current Microbiology*, v. 55, pp. 167–172, 2007.

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

ROJAS, M.P.A. *Influência da relação c/n na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo*. 2010. 67 f. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010.

ROJAS, M.P.A.; ZAIAT, M.; SILVA, W.L. *Influence of carbon/nitrogen ratio on the hydrogen production in fixed-bed anaerobic reactor*. In: 18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010.

ROMANO, S.; PAGANIN, P.; VARRONE, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Dynamics of hydrogen-producing bacteria in a repeated batch fermentation process using lake sediment as inoculum. *Archives of Microbiology*, v. 196, p. 97–107, 2014.

ROSA, P.R.F; SANTOS, S.C; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 1288-1296, 2014.

SAADY, N.M.; CHAGANTI, S.R.; LALMAN, J.A.; HEATH, D. Impact of culture source and linoleic acid (C18:2) on biohydrogen production from glucose under mesophilic conditions. *International journal of hydrogen energy*, v. 37, p. 4036-4045, 2012.

SAADY, N.M.C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 13172-13191, 2013.

SCARDOVI, V. The genus *Bifidobacterium*: the prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, New York, USA, 1981.

SCARDOVI, V., Section 15. Irregular nonsporing gram-positive rods. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924. In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edn., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2: 1418-1434. 62: 151-187, 1986.

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. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39 (17), p. 9000–9011, 2014.

SCHINK, B., ZEIKUS, J.G. 1980. Microbial Methanol Formation: A Major End Product of Pectin Metabolism. *Current microbiology*, 4 pp. 387-389.

SETO, A.; SAITO, Y.; MATSUSHIGE, M.; KOBAYASHI, H.; SASAKI, Y.; TONOUCHI, N.; TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F.; UEDA, K.; BEPPU, T. Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73, 915–921, 2006.

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

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

SHIDA, G.M. *Produção de Hidrogênio e Ácidos Orgânicos por Fermentação Acidogênica em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado*.2008. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos – SP, 2008.

SHINOHARA, K.; OHASHI, Y.; KAWASUMI, K.; TERADA, A.; FUJISAWA, T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*, 16, 510-515, 2010.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 7460-7478, 2011.

SONG, Z.; DAI, Y.; FAN, Q.; LI, X.; FAN, Y.; HOU, H. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 5631-5636, 2012.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, P. Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p.4092–4102, 2010.

STÖHLMACHER, P. Methanol from ethanol? On cleavage of the ethanol carbon bond and methanol formation within the scope of microbial metabolic processes. *Blutalkohol*, v. 32,p. 193-207, 1995.

TEMUDO, M.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 80(6), p.1121-1130, 2008.

THOMPSON, L.J.; GRAY, V.; LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Carbon: nitrogen: phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 1105-1113, 2006.

VALDEZ-VAZQUEZ I, RI'OS-LEAL E, CARMONA-MARTÍNEZ A, MÚÑOZ-PAÍEZ KM, POGGI-VARALDO HM. Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ Sci Technol*; 40, 10, 3409-15, 2006.

VALLEE, B.L.; ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem*, v.41, p. 91-128, 1972.

VAN GINKEL, S.W.; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research.*, v. 39, p. 3819-3826, 2005.

VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*. v. 38 (3), p. 1319-1331, 2013.

WANG AJ, REN NQ, SHI Y, LEE DY. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture *Clostridium acetobutylicum* X9 and *Ethanoigenens harbinense* B49. *International journal of hydrogen energy*; v. 33, p. 912–917, 2008.

WANG, J. L.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, 799-811, 2009.

WU, S.Y.; LIN, C.Y.; LEE, K.S.; HUNG, C.H.; CHANG, J.S.; LIN, P.J.; Dark fermentative hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 22, 113-119, 2008.

WU, S.Y.; LIN, C.N.; CHANG, J.S. Hydrogen Production with Immobilized Sewage Sludge In three-Phase Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnol. Prog.*, v. 19, p. 828-832, 2003.

XING, D.F.; REN, N.Q.; LI, Q.B.; LIN, M.; WANG, A.J.; ZHAO, L.H. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.56, p. 755-760, 2006.

XU, L.; REN, N.; WANG, X.; JIA, Y. Biohydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49: Nutrient optimization. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 33, p. 6962–6967, 2008.

YE, F.; YE, F.; LI, Y. Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. *Journal of Hazardous Materials*, v. 188, p. 37-43, 2011.

ZHAO, Y.; REN, N.; WANG, A. Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. *Chemosphere*, v. 72, p. 233–242, 2008.

ZHANG, Z. P.; TAY, J. H.; SHOW, K. Y.; YAN, R.; LIANG, D. T.; LEE, D. J.; JIANG, W. J. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 185-191, 2007.

ZHANG, Z-P.; SHOW, K-Y.; TAY, J-H.; LIANG, D.T.; LEE, D-J. Enhanced Continuous Biohydrogen Production by Immobilized Anaerobic Microflora. *Energy & Fuels*, v. 22, p. 87–92, 2008.

ZHU, H.; PARKER, W.; BASNAR, R.; PRORACKI, A.; FALLETTA, P.; BÉLAND, M.; SETO, P. Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes, *Bioresour. Technol.* v. 100, p. 5097–5102, 2009.

ZONG, W.; YU, R. ZHANG, P.; FAN, M.; ZHOU, Z. Efficient hydrogen gas production from cassava and food waste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation. *Biomass and Bioenergy*, v. 33 (10), p. 1458–1463, 2009.