UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E
SANEAMENTO

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E DA ALCALINIDADE NA
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO
FLUIDIFICADO

Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim

São Carlos

2009

EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E DA ALCALINIDADE NA
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO
FLUIDIFICADO**

Tese apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2009

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

A135e Amorim, Eduardo Lucena Cavalcante de
Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na
produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito
fluidificado / Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim ;
orientador Edson Luiz Silva - São Carlos, 2009.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de
Concentração em Engenharia Hidráulica e Saneamento) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São
Paulo, 2009.

1. Hidrogênio - produção. 2. Reator anaeróbio de leito
fluidificado. 3. Conversão fermentativa. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM**

Tese defendida e julgada em 12/11/2009 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Dr. **EDSON LUIZ SILVA (Orientador)**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado

Prof^a. Dr^a. **MÔNICA LOPES AGUIAR**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Prof. Dr. **ALBERTO COLLI BADINO JR.**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Prof. Dr. **MÁRCIO GOMES BARBOZA**
(Universidade Federal Alagoas/UFAL)

Aprovado

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento

Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

RECEBUE
Serviço de Pós-Graduação
13/11/2009

À minha esposa Evilania Amorim com Amor.
Aos meus pais Ivanerjes Amorim e Selma
Amorim, e à minha irmã Vanessa Amorim.

"A verdadeira sabedoria consiste em saber como aumentar o bem-estar do mundo."

(Benjamin Franklin)

"Quem possui a sabedoria obterá a glória em herança: para onde quer que vá, o Senhor abençoa."

(Eclo 4,13)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o maior responsável pela realização deste trabalho. Quero também mostrar minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, mais especialmente a:

À minha esposa Evilania Amorim, pelo amor, dedicação, compreensão e pela ajuda nas horas difíceis, onde soube “segurar a barra”, juntamente com sua família, Maria Francisca (Tinha), José Luiz, Sebastião Neto (Neto) e Lynd. Todos têm um lugar especial no meu coração.

Meus pais, Ivanerjes e Selma Amorim, irmã Vanessa Amorim, ao Josias Lima, e demais familiares, tios e primos, que são a grande motivação de nosso sucesso; pelas suas demonstrações de confiança e compreensão.

Ao Prof^o. Dr^o. Edson Luiz Silva por acreditar e ter grande confiança em minha pessoa; pela eficácia orientação dedicada e principalmente pela amizade formada durante esses anos de trabalho.

Aos meus avós, Alpiniano e Maria Lucena Marques, José Amancio e Marinete Amorim, por todo apoio e carinho.

À Prof^a. Dr^a Maria Bernadete A. Varesche pela sua sempre colaboração.

Aos meus tios Severino e Dilze Marques por terem sido exemplo para mim e por todo apoio e incentivo.

Ao meu tio Ivanjorge Amorim (em memória) pelos momentos descontraídos e por todo apoio e carinho.

Ao técnico Oscar da Silva, pela construção do reator e pela ajuda realizada durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof^o. Titular Eugênio Foresti pela oportunidade em participar do Projeto Temático.

Ao Profº. Drº. Marcelo Zaiat pelas sábias orientações durante todo meu doutorado.

À Márcia Damianovic por todas as contribuições durante meu doutorado.

À Bruna Fernandes por todas as contribuições durante a elaboração do plano deste doutorado.

Ao Profº Valdir Schalch por ter me acompanhado durante a etapa de estágio a docência do programa de aperfeiçoamento de ensino (PAE).

Às secretárias do departamento Sá e Pavi, em especial à recepcionista Rose pelo bom humor e disposição em sempre ajudar.

À Flávia e a Fernanda da contabilidade pela atenção e colaboração sempre dada.

À Janja e a Julia do Laboratório de Processos Biológicos-LPB do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - EESC/USP pelas análises de cromatografia.

À Eloísa Pozzi, Sandra Maintinguer, Isabel Sakamoto, Nora Kátia, pelas análises microscópicas e microbiológicas.

Ao Tiago Martins e a Lorena pelos ensinamentos em construções de árvores filogenéticas.

Ao meu grande amigo Profº. Drº. Márcio Barboza, pela contribuição e incentivo para a minha aprovação na pós-graduação.

A todos os meus ex-professores da Universidade Federal de Alagoas que sempre confiaram e acreditaram em meu potencial, em especialmente Profº. Drº. Roberaldo Carvalho, Profª. Drª. Cleuda Freire.

Aos amigos que fazem parte da colônia Alagoana e aos agregados, Antonio Netto, Saulo Almeida, Eduardo Toledo, Rafael Piatti, Walter Oliveira, Suzana, Gustavinho, Marinhinha, Rômulo Farias, Pedro, Valter Cléber, Paulino Almeida, Walter Ferreira, Álvaro, Rafael e outros.

A todos os amigos, Aruana, Cristiane, do Laboratório de Controle Ambiental II pelas contribuições, momentos de descontração e pela companhia.

Aos ex-alunos do Laboratório de Controle Ambiental II, Jorge Pantoja, Sylvia e Gessia pelas contribuições e pelos momentos de descontração.

Aos alunos de iniciação científica, Lucas, Guilherme, Aline, Igor e Danilo, do Laboratório de Controle Ambiental II pela colaboração na parte experimental.

Ao Sr^o. Nelson Gallo do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Um especial agradecimento ao meu amigo e companheiro Antonio Pedro (Netto), pessoa com quem convivi durante boa parte da minha estada em São Carlos e que esteve sempre ao meu lado nos momentos de alegria, lazer e estresses.

Aos amigos de Maceió que compreenderam a minha ausência em certas ocasiões, mas que sempre estiveram no meu coração.

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

RESUMO

AMORIM, E.L.C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado.** Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de alcalinidade, da concentração da glicose e da taxa de carregamento orgânico na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reator anaeróbico de leito fluidificado (RALF), contendo argila expandida (2,8 – 3,35 mm) como material suporte para adesão microbiana. Foram utilizados oito reatores idênticos, sendo quatro deles operados sem adição de alcalinidade, e com concentração de glicose de 2000, 4000, 10000 e 25000 mg L⁻¹, respectivamente. Outros quatro reatores operados com adição de alcalinidade, e com as mesmas concentrações de glicose cada um. Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbico pré-tratado termicamente, operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) decrescente de 8 h a 1 h à temperatura controlada de 30°C. Foi constatada produção volumétrica de hidrogênio máxima de 1,58 L h⁻¹ L⁻¹, para o reator operado com 10000 mg L⁻¹ de glicose com adição de alcalinidade (R10CA) e um rendimento máximo de 2,52 mol H₂/mol glicose, para o reator operado com 4000 mg L⁻¹ de glicose com adição de alcalinidade (R4CA). O biogás produzido foi composto de H₂ e CO₂. Em ambos os reatores, o conteúdo de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 h para 1 h, alcançando valor máximo de 77%, para o reator operado com 4000 mg L⁻¹ sem adição de alcalinidade (R4SA). Os reatores operados com altas concentrações de glicose (10000 mg L⁻¹ e 25000 mg L⁻¹) apresentaram maiores proporções de solventes como metabólitos solúveis. Verificou-se uma correlação linear entre a produção volumétrica de hidrogênio e a taxa de carregamento orgânico em todos os reatores. O rendimento, a produção volumétrica de hidrogênio e a distribuição dos metabólitos solúveis, em ambos os reatores, foram influenciados pelo aumento da concentração de glicose. O reator operado com 4000 mg L⁻¹, com adição de alcalinidade, apresentou a distribuição mais favorável dos metabólitos solúveis para a produção de hidrogênio, o qual predominou o ácido acético e butírico. Neste mesmo reator, o rendimento da produção de hidrogênio foi superior aos outros reatores. As análises de clonagem e sequenciamento do consórcio bacteriano revelaram semelhanças com *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e bactérias não cultivadas.

Palavras-chave: Produção de hidrogênio, reator anaeróbico de leito fluidificado, conversão fermentativa.

ABSTRACT

AMORIM, E.L.C. **Effect of glucose concentration and alkalinity in the hydrogen production in anaerobic fluidized bed.** Thesis - School of Engineering of São Carlos, Department of Hydraulics and Sanitation, University of São Paulo, São Carlos, 2009.

This study evaluated the effect alkalinity addition, glucose concentration and organic loading rate in the hydrogen production and organic acids in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR), containing expanded clay (2.8 - 3, 35 mm) as support material for microbial adhesion. We used eight identical reactors, four of them operated without the addition of alkalinity, and concentration of glucose in 2000, 4000, 10000 and 25000 mg L⁻¹, respectively. Another four reactors operated with the addition of alkalinity, and with the same concentrations of glucose each. The reactors were operated with hydraulic retention times (HRT) ranging from 8 h at 1 h, and temperature of 30°C. It has been found for hydrogen production rate maximum 1.58 L h⁻¹ L⁻¹ for the reactor operated with 10000 mg L⁻¹ glucose with the addition of alkalinity (R10CA) and a maximum yield of 2.52 mol H₂/mol glucose to the reactor operated with 4000 mg L⁻¹ glucose with the addition of alkalinity (R4CA). The biogas produced was composed of H₂ and CO₂. In both reactors, the hydrogen content increased with the reduction of HRT of 8 h at 1 h, reaching a maximum of 77% for the reactor operated from 4000 mg L⁻¹ without added alkalinity (R4SA). The reactors operated with high glucose concentrations (10000 mg L⁻¹ and 25000 mg L⁻¹) had higher proportions of solvents such as soluble metabolites. There was a linear correlation between the hydrogen production rate and organic loading rate in all reactors. The yield, the hydrogen production rate and distribution of soluble metabolites in both reactors, were influenced by the glucose concentration. The reactor operated with 4000 mg L⁻¹ and addition of alkalinity, presented the most favorable distribution of soluble metabolites to hydrogen production, which was predominant acetic and butyric acid. In the same reactor, the hydrogen yield was higher than other reactors. The cloning and sequencing analysis of the bacterial consortium revealed the presence of *Clostridium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and uncultivated bacteria.

Key-words: Hydrogen production, anaerobic fluidized bed reactor, fermentative conversion.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Símbolos e Abreviações	xvii
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	6
CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Produção de hidrogênio	7
2.2 Produção biológica de hidrogênio	7
2.2.1 Biofotólise	8
2.2.1.1 Biofotólise direta	8
2.2.1.2 Biofotólise indireta	9
2.2.2 Fotofermentação	10
2.2.3 Fermentação	11
2.3 Rotas fermentativas	13
2.4 Microbiologia da produção biológica de hidrogênio	15
2.5 Parâmetros importantes para a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios	16
2.5.1 pH	16
2.5.2 Substrato	17
2.5.3 Tempo de detenção hidráulica (TDH)	18

2.5.4 Temperatura	19
2.5.5 Tratamento do inóculo	19
2.6 Produção de hidrogênio: ênfase em biorreatores	20
2.6.1 Reator anaeróbio de leito fluidificado	23
2.6.1.1 Materiais suporte para adesão microbiana	27
2.7 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica	29
CAPÍTULO 3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Tratamento térmico do inóculo	30
3.2 Meio fermentativo	31
3.3 Material suporte	33
3.4 Reator anaeróbio de leito fluidificado	35
3.5 Partida e condições operacionais do reator para a produção de hidrogênio	38
3.6 Análises físico-químicas	42
3.6.1 Determinação da glicose	43
3.6.2 Determinação do hidrogênio	43
3.6.3 Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois	44
3.6.4 Exames microscópicos	45
3.6.5 Caracterização microbiológica do biofilme anaeróbio	45
3.6.7 Avaliação da comunidade microbiana por técnica de biologia molecular	46
3.6.7 Frequência das análises químicas e microbiológicas	47
3.6.8 Cálculo dos principais parâmetros	47
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1 Morfologias presentes no inóculo após o enriquecimento	50
4.2 Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF)	51
4.2.1 Conversão da glicose	51

4.2.1.1 Reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA)	52
4.2.1.2 Reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA)	54
4.2.1.3 Reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA)	56
4.2.1.4 Reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA)	57
4.2.1.5 Reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA)	59
4.2.1.6 Reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA)	60
4.2.1.7 Reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA)	62
4.2.1.8 Reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA)	63
4.2.1.9 Discussão sobre a conversão da glicose nos reatores	65
4.2.2 Composição dos metabólitos solúveis e gasosos	66
4.2.2.1 Reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA)	66
4.2.2.2 Reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA)	70
4.2.2.3 Reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA)	74
4.2.2.4 Reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA)	78
4.2.2.5 Reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA)	82
4.2.2.6 Reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA)	86
4.2.2.7 Reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA)	90
4.2.2.8 Reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA)	94
4.2.2.9 Discussão sobre a composição dos metabólitos solúveis e gasosos dos reatores	98
4.2.3 Efeito da alcalinidade e do TDH na produção de hidrogênio	102
4.2.3.1 Reatores contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA)	102
4.2.3.2 Reatores contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA)	106
4.2.3.3 Reatores contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e	109

com adição de alcalinidade (R10CA)	
4.2.3.4 Reatores contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e	113
com adição de alcalinidade (R25CA)	
4.2.3.5 Discussão sobre o efeito da alcalinidade na produção de hidrogênio nos reatores	116
4.2.4 Efeito da taxa de carregamento orgânico (TCO) na produção de hidrogênio	117
4.2.4.1 Reatores contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e	117
com adição de alcalinidade (R2CA)	
4.2.4.2 Reatores contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e	119
com adição de alcalinidade (R4CA)	
4.2.4.3 Reatores contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e	121
com adição de alcalinidade (R10CA)	
4.2.4.4 Reatores contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e	123
com adição de alcalinidade (R25CA)	
4.2.4.5 Discussão sobre o efeito da TCO na produção de hidrogênio nos reatores	125
4.2.5 Efeito da concentração de glicose na produção de hidrogênio	126
4.3 Balanço de carbono	131
4.3.1 Discussão sobre o balanço de carbono nos reatores	136
4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do material suporte	136
4.5 Avaliação da diversidade microbiana através da técnica de biologia molecular	140
4.6 Considerações finais	148
CAPÍTULO 5	150
5.1 Conclusões	150
5.2 Sugestões	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Rotas da produção de hidrogênio a partir da biomassa ou matéria orgânica (Fonte: MANISH e BANERJEE, 2008).	8
Figura 2.2	Fluxograma das diferentes rotas a partir da glicose (Fonte: ANTONOPOULOU <i>et al.</i> , 2008).	15
Figura 3.1	Instalação piloto dos reatores UASB da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP), Campus Jaboticabal.	30
Figura 3.2	Partículas de argila expandida para utilização como suporte para aderência das populações microbianas. (a) sem tratamento, (b) com tratamento.	34
Figura 3.3	Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.	35
Figura 3.4	Reator anaeróbio de leito fluidificado.	37
Figura 3.5	Componentes do experimento: (a) distribuidor da alimentação; (b) topo do reator; (c) reservatório de alimentação (caixa d'água).	38
Figura 3.6	Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado durante a etapa de inoculação/adaptação.	40
Figura 4.1	Morfologias observadas na adaptação do inóculo: (a) e (b) bacilos e morfologias semelhantes à <i>Clostridium</i> sp. e <i>Enterobacter</i> sp.	51
Figura 4.2	Comportamento da concentração média de glicose afluente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	53
Figura 4.3	Comportamento da concentração média de glicose afluente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).	55
Figura 4.4	Comportamento da concentração média de glicose afluente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH,	56

	para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	
Figura 4.5	Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).	58
Figura 4.6	Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	59
Figura 4.7	Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	61
Figura 4.8	Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	62
Figura 4.9	Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).	64
Figura 4.10	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	66
Figura 4.11	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	69
Figura 4.12	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).	70
Figura 4.13	Figura 4.13 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator	73

	contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).	
Figura 4.14	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	74
Figura 4.15	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	77
Figura 4.16	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).	78
Figura 4.17	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).	81
Figura 4.18	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	82
Figura 4.19	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	85
Figura 4.20	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	86
Figura 4.21	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	89
Figura 4.22	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	90
Figura 4.23	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	93
Figura 4.24	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o	94

	reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).	
Figura 4.25	Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).	97
Figura 4.26	Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 2000 m L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA) em função do TDH.	103
Figura 4.27	Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 2000 m L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA) em função do TDH.	103
Figura 4.28	Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 2000 m L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA) em função do TDH.	104
Figura 4.29	Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 4000 m L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA) em função do TDH.	106
Figura 4.30	Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 4000 m L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA) em função do TDH.	107
Figura 4.31	Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 4000 m L ⁻¹ de glicose sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA) em função do TDH.	107
Figura 4.32	Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 10000 m L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA) em função do TDH.	110
Figura 4.33	Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 10000 m L ⁻¹ de glicose sem adição de alcalinidade (R10SA) e com	110

	adição de alcalinidade (R10CA) em função do TDH.	
Figura 4.34	Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA) em função do TDH.	111
Figura 4.35	Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA) em função do TDH.	113
Figura 4.36	Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA) em função do TDH.	114
Figura 4.37	Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA) em função do TDH.	114
Figura 4.38	Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose ($y_{R2SA} = 0,0087 x_{R2SA} - 0,0157$, $R^2 = 0,9889$ e $y_{R2CA} = 0,0057 x_{R2CA} + 0,0107$, $R^2 = 0,9383$).	118
Figura 4.39	Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 2000 mg L ⁻¹ de glicose.	118
Figura 4.40	Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose ($y_{R4SA} = 0,0041 x_{R4SA} - 0,0398$, $R^2 = 0,9966$ e $y_{R4CA} = 0,0051 x_{R4CA} + 0,1667$, $R^2 = 0,9910$).	120
Figura 4.41	Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 4000 mg L ⁻¹ de glicose.	120
Figura 4.42	Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose ($y_{R10SA} = 0,0016 x_{R10SA} - 0,0715$,	122

$$R^2 = 0,9980 \text{ e } y_{R10CA} = 0,0016 x_{R10CA} + 0,0225, R^2 = 0,9758).$$

Figura 4.43	Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 10000 mg L ⁻¹ de glicose.	122
Figura 4.44	Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose.	124
Figura 4.45	Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 25000 mg L ⁻¹ de glicose.	124
Figura 4.46	Comportamento do rendimento (TDH de 2 h) e produção volumétrica de hidrogênio (TDH de 1 h) em função do efeito da concentração de glicose.	127
Figura 4.47	Comportamento do conteúdo de hidrogênio no biogás em função do efeito da concentração de glicose para TDH de 1 h.	127
Figura 4.48	Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R2SA: coco bacilos, bacilos retos (TDH de 8 h), (b) R2SA: bacilos retos de vários comprimentos, semelhantes à <i>Clostridium sp.</i> (TDH de 2 h), (c) R2CA: bacilos retos e ovalados (TDH de 8 h), (d) R2CA: bacilos retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).	137
Figura 4.49	Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R4SA: cocos, bacilos retos (TDH de 8 h), (b) R4SA: bacilos retos e ovalados, semelhantes à <i>Clostridium sp.</i> (TDH de 2 h), (c) R4CA: bacilos retos (TDH de 8 h), (d) R4CA: bacilos curvos, retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).	137
Figura 4.50	Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R10SA: bacilos retos (TDH de 8 h), (b) R10SA: bacilos retos e ovalados (TDH de 2 h), (c) R10CA: bacilos retos (TDH de 8 h), (d)	138

	R10CA: bacilos retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).	
Figura 4.51	Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R25SA: bacilos retos, estruturas semelhantes à <i>Clostridium</i> sp. (TDH de 8 h), (b) R25SA: bacilos retos (TDH de 2 h), (c) R25CA: bacilos retos e ovalados (TDH de 8 h), (d) R25CA: bacilos retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).	138
Figura 4.52	Porcentagem de distribuição filogenética dos clones do consórcio microbiano da identificação de fragmentos do RNAr 16 S para o Domínio <i>Bacteria</i> .	144
Figura 4.53	Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com <i>primers</i> para Domínio <i>Bacteria</i> . Foi acrescentada como <i>out group</i> sequência de <i>Thermotoga marítima</i> (NC000853).	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Comparação dos principais processos biológicos da produção de hidrogênio.	12
Tabela 2.2	Estudos comparativos das condições operacionais e eficiência na produção fermentativa de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e reatores anaeróbios de leito fluidificado.	22
Tabela 3.1	Composição da água residuária sintética a base de glicose.	32
Tabela 3.2	Características físicas da argila expandida (cinasita) segundo Ortega <i>et al.</i> (2001).	33
Tabela 3.3	Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação para as partículas de argila expandida.	34
Tabela 3.4	Parâmetros utilizados nos reatores anaeróbios de leito fluidificado.	41
Tabela 3.5	Fases em que a pesquisa foi desenvolvida para os reatores sem adição de agente alcalinizante.	48
Tabela 3.6	Fases em que a pesquisa foi desenvolvida para os reatores com adição de agente alcalinizante para controle do pH.	48
Tabela 3.7	Frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases de operação.	49
Tabela 4.1	Concentração média da glicose afluente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	53
Tabela 4.2	Concentração média de glicose afluente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).	55
Tabela 4.3	Concentração média de glicose afluente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	57

Tabela 4.4	Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose e com adição de alcalinidade (R4CA).	58
Tabela 4.5	Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	60
Tabela 4.6	Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	61
Tabela 4.7	Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	63
Tabela 4.8	Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25CA).	64
Tabela 4.9	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	67
Tabela 4.10	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	68
Tabela 4.11	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).	69
Tabela 4.12	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).	71
Tabela 4.13	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de	72

	alcalinidade (R2CA).	
Tabela 4.14	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2CA).	73
Tabela 4.15	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	75
Tabela 4.16	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	76
Tabela 4.17	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).	77
Tabela 4.18	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).	79
Tabela 4.19	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).	80
Tabela 4.20	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).	81
Tabela 4.21	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	83
Tabela 4.22	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	84
Tabela 4.23	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).	85
Tabela 4.24	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	87
Tabela 4.25	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	88

Tabela 4.26	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).	89
Tabela 4.27	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	91
Tabela 4.28	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	92
Tabela 4.29	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).	93
Tabela 4.30	Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).	95
Tabela 4.31	Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).	96
Tabela 4.32	Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).	97
Tabela 4.33	Tabela 4.33. Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H ₂ , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.	105
Tabela 4.34	Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H ₂ , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.	108
Tabela 4.35	Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H ₂ , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.	112
Tabela 4.36	Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H ₂ , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.	115
Tabela 4.37	Efeito das concentrações de glicose e TDH para cada reator avaliado sem adição de alcalinidade.	128
Tabela 4.38	Efeito das concentrações de glicose e TDH para cada reator	129

	avaliado com adição de alcalinidade.	
Tabela 4.39	Média e desvio padrão da DQO afluyente e efluente, e redução da DQO para todos os reatores.	134
Tabela 4.40	Média das DQO teóricas dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida.	135
Tabela 4.41	Identificação dos clones do Domínio <i>Bacteria</i> .	141

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ATP	Adenosina trifosfato	
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	
EVA	Etileno-acetato de vinila	
FID	Detector de ionização de chama	
GC	Cromatógrafo gasoso	
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	
PET	Polietileno tereftalato	
RALF	Reator anaeróbio de leito fluidificado	
RALFH	Reator anaeróbio de leito fixo horizontal	
RALFV	Reator anaeróbio de leito fixo vertical	
R2SA	Reator operado com 2000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade	
R2CA	Reator operado com 2000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade	
R4SA	Reator operado com 4000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade	
R4CA	Reator operado com 4000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade	
R10SA	Reator operado com 10000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade	
R10CA	Reator operado com 10000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade	
R25SA	Reator operado com 25000 mg L ⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade	
R25CA	Reator operado com 25000 mg L ⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade	
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo	
Φ	Dimensão da partícula	(L)
ρ	Densidade da partícula	(ML ⁻³)
C_g	Concentração de glicose	(ML ⁻³)
ΔP	Perda de carga	(L)

DQO	Demanda química de oxigênio	(ML ⁻³)
H _o	Altura correspondente a massa de partículas em leito fixo	(L)
H _f	Altura correspondente a massa de partículas em leito fluidizado	(L)
HAc	Ácido acético	(ML ⁻³)
HBu	Ácido butírico	(ML ⁻³)
HPr	Ácido propiônico	(ML ⁻³)
EtOH	Etanol	(ML ⁻³)
MetOH	Metanol	(ML ⁻³)
HY	Rendimento da produção de hidrogênio	(mol H ₂ /mol substrato)
HPR	Produção volumétrica de hidrogênio	(L ³ T ⁻¹ L ⁻³)
M	Massa de partículas usada nos reatores	(M)
Q _r	Vazão de recirculação	(L ³ T ⁻¹)
μ _{máximo}	Velocidade específica máxima de crescimento microbiano	(T ⁻¹)
V _{mf}	Velocidade de mínima fluidificação	(LT ⁻¹)
SST	Sólidos suspensos totais	(ML ⁻³)
SSV	Sólidos em suspensão voláteis	(ML ⁻³)
ST	Sólidos totais	(ML ⁻³)
TCO	Taxa de carregamento orgânico	(ML ⁻³ T ⁻¹)
TDH	Tempo de detenção hidráulica	(T)
AVT	Ácidos voláteis totais	(ML ⁻³)
SMP	Metabólitos solúveis totais produzidos	(ML ⁻³)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Recentemente, o hidrogênio tem surgido como uma das mais promissoras novas fontes de energia, principalmente por ser limpa, reciclável e eficiente. Além disso, o hidrogênio pode ser utilizado como matéria-prima em diversas indústrias (DAS e VEZIROGLU, 2001; WANG *et al.*, 2007). No entanto, o hidrogênio é produzido principalmente a partir dos combustíveis fósseis, como gás natural, petróleo e carvão, através da reforma a vapor ou a partir da água, através da eletrólise e decomposição termoquímica. Esses processos possuem alto custo e não são favoráveis ambientalmente. Portanto, o processo biológico de produção de hidrogênio, o qual é favorável por apresentar baixos custos e ambientalmente adequado, tem sido estudado por diversos pesquisadores.

Reduzir o custo do tratamento de águas residuárias e de encontrar formas de produzir produtos úteis a partir desse resíduo, vem ganhando importância na perspectiva de atingir a sustentabilidade ambiental. Uma forma de reduzir o custo do tratamento de águas residuárias é gerar bioenergia, tais como o gás hidrogênio, a partir da matéria orgânica presente nas águas residuárias, ao mesmo tempo realizando o seu tratamento. As águas residuárias industriais, geradas a partir de diferentes processos, são consideradas ideais, pois possuem substratos que contêm altos níveis de matéria orgânica facilmente degradável, o que resulta em um balanço energético economicamente positivo. A produção de hidrogênio a partir de águas residuárias com o tratamento simultâneo vem atraindo interesse e é uma maneira eficaz de aproveitamento de energia limpa a partir de recursos renováveis, em uma abordagem sustentável (MOHAN, 2009).

A produção biológica de hidrogênio pode ser dividida em dois processos:

fotofermentação e fermentação (HWANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007). A produção fermentativa de hidrogênio apresenta a vantagem de ter alta velocidade de produção em relação às bactérias fotossintéticas ou algas (DAS e VEZIROGLU, 2001; WANG *et al.*, 2007). Além disso, as bactérias fermentativas utilizam matéria orgânica como substrato, e isso representa uma vantagem, pois elas convertem resíduos orgânicos em uma valiosa fonte de energia. Portanto, a fermentação tem recentemente atraído atenção como um caminho efetivo para a produção de hidrogênio a partir da matéria orgânica presente em águas residuárias (DAS e VEZIROGLU, 2001; LEE *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que o processo fermentativo de produção de hidrogênio em reatores é significativamente influenciado por vários fatores, como a especificidade da água residuária, configuração do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentração do substrato, temperatura, requerimentos nutricionais, taxa de carregamento orgânico (TCO) e pH (NOIKE e MIZUNO, 2000; LOGAN *et al.*, 2002; OH *et al.*, 2004; MU *et al.*, 2006). Dentre esses fatores, o pH tem-se mostrado crucial para a distribuição dos produtos acidogênicos (GOTTSCALK, 1986; REN *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2002; MU *et al.*, 2006).

A partida de reatores de filme fixo requer controle rigoroso das condições ambientais, operacionais e das características do material suporte, visando o desenvolvimento do biofilme. No caso desses reatores, a partida é dificultada pelas baixas velocidades de crescimento microbiano, rigorosos requerimentos ambientais e limitada habilidade de aderência e fixação do biofilme. Estes obstáculos podem ser superados por meio da seleção adequada do suporte, formulação do procedimento de inoculação, estratégias de partida, além da escolha ideal do reator (ANNACHHATRE e BHAMIDIMARRI, 1992). O conhecimento nutricional, toxicológico e os requisitos ambientais dos microrganismos que degradam matéria orgânica e águas residuárias para produzirem hidrogênio têm ajudado a definir melhores condições de

proliferação microbiana. Estudos anteriores demonstraram que a operação em baixos pH associada aos procedimentos de enriquecimento microbiano, como os diversos tipos de tratamento térmico do inóculo, são eficientes na seleção das culturas produtoras de hidrogênio (LIU *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2003; VAN GINKEL e LOGAN, 2005; KIM *et al.*, 2006).

A Escola de Engenharia de São Carlos, através do Departamento de Hidráulica e Saneamento, vem estudando desde 2005, reator biológico de filme fixo para a produção de ácidos orgânicos e hidrogênio. Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos em reator de leito fixo foi o de Leite, em 2005; seguido de outros, realizados em escala de bancada: Fernandes (2008) e Peixoto (2008).

Decorrente do sucesso obtido por esses pesquisadores, utilizando esse tipo de reator de filme fixo, surgiu-se a necessidade de se estudar outras configurações para a produção fermentativa de hidrogênio. Outra configuração interessante para ser avaliada seria o reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF), pois esse apresenta diversos fatores positivos como o acúmulo de grande quantidade de biomassa aderida ao meio suporte, suportando elevadas TCO, possibilidade de aplicação de baixos TDH e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos, além de promover alta velocidade de agitação na fase líquida favorece o desprendimento do hidrogênio nesta fase (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2007). O primeiro trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa utilizando o RALF foi o de Shida em 2008, o qual verificou-se a potencialidade do reator em produzir ácidos orgânicos e consequentemente hidrogênio; seguido de Barros (2009), que visou avaliar diferentes materiais suporte para a produção de hidrogênio. Além desses, outros trabalhos apresentados na literatura destacam a potencialidade do RALF em produzir hidrogênio (KOSKINEN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

O rendimento de produção de hidrogênio em cultura mista, tipicamente, pode variar entre 0,7-4,0 mol H₂/mol glicose dependendo da comunidade bacteriana, temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica, concentração do substrato e outros fatores (VAN GINKEL e LOGAN, 2005). Em testes em batelada com temperatura mesofílica, observou que o rendimento da produção de hidrogênio varia em função da taxa de carregamento orgânico, e os maiores rendimentos foram obtidos com a menor carga orgânica (VAN GINKEL *et al.*, 2001). Em testes utilizando operação contínua, as concentrações de glicose afluyente inferior a 7000 mg L⁻¹ resultaram em maior produção de hidrogênio. Por exemplo, em uma concentração de glicose afluyente de 20000 mg DQO L⁻¹ (TDH de 6 h), Lin e Chang (1999) obtiveram rendimento de 1,7 mol H₂/mol glicose, porém a uma concentração de glicose inferior (7000 mg L⁻¹ e TDH de 6 h), Fang e Liu (2002) obtiveram 2,1 mol H₂/mol glicose. Taguchi *et al.* (1995) encontraram um maior rendimento de produção de hidrogênio de 2,4 mol H₂/mol glicose, com concentração de glicose ainda menor (3000 mg L⁻¹ e TDH de 5,5 h). Kataoka *et al.* (1997) observaram que o aumento da concentração de glicose de 5000 mg L⁻¹ a 10000 mg L⁻¹ (TDH de 8 h) reduziu os rendimentos de hidrogênio de 2,0-2,3 mol H₂/mol glicose para 1,4-2,0 mol H₂/mol glicose. Zhang *et al.* (2007), utilizando reator anaeróbio de leite fluidificado operado com glicose, observaram que o rendimento de produção de hidrogênio reduziu de 1,19 mol H₂/mol glicose para 1,10 mol H₂/mol glicose com o aumento da concentração de glicose de 10000 mg L⁻¹ para 30000 mg L⁻¹ (TDH de 1 h).

Tem sido demonstrado que, em uma faixa apropriada, o aumento da concentração de substrato poderia aumentar a capacidade de bactérias produtoras de hidrogênio em produzir hidrogênio, porém concentrações de substrato a níveis muito elevados podem reduzir o rendimento de hidrogênio (WANG e WAN, 2009). Além disso, existe certo desacordo sobre a concentração ideal de um determinado substrato para produção fermentativa de hidrogênio. Por exemplo, a concentração de sacarose ideal para a produção de hidrogênio relatada por

Van Ginkel *et al.* (2001) foi de 7500 mg DQO L⁻¹, enquanto que o relatado por Lo *et al.* (2008) foi de 40000 mg DQO L⁻¹. A possível razão para esta discordância entre esses estudos pode ser atribuída ao diferente inóculo utilizado, reator e ampla concentração de substrato estudado.

Um grande número de estudos têm sido desenvolvidos para investigar o efeito do pH na produção de hidrogênio em modo batelada e contínuo (CHEN *et al.*, 2002; LEVIN *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2004; MU *et al.*, 2006). No entanto, o pH ótimo para a produção de hidrogênio é conflitante, variando entre 4,0 e 9,0 (LAY *et al.*, 1999; LAY, 2000; CAI *et al.*, 2004; MU *et al.*, 2006). O mesmo observou-se em relação à concentração do substrato aplicado ao reator, variando entre 2000 mg L⁻¹ e 10000 mg L⁻¹ de glicose e taxa de carregamento orgânico (TCO), variando entre 13,57 kg m⁻³ d⁻¹ e 480 kg m⁻³ d⁻¹ (KOSKINEN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; SHIDA, 2008; BARROS, 2009).

Os resultados apresentados na literatura demonstraram dificuldades em estabelecer elevado rendimento na produção de hidrogênio, creditada a agitação (LAMED *et al.*, 1988; CHOU *et al.*, 2008), ao pH (LAY, 2000; VAN GINKEL *et al.*, 2001; CHOU *et al.*, 2008), ao TDH (ZHANG *et al.*, 2007; 2008) e ao enriquecimento do inóculo (HAWKES *et al.*, 2002; BAGHCHEHSARAEI *et al.*, 2008). Além disso, existem poucas informações na literatura sobre a avaliação do efeito da adição ou não de alcalinidade para controle do pH e efeito da concentração de substrato na produção fermentativa de hidrogênio em RALF. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição ou não de alcalinidade para controle do pH e o efeito da concentração de substrato na produção de hidrogênio e na distribuição dos produtos acidogênicos no RALF operado sob aumento progressivo da carga orgânica.

1.2 Objetivos

Esta pesquisa teve como objetivo geral analisar a influência da adição ou não de alcalinidade para controle do pH e o efeito da concentração de substrato na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado utilizando água residuária sintética contendo glicose como única fonte de carbono.

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

- a) Avaliar o desempenho do reator anaeróbio de leito fluidificado preenchido com partículas de argila expandida na produção de H_2 ;
- b) Avaliar a utilização de consórcios de microrganismos anaeróbios com potencial de produção de H_2 ;
- c) Avaliar o efeito da taxa de carregamento orgânico na produção de H_2 .

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de hidrogênio

O hidrogênio está sendo projetado como a fonte de energia para o futuro (JOHNSTON *et al.*, 2005; MOMIRLAN e VEZIROGLU, 2005). Convencionalmente o hidrogênio é produzido a partir do gás natural através da reforma a vapor. Outros métodos industriais são: gaseificação do carvão e eletrólise da água (DAS e VEZIROGLU, 2001). No entanto, estes métodos utilizam fontes de energia não renováveis para produzir hidrogênio e não são sustentáveis ambientalmente. Portanto, faz-se necessário explorar a produção de hidrogênio a partir de fontes de energia renováveis como as águas residuárias e a biomassa.

2.2 Produção biológica de hidrogênio

Os processos biológicos da produção de hidrogênio são fundamentalmente dependentes da presença de enzimas para produzir hidrogênio. Estas enzimas catalisam a reação química $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$. Atualmente, três enzimas são responsáveis pela realização desta reação: nitrogenase, Fe-hidrogenase e NiFe-hidrogenase (HALLENBECK e BENEMANN, 2002). A enzima Fe-hidrogenase é utilizada nos processos de biofotólise e a nitrogenase é utilizada nos processos de fotofermentação. A seguir, será apresentada uma breve descrição desses processos.

A Figura 2.1 apresenta as possíveis rotas de produção de hidrogênio a partir da biomassa ou matéria orgânica.

Figura 2.1 – Rotas da produção de hidrogênio a partir da biomassa ou matéria orgânica

(Fonte: MANISH e BANERJEE, 2008).

2.2.1 Biofotólise

Neste item serão apresentados os métodos de biofotólise utilizados para a produção de hidrogênio.

2.2.1.1 Biofotólise direta

Este método é semelhante ao encontrado em plantas e processos de fotossíntese através das algas. Neste processo, a energia solar é diretamente convertida a hidrogênio através de reações fotossintéticas (Eq. 2.1). Este é um processo atrativo, pois a energia solar é utilizada para converter um substrato prontamente disponível, a água, para oxigênio e hidrogênio. No entanto, apenas em condições especiais a produção de hidrogênio é possível ser realizada por este método, uma vez que a atividade da Fe-hidrogenase é extremamente sensível ao oxigênio.

O processo de biofotólise direta deve funcionar a uma pressão parcial próxima de uma atmosfera de O_2 , que é mil vezes maior que o máximo que possa ser tolerado. Desta forma, a sensibilidade ao O_2 da reação da enzima hidrogenase continua a ser o principal problema (HALLENBECK e BENEMANN, 2002). Na biofotólise direta, as taxas de produção de hidrogênio encontrada na literatura foram da ordem de $0,07 \text{ mmol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (MELIS *et al.*, 2000; KOSOUROV *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Biofotólise indireta

Na biofotólise indireta, problemas de sensibilidade no processo evolutivo do hidrogênio são potencialmente atingidos por meio de uma separação temporalmente e/ou espacialmente da evolução do oxigênio e do hidrogênio. Desta forma, os processos de biofotólise indireta envolvem a separação das reações de evolução do H_2 e O_2 em fases distintas, acoplado através da fixação/evolução do CO_2 . As cianobactérias têm as características de utilização do CO_2 no ar, como fonte de carbono, e da luz solar, como fonte de energia (Eq. 2.2). As células utilizam primeiro o CO_2 para produzir substâncias celulares, que são posteriormente utilizadas para a produção de hidrogênio (Eq. 2.3). O mecanismo global de produção de hidrogênio através das cianobactérias pode ser representado pelas seguintes reações:

Devido às elevadas taxas da produção de hidrogênio por espécies de *Anabaena*, estas têm sido objeto de intenso estudo (LEVIN *et al.*, 2004). Na biofotólise indireta cepas mutantes de *A. variabilis* apresentaram taxa da produção de hidrogênio, da ordem de 0,355 mmol h⁻¹ L⁻¹ (SVESHNIKOV *et al.*, 1997).

2.2.2 Fotofermentação

As bactérias fotossintéticas envolvem hidrogênio molecular catalisado pela nitrogenase sob condições deficientes de nitrogênio utilizando luz como energia e compostos reduzidos (ácidos orgânicos) (LEVIN *et al.*, 2004). Estas bactérias não são suficientemente potentes para dividir a molécula de água. No entanto, em condições anaeróbias, estas bactérias são capazes de utilizar ácidos orgânicos simples, como o ácido acético, como doadores de elétrons. Estes elétrons são transportados para a Fe-nitrogenase pelo uso de energia na forma de Adenosina Trifosfato (ATP). Quando nitrogênio não estiver presente, esta enzima nitrogenase pode reduzir prótons em gás hidrogênio utilizando energia extra sob a forma de ATP (AKKERMAN *et al.*, 2002). A reação global da produção de hidrogênio pode ser dada como:

$$\Delta G_0 = +3,2 \text{ kJ}$$

Na literatura foram encontradas taxa de produção de hidrogênio da ordem de 145-160 mmol h⁻¹ L⁻¹ (revisto por LEVIN *et al.*, 2004).

2.2.3 Fermentação

O hidrogênio pode ser produzido por bactérias anaeróbias, cultivadas na ausência de fonte de luz (no escuro) a partir de substrato rico em carboidratos. A maioria dos microrganismos produtores de hidrogênio são impulsionados pelo metabolismo anaeróbio do piruvato, formado durante o catabolismo de diferentes substratos. A repartição do piruvato é catalisada por uma enzima de dois sistemas (HALLENBECK e BENEMANN, 2002):

1. Piruvato: formato liase (PFL)

2. Piruvato: ferredoxin óxido redutase (PFOR)

Os carboidratos são os substratos preferenciais para produzir hidrogênio através da fermentação. O rendimento da produção de hidrogênio a partir da glicose depende da rota fermentativa e dos produtos finais. Em bactérias anaeróbias estritas, um rendimento máximo teórico de 4 moles de hidrogênio por mol de glicose pode ser obtido, no entanto, em anaeróbios facultativos como *Escherichia coli* máximo de 2 moles de hidrogênio por mol de glicose pode ser produzido. Em experimentos de laboratório, os rendimentos de produção de hidrogênio têm alcançado a ordem de $77 \text{ mmol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (KUMAR e DAS, 2002).

A Tabela 2.1 apresenta a comparação dos principais processos biológicos da produção de hidrogênio.

Tabela 2.1 - Comparação dos principais processos biológicos da produção de hidrogênio.

Processo	Tipo de microrganismo	Vantagens	Desvantagens
Biofotólise direta	Algas verdes	Capaz de produzir H_2 diretamente a partir da água e luz solar; Maior conversão da energia solar em comparação com árvores, culturas.	Requer alta intensidade de luz; O_2 pode ser perigoso para o sistema.
Biofotólise indireta	Cianobactérias	Pode produzir H_2 a partir da água; Tem capacidade de fixar N_2 da atmosfera.	Baixa eficiência fotoquímica; O_2 tem um efeito inibitório sobre nitrogenase.
Fotofermentação	Bactéria fotossintética	Um grande espectro de luz (energia) pode ser utilizado por estas bactérias; Pode utilizar diferentes substratos, como efluentes de destilaria, resíduos etc.	Eficiência de conversão é muito baixa, apenas 1-5%; O_2 é um forte inibidor da hidrogenase.
Fermentação (sem luz)	Bactéria fermentativa	Pode produzir H_2 durante todo o dia sem luz; Uma variedade de fontes de carbono pode ser utilizada como substratos; Produce metabólitos com valor agregado, tais como ácidos butírico, láctico e acético.	Relativamente mais baixos rendimentos de H_2 são alcançados; Produto contém mistura de gás CO_2 , que tem que ser separado.

2.3 Rotas fermentativas

Em geral, a produção dos ácidos acético e butírico são favoráveis a produção de hidrogênio, de acordo com as equações (2.7) e (2.8), enquanto a produção do ácido propiônico consome hidrogênio (Eq. 2.9):

Produção do ácido acético:

Produção do ácido butírico:

Produção do ácido propiônico:

O ácido láctico é produzido a partir da glicose através de três rotas metabólicas, a homofermentativa (Eq. 2.10), a heterofermentativa (Eq. 2.11) e a rota bifidum (Eq. 2.12). Em todas as três rotas o saldo de hidrogênio é zero, ou seja, o hidrogênio não é consumido nem produzido. O mesmo é para produção do etanol, onde o saldo de hidrogênio é zero (Eq. 2.13).

Rota homofermentativa:

Rota heterofermentativa:

Rota bifidum:

Produção do etanol:

A Figura 2.2 apresenta as diferentes rotas metabólicas presente neste estudo. Com base nas equações acima e nos produtos metabólicos medidos, a previsão do rendimento da produção de hidrogênio foi calculada para o RALF, ou seja, 2 mmols de hidrogênio por 1 mmol de ácido acético produzido, 2 mmols de hidrogênio por 1 mmol de ácido butírico produzido e menos 1 mmol de hidrogênio por 1 mmol de ácido propiônico produzido (Eq. 2.14).

Figura 2.2 – Fluxograma das diferentes rotas a partir da glicose (Fonte: ANTONOPOULOU *et al.*, 2008).

Assumindo que a produção dos ácidos acético e propiônico procedido através da fermentação do ácido láctico, de acordo com a Eq. (2.14), a previsão do rendimento da produção de hidrogênio foi calculada levando em consideração que 2 mmols de hidrogênio são produzidos por 1 mmol de ácido butírico produzido.

2.4 Microbiologia da produção biológica de hidrogênio

O processo de produção de hidrogênio a partir de microrganismos vem se tornando um atrativo para o fornecimento de uma parte significativa de hidrogênio necessário para um futuro próximo. Uma grande quantidade de espécies, pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* são relatados como potenciais produtores de hidrogênio através da fermentação (NANDI e SENGUPTA, 1998). Além das culturas puras, diversas microfloras e coculturas mistas também vêm sendo estudadas para a produção de hidrogênio a partir de carboidratos (NANDI e SENGUPTA, 1998; DAS e VERZIROGLU, 2001; LEVIN *et al.*, 2004). No entanto, a busca do microrganismo(s) ideal para a produção microbiana de hidrogênio a partir de diversas fontes de matéria orgânica tem sido um dos principais alvos dos pesquisadores.

2.5 Parâmetros importantes para a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios

A produção fermentativa de hidrogênio é um processo complexo e influenciado por diversos fatores, tais como: pH, substrato, tempo de detenção hidráulica, TCO, temperatura e

método de tratamento do inóculo. Os efeitos destes fatores sobre a produção fermentativa de hidrogênio foram relatados por grande número de estudos nos últimos anos (DAS e VEZIROGLU, 2001; HAWKES *et al.*, 2002; NISHIO e NAKASHIMADA, 2004; KAPDAN e KARGI, 2006; KRAEMER e BAGLEY, 2007; HAWKES *et al.*, 2007; LI e FANG, 2007; DAS e VEZIROGLU, 2008; WANG e WAN, 2009).

2.5.1 pH

O pH é um dos mais importantes parâmetros que influencia a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio, e a produção fermentativa de hidrogênio, porque pode afetar a ação da hidrogenase, bem como a rota metabólica (WANG e WAN, 2009). Tem sido demonstrado que, em uma faixa adequada, aumentando o pH poderia aumentar a capacidade das bactérias para produzir hidrogênio durante a produção fermentativa, mas o pH em níveis muito elevados poderá reduzir significativamente a produção. Dado que a maioria dos estudos foram realizados em modo batelada sem controle de pH, apenas o efeito do pH inicial sob a produção fermentativa de hidrogênio foi investigado nestes estudos.

Diversos estudos foram realizados em modo batelada, porém existem desacordos sobre o valor de pH ótimo para a produção fermentativa de hidrogênio (WANG e WAN, 2009). Por exemplo, o pH inicial ótimo para a produção fermentativa de hidrogênio em ensaio em batelada relatado por Khanal *et al.* (2004) foi de 4,5, enquanto que o relatado por Lee *et al.* (2002) foi de 9,0 (pH inicial). Já Mu *et al.* (2006) encontrou pH de 4,2, enquanto que o relatado por Zhao e Yu (2008) foi de 7,0. A possível razão para esta discordância pode ser atribuída a diferença entre esses estudos, em termos do inóculo, substrato e faixa de pH inicial estudado. Além disso, a sacarose foi o substrato mais utilizado durante os estudos do efeito do pH inicial sob a produção fermentativa de hidrogênio. Assim, recomenda-se estudar o efeito

do pH inicial sob a produção fermentativa de hidrogênio utilizando outras fontes de carbono, como glicose, e resíduos orgânicos como substrato. Além disso, reforça-se a importância de avaliar esse efeito, uma vez que diversos estudos sobre a produção fermentativa de hidrogênio foram realizados em modo batelada com controle do pH, enquanto poucos estudos foram conduzidos em modo contínuo para avaliar o efeito do pH.

2.5.2 Substrato

Diversos substratos têm sido utilizados para a produção fermentativa de hidrogênio. A glicose, sacarose e amido têm sido mais utilizados como substrato (WANG e WAN, 2009). No entanto, nos últimos anos, alguns estudos têm começado a utilizar resíduos orgânicos como substrato para a produção de hidrogênio (KAPDAN e KARGI, 2006). Além disso, diversos estudos sobre a produção fermentativa de hidrogênio foram realizados em modo batelada, porém atualmente vêm se desenvolvendo estudos em reatores de fluxo contínuo. Tem sido demonstrado que uma faixa apropriada do aumento da concentração do substrato poderia aumentar a capacidade da produção de hidrogênio das bactérias produtoras de hidrogênio, porém as concentrações de substrato em níveis muito elevados poderão reduzir ou limitar a sua produção (LO *et al.*, 2008; VAN GINKEL *et al.*, 2001). Além disso, existem diversas divergências sobre a concentração ótima de um determinado substrato para a produção fermentativa de hidrogênio. Por exemplo, a concentração ótima de sacarose para a produção fermentativa de hidrogênio relatada por van Ginkel *et al.* (2001) foi de 7,5 g DQO L⁻¹, enquanto Lo *et al.* (2008) encontrou 40 g DQO L⁻¹. A possível razão para esta discordância seria a diferença da origem do inóculo, do método de enriquecimento, entre outros.

Observou-se na literatura que a glicose foi o substrato mais utilizado pelos estudos que visam à produção fermentativa de hidrogênio (WANG e WAN, 2009).

2.5.3 Tempo de detenção hidráulica (TDH)

Diversos estudos utilizaram o TDH como parâmetro para aumentar a produção de hidrogênio. A utilização de alta taxa de carregamento orgânico, a qual está correlacionada com baixo tempo de detenção hidráulica, pode inibir a atividade dos microrganismos metanogênico (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006; KOSKINEN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). A manipulação desse parâmetro operacional contribui para o carreamento das arqueias metanogênicas nos reatores. Segundo Chen *et al.* (2001), o arraste desses microrganismos se dá pelo fato da velocidade específica máxima de crescimento das arqueias metanogênicas ($\mu_{\text{máximo}} = 0,0167 \text{ h}^{-1}$) serem significativamente inferiores quando comparada aos microrganismos acidogênicos ($\mu_{\text{máximo}} = 0,083 \text{ h}^{-1}$). Essa constatação mostra que os microrganismos metanogênicos são incapazes de se reproduzir ou manter-se em equilíbrio nessas condições, fazendo com que eles sejam eliminados do reator. O que é interessante para a produção fermentativa de hidrogênio.

2.5.4 Temperatura

A temperatura é outro fator que influencia as atividades dos microrganismos fermentativos produtores de hidrogênio. Tem sido demonstrado que uma faixa adequada de aumento de temperatura poderia aumentar a capacidade dos microrganismos produtores de hidrogênio durante a produção fermentativa, porém a temperatura a níveis muito elevados poderia reduzir significativamente a atividade das produtoras de hidrogênio (WANG e WAN,

2008). As faixas ótimas de temperatura relatadas na literatura para a produção fermentativa de hidrogênio não tem sido sempre as mesmas, essas faixa estão dentro da faixa mesofílica (cerca de 37 °C) e termofílica (cerca de 55 °C) (LI e FANG, 2007).

A glicose e a sacarose foram os substratos mais utilizados durante os estudos para avaliar o efeito da temperatura sob condições fermentativas para a produção de hidrogênio (WANG e WAN, 2009). Além disso, a maioria dos estudos apresentados na literatura para avaliar o efeito da temperatura foram realizados em modo batelada. Decorrente desta constatação, os estudos em modo contínuo são recomendados, para melhor entendimento do efeito desse parâmetro. Wang e Wan (2008) reportaram que a concentração de etanol em testes em batelada aumentou com a elevação da temperatura de 20 °C a 35 °C, porém reduziu quando ocorreu um novo aumento da temperatura de 35 °C a 55 °C. Seus resultados também mostraram que a concentração de ácido acético nos ensaios em batelada aumentou com a elevação da temperatura de 20 °C a 35 °C, porém tenderam a reduzir com o aumento da temperatura de 35 °C a 55 °C. As mudanças na concentração de etanol e na concentração de ácido acético dos metabólitos solúveis de cada ensaio em batelada com o aumento da temperatura pode resultar na mudança da rota metabólica induzida pelas diferentes bactérias que foram dominantes em cada temperatura. Além disso, a concentração de ácido propiônico e ácido butírico modificaram consideravelmente com o aumento da temperatura de 20 °C a 55 °C, porém eles foram muito baixos, atingindo valores não detectáveis.

2.5.5 Tratamento do inóculo

A fim de alcançar um alto rendimento de produção de H₂, uma consideração fundamental seria impedir o crescimento de microrganismos metanogênicos consumidores de hidrogênio. Diversos estudos vêm se desenvolvendo em manipular alguns parâmetros para

bloquear o desenvolvimento de culturas metanogênicas, como por exemplo, operar sistemas com baixo pH, baixas temperaturas e curto tempo de retenção celular (LIN e CHANG, 1999; NOIKE e MIZUNO, 2000; MU *et al.*, 2007). Outros métodos para enriquecer as culturas produtoras de hidrogênio são: o tratamento ácido e térmico do inóculo para remover as bactérias não formadoras de esporos, tais como as metanogênicas, a partir do inóculo anaeróbio (VAN GINKEL *et al.*, 2001; IYER *et al.*, 2004; LOGAN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2002).

Os tratamentos térmico e ácido foram comparados para a produção de hidrogênio e foi observado que o tratamento térmico promoveu um maior rendimento de produção de hidrogênio quando comparado ao tratamento ácido do inóculo (OH *et al.*, 2003).

Kim *et al.* (2006) realizaram um pré-tratamento à 90°C por 10 minutos para selecionar bactérias acidogênicas. Análises dos perfis de DGGE mostraram que todas as bactérias acidogênicas estavam relacionadas com *Clostridium*. Esses resultados foram consistentes às altas produções volumétricas de hidrogênio e razão ácido butírico/ácido acético para as concentrações de sacarose avaliada (10 g DQO L⁻¹ a 60 g DQO L⁻¹). O pré-tratamento foi suficiente para excluir arqueias metanogênicas durante longos tempos de operação. No entanto, algumas acetogênicas e produtoras de lactato sobreviveram, pois constituem bactérias formadoras de esporo.

2.6 Produção de hidrogênio: ênfase em biorreatores

Os diversos tipos de reatores existentes que são utilizados para a produção de hidrogênio possuem diferentes propriedades e a comparação desses reatores tem sido conduzido por diversos estudos. Por exemplo, Zhang *et al.* (2008) compararam um reator contendo biofilme aderido e um leito granular e concluíram que o reator contendo leito

granular foi superior ao reator contendo biofilme aderido para a produção contínua de hidrogênio, pois o reator contendo biofilme granular possui maior habilidade para a retenção da biomassa (Tabela 2.2). No entanto, o reator contendo biofilme aderido, também apresentou desempenho satisfatório para a produção de hidrogênio.

A Tabela 2.2 apresenta os principais estudos comparativos das condições operacionais e eficiência na produção fermentativa de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e reatores anaeróbios de leito fluidificado.

Tabela 2.2 – Estudos comparativos das condições operacionais e eficiência na produção fermentativa de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e reatores anaeróbios de leito fluidificado.

Reator Temperatura	Microrganismo Pré-tratamento	Imobilização da Biomassa Material Suporte	Substrato Concentração	TDH pH	HY TCO	Referência
RALFV (fluxo vertical) 35°C	Lodo de ETE Ácido	Aderido Argila expandida	Sacarose 20 g DQO L ⁻¹	0,5–5 h 6,7	0,08–1,14 mol H ₂ /mol sacarose ^a 96–960 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Chang <i>et al.</i> (2002)
RALFH (fluxo horizontal) 30°C	Fermentação Natural Nenhum	Aderido Argila expandida	Glicose 2 g L ⁻¹	0,5 h 3,9–7,3	1,81–2,48 mol H ₂ /mol glicose 96 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Leite <i>et al.</i> (2008)
RALF 35°C	Lodo de ETE Ácido e térmico 70°C – 30 min	Imobilizado Gel de alginato	Sacarose/ 20 g DQO L ⁻¹	1–6 h 5,8–6,8	0,126–2,67 mol H ₂ /mol sacarose 80–480 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Wu <i>et al.</i> (2003)
RALF (draft tube) 40°C	Lodo de ETE Térmico 100°C – 1 h	Imobilizado Gel de silicone	Sacarose 5–40 g DQO L ⁻¹	2,2–8,9 h ---	1,83–4,98 mol H ₂ /mol sacarose 13,5–436,4 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Lin <i>et al.</i> (2006)
RALF 35°C	Lodo de ETE Ácido	Aderido Celite R-633	Glicose 5 or 10 g L ⁻¹	1,4–5,6 h 6,0	0,15–1,35 mol H ₂ /mol glicose ^a 21,4–85,7 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Koskinen <i>et al.</i> (2007)
RALF 37°C	Lodo de ETE Térmico 105°C – 45 min	Aderido Carvão ativado	Glicose 10 g L ⁻¹	0,5–4 h 4,0	0,94–1,19 mol H ₂ /mol glicose 60–480 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> (2007)
RALFV (fluxo vertical) 35°C	Fermentação Natural Nenhum	Aderido argila, carvão vegetal e polietileno	Sacarose 1 g DQO L ⁻¹	0,5 e 2 h 4,0–6,5 ^a	3,27–4,52 mol H ₂ /mol sacarose 12,00–48,00 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Fernandes (2008)
RALFV (fluxo vertical) 25°C	Fermentação Natural Nenhum	Aderido Polietileno de baixa densidade	Efl. refrigerante 1,992 g DQO L ⁻¹	0,5 h 6,0	2,5–4,2 mol H ₂ /mol sacarose 71,30–258,51 kg DQO m ⁻³ d ^{-1 a}	Peixoto (2008)
RALF 30°C	Lodo de suinocultura Térmico 90°C – 10 min	Aderido Argila expandida	Glicose 2 g L ⁻¹	8–1 h 3,50–4,39	1,84–2,29 mol H ₂ /mol glicose 13,57–104,20 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Shida (2008)
RALF 30°C	Lodo de suinocultura Térmico 90°C – 10 min	Aderido Poliestireno, pneu triturado e PET	Glicose 4 g L ⁻¹	8–0,5 h 4,85–6,10, 4,47–5,85 e 4,44–5,67	0,90–1,90, 1,20–2,15 e 1,14–1,87 mol H ₂ /mol glicose 20,9–291,9 24,52–311,86 e 28,17– 445,83 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	Barros (2009)
RALF 40°C	Lodo de ETE Térmico 100°C – 1 h	Imobilizado Etileno-acetato de vinila	Sacarose 5–40 g DQO L ⁻¹	6–2 h -	2,31–4,26 mol H ₂ /mol sacarose 34,7–833,3 kg DQO m ⁻³ d ^{-1 a}	Lin <i>et al.</i> (2009)

^a Baseado nos dados dos artigos.

2.6.1 Reator anaeróbio de leito fluidificado

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

Lin *et al.* (2006) operaram um reator de leito fluidificado com tubo draft contendo partículas de silicone gel com células imobilizadas para a produção de hidrogênio. Os autores avaliaram a influência do TDH de 8,9 h; 6,0 h; 3,0 h e 2,2 h sobre a produção de hidrogênio. Foi utilizado lodo proveniente de uma estação de tratamento de águas residuárias e foi submetido a um pré-tratamento a 100 °C por 1 h.

Os mesmos autores observaram que, durante a operação com DQO de 20 g DQO L⁻¹, a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 1,4 a 1,9 vezes com a redução do TDH de 8,9 h para 3 h, enquanto que em TDH de 3 h e 2,2 h as produções volumétricas de hidrogênio foram similares. O rendimento de produção de hidrogênio variou entre 2,62 e 4,28 mol H₂/mol sacarose em TDH de 8,9 h a 3 h e depois reduziu para 1,9 mol H₂/mol sacarose em TDH de 2,2 h.

Ao contrário do rendimento da produção de hidrogênio e da produção volumétrica de hidrogênio, o conteúdo de hidrogênio no biogás e a conversão de sacarose não sofreram variação com o TDH. O conteúdo de hidrogênio foi mantido entre 40% e 44% e a média de conversão de sacarose foi de 92% a 99%, sugerindo a estável e a eficiente utilização do carbono pelas bactérias acidogênicas. Os metabólitos solúveis consistiram, principalmente, de

ácido butírico e acético, variando de 62% a 73% e 17% a 23% do total dos produtos metabólicos formados, respectivamente.

A produção de ácido propiônico e etanol foram, relativamente, insignificantes, com valores inferiores a 19% do total dos produtos metabólicos formados. A razão ácido butírico e ácido acético (H_{Bu}/H_{Ac}), frequentemente utilizada como indicador de desempenho para a fermentação de hidrogênio variou entre 2,9 a 4,3, sugerindo que as culturas direcionam as suas rotas metabólicas a favor da produção de hidrogênio.

Koskinen *et al.* (2007) estudaram a dinâmica da comunidade microbiana durante a produção fermentativa de hidrogênio a partir da glicose em um reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF), visando conhecer sobre a microbiologia da produção fermentativa de H₂ e fatores resultantes da instabilidade do processo de formação do biofilme. Os pesquisadores utilizaram glicose (5 g L⁻¹ ou 10 g L⁻¹) como fonte de carbono e variaram o TDH de 1,4 h a 5,6 h. A TCO variou entre 21,4 e 85,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹. O material suporte para adesão microbiana utilizado foi celite R-633. O RALF foi submetido a instabilidades operacionais, sendo logo em seguida observada uma rápida redução da produção de H₂. Os resultados obtidos mostraram que o rendimento de produção de hidrogênio variou entre 0,15 e 1,35 mol H₂/mol glicose. Além disso, o gradual enriquecimento dos microrganismos aumentou a diversidade da biomassa aderida e em suspensão durante a operação do RALF. Observou-se no início uma rápida produção de H₂ devido ao rápido crescimento de *Clostridium butyricum* (99-100%) logo após a alimentação no reator. A proporção de *C. butyricum* aderidos e em crescimento suspenso no RALF coincidiu com a produção de H₂ e butirato. A alta taxa de carregamento de glicose favoreceu a produção de H₂ através da *Escherichia coli* (100%). Observou-se redução da produção de H₂ quando ocorreu mudança na produção de acetato-butirato para acetato-propionato, decorrente das mudanças da composição da comunidade bacteriana aderida e em suspensão no RALF. Durante essa transição, organismos, incluindo

potenciais produtores de propionato, foram enriquecidos enquanto a proporção de *C. butyricum* reduziu. Os autores sugerem que a instabilidade na produção fermentativa de H_2 nos reatores de biofilme é devido ao enriquecimento e eficiente aderência sobre o material suporte de consumidoras de H_2 e, portanto, não favorecendo a produção fermentativa mesofílica de H_2 .

Zhang *et al.* (2007) operaram um reator anaeróbio de leito fluidificado preenchido com carvão ativado como material suporte para adesão da biomassa para avaliar a redução do TDH de 4 h para 0,5 h em uma concentração de glicose de 10 g L^{-1} . Sob condições ácidas (pH 4,0) e temperatura de 37°C , a conversão da glicose reduziu aparentemente, de 99,47% em TDH de 4 h para 71,44% em TDH de 0,5 h. A composição de hidrogênio reduziu levemente de 61,2% para 57,2% quando o TDH foi reduzido. Foi encontrado um rendimento de produção de hidrogênio de $0,94 \text{ mol } H_2/\text{mol glicose}$, em TDH de 4 h e estabilizou em $1,12\text{-}1,19 \text{ mol } H_2/\text{mol glicose}$ (média $1,16 \pm 0,03$) entre o TDH de 0,5 h e 2 h. Ambas a produção volumétrica e a produção específica de hidrogênio aumentaram significativamente com a redução do TDH, com um valor máximo em TDH de 0,5 h de $2,22 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e $4,18 \text{ mmol } H_2 \text{ g}^{-1} \text{ SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Além disso, a biomassa aderida foi altamente correlacionada com o TDH, aumentando de $8,1 \text{ g SSV L}^{-1}$ para $21,5 \text{ g SSV L}^{-1}$, com a redução do TDH de 4 h para 0,5 h. Em geral, os metabólitos solúveis foram em ordem decrescente, ácido acético (43% a 46%), ácido butírico (20% a 31%), etanol (14% a 21%), ácido capróico (7% a 10%), seguida por uma insignificante quantidade de ácido propiônico (0% a 3%). Os metabólitos reduziram levemente quando o TDH foi reduzido com exceção do ácido butírico que inicialmente aumentou, mas diminuiu com a redução do TDH de 1 h para 0,5 h.

Shida (2008) avaliou a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em um reator anaeróbio de leito fluidificado contendo argila expandida como material suporte. O reator foi inoculado com lodo pré-tratado termicamente a 90°C por 10 minutos para o enriquecimento

do inóculo acidogênico. O reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8 h a 1 h e foi alimentado com água residuária sintética contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose. A operação contínua teve duração de 178 dias, e em cada TDH o reator foi operado durante, aproximadamente, 30 dias. A 30°C e pH de 3,8, cerca de 92 a 98% da glicose foi removida. A redução do TDH de 8 h a 1 h conduziu a um aumento na produção volumétrica de hidrogênio de 0,28 para 1,15 L h⁻¹ L⁻¹, respectivamente. A máxima produção volumétrica de hidrogênio, de 1,15 L h⁻¹ L⁻¹, foi obtida em TDH de 1 h. Em geral, o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com a redução do TDH, de 1,84 mol H₂/mol glicose em TDH de 8 h para 2,29 mol H₂/mol glicose em TDH de 2 h. O biogás não continha metano e o conteúdo máximo de hidrogênio foi de 37% em TDH de 2 h. Foi observada uma correlação linear entre a produção volumétrica de hidrogênio e a taxa de carregamento orgânico (TCO). Ainda, a TCO máxima de 104 kg m⁻³ d⁻¹ não inibiu a produção de hidrogênio. Os maiores metabólitos solúveis foram o ácido butírico (44,64-52,52%) e o ácido acético (41,17-47,48%) com insignificante concentração de etanol (inferior a 10%). A produção de hidrogênio estável e a porcentagem de ácido butírico sobre o ácido acético indicam que o tratamento térmico do lodo foi efetivo e uma típica fermentação do tipo ácido butírico pode ser assegurada por *Clostridium*. Além disso, foram alcançados bons desempenhos de produção de hidrogênio sob condições de pH em torno de 4,0.

Lin *et al.* (2009) utilizaram etileno-acetato de vinila (EVA) como suporte para imobilização da biomassa para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado. O desempenho do reator alimentado com meio sintético a base de sacarose foi analisado sob diferentes concentrações de sacarose (5 g DQO L⁻¹, 10 g DQO L⁻¹, 20 DQO g L⁻¹ e 40 DQO g L⁻¹) e TDH (6 h, 4 h e 2 h). A maior produção volumétrica de hidrogênio foi de 1,80 ± 0,02 L h⁻¹ L⁻¹ e ocorreu em TDH de 2 h e 40 g DQO L⁻¹, enquanto o rendimento máximo de produção de hidrogênio (4,26 ± 0,04 mol H₂/mol sacarose) foi obtido

em TDH de 6 h e 20 g DQO L⁻¹. O conteúdo de hidrogênio no biogás foi mantido estável em 40% ou acima. Os principais metabólitos solúveis foram ácido butírico e ácido acético, com os dois produtos representando 74-83% do total dos produtos microbianos solúveis formados durante a produção fermentativa de hidrogênio.

2.6.1.1 Materiais suporte para adesão microbiana

O tipo e a forma da partícula suporte, utilizada para a adesão dos microrganismos, pode melhorar o desempenho do reator e diminuir o fenômeno de inibição (KINDZIERSKI *et al.*, 1992). O desenvolvimento e manutenção do biofilme formado nos reatores de leito fluidificado são importantes para garantir alta eficiência no sistema de tratamento. Entretanto, a formação do biofilme depende das características das bactérias, da vazão afluyente e das características do meio suporte (KURODA *et al.*, 1988).

Segundo Kindzierski *et al.* (1992), para avaliar os benefícios do material suporte de reatores biológicos é necessário considerar parâmetros que influenciam na interação meio suporte-microrganismo. As características que influenciam a adesão inicial e aderência dos microrganismos no meio suporte incluem: área e aspereza superficiais, volume dos poros, energia livre e carga. Além disso, são importantes: pH, concentração do eletrólito, fatores hidrodinâmicos do meio líquido e a carga superficial dos microrganismos.

Contudo, existe pouca diversidade entre os materiais suporte empregados em reatores anaeróbios de leito fluidificado utilizados para a produção de hidrogênio. Entre eles, podemos citar: gel de alginato (WU *et al.*, 2003), gel de silicone (LIN *et al.*, 2006), celite (KOSKINEN *et al.*, 2007), carvão ativado (ZHANG *et al.*, 2007), argila expandida (SHIDA, 2008), poliestireno (BARROS, 2009), pneu inservível triturado (BARROS, 2009), politereftalato de etileno (PET) (BARROS, 2009), etileno-acetato de vinil (LIN *et al.*, 2009). No entanto, entre

esses estudos somente o de Barros (2009) comparou material suporte para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado.

Barros (2009) avaliou a influência de diferentes materiais suporte (poliestireno - R1, pneu inservível triturado - R2 e PET - R3) na produção de hidrogênio utilizando três reatores anaeróbios de leito fluidificado. Cada reator possuía um volume total de 4192 cm³, alimentado com meio contendo glicose como fonte de carbono (4000 mg L⁻¹), com pH afluente em torno de 7,0 e efluente em torno de 5,5, com tempo de detenção hidráulica (TDH) variando entre 8 h e 0,5 h a uma temperatura de 30°C ± 1°C, com tratamento térmico do inóculo.

O reator contendo pneu inservível triturado (R2) apresentou maior rendimento de H₂ (2,15 mol H₂/mol glicose), maior conteúdo de H₂ no biogás (52,97%) e maior conversão de glicose (90%). Entretanto, o reator contendo PET (R3) apresentou maior produção volumétrica de H₂, 1,07 L h⁻¹ L⁻¹, um parâmetro secundário na análise de desempenho dos reatores. Em todos os reatores, a produção volumétrica de hidrogênio e o conteúdo de H₂ no biogás aumentaram com a redução do TDH de 8 h para 1 h e o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 h para 2 h.

Os metabólitos solúveis predominantes em todos os reatores foram ácidos acético, butírico, láctico e etanol, havendo uma pequena produção de ácido propiônico, sendo o reator contendo pneu inservível triturado (R2) o que mais produziu ácidos acético e butírico (42,0% e 36,5%, respectivamente).

O melhor desempenho do reator contendo pneu inservível triturado (R2) pode ser atribuído por apresentar rugosidade superior aos demais materiais empregados, acumulando uma maior quantidade de biomassa aderida e uma maior quantidade de bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio. Houve predominância de bacilos semelhantes à *Clostridium* sp. no biofilme de todos os materiais suporte.

2.7 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica

Esta revisão resume sobre os métodos de produção biológica de hidrogênio, os fatores que a influenciam e os principais reatores biológicos envolvidos para a produção biológica. Além disso, apresenta o avanço nos estudos relacionados à produção biológica de hidrogênio, bem como introduzir brevemente e discuti-los, seguido por algumas sugestões para futuros estudos relacionados à produção fermentativa de hidrogênio.

Ainda, a partir da revisão da literatura, foi obtido melhor entendimento de várias questões relacionadas à produção de hidrogênio. As informações obtidas permitiram a ampliação dos conhecimentos referentes aos reatores combinados, concebidos a partir de observações em estudos tratando esse tipo de água residuária. Os sistemas biológicos apresentam-se como uma alternativa promissora para produção de hidrogênio, principalmente por englobar a remoção de material orgânico quanto de nutrientes. O mesmo pode ser afirmado para os reatores de leito fluidificado, os quais possuem alta concentração de biomassa e alto tempo de retenção celular, propiciando a construção de sistemas de produção de hidrogênio de alto desempenho.

Por meio da revisão da literatura, com o objetivo de avaliar o desempenho de reatores de leito fixo e fluidificado, na produção de hidrogênio, obteve-se melhor compreensão dos diversos assuntos relacionados a esta pesquisa de doutorado, auxiliando nas discussões dos resultados obtidos neste trabalho.

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

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 Tratamento térmico do inóculo

Os reatores foram inoculados com lodo proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) que tratava água residuária de suinocultura, fornecido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP), Campus Jaboticabal. A Figura 3.1 mostra a instalação piloto dos reatores UASB da UNESP-Jaboticabal, onde foi coletado o lodo para desenvolvimento deste trabalho.

Figura 3.1 – Instalação piloto dos reatores UASB da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP), Campus Jaboticabal.

O lodo foi submetido a um pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia proposta por Maintinguer *et al.* (2008), adaptada de Kim *et al.* (2006). O pré-tratamento consistiu de um aquecimento prévio do lodo por 10 minutos a 90 °C com monitoramento de um termômetro e, em seguida o lodo foi colocado em banho de gelo até que a temperatura atingisse 25 °C. Esse tratamento térmico possibilitou a eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos, e mantiveram as células acidogênicas com capacidade de formar endósporos, estruturas de resistência a condições desfavoráveis.

3.2 Meio fermentativo

A água residuária sintética foi composta por glicose como principal fonte de carbono e preparada de acordo com Del Nery (1995). As características da água residuária estão apresentadas na Tabela 3.1. Optou-se por operar quatro reatores sem adição de agente alcalinizante, para que o próprio atingisse autoequilíbrio do pH. Outros quatro reatores foram operados com adição de agente alcalinizante para controle do pH, atingindo valores efluentes próximos a 5,5 (ver Tabela 3.4).

Tabela 3.1 - Composição da água residuária sintética a base de glicose.

Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
Glicose	2000/4000/10000/25000
Ureia	125,0
Sulfato de Níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Cloreto férrico	0,5
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Oxido de selênio	0,07
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4

A alimentação dos nutrientes para preparo da solução foi feita com valores constantes desde o início ao fim da operação de cada reator conforme apresentado na Tabela 3.1. As relações carbono/nitrogênio (C/N) foram de 40, 80, 200 e 500.

A água residuária foi armazenada em caixa d'água de 310 L, a qual foi substituída todos os dias. Para garantir anaerobiose no reator foi acoplado um filtro, correspondendo a um corpo de uma seringa de 60 mL preenchida com gaze hidrófila, na caixa d'água de alimentação, com o objetivo de apenas impedir a possível contaminação por alguma impureza encontrada na atmosfera local (ver Figura 3.5), o qual à medida que o substrato de alimentação fosse retirado do reservatório, o mesmo não seria contaminado com a atmosfera ambiente, evitando, assim, a contaminação no reator.

Durante a realização da parte experimental do presente trabalho (120 dias) foi efetuada variação progressiva no tempo de detenção hidráulica de 8 h a 1 h, a fim de avaliar o desempenho do reator.

3.3 Material suporte

Os reatores foram preenchidos com partículas não uniformes de argila expandida (cinasita) para a adesão da biomassa. As características físicas da argila expandida são apresentadas na Tabela 3.2 e estão de acordo com Ortega *et al.* (2001).

Tabela 3.2 - Características físicas da argila expandida (cinasita) segundo Ortega *et al.* (2001).

Características	Valor
Densidade real (g cm^{-3})	1,50
Densidade aparente (g cm^{-3})	1,06
Diâmetro médio do poro (μm)	0,19

A argila expandida foi adquirida como pedras para uso de jardinagem. Inicialmente, as pedras foram lavadas e foi observado que algumas pedras afundavam enquanto outras flutuaram na água. Apenas as pedras com densidade maior que a da água foram submetidas ao tratamento para a preparação do material suporte. Essas pedras foram, então, lavadas novamente, quebradas e separadas por tamanho. À medida que as pedras foram quebradas, essas foram peneiradas e separadas numa faixa granulométrica de 2,8-3,35 mm.

Para o preenchimento dos reatores, as partículas de argila expandida foram novamente lavadas e aquelas partículas que flutuaram na água foram descartadas.

Na Figura 3.2(a) estão as pedras de argila expandida adquiridas para o tratamento e, na Figura 3.2(b), a argila expandida pronta como material suporte para a imobilização da biomassa.

(a)

(b)

Figura 3.2 - Partículas de argila expandida para utilização como suporte para aderência das populações microbianas. (a) sem tratamento, (b) com tratamento.

As condições fluidodinâmicas do reator, tais como velocidade de mínima fluidificação e vazão de recirculação para a argila expandida, foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga. As características como dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação são apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação para as partículas de argila expandida.

Partícula	Φ (mm)	ρ (g cm ⁻³)	V_{mf} (cm s ⁻¹)
Argila expandida	2,8 - 3,35	1,50	1,24

3.4 Reator anaeróbio de leito fluidificado

Foram utilizados para a realização do experimento oito reatores semelhantes. Eles foram construídos em acrílico transparente de 5 mm de espessura e apresenta as seguintes dimensões: altura de 190 cm e diâmetro interno de 5,3 cm. Os amostradores intermediários ao longo do comprimento do reator foram colocados a 20 cm, 40 cm, 70 cm, 110 cm e 160 cm da base do reator. A temperatura foi mantida em 30 ± 1 °C por meio de encamisamento do reator em banho termostatizado. O reator possuía um volume total de 4192 cm³, deste, aproximadamente 2105 cm³ foi ocupado pelo suporte.

A Figura 3.3 mostra o esquema da instalação piloto do reator anaeróbio de leito fluidificado que foi utilizada para o estudo de produção de hidrogênio, apresentando todos os componentes utilizados durante a operação do sistema.

Figura 3.3 – Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.

A bomba de alimentação utilizada foi a DOSITEC, modelo DLX MA/A, cuja vazão e pressão máxima foram de 1 L h^{-1} e 15 Bar, respectivamente, e bomba de recirculação utilizada foi a ECOSAN-Bomba dosadora, cuja vazão varia de 10 a 200 L h^{-1} e pressão de 6 kg cm^{-2} .

O sistema para manter o reator com temperatura constante utilizado foi banho ultratermostatizado Marconi modelo 184.

A Figura 3.4 mostra uma fotografia do reator utilizado e a Figura 3.5 apresenta, em detalhe, alguns dos componentes do reator anaeróbio de leito fluidificado.

Figura 3.4 – Reator anaeróbio de leito fluidificado.

Figura 3.5 – Componentes do experimento: (a) distribuidor da alimentação; (b) topo do reator; (c) reservatório de alimentação (caixa d'água).

3.5 Partida e condições operacionais dos reatores para a produção de hidrogênio

Para facilitar a discussão dos resultados e identificar os reatores, optou-se por nomear cada reator com quatro caracteres, significando a concentração de glicose aplicada e a adição ou não de alcalinidade. Exemplo: R2SA: Reator contendo 2000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade; R2CA: Reator contendo 2000 mg L^{-1} de glicose, com adição de alcalinidade. Todos os reatores estão identificados na Tabela 3.4.

No tratamento biológico de efluentes industriais, em especial àqueles projetados para remoção de alta carga orgânica, torna-se necessário à adaptação da população microbiana para que ela seja capaz de degradá-los, garantindo o bom desempenho do processo. O método

utilizado para a adaptação da biomassa foi o da adaptação dos microrganismos no próprio reator, contendo as partículas de argila expandida utilizadas como meio suporte para adesão microbiana, utilizando-se como inóculo a biomassa proveniente de reator UASB conforme citado no item 3.1. Com a finalidade de manter a atividade microbiana do inóculo utilizado, água residuária sintética contendo glicose com concentrações de 2.000, 4.000, 10.000 e 25.000 mg L⁻¹ foram utilizadas como despejo sintético na alimentação do reator.

O primeiro passo desta etapa foi ajustar as condições fluidodinâmicas do reator. Para isto, foram utilizados os dados experimentais de velocidade de mínima fluidificação, para partículas de argila expandida de 2,80-3,34 mm de diâmetro no mesmo reator de leito fluidificado utilizado neste trabalho. Com estes dados foi possível calcular a vazão de recirculação necessária para que o reator atingisse as condições de fluidificação, ou seja, correspondente a 1,3 vez V_{mf} . O valor da velocidade de mínima fluidificação para a partícula de argila expandida foi de 1,24 cm s⁻¹, porém o utilizado durante a operação do sistema foi 1,612 cm s⁻¹ (1,3 vez V_{mf}) e com o uso de um medidor de vazão acoplado no reator a bomba foi regulada. A Tabela 3.4 apresenta as massas de argila expandida e as alturas de leito fixo ocupada pelo suporte em cada reator.

A próxima etapa foi o acionamento da bomba dosadora da ECOSAN, deixando o sistema permanecer em recirculação como se estivesse em batelada com uma vazão de recirculação de 128 L h⁻¹, correspondendo a 1,3 vez a vazão mínima de fluidificação. A altura de fluidificação atingida para cada reator está apresentada na Tabela 3.4. Nesta fase, monitorou-se a concentração de glicose da água residuária contendo inóculo para que, em seguida, retirou-se o reservatório de inóculo, acoplando mangueira de alimentação, passando assim a operar o sistema continuamente.

A Figura 3.6 mostra o esquema da instalação piloto do reator anaeróbio de leito fluidificado durante a etapa de partida.

Figura 3.6 – Esquema da instalação do reator anaeróbico de leito fluidificado durante a etapa de inoculação/adaptação.

A Tabela 3.4 mostra os parâmetros utilizados nos reatores anaeróbios de leito fluidificado durante a etapa de inoculação e operação contínua.

Tabela 3.4 – Parâmetros utilizados nos reatores anaeróbios de leito fluidificado.

Reator	Q_r (L h ⁻¹)	M (g)	H_o (cm)	H_f (cm)	C_g (mg L ⁻¹)	Adição de alcalinidade
R2SA	128	1200	90	120	2000	-
R2CA					2000	Bicarbonato de sódio (1 g L ⁻¹) HCl 10M (1 mL L ⁻¹)
R4SA					4000	-
R4CA					4000	Bicarbonato de sódio (1 g L ⁻¹) HCl 10M (1 mL L ⁻¹)
R10SA					10000	-
R10CA					10000	Bicarbonato de sódio (1 g L ⁻¹) HCl 10M (1 mL L ⁻¹)
R25SA					25000	-
R25CA					25000	Bicarbonato de sódio (1 g L ⁻¹) HCl 10M (1 mL L ⁻¹)

onde: Q_r : vazão de recirculação;

M : massa de partículas usada no reator;

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

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

C_g : concentração de glicose no inóculo.

A inoculação foi efetuada introduzindo-se no reator anaeróbio de leito fluidificado o inóculo desenvolvido em barrilete (20 L) contendo 15 L de solução (água residuária e inóculo), desses, 10% correspondia ao lodo de reator anaeróbio e o restante, água residuária sintética contendo glicose e suplementos apresentados na Tabela 3.1. Foi adicionado

nitrogênio no “*headspace*” do barrilete, para garantir condições de anaerobiose. O barrilete foi mantido em recirculação no reator através de uma bomba de deslocamento positivo e a temperatura do reator foi controlada em 30 °C, controlada através de banho ultratermostatizado.

Neste experimento adotou-se o sistema de recirculação entre o barrilete e o reator com o objetivo de adaptar o lodo no próprio reator, objetivando realizar uma partida rápida.

Durante 48 horas, o reator foi operado em circuito fechado (modo batelada). Durante este período, para analisar o consumo de substrato pelos microrganismos foram retiradas amostras periódicas para análise da concentração de glicose e à medida que a glicose era consumida, adicionava-se solução para reposição da glicose no barrilete de alimentação.

Os oito reatores começaram a receber afluente de forma contínua após o período de 48 horas de recirculação (ver Figura 3.3), sendo quatro reatores com concentrações de glicose de 2000, 4000, 10000 e 25000 mg L⁻¹, sem adição de agente alcalinizante e quatro outros reatores com as mesmas concentrações e com a adição de 1 g L⁻¹ de bicarbonato e 1 mL L⁻¹ de HCl 10M, como agente alcalinizante (ver Tabela 3.4). A vazão de alimentação pela bomba DOSITEC foi de 524 mL h⁻¹, correspondendo ao tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8 h, sendo posteriormente reduzido para 6 h (698 mL h⁻¹), 4 h (1048 mL h⁻¹), 2 h (2096 mL h⁻¹) e 1 h (4192 mL h⁻¹) por 120 dias em cinco fases experimentais.

3.6 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram efetuadas periodicamente. Todas as análises foram realizadas em amostras filtradas em membrana 0,45 µm, exceto sólidos voláteis totais. As análises de pH, DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram feitas de acordo com o APHA: Standard Methods for the Examination

of Water and Wastewater (1998). As concentrações de ácidos voláteis totais, expressas como ácido acético foram analisados de acordo com metodologia proposta por Dillalo e Albertson (1961) e alcalinidade, como CaCO_3 , conforme metodologia modificada por Ripley *et al.* (1986).

3.6.1 Determinação da glicose

As determinações de glicose na solução do substrato afluente e efluente do reator foram realizadas pelo método da reação enzimática com glicose oxidase, fornecida pela LABORLAB. O mesmo método foi utilizado com sucesso por Shida (2008).

Alíquotas de 50 μL de amostra foram adicionadas em tubos contendo 5 mL de reativo de trabalho. O reativo de trabalho foi composto de reativo enzimático contendo glicose oxidase (≥ 3000 U) e peroxidase (≥ 400 U), 0,0015 mol de reativo de cor (1) contendo 4 aminofenazona 0,025 mol L^{-1} e tampão TRIS 0,92 mol L^{-1} , e 0,00275 mol de reativo (2) contendo fenol 0,055 mol L^{-1} . Os tubos foram incubados a 37°C durante 10 minutos em banho-maria. Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (aparelho Hatch, modelo DR 2010) a 505 nm, zerando o aparelho em absorbância com um branco.

3.6.2 Determinação do hidrogênio

A determinação do gás hidrogênio foi efetuada por meio da retirada de 0,1 mL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa “gastight” com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm) e detector de condutividade térmica e, o gás de arraste foi o argônio sob fluxo de 21,9 cm s^{-1} .

As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram 30°C, 200°C e 230°C, respectivamente. A produção volumétrica de hidrogênio foi medida por meio do MilliGas-counter da Ritter.

3.6.3 Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois

A análise cromatográfica para determinação dos ácidos voláteis e solventes foi desenvolvida pelo Laboratório de Processos Biológicos – Setor Cromatografia do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) (MAINTINGUER *et al.*, 2008). Foi utilizado o cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com detector de ionização de chama e amostrador automático para “headspace” COMBI-PAL, modelo AOC 5000 e coluna HP-INNOWAX, de 30m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme. Para a determinação dos ácidos voláteis e dos solventes as condições cromatográficas foram:

- Temperatura do injetor = 250°C, razão de split = 1.
- Temperatura do forno: 35°C (0') 2°C/min. 38°C (0') 10°C/min. 75°C (0') 35°C/min. 120°C (1') 10°C/min. 170°C (2'), gás de arraste: hidrogênio.
- Temperatura do detector = 280°C, gás auxiliar (N₂): 30 mL min⁻¹; ar sintético: 300 mL min⁻¹. e hidrogênio: 30 mL min⁻¹.

As condições do amostrador automático de “headspace” COMBI-PAL, AOC 5000 para a injeção das amostras foram:

- Seringa de 2,5 mL;
- Temperatura da seringa: 90°C;

- Volume injetado: 400 µL;
- Temperatura de incubação da amostra: 100°C;
- Tempo de incubação da amostra: 13 minutos.

3.6.4 Exames microscópicos

Foram realizados exames microscópicos das amostras do reator para as fases de operação, através de luz comum em microscópio Olympus BX60-FLA. As imagens foram captadas através da câmera Optronics e software Image Pro-Plus versão 3.0.1, sendo possível observar microrganismos presentes nas amostras.

3.6.5 Caracterização microbiológica do biofilme anaeróbio

A morfologia das bactérias e a análise estrutural do biofilme foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (Digital Scanning Microscope DSM 960, ZEISS). As amostras de biopartículas foram lavadas com solução tampão fosfato, permitindo que os microrganismos se fixassem naturalmente na partícula. Os microrganismos foram fixados as biopartículas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, permanecendo por 12 h. Após a fixação, as biopartículas foram desidratadas pelas lavagens sucessivas em 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% de etanol, em seguida, secas em estufa bacteriológica a 35 °C, logo após, coberto com ouro e, finalmente, observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (VARESCHE et al, 1997). O microscópio eletrônico utilizado foi o ZEISS DSM 960 do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

3.6.6 Avaliação da comunidade microbiana por técnica de biologia molecular

As amostras utilizadas para a técnica de biologia molecular foram provenientes do reator R2CA (2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade). Foi escolhido este reator, pois seus resultados foram bastante positivos e ainda as amostras apresentaram melhores condições para extração do DNA. Além disso, a técnica possui um custo bastante elevado e leva um tempo considerável para ser realizada. Essa técnica foi realizada pelo Laboratório de Processos Biológicos – Setor Microbiologia do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP).

A extração do DNA da amostra, foi realizada de acordo com o protocolo de Griffiths *et. al* (2000) modificado.

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com *primers* 27F - 1100R (LANE, 1991). O programa para a PCR (termociclador Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré desnaturação de 94°C por 5 minutos; com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 55°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto e 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; resfriamento a 4°C. A purificação do produto da PCR foi feita com o *Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification* (GE Healthcare).

Na clonagem utilizou-se o pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) para a biblioteca clones, com células competentes de *E. coli*. Utilizou-se aproximadamente 60 clones no sequenciamento dos nucleotídeos.

A amplificação do DNA plasmidial foi feita pela reação da polimerase em cadeia (PCR) com *primers* M13F – M13R (MESSING, 1983). O programa para a PCR (termociclador “Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré desnaturação a 94°C por 2 minutos; com 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 55°C por 1

minuto; extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 7 minutos; resfriamento a 4°C.

O sequenciamento dos nucleotídeos foi feito no sequenciador ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O consenso das sequências obtidas foi realizado no programa “SeqMan” do software DNASTAR (Lasergene sequence analysis), em seguida essas sequências foram comparadas no Banco de Dados NCBI-database para aproximação da identidade filogenética.

3.6.7 Frequência das análises químicas e microbiológicas

Para facilitar a análise dos resultados, a pesquisa foi dividida em cinco fases, principalmente em função dos diferentes tempos de detenção hidráulica.

Nas Tabelas 3.5 e 3.6 apresentam-se de forma objetiva, os valores correspondentes a concentração de glicose e TDH em cada fase de operação e suas respectivas durações para cada reator.

O TDH foi alterado quando o estado estacionário foi atingido no reator, ou seja, a estabilidade na eficiência de conversão da glicose e a formação dos produtos, como os ácidos orgânicos e o hidrogênio. Zhang *et al.* (2007) consideraram que as condições do estado estacionário foram atingidas quando as variações dos produtos e da concentração da biomassa foram menores que 10%. Somente os dados obtidos sobre as condições de estado estacionário foram relatados. Durante cada mudança de fase, partículas de argila expandida foram retiradas para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Tabela 3.5 – Fases em que a pesquisa foi desenvolvida para os reatores sem adição de agente alcalinizante.

Fase	Reator	Concentração de glicose afluente (mg L ⁻¹)	TDH (h)	Duração (Dias)
I			8	24
II	R2SA/R4SA/R10SA/R25SA	2000/4000/10000/25000	6	24
III			4	24
IV			2	24
V			1	24
			TOTAL	120

Tabela 3.6 – Fases em que a pesquisa foi desenvolvida para os reatores com adição de agente alcalinizante para controle do pH.

Fase	Reator	Concentração de glicose afluente (mg L ⁻¹)	TDH (h)	Duração (Dias)
I			8	24
II	R2CA/R4CA/R10CA/R25CA	2000/4000/10000/25000	6	24
III			4	24
IV			2	24
V			1	24
			TOTAL	120

A Tabela 3.7 apresenta a frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases de operação dos reatores.

Tabela 3.7 – Frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases de operação.

Análises	Frequência
pH	Diária
Glicose/DQO	3x semana
Produção volumétrica e rendimento de H ₂	3x semana
Conteúdo do biogás (H ₂ e CO ₂)	3x semana
Ácidos orgânicos e álcoois	3x semana
Alcalinidade/Ácidos voláteis totais	3x semana
Vazão	4x diária
ST, SST e SSV	3x semana
MEV e microscopia ótica	1x fase

3.6.8 Cálculo dos principais parâmetros

- HY: Rendimento de hidrogênio = (quantidade (mol) de H₂ produzido)/(quantidade (mol) de glicose consumida);
- HPR: Produção volumétrica de H₂ = (quantidade (L) de H₂ produzido)/(tempo (h))/(volume (L) de trabalho do reator);
- Conversão da glicose = 100 x (glicose afluenta – glicose efluente)/(glicose afluenta);
- Taxa de carregamento orgânico aplicada = DQO afluenta/TDH;
- Taxa de carregamento orgânico removida = (DQO afluenta - DQO efluente)/TDH;
- AVT = ácidos voláteis totais e SMP = metabólitos totais produzidos foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBU/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBU, relação molar do acetato com o butirato.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os principais resultados dos parâmetros analisados para avaliação do desempenho dos reatores anaeróbios de leito fluidificado empregado na presente pesquisa. As informações básicas serão apresentadas através de curvas de variação dos principais parâmetros analisados, abrangendo todo o período de coleta de dados, e são apresentadas tabelas com os valores médios correspondentes a cada fase de operação dos reatores.

4.1 Morfologias presentes no inóculo após o enriquecimento

No final das 48 horas da adaptação do inóculo, foram retiradas amostras do reator e visualizadas em microscópio óptico com a finalidade de observar as morfologias presentes.

A Figura 4.1 mostra que as morfologias encontradas são semelhantes à *Clostridium* *sp.*, *Enterobacter* *sp.*, além da presença predominante de bacilos. Essa constatação pode ser confirmada pela utilização da técnica de biologia molecular, a qual será apresentada no final deste capítulo. As morfologias encontradas nestes experimentos foram semelhantes às encontradas por Zhang *et al.* (2007), Koskinen *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Maintinguer *et al.* (2008).

Figura 4.1 - Morfologias observadas na adaptação do inóculo: (a) e (b) bacilos e morfologias semelhantes à *Clostridium* sp. e *Enterobacter* sp.

4.2 Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado (RALF)

Neste item serão apresentados os principais resultados relacionados à produção de hidrogênio no reator anaeróbico de leito fluidificado.

4.2.1 Conversão da glicose

Os reatores anaeróbios de leito fluidificado foram operados por 120 dias e, durante esse período, a produção de hidrogênio, ácidos orgânicos e solventes foram avaliadas à medida que o sistema operava sob condições de TDH de 8 h (24 dias), 6 h (24 dias), 4 h (24 dias), 2 h (24 dias) e 1 h (24 dias). À medida que o sistema alcançou um estado estacionário definido como a estabilidade na conversão da glicose e formação dos produtos desejados no reator, o TDH foi alterado.

As condições do estado estacionário no estudo de Zhang *et al.* (2007) foram consideradas alcançadas quando as variações dos produtos e da concentração da biomassa

foram inferiores a 10%. Somente os dados obtidos sobre as condições de estado estacionário foram relatados.

O presente experimento foi iniciado a partir de um período de adaptação da biomassa a uma nova condição, que consistiu na operação do reator em modo de batelada durante 48 horas. Em seguida, o sistema foi aberto em modo contínuo com TDH inicial de 8 h. A variação do TDH foi aplicada sobre o sistema a partir de mudanças de vazão de entrada da água residuária.

Os valores de vazão foram calculados dividindo-se o volume total do reator (4192 L) pelo tempo, em horas, de cada TDH estabelecido. Assim, para os TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, os valores de vazão foram, respectivamente de, 524,0 mL h⁻¹, 698,7 mL h⁻¹, 1048,0 mL h⁻¹, 2096,0 mL h⁻¹ e 4192,0 mL h⁻¹.

Para o controle das medidas de vazão, foi estabelecida uma faixa de tolerância, 10% acima e abaixo do valor teórico da vazão. A maioria dos pontos medidos foram considerados, e aqueles fora da faixa, provavelmente, devido à sensibilidade da bomba de vazão ou às oscilações na rede elétrica que contribuíram para a alteração na vazão da bomba de alimentação, foram descartados. Durante todo o experimento, a vazão foi controlada e a operação manteve-se estável (dados não apresentados).

4.2.1.1 Reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA)

A Figura 4.2 apresenta o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluente e efluente em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L⁻¹, sem adição de alcalinidade. Os altos valores da conversão da glicose, atribuída aos baixos valores de glicose verificados no efluente, demonstraram que desde o início da operação contínua o sistema mostrou-se bastante estável.

Figura 4.2 - Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

A Tabela 4.1 apresenta os valores das médias e desvio padrão da concentração de glicose afluyente e efluente e a conversão da glicose para cada etapa do processo.

Tabela 4.1 - Concentração média da glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L ⁻¹)	Glicose no efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	2379 ± 51	206 ± 97	91 ± 5
6	2377 ± 69	222 ± 94	91 ± 4
4	2408 ± 332	241 ± 38	90 ± 10
2	2173 ± 97	140 ± 39	94 ± 3
1	2065 ± 133	217 ± 12	89 ± 7

Os valores médios das concentrações de glicose afluyente em todas as etapas foram em média 2280 mg L^{-1} . A concentração média de glicose no afluyente variou de 2065 mg L^{-1} (TDH de 1 h) a 2279 mg L^{-1} (TDH de 8 h).

A concentração de glicose efluente, que representa a glicose não convertida, variou entre 140 mg L^{-1} (TDH de 2 h) e 241 mg L^{-1} (TDH de 4 h). O TDH de 2 h apresentou a menor concentração de glicose efluente ($140 \pm 39 \text{ mg L}^{-1}$), enquanto que o TDH de 4 h apresentou a maior concentração de glicose efluente ($241 \pm 38 \text{ mg L}^{-1}$). A conversão da glicose global para todas as etapas do processo foi próxima a 91%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 91%, 91%, 90%, 94% e 89%, respectivamente.

4.2.1.2 Reator contendo 2000 mg L^{-1} de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA)

A Figura 4.3 e a Tabela 4.2 apresentam o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluyente e efluente em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L^{-1} , com adição de alcalinidade. As altas conversões da glicose, atribuída aos baixos valores de glicose verificados no efluente, demonstraram que desde o início da operação contínua o sistema mostrou-se bastante estável.

Figura 4.3 - Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L^{-1} de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

Tabela 4.2. Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 2000 mg L^{-1} de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L^{-1})	Glicose efluente (mg L^{-1})	Conversão da glicose (%)
8	2349 ± 42	16 ± 47	99 ± 4
6	2370 ± 73	33 ± 49	99 ± 5
4	2092 ± 243	45 ± 84	98 ± 9
2	2077 ± 63	100 ± 10	95 ± 4
1	2369 ± 97	498 ± 39	79 ± 3

A glicose afluyente em todas as etapas foram em média 2251 mg L^{-1} . A concentração média de glicose afluyente variou entre 2077 mg L^{-1} (TDH de 2 h) e 2370 mg L^{-1} (TDH de 6 h). A concentração de glicose efluente variou entre 16 mg L^{-1} (TDH de 8 h) e 498 mg L^{-1}

(TDH de 1 h). O TDH de 1 h apresentou a maior concentração de glicose efluente (498 ± 39 mg L⁻¹), enquanto o TDH de 8 h apresentou a menor concentração de glicose efluente (16 ± 47 mg L⁻¹). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 94%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 99%, 99%, 98%, 95% e 79%, respectivamente.

4.2.1.3 Reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA)

A Figura 4.4 e a Tabela 4.3 apresentam o comportamento da conversão da glicose e suas concentrações afluentes e efluente em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹, sem adição de alcalinidade. As altas conversões de glicose demonstraram que desde o início da operação contínua o sistema mostrou-se bastante estável.

Figura 4.4 - Comportamento da concentração média de glicose afluente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

Tabela 4.3. Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L ⁻¹)	Glicose efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	4203 ± 53	887 ± 25	79 ± 3
6	4003 ± 64	446 ± 37	89 ± 5
4	4055 ± 101	845 ± 65	79 ± 2
2	3985 ± 97	625 ± 94	84 ± 4
1	4043 ± 56	1308 ± 57	68 ± 3

As concentrações de glicose afluyente em todas as etapas foram em média 4058 mg L⁻¹. A concentração média de glicose afluyente variou entre 3985 mg L⁻¹ (TDH de 2 h) e 4203 mg L⁻¹ (TDH de 8 h). A concentração de glicose efluente variou entre 446 mg L⁻¹ (TDH de 6 h) e 1308 mg L⁻¹ (TDH de 1 h). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 80%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h as conversões alcançaram 79%, 89%, 79%, 84% e 68%, respectivamente.

4.2.1.4 Reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA)

A Figura 4.5 e a Tabela 4.4 apresentam o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluyente e efluente em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹, com adição de alcalinidade. As altas conversões de glicose demonstram que desde o início da operação contínua o sistema mostrou-se bastante estável.

Figura 4.5 - Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

Tabela 4.4 - Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose e com adição de alcalinidade (R4CA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L ⁻¹)	Glicose efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	3714 ± 37	440 ± 39	88 ± 3
6	4121 ± 83	231 ± 51	94 ± 4
4	4117 ± 154	154 ± 76	96 ± 2
2	3935 ± 99	993 ± 97	76 ± 3
1	4007 ± 87	1184 ± 79	70 ± 2

As concentrações de glicose afluyente em todas as etapas foram em média 3979 mg L⁻¹. A concentração média de glicose afluyente variou entre 3714 mg L⁻¹ (TDH de 8 h) e 4121 mg L⁻¹ (TDH de 6 h). A concentração de glicose efluente variou entre 154 mg L⁻¹ (TDH de 4 h) e

440 mg L⁻¹ (TDH de 4 h). O TDH de 8 h apresentou a menor concentração de glicose efluente (154 ± 76 mg L⁻¹). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 85%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 88%, 94%, 96%, 76% e 70%, respectivamente.

4.2.1.5 Reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA)

A Figura 4.6 e a Tabela 4.5 apresentam o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluente e efluente em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹, sem adição de alcalinidade.

Figura 4.6 - Comportamento da concentração média de glicose afluente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

Tabela 4.5 - Concentração média de glicose afluenta e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

TDH (h)	Glicose afluenta (mg L ⁻¹)	Glicose efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	9925 ± 102	4235 ± 97	57 ± 4
6	9519 ± 110	5448 ± 85	43 ± 3
4	9789 ± 123	6506 ± 93	34 ± 2
2	9780 ± 99	6247 ± 101	36 ± 2
1	10528 ± 126	6228 ± 114	41 ± 3

As concentrações de glicose afluenta em todas as etapas foram em média 9908 mg L⁻¹. A concentração média de glicose afluenta variou entre 9519 mg L⁻¹ (TDH de 6 h) e 10528 mg L⁻¹ (TDH de 1 h). A concentração de glicose efluente variou entre 4235 mg L⁻¹ (TDH de 8 h) e 6247 mg L⁻¹ (TDH de 2 h). O TDH de 8 h apresentou a menor concentração de glicose efluente (4235 ± 97 mg.L⁻¹). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 42%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 57%, 43%, 34%, 36% e 41%, respectivamente.

4.2.1.6 Reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA)

A Figura 4.7 e a Tabela 4.6 apresentam o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluenta e efluente em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹, com adição de alcalinidade.

Figura 4.7 - Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

Tabela 4.6 - Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L ⁻¹)	Glicose efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	10304 ± 105	3558 ± 86	65 ± 5
6	9206 ± 100	6444 ± 93	30 ± 2
4	10376 ± 131	5598 ± 99	46 ± 3
2	10265 ± 107	6174 ± 112	40 ± 1
1	11001 ± 117	6760 ± 98	39 ± 2

As concentrações de glicose afluyente em todas as etapas foram em média 10230 mg L⁻¹. A concentração média de glicose afluyente variou entre 9206 mg L⁻¹ (TDH de 6 h) e 11001 mg L⁻¹ (TDH de 1 h). A concentração de glicose efluente variou entre 3558 mg L⁻¹

(TDH de 8 h) e 6760 mg L^{-1} (TDH de 1 h). O TDH de 8 h apresentou a menor concentração de glicose efluente ($3558 \pm 86 \text{ mg L}^{-1}$). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 44%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 65%, 30%, 46%, 40% e 39%, respectivamente.

4.2.1.7 Reator contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA)

A Figura 4.8 e a Tabela 4.7 apresentam o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluente e efluente em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L^{-1} , sem adição de alcalinidade.

Figura 4.8 - Comportamento da concentração média de glicose afluente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

Tabela 4.7 - Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L ⁻¹)	Glicose efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	25187 ± 201	16113 ± 198	36 ± 4
6	23434 ± 210	15563 ± 187	34 ± 3
4	25610 ± 223	18249 ± 139	29 ± 2
2	25618 ± 204	19814 ± 201	23 ± 2
1	26809 ± 234	21572 ± 242	20 ± 1

As concentrações de glicose afluyente em todas as etapas foram em média 25332 mg L⁻¹. A concentração média de glicose afluyente variou entre 23434 mg L⁻¹ (TDH de 6 h) e 26809 mg L⁻¹ (TDH de 1 h). A concentração de glicose efluente variou entre 15563 mg L⁻¹ (TDH de 6 h) e 21572 mg L⁻¹ (TDH de 1 h). O TDH de 6 h apresentou a menor concentração de glicose efluente (15563 ± 187 mg L⁻¹). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 28%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 36%, 34%, 29%, 23% e 20%, respectivamente.

4.2.1.8 Reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA)

A Figura 4.9 e a Tabela 4.8 apresentam o comportamento da conversão da glicose e as concentrações afluyente e efluente em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L⁻¹, com adição de alcalinidade.

Figura 4.9 - Comportamento da concentração média de glicose afluyente e efluente, e a conversão da glicose em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

Tabela 4.8 - Concentração média de glicose afluyente e efluente, e conversão da glicose das etapas do experimento para o reator contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R25CA).

TDH (h)	Glicose afluyente (mg L ⁻¹)	Glicose efluente (mg L ⁻¹)	Conversão da glicose (%)
8	24702 ± 197	17975 ± 200	27 ± 3
6	23799 ± 203	11004 ± 198	54 ± 5
4	25262 ± 212	12024 ± 133	52 ± 2
2	25386 ± 199	18750 ± 204	26 ± 3
1	27173 ± 199	21797 ± 239	20 ± 2

As concentrações de glicose afluyente em todas as etapas foram em média 25265 mg L^{-1} . A concentração média de glicose afluyente variou entre 23799 mg L^{-1} (TDH de 6 h) e 27173 mg L^{-1} (TDH de 1 h). A concentração de glicose efluente variou entre 11004 mg

L^{-1} (TDH de 6 h) e $21797 \text{ mg } L^{-1}$ (TDH de 1 h). O TDH de 6 h apresentou a menor concentração de glicose efluente ($11004 \pm 198 \text{ mg } L^{-1}$). A conversão da glicose global para todas as etapas do experimento foi em média 36%. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h, 2 h e 1 h, as conversões alcançaram 27%, 54%, 52%, 26% e 20%, respectivamente.

4.2.1.9 Discussão sobre a conversão da glicose nos reatores

As conversões da glicose alcançadas pelos reatores R2SA, R2CA, R4SA e R4CA estão de acordo com outros estudos utilizando reator anaeróbio de leito fluidificado para produção de hidrogênio (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; SHIDA, 2008; BARROS, 2009). Wu *et al.* (2003) e Lin *et al.* (2006) obtiveram conversão do substrato acima de 90% e entre 92% e 99%, respectivamente. Zhang *et al.* (2007) verificaram que a conversão da glicose variou entre 71,44% e 99,47%. Shida (2008) encontrou conversão de glicose variando entre 92,06% e 98,08%. No entanto, Barros (2009) verificou que a conversão de glicose foi semelhante aos reatores operados com $4000 \text{ mg } L^{-1}$ de glicose. Para o RALF contendo poliestireno, a conversão de glicose reduziu de 83,70% a 49,11%, com a redução do TDH de 8 h para 1 h. O autor, também observou o mesmo comportamento para os reatores contendo pneu e PET como suporte, reduzindo de 90,88% para 63,44% e de 91,28% para 60,31%, respectivamente, com a redução do TDH de 8 h para 1 h.

Essas constatações podem ser atribuídas aos elevados tempos de retenção celular devido ao sistema de crescimento aderido, o qual proporcionou maior acúmulo de biomassa no sistema. O mesmo foi alcançado por Gavala *et al.* (2006) quando estudou a produção de hidrogênio em reator CSTR.

4.2.2 Composição dos metabólitos solúveis e gasosos

Neste item serão apresentados os metabólitos solúveis e gasosos produzidos pelos reatores.

4.2.2.1 Reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA)

A Figura 4.10 e a Tabela 4.9 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, dos ácidos acético e butírico, e também etanol em todos os TDH. O ácido butírico foi predominante durante a operação do reator com TDH entre 8 h e 6 h. No entanto, a partir do TDH de 4 h, o ácido acético foi predominante.

Figura 4.10 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

A Tabela 4.9 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos ácidos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.9 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	3,79 ± 0,51	4,66 ± 0,89	0	1,99 ± 0,15	0
6	3,76 ± 0,11	4,67 ± 0,27	0	1,98 ± 0,21	0
4	7,78 ± 0,16	6,01 ± 0,11	0	2,14 ± 0,12	0
2	8,87 ± 0,49	6,60 ± 0,63	0	1,17 ± 0,19	0
1	7,48 ± 0,18	6,16 ± 0,17	0	1,16 ± 0,20	0

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;

^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;

^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;

^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;

^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético aumentaram quando o TDH foi reduzido de 8 h (3,79 mM) para 2 h e reduziu em TDH de 1 h (7,48 mM). De maneira similar, foi observado que a concentração de ácido butírico aumentou quando o TDH reduziu de 8 h (4,66 mM) para 2 h (6,60 mM) e reduziu em TDH de 1 h (6,16 mM). O ácido acético variou entre 3,76 mM e 8,87 mM. Seguido do ácido butírico (4,66 mM e 6,60 mM). Também foi detectado etanol, variando entre 1,16 mM (TDH de 1 h) e 2,14 mM (TDH de 4 h).

A Tabela 4.10 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA). Para calcular a porcentagem de cada metabólito produzido em relação ao total, o cálculo foi baseado na fração molar de cada produto, visto que cada composto possui um peso molecular diferente.

Tabela 4.10 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	36,28	44,66	0,00	19,06	0,00	8,45	10,44	0,81
6	36,12	44,87	0,00	19,01	0,00	8,42	10,40	0,80
4	48,85	37,73	0,00	13,42	0,00	13,80	15,94	1,29
2	53,32	39,65	0,00	7,03	0,00	15,47	16,64	1,34
1	50,55	41,60	0,00	7,85	0,00	13,63	14,80	1,22

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R2SA, os produtos em ordem decrescente foram acetato (36,12% a 53,32%), butirato (37,73% a 44,87%) e etanol (7,03% a 19,06%).

A Figura 4.11 e a Tabela 4.11 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

Figura 4.11 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

Tabela 4.11 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	8	92	0
6	16	84	0
4	25	75	0
2	30	70	0
1	35	65	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.11 mostra que a porcentagem média nesse TDH correspondeu a 35% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 8%, 16%, 25% e 30%, respectivamente.

4.2.2.2 Reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA)

A Figura 4.12 e a Tabela 4.12 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, dos ácidos acético, butírico, propiônico e também etanol em todos os TDH. O ácido acético foi predominante durante a operação do reator com TDH entre 6 h e 1 h.

Figura 4.12 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

A Tabela 4.12 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos ácidos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.12 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	5,00 ± 0,35	1,88 ± 0,23	1,35 ± 0,12	7,61 ± 0,25	0,00
6	6,67 ± 0,22	2,16 ± 0,26	2,43 ± 0,21	5,43 ± 0,32	0,00
4	8,33 ± 0,19	2,27 ± 0,10	1,89 ± 0,13	5,43 ± 0,21	0,00
2	8,67 ± 0,25	2,27 ± 0,34	1,22 ± 0,10	4,35 ± 0,33	0,00
1	4,33 ± 0,23	3,13 ± 0,37	2,03 ± 0,20	2,51 ± 0,24	0,00

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;

^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;

^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;

^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;

^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético aumentaram quando o TDH foi reduzido de 8 h (5,00 mM) para 2 h (8,67 mM) e diminuiu em TDH de 1 h (4,33 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico aumentaram quando o reduziu TDH de 8 h (1,88 mM) a 1 h (3,13 mM). O ácido acético variou entre 4,33 mM (TDH de 1 h) e 8,67 mM (TDH de 2 h). Seguido do ácido butírico (1,88 mM a 3,13 mM). Também foi detectado ácido propiônico (1,22 mM a 2,43 mM) e etanol (2,51 mM a 7,61).

A Tabela 4.13 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

Tabela 4.13 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	31,58	11,84	8,53	48,05	0,00	8,23	15,84	2,67
6	39,94	12,93	14,57	32,56	0,00	11,26	16,69	3,09
4	46,47	12,67	10,55	30,31	0,00	12,50	17,93	3,67
2	52,51	13,77	7,37	26,34	0,00	12,16	16,50	3,81
1	36,12	26,04	16,89	20,95	0,00	9,49	12,00	1,39

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R2CA, os produtos em ordem decrescente foram acetato (31,58% a 52,51%), etanol (20,95% a 48,05%), butirato (11,84% a 26,04%) e propiônico (7,37% a 16,89%).

A Figura 4.13 e a Tabela 4.14 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2CA).

Figura 4.13 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R2CA).

Tabela 4.14 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2CA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	8	92	0
6	14	86	0
4	22	78	0
2	29	71	0
1	40	60	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.14 mostra que a porcentagem média nesse TDH correspondeu a 40% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 8%, 14%, 22% e 29%, respectivamente.

4.2.2.3 Reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA)

A Figura 4.14 e a Tabela 4.15 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, de etanol e dos ácidos acético e butírico em todos os TDH. O etanol foi predominante durante a operação do reator com TDH de 6 h, 2 h e 1 h, seguido do ácido butírico, o qual predominou nos TDH de 8 h e 4 h.

Figura 4.14 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

A Tabela 4.15 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos ácidos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.15 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	3,83 ± 0,14	8,64 ± 0,20	0,00	4,35 ± 0,13	0,00
6	3,00 ± 0,11	6,25 ± 0,21	0,00	19,35 ± 0,22	0,00
4	5,00 ± 0,17	9,77 ± 0,15	0,00	6,52 ± 0,25	0,00
2	5,00 ± 0,21	11,02 ± 0,24	0,00	13,70 ± 0,21	0,00
1	3,67 ± 0,23	6,02 ± 0,34	0,00	8,70 ± 0,33	0,00

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;

^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;

^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;

^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;

^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético aumentaram quando o TDH foi reduzido de 8 h (3,83 mM) para 2 h (5,00 mM) e reduziu em TDH de 1 h (3,67 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico aumentaram quando reduziu o TDH de 6 h (6,25 mM) a 2 h (11,02 mM). O ácido butírico variou entre 6,02 mM (TDH de 1 h) e 11,02 mM (TDh de 2 h). Seguido do ácido acético (3,00 mM a 5,00 mM). Também foi detectado etanol (4,35 mM a 19,35).

A Tabela 4.16 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

Tabela 4.16 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	22,79	51,35	0,00	25,85	0	12,47	16,82	0,44
6	10,49	21,85	0,00	67,65	0	9,25	28,60	0,48
4	23,48	45,89	0,00	30,63	0	14,77	21,29	0,51
2	16,82	37,09	0,00	46,08	0	16,02	29,72	0,45
1	19,94	32,76	0,00	47,30	0	9,69	18,39	0,61

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R4SA, os produtos em ordem decrescente foram etanol (25,85% a 67,65%), butirato (21,85% a 51,35%) e acetato (10,49% a 23,48%).

A Figura 4.15 e a Tabela 4.17 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

Figura 4.15 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

Tabela 4.17 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	61	39	0
6	68	32	0
4	71	29	0
2	76	24	0
1	77	23	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.17 mostra que o conteúdo nesse TDH correspondeu a 77% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 61%, 68%, 71% e 76%, respectivamente.

4.2.2.4 Reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA)

A Figura 4.16 e a Tabela 4.18 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, dos ácidos acético, butírico e propiônico, e também etanol em todos os TDH. O ácido acético predominou durante operação com TDH entre 4 h e 1 h, seguido do ácido butírico, o qual predominou nos TDH de 8 h e 6 h.

Figura 4.16 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

A Tabela 4.18 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos metabólitos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.18 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	6,25 ± 0,21	7,67 ± 0,20	0,68 ± 0,10	4,35 ± 0,15	0,00
6	10,00 ± 0,31	11,08 ± 0,21	0,34 ± 0,07	5,43 ± 0,21	0,00
4	12,50 ± 0,23	11,08 ± 0,15	0,41 ± 0,05	2,72 ± 0,22	0,00
2	12,83 ± 0,12	10,63 ± 0,24	0,68 ± 0,10	4,35 ± 0,16	0,00
1	9,06 ± 0,31	8,35 ± 0,34	1,01 ± 0,12	2,28 ± 0,26	0,00

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;

^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;

^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;

^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;

^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético aumentaram quando o TDH foi reduzido de 8 h (6,25 mM) para 2 h (12,83 mM) e diminuiu em TDH de 1 h (9,06 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico tiveram acréscimo quando reduziu o TDH de 6 h (11,08 mM) a 1 h (8,35 mM). O ácido acético alternou entre 6,25 mM e 12,83 mM, seguido do ácido butírico (7,67 mM a 11,08 mM). Também foi detectado ácido propiônico (0,34 mM a 1,01 mM) e etanol (2,28 mM a 5,43 mM).

A Tabela 4.19 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

Tabela 4.19 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	32,99	40,49	3,57	22,95	0,00	14,60	18,94	0,81
6	37,24	41,26	1,26	20,24	0,00	21,42	26,85	0,90
4	46,81	41,49	1,52	10,18	0,00	23,98	26,70	1,13
2	45,06	37,30	2,37	15,27	0,00	24,13	28,48	1,21
1	43,74	40,34	4,90	11,02	0,00	18,42	20,70	1,08

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R4CA, os produtos em ordem decrescente foram acetato (32,99% a 46,81%), butirato (37,30% a 41,49%), etanol (10,18% a 22,95%) e propiônico (1,26% a 4,90%).

A Figura 4.17 e a Tabela 4.20 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

Figura 4.17 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

Tabela 4.20 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	22	78	0
6	29	71	0
4	47	53	0
2	48	52	0
1	51	49	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.20 mostra que o conteúdo nesse TDH correspondeu a 51% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 22%, 29%, 47% e 48%, respectivamente.

4.2.2.5 Reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA)

A Figura 4.18 e a Tabela 4.21 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, de etanol, dos ácidos acético e butírico, e também de metanol. O etanol predominou durante a operação do reator com TDH entre 6 h e 1 h, seguido dos ácidos acético e butírico.

Figura 4.18 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

A Tabela 4.21 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos metabólitos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.21 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	11,67 ± 0,41	3,41 ± 0,13	0,00	19,35 ± 0,11	23,44 ± 0,47
6	7,67 ± 0,13	4,55 ± 0,31	0,00	13,04 ± 0,12	2,50 ± 0,33
4	5,00 ± 0,22	4,55 ± 0,19	0,00	5,00 ± 0,21	0,00
2	5,83 ± 0,32	5,68 ± 0,21	0,00	10,87 ± 0,36	0,00
1	5,00 ± 0,30	4,38 ± 0,32	0,00	11,96 ± 0,45	2,34 ± 0,28

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;
^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;
^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;
^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;
^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético diminuíram quando o TDH foi reduzido de 8 h (11,67 mM) para 1 h e 4 h (5,00 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico aumentaram quando reduziu o TDH de 8 h (3,41 mM) a 2 h (5,68 mM), porém quando o TDH foi reduzido para 1 h a concentração diminuiu (4,38 mM). O etanol foi predominante variando entre 5,00 mM (TDH de 4 h) e 19,35 mM (TDH de 8 h). Também foi detectado metanol nos TDH de 8 h (23,44 mM), 6 h (2,50 mM) e 1 h (2,34 mM). Não foi detectada a presença do ácido propiônico.

A Tabela 4.22 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

Tabela 4.22 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	20,16	5,89	0,00	33,44	40,51	15,08	57,86	3,42
6	27,62	16,38	0,00	46,99	9,01	12,21	27,76	1,69
4	34,38	31,25	0,00	34,38	0,00	9,55	14,55	1,10
2	26,06	25,38	0,00	48,56	0,00	11,52	22,38	1,03
1	21,12	18,48	0,00	50,50	9,90	9,38	23,68	1,14

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, o etanol e os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R10SA, os produtos em ordem decrescente foram etanol (33,44% a 50,50%), acetato (20,16% a 34,38%), butirato (5,89% a 31,25%) e metanol (0,00% a 40,51%).

A Figura 4.19 e a Tabela 4.23 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

Figura 4.19 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

Tabela 4.23 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	27	73	0
6	34	66	0
4	51	49	0
2	62	38	0
1	64	36	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.23 mostra que o conteúdo nesse TDH correspondeu a 64% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 27%, 34%, 51% e 62%, respectivamente.

4.2.2.6 Reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA)

A Figura 4.20 e a Tabela 4.24 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, de etanol, dos ácidos acético e butírico, e também metanol. O etanol predominou durante a operação do reator com TDH de 8 h, 4 h, 2 h e 1 h, seguido dos ácidos acético e butírico e a presença de metanol somente em TDH de 8 h e 4 h.

Figura 4.20 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

A Tabela 4.24 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos metabólitos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.24 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	11,67 ± 0,43	0,68 ± 0,15	0,00	26,09 ± 0,99	14,06 ± 0,47
6	7,50 ± 0,15	1,70 ± 0,29	0,00	2,17 ± 0,25	0,00
4	10,83 ± 0,20	5,68 ± 0,22	0,00	17,39 ± 0,88	9,38 ± 0,46
2	8,00 ± 0,37	7,39 ± 0,31	0,00	8,70 ± 0,53	0,00
1	5,83 ± 0,39	6,19 ± 0,45	0,00	11,96 ± 0,59	0,00

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;
^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;
^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;
^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;
^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético diminuíram quando o TDH foi reduzido de 8 h (11,67 mM) para 1 h (5,83 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico aumentaram quando reduziu o TDH de 8 h (0,68 mM) a 2 h (7,39 mM). Quando reduziu o TDH para 1 h, a concentração de ácido butírico também reduziu (6,19 mM). O etanol foi predominante variando entre 2,17 mM (TDH de 6 h) e 26,09 mM (TDH de 8 h). Também foi detectado metanol nos TDH de 8 h (14,06 mM) e 4 h (9,38 mM). Não foi detectada a presença de ácido propiônico.

A Tabela 4.25 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

Tabela 4.25 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	22,22	1,30	0,00	49,69	26,79	12,35	52,50	17,11
6	65,91	14,98	0,00	19,11	0,00	9,20	11,38	4,40
4	25,03	13,13	0,00	40,18	21,66	16,52	43,28	1,91
2	33,22	30,67	0,00	36,11	0,00	15,39	24,08	1,08
1	24,32	25,82	0,00	49,85	0,00	12,03	23,98	0,94

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, o etanol e os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R10CA, os produtos em ordem decrescente foram acetato (22,22% a 65,91%), etanol (19,11% a 49,85%), butirato (1,30% a 30,67%) e metanol (0,00% a 26,79%).

A Figura 4.21 e a Tabela 4.26 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

Figura 4.21 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

Tabela 4.26 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R10CA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	8	92	0
6	27	73	0
4	37	63	0
2	56	44	0
1	58	42	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.26 mostra que o conteúdo nesse TDH correspondeu a 58% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 8%, 27%, 37% e 56%, respectivamente.

4.2.2.7 Reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA)

A Figura 4.22 e a Tabela 4.27 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, de etanol, dos ácidos acético e butírico, e também metanol. O etanol predominou durante a operação do reator com TDH de 8 h, 4 h, 2 h e 1 h, seguido dos ácido acético e butírico e a presença de metanol somente em TDH de 4 h e 2 h.

Figura 4.22 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

A Tabela 4.27 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos metabólitos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.27 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	13,33 ± 0,93	1,93 ± 0,12	0,00	32,61 ± 1,05	31,25 ± 1,53
6	10,42 ± 0,51	1,82 ± 0,21	0,00	0,00	0,00
4	7,17 ± 0,26	2,84 ± 0,32	0,00	25,54 ± 0,91	6,25 ± 0,99
2	5,83 ± 0,23	3,98 ± 0,34	0,00	17,93 ± 0,61	3,13 ± 0,71
1	4,00 ± 0,49	4,55 ± 0,51	0,00	14,13 ± 0,64	0,00

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;

^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;

^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;

^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;

^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético diminuíram quando o TDH foi reduzido de 8 h (13,33 mM) para 1 h (4,00 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico aumentaram quando reduziu o TDH de 8 h (1,93 mM) a 1 h (4,55 mM). O etanol foi predominante variando entre 0,00 mM (TDH de 6 h) e 32,61 mM (TDH de 8 h). Também foi detectado metanol nos TDH de 8 h (31,25 mM), 4 h (6,25 mM) e 2 h (3,13 mM). Não foi detectada a presença de ácido propiônico.

A Tabela 4.28 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

Tabela 4.28 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	16,85	2,44	0,00	41,21	39,50	15,27	79,12	6,90
6	85,14	14,86	0,00	0,00	0,00	12,23	12,23	5,73
4	17,14	6,80	0,00	61,11	14,95	10,01	41,80	2,52
2	18,90	12,88	0,00	58,10	10,12	9,81	30,87	1,47
1	17,64	20,05	0,00	62,31	0,00	8,55	22,68	0,88

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, o etanol e os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R25SA, os produtos em ordem decrescente foram etanol (0,00% a 62,31%), acetato (16,85% a 85,14%), butirato (2,44% a 20,05%) e metanol (0,00% a 39,50%).

A Figura 4.23 e a Tabela 4.29 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

Figura 4.23 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

Tabela 4.29 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	15	85	0
6	18	82	0
4	31	69	0
2	55	45	0
1	59	41	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.29 mostra que o conteúdo nesse TDH correspondeu a 59% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 15%, 18%, 31% e 55%, respectivamente.

4.2.2.8 Reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA)

A Figura 4.24 e a Tabela 4.30 apresentam o comportamento dos metabólitos solúveis produzidos em função de cada TDH, no reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade. O efluente foi composto, principalmente, de etanol, dos ácidos acético e butírico, e também etanol e metanol. O etanol predominou durante todas as etapas, seguido dos ácidos acético e butírico e a presença de metanol somente em TDH de 6 h e 4 h.

Figura 4.24 – Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

A Tabela 4.30 apresenta as médias e desvio padrão das concentrações dos metabólitos individualizados produzidos em cada etapa do experimento.

Tabela 4.30 - Metabólitos solúveis produzidos em função do TDH, para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

TDH (h)	(a) Ac. Acético (mM)	(b) Ac. Butírico (mM)	(c) Ac. Propiônico (mM)	(d) Etanol (mM)	(e) Metanol (mM)
8	8,00 ± 0,72	2,10 ± 0,22	0,00	19,57 ± 1,12	0,00
6	20,00 ± 1,41	3,41 ± 0,19	0,00	76,09 ± 2,53	31,25 ± 1,22
4	12,50 ± 0,87	0,80 ± 0,28	0,00	69,57 ± 2,11	40,63 ± 2,17
2	5,92 ± 0,35	3,95 ± 0,31	0,00	11,96 ± 0,92	1,88 ± 0,18
1	5,00 ± 0,51	3,41 ± 0,45	0,00	11,74 ± 0,89	0,00

^(a) LD₁ (0,80 mM) – Limite de detecção do ácido acético;
^(b) LD₂ (2,29 mM) – Limite de detecção do ácido butírico;
^(c) LD₃ (0,14 mM) – Limite de detecção do ácido propiônico;
^(d) LD₃ (0,31 mM) – Limite de detecção do etanol;
^(e) LD₃ (0,54 mM) – Limite de detecção do metanol.

As concentrações de ácido acético diminuíram quando o TDH foi reduzido de 6 h (20,00 mM) para 1 h (5,00 mM). No entanto, as concentrações do ácido butírico foram praticamente constante, variando entre 2,10 mM (TDH de 8 h) e 3,95 mM (TDH de 2 h), exceto no TDH de 4 h (0,80 mM). O etanol foi predominante, variando entre 11,74 mM (TDH de 1 h) e 76,09 mM (TDH de 6 h). Também foi detectado metanol nos TDH de 6 h (31,25 mM), 4 h (40,63 mM) e 2 h (1,88 mM). Não foi detectada a presença do ácido propiônico.

A Tabela 4.31 apresenta a porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

Tabela 4.31 - Porcentagem de cada metabólito produzido pelo reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

TDH (h)	HAc/SMP (%)	HBu/SMP (%)	HPr/SMP (%)	EtOH/SMP (%)	MetOH/SMP (%)	AVT (mM)	SMP (mM)	HAc/HBu
8	26,97	7,09	0,00	65,95	0,00	10,10	29,67	3,81
6	15,30	2,61	0,00	58,19	23,90	23,41	130,75	5,87
4	10,12	0,64	0,00	56,33	32,90	13,30	123,49	15,71
2	24,96	16,68	0,00	50,44	7,91	9,87	23,70	1,50
1	24,82	16,92	0,00	58,26	0,00	8,41	20,15	1,47

HAc: acetato; HBu: butirato; HPr: propionato; EtOH: etanol; MetOH: metanol; SMP = HAc + HBu + HPr + EtOH + MetOH; AVT = ácidos voláteis totais; SMP = metabólitos totais produzidos; AVT e SMP foram baseados na concentração molar; EtOH/SMP, relação molar do etanol com o SMP; MetOH/SMP, relação molar do metanol com o SMP; HAc/SMP, relação molar do acetato com o SMP; HBu/SMP, relação molar do butirato com o SMP; HPr/SMP, relação molar do propionato com o SMP; HAc/HBu, relação molar do acetato com o butirato.

Baseado na fração molar, o etanol e os ácidos acético e butírico apresentaram as maiores porcentagens. No reator R25CA, os produtos em ordem decrescente foram etanol (50,44% a 65,95%), acetato (10,12% a 26,97%), butirato (0,64% a 16,92%) e metanol (0,00% a 32,90%).

A Figura 4.25 e a Tabela 4.32 apresentam o comportamento dos principais gases presentes no biogás para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

Figura 4.25 - Conteúdo de hidrogênio, dióxido de carbono e metano no biogás em função do TDH para o reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

Tabela 4.32 – Conteúdo do biogás produzido pelo reator contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R25CA).

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
8	10	90	0
6	13	87	0
4	15	85	0
2	55	45	0
1	57	43	0

O maior conteúdo de hidrogênio no biogás ocorreu quando o sistema foi operado em TDH de 1 h. A Tabela 4.32 mostra que o conteúdo nesse TDH correspondeu a 57% de hidrogênio no biogás. Em TDH de 8 h, 6 h, 4 h e 2 h, as porcentagens médias corresponderam a 10%, 13%, 15% e 55%, respectivamente.

4.2.2.9 Discussão sobre a composição dos metabólitos solúveis e gasosos dos reatores

Em diversos estudos, que utilizaram condições análogas a esta pesquisa, observaram semelhança em relação aos metabólitos produzidos, porém sua distribuição nem sempre se comportou de maneira semelhante (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; SHIDA, 2008; BARROS, 2009).

As proporções dos metabólitos solúveis produzidos pelos reatores R2SA, R2CA, R4SA e R4CA foram pareados aos resultados apresentados na literatura (WU *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; SHIDA, 2008; BARROS, 2009). No entanto, as proporções dos metabólitos solúveis nos reatores R10SA, R10CA, R25SA e R25CA, apresentaram valores distintos.

Observou-se, principalmente, que os reatores contendo elevadas concentrações de glicose (10000 mg L^{-1} e 25000 mg L^{-1}) produziram maior quantidade de solventes, a exemplo do metanol e etanol nos reatores R25SA e R25CA.

No estudo realizado por Lin *et al.* (2006), os autores verificaram comportamento similar aos reatores operados com 2000 mg L^{-1} e 4000 mg L^{-1} de glicose. Os autores notaram o predomínio do ácido butírico (62% a 73%), seguido do ácido acético (17% a 23%). A produção de ácido propiônico e etanol foram relativamente insignificantes, correspondendo a 19% dos metabólitos solúveis totais. Ainda, os autores não encontraram mudança significativa na produção dos ácidos orgânicos totais e na distribuição dos ácidos individualizados, quando variou o TDH de 8,9 h a 2,2 h.

De forma semelhante aos quatro reatores contendo 2000 mg L^{-1} e 4000 mg L^{-1} de glicose (R2SA, R2CA, R4SA e R4CA), Zhang *et al.* (2007) observaram o predomínio de ácido acético (43% a 46% dos metabólitos solúveis totais) sobre o ácido butírico (20% a 31%) e considerável produção de etanol (14% a 21%).

Ambos os autores, Shida (2008) e Barros (2009), operaram reatores anaeróbios de leite fluidificado em condições parecidas aos reatores operados com 2000 mg L⁻¹ de glicose sem adição de alcalinidade (R2SA) e 4000 mg L⁻¹, com adição de alcalinidade (R4CA), respectivamente.

Shida (2008) também notou uma distribuição análoga dos metabólitos solúveis em relação aos reatores R2SA, R2CA, R4SA e R4CA. A distribuição dos metabólitos solúveis em ordem decrescente observada pelo autor foi o ácido butírico (44,64% a 52,52%) em predominância, seguido do ácido acético (41,17% a 47,48%), com baixa concentração de etanol (inferior a 10%). O mesmo autor também não verificou a presença do ácido propiônico, em condições semelhantes aos reatores operados sem adição de alcalinidade contendo 2000 mg L⁻¹ (R2SA) e 4000 mg L⁻¹ (R4SA) de glicose.

Barros (2009), em ambos os reatores, verificou o predomínio do ácido acético, seguido dos ácidos butírico e lático, também de etanol e pequenas concentrações do ácido propiônico. O reator contendo pneu foi o que mais produziu os ácidos acético e butírico, atingindo valores próximos a 42,0% e 36,5%, respectivamente. Esse autor observou a presença semelhante de pequenas concentrações do ácido propiônico aos reatores operados com adição de alcalinidade (R2CA e R4SA).

O ácido propiônico não foi detectado durante a operação dos reatores sem adição de alcalinidade (R2SA, R4SA, R10SA e R25SA) e nos reatores contendo alcalinidade (R10CA, e R25CA). No entanto, os reatores contendo adição de alcalinidade, operados com 2000 mg L⁻¹ e 4000 mg L⁻¹ de glicose, apresentaram baixas concentrações de ácido propiônico. A ausência do ácido propiônico, em todos os TDH, sugere que a atividade das bactérias formadoras desse ácido pode ser inibida em condições de baixo pH, ser sensíveis a baixos TDH (ZHANG *et al.*, 2007) e também, a elevadas cargas orgânicas. Além disso, a ausência da produção de ácido

propiónico garante maior produção de hidrogênio em decorrência de não haver demanda de H_2 para formação de ácido propiónico (Equação 4.1).

As produções dos ácidos acético e butírico representam metabólitos solúveis favoráveis a produção de hidrogênio, uma vez que na geração desses produtos ocorrem a produção de hidrogênio (Equação 4.2 e 4.3).

O etanol foi produzido em grande proporção na maioria dos reatores, com exceção do reator contendo 2000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA). Neste reator as porcentagens de etanol foram inferiores a 19,06% no início da operação, sendo posteriormente reduzido e estabilizando em valores próximos a 7%. Sabe-se que a produção de etanol é considerada como metabólito desfavorável para a produção de hidrogênio, uma vez que nenhum hidrogênio é produzido (Equação 4.4).

Os metabólitos gasosos foram compostos dos gases hidrogênio e dióxido de carbono durante todas as etapas do experimento. Nenhum conteúdo de metano foi encontrado no biogás em ambos os reatores. Certamente, a associação de um tratamento térmico do inóculo com a operação do pH em condições acidogênicas, inibiram a atividade metanogênica responsável pelo consumo de hidrogênio no sistema. Ainda, segundo a revisão bibliográfica

deste trabalho, observou-se que a manipulação de alguns parâmetros operacionais, como por exemplo, o TDH, contribui para o carreamento das arqueias metanogênicas nos reatores.

Segundo Chen *et al.* (2001) o arraste desses microrganismos se dá pelo fato da velocidade específica máxima de crescimento das arqueias metanogênicas ($\mu_{\text{máximo}} = 0,0167 \text{ h}^{-1}$) serem significativamente inferiores quando comparada aos microrganismos acidogênicos ($\mu_{\text{máximo}} = 0,083 \text{ h}^{-1}$). Esta constatação mostra que os microrganismos metanogênicos são incapazes de se reproduzirem ou manterem-se em equilíbrio nessas condições, fazendo com que eles sejam eliminados do reator.

Observou-se que, durante todo o experimento, o comportamento dos gases variou de acordo com as mudanças no TDH. Em geral, o conteúdo de hidrogênio no biogás aumentou com a redução do TDH de 8 h para 1 h em ambos os reatores.

Os resultados obtidos do conteúdo do biogás nos reatores estão de acordo com diversos estudos realizados utilizando reator anaeróbio de leito fluidificado (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; SHIDA, 2008; BARROS, 2009).

No estudo realizado por Wu *et al.* (2003), obtiveram conteúdo de hidrogênio no biogás variando entre 28% e 38%. Esses valores foram semelhantes aos obtidos pelos reatores operados com 2000 mg L⁻¹ de glicose (R2SA e R2CA). O mesmo foi observado por Lin *et al.* (2006), o qual obtiveram porcentagens de hidrogênio no biogás entre 39% e 47%. No entanto, Zhang *et al.* (2007) notaram valores superiores, variando entre 57,2% e 61,2%. Esses valores estão de acordo com os obtidos pelos reatores operados com concentração de glicose de 4000 mg L⁻¹ (R4SA e R4CA), 10000 mg L⁻¹ (R10SA e R10CA) e 25000 mg L⁻¹ (R25SA e R25CA). No entanto, o reator operado com 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade, apresentou maior conteúdo de hidrogênio (77%).

Shida (2008), operando RALF em condições semelhantes ao reator R2SA, observou valores semelhantes do conteúdo de hidrogênio no biogás, porém o comportamento não foi

similar. O autor verificou que o conteúdo de hidrogênio aumentou de 21,84% para 37,55% com a diminuição do TDH de 8 h para 2 h. Quando reduziu o TDH para 1 h, o conteúdo de hidrogênio reduziu levemente atingindo valores próximos a 31,27%.

Barros (2009), em condições semelhantes ao reator operado com 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA), obteve conteúdo de hidrogênio no biogás semelhante ao observado neste estudo. O conteúdo, observado pelo autor, variou entre 11% e 50% para o reator contendo poliestireno, 9% e 58% para o reator contendo pneu e 10% e 49% para o reator contendo PET.

Os resultados dos metabólitos solúveis e gasosos demonstram que, neste estudo, as concentrações dos ácidos individualizados e dos gases (H₂ e CO₂) foram influenciadas pela redução do TDH. Ainda, a diferença encontrada neste estudo e nos demais relatados, demonstra a necessidade de controlar a manutenção das populações acidogênicas e prevenir a contaminação de outros organismos não produtores de hidrogênio no sistema que levaria a competição pelo substrato.

4.2.3 Efeito da alcalinidade e do TDH na produção de hidrogênio

Neste item serão apresentados os resultados referentes ao efeito da alcalinidade e TDH para a produção de hidrogênio nos reatores.

4.2.3.1 Reatores contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA)

As Figuras 4.26, 4.27 e 4.28 apresentam a produção volumétrica (HPR), rendimento (HY) e o conteúdo de hidrogênio para os reatores contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose.

Figura 4.26 - Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 2000 m L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA) em função do TDH.

Figura 4.27 - Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 2000 m L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA) em função do TDH.

Figura 4.28 - Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 2000 m L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA) em função do TDH.

A Tabela 4.33 apresenta os valores de produção volumétrica, rendimento e conteúdo de hidrogênio para os reatores R2SA e R2CA.

Tabela 4.33. Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H_2 , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.

TDH (h)	Reator	pH	Produção volumétrica de H_2 ($L \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$)	Rendimento de H_2 ($mol H_2 \cdot mol \text{ glicose}^{-1}$)	H_2 no biogás (%)
8	R2SA	$4,05 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,19$	8 ± 3
6		$3,68 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,05$	$1,61 \pm 0,23$	16 ± 10
4		$3,71 \pm 0,13$	$0,31 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,19$	25 ± 2
2		$3,96 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,04$	$2,49 \pm 0,13$	30 ± 2
1		$3,72 \pm 0,11$	$0,97 \pm 0,06$	$2,41 \pm 0,20$	35 ± 1
8	R2CA	$5,54 \pm 0,15$	$0,12 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,19$	8 ± 3
6		$5,29 \pm 0,13$	$0,13 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,23$	14 ± 10
4		$5,31 \pm 0,21$	$0,21 \pm 0,05$	$1,78 \pm 0,19$	22 ± 2
2		$5,50 \pm 0,47$	$0,62 \pm 0,04$	$1,90 \pm 0,13$	29 ± 2
1		$5,09 \pm 0,17$	$0,76 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,20$	40 ± 1

O pH nos reatores R2SA e R2CA variou entre 3,68 e 4,05, 5,09 e 5,54, respectivamente.

Em ambos os reatores a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) aumentou com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.26 e Tabela 4.33). A HPR máxima para os reatores R2CA e R2SA foi de 0,76 e 0,97 $L \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$, respectivamente (Figura 4.26 e Tabela 4.33).

No reator R2SA, o rendimento da produção de hidrogênio aumentou de 1,41 $mol H_2/mol \text{ glicose}$ a 2,49 $mol H_2/mol \text{ glicose}$ com a redução do TDH de 8 h a 2 h. Quando reduziu o TDH para 1 h, o rendimento também reduziu para 2,41 $mol H_2/mol \text{ glicose}$. No reator R2CA, também foi observado o mesmo comportamento, variando entre 0,96 $mol H_2/mol \text{ glicose}$ e 1,90 $mol H_2/mol \text{ glicose}$, quando reduziu o TDH de 8 h a 2 h. Quando reduzido o TDH para 1 h, o rendimento do reator R2CA também reduziu, atingindo 1,24 $mol H_2/mol \text{ glicose}$ (Figura 4.27 e Tabela 4.33). O reator que apresentou maior rendimento de produção de hidrogênio foi o operado sem adição de alcalinidade - R2SA (2,49 $mol H_2/mol \text{ glicose}$) para o TDH de 2 h.

A Figura 4.28 mostra a variação do conteúdo de hidrogênio em função do TDH e da adição (R2CA) ou não de alcalinidade (R2SA) para os reatores. No reator R2SA o conteúdo de hidrogênio aumentou de 8% a 35% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.28 e Tabela 4.33). O conteúdo de hidrogênio no reator R2CA aumentou de 8% a 40% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.28 e Tabela 4.33). Ambos os reatores apresentaram um comportamento semelhante em relação ao conteúdo de hidrogênio. O reator R2CA apresentou maior conteúdo de hidrogênio, atingindo valor máximo de 40% (Figura 4.28 e Tabela 4.33).

4.2.3.2 Reatores contendo 4000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA)

As Figuras 4.29, 4.30 e 4.31 apresentam a produção volumétrica (HPR), rendimento (HY) e o conteúdo de hidrogênio para os reatores contendo 4000 mg L^{-1} de glicose.

Figura 4.29 - Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 4000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA) em função do TDH.

Figura 4.30 - Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 4000 m L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA) em função do TDH.

Figura 4.31 - Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 4000 m L⁻¹ de glicose sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA) em função do TDH.

A Tabela 4.34 apresenta os valores de produção volumétrica, rendimento e conteúdo de hidrogênio para os reatores R4SA e R4CA.

Tabela 4.34. Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H_2 , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.

TDH (h)	Reator	pH	Produção volumétrica de H_2 ($L\ h^{-1}\ L^{-1}$)	Rendimento de H_2 (mol H_2 /mol glicose)	Conteúdo de H_2 (%)
8	R4SA	$3,70 \pm 0,12$	$0,14 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,15$	61 ± 5
6		$3,53 \pm 0,10$	$0,15 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,21$	68 ± 7
4		$3,26 \pm 0,07$	$0,27 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,16$	71 ± 4
2		$3,32 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,18$	76 ± 4
1		$3,53 \pm 0,13$	$1,06 \pm 0,07$	$1,25 \pm 0,11$	77 ± 3
8	R4CA	$5,42 \pm 0,22$	$0,25 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,11$	22 ± 2
6		$5,00 \pm 0,19$	$0,35 \pm 0,03$	$1,95 \pm 0,19$	29 ± 4
4		$4,92 \pm 0,26$	$0,51 \pm 0,04$	$2,22 \pm 0,09$	47 ± 3
2		$5,59 \pm 0,33$	$0,80 \pm 0,03$	$2,52 \pm 0,10$	48 ± 4
1		$5,69 \pm 0,38$	$1,29 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,08$	51 ± 3

O pH nos reatores R4SA e R4CA variou entre 3,26 e 3,70, 4,92 e 5,69, respectivamente.

Em ambos os reatores a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) aumentou com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.29 e Tabela 4.34). A HPR máxima para os reatores R4SA e R4CA foi de $1,06\ L\ h^{-1}\ L^{-1}$ e $1,29\ L\ h^{-1}\ L^{-1}$, respectivamente (Figura 4.29 e Tabela 4.34).

No reator R4SA, o rendimento de produção de hidrogênio aumentou de $1,10\ mol\ H_2/mol\ glicose$ a $1,78\ mol\ H_2/mol\ glicose$ com a redução do TDH de 8 h a 2 h. Quando reduziu o TDH para 1 h, o rendimento também reduziu para $1,25\ mol\ H_2/mol\ glicose$. No reator R4CA, também foi observado o mesmo comportamento, variando entre $1,51\ mol\ H_2/mol\ glicose$ e $2,52\ mol\ H_2/mol\ glicose$, quando reduziu o TDH de 8 h a 2 h. Quando reduzido o TDH para 1 h, o rendimento do reator R4CA também reduziu, atingindo

1,84 mol H₂/mol glicose (Figura 4.30 e Tabela 4.34). O reator que apresentou maior rendimento de produção de hidrogênio foi o operado com adição de alcalinidade – R4CA (2,52 mol H₂/mol glicose) para o TDH de 2 h.

A Figura 4.31 apresenta a variação do conteúdo de hidrogênio em função do TDH e da adição (R4CA) ou não de alcalinidade (R4SA) para os reatores. No reator R4SA o conteúdo de H₂ aumentou de 61% a 77% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.31 e Tabela 4.34). O conteúdo de H₂ no reator R4CA aumentou de 22% a 51% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.31 e Tabela 4.34). Ambos os reatores apresentaram um comportamento semelhante em relação ao conteúdo de hidrogênio. No entanto, o reator R4SA apresentou maior conteúdo de hidrogênio, atingindo valor máximo de 77% (Figura 4.31 e Tabela 4.34).

4.2.3.3 Reatores contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA)

As Figuras 4.32, 4.33 e 4.34 apresentam a produção volumétrica (HPR), rendimento (HY) e o conteúdo de hidrogênio para os reatores contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose.

Figura 4.32 - Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 10000 m L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA) em função do TDH.

Figura 4.33 - Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 10000 m L^{-1} de glicose sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA) em função do TDH.

Figura 4.34 - Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 10000 m L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA) em função do TDH.

A Tabela 4.35 apresenta os valores de produção volumétrica, rendimento e conteúdo de hidrogênio para os reatores R10SA e R10CA.

Tabela 4.35. Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H_2 , e rendimento da produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.

TDH (h)	Reator	pH	Produção volumétrica de H_2 ($L\ h^{-1}\ L^{-1}$)	Rendimento de H_2 (mol H_2 /mol glicose)	Conteúdo de H_2 (%)
8	R10SA	$3,23 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,08$	27 ± 3
6		$3,12 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,04$	$0,76 \pm 0,14$	34 ± 5
4		$3,04 \pm 0,11$	$0,25 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,22$	51 ± 4
2		$3,41 \pm 0,25$	$0,52 \pm 0,08$	$1,26 \pm 0,27$	62 ± 6
1		$3,57 \pm 0,18$	$1,46 \pm 0,10$	$0,78 \pm 0,10$	64 ± 5
8	R10CA	$5,58 \pm 0,36$	$0,12 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,10$	8 ± 2
6		$5,21 \pm 0,24$	$0,25 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,14$	27 ± 4
4		$5,02 \pm 0,17$	$0,49 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,19$	37 ± 3
2		$5,00 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,08$	$1,32 \pm 0,11$	56 ± 4
1		$5,21 \pm 0,22$	$1,58 \pm 0,13$	$1,04 \pm 0,08$	58 ± 3

O pH nos reatores R10SA e R10CA variou entre 3,04 e 3,57, 5,00 e 5,58, respectivamente.

Em ambos os reatores a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) aumentou com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.32 e Tabela 4.35). A HPR máxima para os reatores R10CA e R10SA foi de $1,58\ L\ h^{-1}\ L^{-1}$ e $1,46\ L\ h^{-1}\ L^{-1}$, respectivamente (Figura 4.32 e Tabela 4.35).

No reator R10SA, o rendimento de produção de hidrogênio aumentou de $0,62\ mol\ H_2/mol\ glicose$ a $1,26\ mol\ H_2/mol\ glicose$ com a redução do TDH de 8 h a 2 h. Quando reduziu o TDH para 1 h, o rendimento também reduziu para $0,78\ mol\ H_2/mol\ glicose$. No reator R10CA, também foi observado o mesmo comportamento, variando entre $0,48\ mol\ H_2/mol\ glicose$ e $1,32\ mol\ H_2/mol\ glicose$, quando reduziu o TDH de 8 h a 2 h. Quando reduziu o TDH para 1 h, o rendimento do reator R10CA também reduziu, atingindo $1,04\ mol\ H_2/mol\ glicose$ (Figura 4.33 e Tabela 4.35). O reator que apresentou maior rendimento de produção de hidrogênio foi o operado com adição de alcalinidade – R10CA ($1,32\ mol\ H_2/mol\ glicose$) para o TDH de 2 h.

A Figura 4.34 apresenta a variação do conteúdo de hidrogênio em função do TDH e da adição (R10CA) ou não de alcalinidade (R10SA) para os reatores. No reator R10SA, o conteúdo de H_2 aumentou de 27% a 64% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.34 e Tabela 4.35). O conteúdo de H_2 no reator R10CA aumentou de 8% a 58% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.34 e Tabela 4.35). Ambos os reatores apresentaram um comportamento semelhante em relação ao conteúdo de hidrogênio. No entanto, o reator R10SA apresentou maior conteúdo de hidrogênio, atingindo valor máximo de 64% (Figura 4.34 e Tabela 4.35).

4.2.3.4 Reatores contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA)

As Figuras 4.35, 4.36 e 4.37 apresentam a produção volumétrica (HPR), rendimento (HY) e o conteúdo de hidrogênio para os reatores contendo 25000 mg L^{-1} de glicose.

Figura 4.35 - Produção volumétrica de hidrogênio para os reatores contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA) em função do TDH.

Figura 4.36 - Rendimento de hidrogênio para os reatores contendo 25000 m L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA) em função do TDH.

Figura 4.37 - Conteúdo de hidrogênio no biogás para os reatores contendo 25000 m L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA) em função do TDH.

A Tabela 4.36 apresenta os valores de produção volumétrica, rendimento e conteúdo de hidrogênio para os reatores R25SA e R25CA.

Tabela 4.36 - Conteúdo de hidrogênio no biogás, produção volumétrica de H_2 , e rendimento de produção de hidrogênio em função do TDH para cada reator.

TDH (h)	Reator	pH	Produção volumétrica de H_2 ($L\ h^{-1}\ L^{-1}$)	Rendimento de H_2 (mol H_2 /mol glicose)	Conteúdo de H_2 (%)
8	R25SA	$3,38 \pm 0,12$	$0,08 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,05$	15 ± 4
6		$3,04 \pm 0,09$	$0,54 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,09$	18 ± 2
4		$3,06 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,14$	31 ± 3
2		$3,31 \pm 0,15$	$0,71 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,17$	55 ± 2
1		$3,46 \pm 0,18$	$0,61 \pm 0,14$	$0,56 \pm 0,13$	59 ± 4
8	R25CA	$5,42 \pm 0,22$	$0,06 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,08$	10 ± 3
6		$4,96 \pm 0,35$	$0,43 \pm 0,04$	$0,49 \pm 0,11$	13 ± 4
4		$5,13 \pm 0,19$	$0,53 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,15$	15 ± 2
2		$5,01 \pm 0,23$	$0,84 \pm 0,08$	$0,63 \pm 0,13$	55 ± 7
1		$5,16 \pm 0,15$	$0,68 \pm 0,11$	$0,56 \pm 0,19$	57 ± 5

O pH nos reatores R25SA e R25CA variou entre 3,04 e 3,46, 4,96 e 5,42, respectivamente.

Em ambos os reatores a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) aumentou com a redução do TDH de 8 h a 2 h, diminuindo quando aumentou o TDH para 1 h (Figura 4.35 e Tabela 4.36). A HPR máxima para os reatores R25CA e R25SA foi de $0,84\ L\ h^{-1}\ L^{-1}$ e $0,71\ L\ h^{-1}\ L^{-1}$, respectivamente (Figura 4.35 e Tabela 4.36) para o TDH de 2 h.

No reator R25SA, o rendimento de produção de hidrogênio aumentou de $0,23\ mol\ H_2/mol\ glicose$ a $0,60\ mol\ H_2/mol\ glicose$ com o decréscimo do TDH de 8 h a 2 h. Quando reduziu o TDH para 1 h, o rendimento também reduziu para $0,56\ mol\ H_2/mol\ glicose$. No reator R25CA, também foi observado o mesmo comportamento, variando entre $0,44\ mol\ H_2/mol\ glicose$ e $0,63\ mol\ H_2/mol\ glicose$, quando reduziu o TDH de 8 h a 2 h. Quando reduzido o TDH para 1 h, o rendimento do reator R25CA também reduziu, atingindo

0,56 mol H₂/mol glicose (Figura 4.36 e Tabela 4.36). O reator que apresentou maior rendimento da produção de hidrogênio foi o operado com adição de alcalinidade – R25CA (0,63 mol H₂/mol glicose) para o TDH de 2 h.

A Figura 4.37 apresenta a variação do conteúdo de hidrogênio em função do TDH e da adição (R25CA) ou não de alcalinidade (R25SA) para os reatores. No reator R25SA o conteúdo de H₂ aumentou de 15% a 59% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.37 e Tabela 4.36). O conteúdo de H₂ no reator R25CA aumentou de 10% a 57% com a redução do TDH de 8 h a 1 h (Figura 4.37 e Tabela 4.36). Ambos os reatores apresentaram um comportamento semelhante em relação ao conteúdo de hidrogênio. No entanto, o reator sem adição de alcalinidade (R25SA) apresentou maior conteúdo de hidrogênio, atingindo valor máximo de 59% (Figura 4.37 e Tabela 4.36).

4.2.3.5 Discussão sobre o efeito da alcalinidade na produção de hidrogênio nos reatores

Observou-se que o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose com adição de alcalinidade (R4CA), apresentou maior rendimento de hidrogênio (2,52 mol H₂/mol glicose). No entanto, o reator contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose com adição de alcalinidade (R10CA), apresentou a maior produtividade de hidrogênio (1,58 L h⁻¹ L⁻¹). E o reator contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose sem adição de alcalinidade (R4SA), apresentou maior conteúdo de hidrogênio no biogás (77%).

Ambos os reatores apresentaram rendimento da produção de hidrogênio superior a Koskinen *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2007), Shida (2008) e Barros (2009) com exceção dos reatores contendo 10000 mg L⁻¹ e 25000 mg L⁻¹ de glicose (R25SA e R25CA). Estes pesquisadores utilizaram o mesmo reator (RALF) contendo glicose como fonte de carbono variando entre 2000 mg L⁻¹ e 10000 mg L⁻¹ e obtiveram rendimento máximo da produção de

hidrogênio de 1,35 mol H₂/mol glicose, 1,19 mol H₂/mol glicose, 2,29 mol H₂/mol glicose e 2,15 mol H₂/mol glicose, respectivamente.

Os valores de conteúdo de H₂ estão de acordo com diversos estudos apresentados na literatura que utilizaram RALF operados com adição de alcalinidade (ZHANG *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2006; BARROS, 2009) e sem adição de alcalinidade (KOSKINEN *et al.*, 2007; SHIDA, 2008). Não foi detectado metano durante a operação em ambos os reatores.

Contudo, o reator que apresentou melhor desempenho global foi o contendo adição de alcalinidade com 4000 mg L⁻¹ de glicose (R4CA) para o TDH de 2 h, pois apresentou maior rendimento de hidrogênio, visto que este é um parâmetro primário para a análise do desempenho dos reatores utilizados para a produção de hidrogênio. Essa constatação pode ser atribuída ao desvio do fluxo de elétrons para a produção dos ácidos acético e butírico, os quais são favoráveis a produção de hidrogênio.

4.2.4 Efeito da taxa de carregamento orgânico (TCO) na produção de hidrogênio

Neste item serão apresentados os resultados referentes ao efeito da TCO na produção de hidrogênio nos reatores.

4.2.4.1 Reatores contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R2SA) e com adição de alcalinidade (R2CA)

A Figura 4.38 apresenta o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada. Observa-se um aumento linear da produção volumétrica de hidrogênio com o aumento da TCO em ambos os reatores. Além disso, pode-se observar que as TCO máximas de 116,46 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R2SA) e 140,61 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R2CA) não inibiram a produção volumétrica de hidrogênio em ambos os reatores.

Figura 4.38 - Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo $2000 \text{ mg } L^{-1}$ de glicose ($y_{R2SA} = 0,0087 x_{R2SA} - 0,0157$, $R^2 = 0,9889$ e $y_{R2CA} = 0,0057 x_{R2CA} + 0,0107$, $R^2 = 0,9383$).

Figura 4.39 – Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com $2000 \text{ mg } L^{-1}$ de glicose.

A Figura 4.39 mostra o comportamento do rendimento da produção de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada nos reatores R2SA e R2CA. De maneira similar na produção volumétrica de hidrogênio, observa-se que o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com o aumento da TCO em ambos os reatores. No reator R2SA, quando aumentou a TCO de 19,40 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ para 65,93 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento da produção de hidrogênio aumentou significativamente de 1,41 mol H₂/mol glicose para 2,49 mol H₂/mol glicose, porém quando aumentou a TCO para 116,46 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento reduziu para 2,41 mol H₂/mol glicose. O mesmo comportamento ocorreu para o reator R2CA, porém o rendimento máximo da produção de hidrogênio foi inferior (1,90 mol H₂/mol glicose) ao reator R2SA, quando a TCO foi 84,32 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, sendo observada uma redução para 1,24 mol H₂/mol glicose, quando aumentou a TCO para 140,61 kg DQO m⁻³ dia⁻¹.

4.2.4.2 Reatores contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R4SA) e com adição de alcalinidade (R4CA)

A Figura 4.40 apresenta o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada. Observa-se um aumento linear da produção volumétrica de hidrogênio com o aumento da TCO em ambos os reatores. Além disso, pode-se observar que as TCO máximas de 273,26 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R4SA) e 223,55 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R4CA) não inibiram a produção volumétrica de hidrogênio em ambos os reatores.

Figura 4.40 - Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 4000 mg L^{-1} de glicose ($y_{R4SA} = 0,0041 x_{R4SA} - 0,0398$, $R^2 = 0,9966$ e $y_{R4CA} = 0,0051 x_{R4CA} + 0,1667$, $R^2 = 0,9910$).

Figura 4.41 – Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 4000 mg L^{-1} de glicose.

A Figura 4.41 apresenta o comportamento do rendimento da produção de hidrogênio em função do incremento da TCO aplicada nos reatores R4SA e R4CA. Observou-se que o rendimento da produção de hidrogênio aumentou com o incremento da TCO, em ambos os reatores. No reator R4SA, quando incrementou a TCO de 41,08 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ para 148,23 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento da produção de hidrogênio aumentou significativamente de 1,10 mol H₂/mol glicose para 1,78 mol H₂/mol glicose, porém quando aumentou a TCO para 273,26 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento reduziu para 1,25 mol H₂/mol glicose. O mesmo comportamento ocorreu para o reator R4CA, porém o rendimento máximo da produção de hidrogênio foi superior (2,52 mol H₂/mol glicose) ao reator R4SA, quando a TCO foi de 114,72 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, sendo observada uma redução para 1,84 mol H₂/mol glicose, quando incrementou a TCO para 223,55 kg DQO m⁻³ dia⁻¹.

4.2.4.3 Reatores contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R10SA) e com adição de alcalinidade (R10CA)

A Figura 4.42 apresenta o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada. Observa-se um aumento linear da produção volumétrica de hidrogênio com o aumento da TCO em ambos os reatores. Além disso, pode-se observar que as TCO máximas de 952,60 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R10SA) e 1010,38 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R10CA) não inibiram a produção volumétrica de hidrogênio em ambos os reatores.

Figura 4.42 - Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 10000 mg L⁻¹ de glicose ($y_{R10SA} = 0,0016 x_{R10SA} - 0,0715$, $R^2 = 0,9980$ e $y_{R10CA} = 0,0016 x_{R10CA} + 0,0225$, $R^2 = 0,9758$).

Figura 4.43 – Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 10000 mg L⁻¹ de glicose.

A Figura 4.43 apresenta o comportamento do rendimento da produção de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada nos reatores R10SA e R10CA. Observou-se que o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com o incremento da TCO, em ambos os reatores. No reator R10SA, quando aumentou a TCO de 116,12 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ para 394,05 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento da produção de hidrogênio aumentou significativamente de 0,62 mol H₂/mol glicose para 1,26 mol H₂/mol glicose, porém quando aumentou a TCO para 952,60 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento reduziu para 0,78 mol H₂/mol glicose. O mesmo comportamento ocorreu para o reator R10CA, porém o rendimento máximo da produção de hidrogênio foi (1,32 mol H₂/mol glicose) superior ao reator R10SA, quando a TCO foi de 515,51 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, sendo observada uma redução para 1,04 mol H₂/mol glicose, quando aumentou a TCO para 1010,38 kg DQO m⁻³ dia⁻¹.

4.2.4.4 Reatores contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade (R25SA) e com adição de alcalinidade (R25CA)

A Figura 4.44 apresenta o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada. Observa-se, em ambos os reatores, que não ocorreu uma relação linear entre a produção volumétrica de hidrogênio e a TCO. Além disso, pode-se observar que as TCO máximas de 2012,37 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R25SA) e 2247,90 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (R25CA) podem ter inibido a produção volumétrica de hidrogênio em ambos os reatores.

Figura 4.44 - Produção volumétrica de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores contendo 25000 mg L⁻¹ de glicose.

Figura 4.45 – Rendimento e conteúdo de hidrogênio em função da taxa de carregamento orgânico (TCO) para os reatores operados com 25000 mg L⁻¹ de glicose.

A Figura 4.45 apresenta o comportamento do rendimento da produção de hidrogênio em função do aumento da TCO aplicada nos reatores R25SA e R25CA. Observou-se que o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com o incremento da TCO, em ambos os reatores. No reator R25SA, quando aumentou a TCO de 274,92 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ para 1146,45 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento da produção de hidrogênio aumentou significativamente de 0,23 mol H₂/mol glicose para 0,60 mol H₂/mol glicose, porém quando aumentou a TCO para 2012,37 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, o rendimento reduziu para 0,56 mol H₂/mol glicose. O mesmo comportamento ocorreu para o reator R25CA, porém o rendimento máximo da produção de hidrogênio foi (0,63 mol H₂/mol glicose) superior ao reator R25SA, quando a TCO foi de 1108,79 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, sendo observada uma redução para 0,56 mol H₂/mol glicose, quando aumentou a TCO para 2247,90 kg DQO m⁻³ dia⁻¹.

4.2.4.5 Discussão sobre o efeito da TCO na produção de hidrogênio nos reatores

Notou-se em ambos os reatores que ocorreu uma relação linear entre a produção volumétrica de hidrogênio e a TCO. Esta constatação também foi obtida em outros estudos utilizando reator anaeróbio de leito fluidificado (LIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; SHIDA, 2008; BARROS, 2009).

Em ambos os reatores, observou-se que o rendimento aumenta com o incremento da taxa de carregamento orgânico até chegar a um limite, o qual acarreta na redução do rendimento de hidrogênio com o incremento da TCO. Essas constatações podem ser atribuídas às sobrecargas decorrentes da elevada TCO aplicada ao reator, ou ainda, pode ter ocorrido limitações cinéticas. Barros (2009) também observou esse comportamento. O autor observou que, a TCO a partir de 150 kg m⁻³ d⁻¹ e 200 kg m⁻³ d⁻¹, o rendimento sofreu significativa redução. Os rendimentos máximos observados pelo autor foram 1,90 mol H₂/mol

glicose, 2,15 mol H₂/mol glicose e 1,87 mol H₂/mol glicose, para os reatores contendo poliestireno, pneu e PET, respectivamente.

O rendimento da produção de hidrogênio máximo foi obtido pelo reator R4CA, operado com TCO de 114,72 kg DQO m⁻³ dia⁻¹, com adição de alcalinidade contendo 4000 mg L⁻¹ de glicose, atingindo 2,52 mol H₂/mol glicose. Este rendimento foi superior aos obtidos por Zhang *et al.* (2007), Koskinen *et al.* (2007), Shida (2008) e Barros (2009), utilizando o mesmo substrato (glicose).

Zhang *et al.* (2007) obtiveram rendimento máximo de 1,19 mol H₂/mol glicose. Koskinen *et al.* (2007) verificaram rendimento máximo de 1,35 mol H₂/mol glicose. No entanto Shida (2008) e Barros (2009) obtiveram rendimentos máximos próximos ao obtido pelo reator operado com 4000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade (R4CA), atingindo valores máximos de 2,29 mol H₂/mol glicose (TCO próxima a 75 kg DQO m⁻³ dia⁻¹) e 2,15 mol H₂/mol glicose (TCO de 59,43 kg DQO m⁻³ dia⁻¹), respectivamente.

4.2.5 Efeito da concentração de glicose na produção de hidrogênio

Conforme observado, os rendimentos máximos em ambos os reatores foram obtidos quando os mesmos foram operados em TDH de 2 h. No entanto, observou-se que para a produção volumétrica, os valores máximos foram obtidos quando ambos os reatores foram operados em TDH de 1 h, com exceção dos reatores operados com 25000 mg L⁻¹ de glicose. Decorrente desta constatação, para se avaliar o efeito da concentração, optou-se por utilizar os valores de rendimento máximo, quando operados em TDH de 2 h, para correlacionar com a concentração de glicose, valores máximos de produção volumétrica de hidrogênio, quando operados em TDH de 1 h (ver Figura 4.46) e valores máximos do conteúdo de hidrogênio no

biogás sob TDH de 1 h (ver Figura 4.47). Essa estratégia também foi adotada por Zhang *et al.* (2007).

Figura 4.46 – Comportamento do rendimento (TDH de 2 h) e produção volumétrica de hidrogênio (TDH de 1 h) em função do efeito da concentração de glicose.

Figura 4.47 – Comportamento do conteúdo de hidrogênio no biogás em função do efeito da concentração de glicose para TDH de 1 h.

As Tabelas 4.37 e 4.38 apresentam o efeito das concentrações de glicose para cada reator e TDH avaliados.

Tabela 4.37 – Efeito das concentrações de glicose e TDH para cada reator avaliado sem adição de alcalinidade.

TDH (h)	Concentração de glicose (mg L ⁻¹)	Produção volumétrica de H ₂ (L h ⁻¹ L ⁻¹)	Rendimento de H ₂ (mol H ₂ /mol glicose)	Conteúdo de H ₂ (%)
8	2000	0,11	1,41	8
	4000	0,14	1,10	61
	10000	0,13	0,62	27
	25000	0,08	0,23	15
6	2000	0,18	1,61	16
	4000	0,15	1,14	68
	10000	0,19	0,76	34
	25000	0,54	0,48	18
4	2000	0,31	2,23	25
	4000	0,27	1,26	71
	10000	0,25	1,04	51
	25000	0,55	0,48	31
2	2000	0,60	2,49	30
	4000	0,60	1,78	76
	10000	0,52	1,26	62
	25000	0,71	0,60	55
1	2000	0,97	2,41	35
	4000	1,06	1,25	77
	10000	1,46	0,78	64
	25000	0,61	0,56	59

Tabela 4.38 – Efeito das concentrações de glicose e TDH para cada reator avaliado com adição de alcalinidade.

TDH (h)	Concentração de glicose (mg L ⁻¹)	Produção volumétrica de H ₂ (L h ⁻¹ L ⁻¹)	Rendimento de H ₂ (mol H ₂ /mol glicose)	Conteúdo de H ₂ (%)
8	2000	0,12	0,96	8
	4000	0,25	1,51	22
	10000	0,12	0,48	8
	25000	0,06	0,44	10
6	2000	0,13	1,13	14
	4000	0,35	1,95	29
	10000	0,25	1,02	27
	25000	0,43	0,49	13
4	2000	0,21	1,78	22
	4000	0,51	2,22	47
	10000	0,49	1,24	37
	25000	0,53	0,58	15
2	2000	0,62	1,90	29
	4000	0,80	2,52	48
	10000	0,95	1,32	56
	25000	0,84	0,63	55
1	2000	0,76	1,24	40
	4000	1,29	1,84	51
	10000	1,58	1,04	58
	25000	0,68	0,56	57

Observou-se, para todos os reatores, que ambos os rendimentos e as produções volumétricas de hidrogênio foram influenciados pela concentração de glicose (Figura 4.46 e 3.47, Tabela 4.37 e 4.38).

Para os reatores contendo adição de alcalinidade, o rendimento aumentou de 1,90 mol H₂/mol glicose para 2,52 mol H₂/mol glicose, com o aumento da concentração de glicose de 2000 mg L⁻¹ para 4000 mg L⁻¹; quando aumentou a concentração de glicose para 10000 mg L⁻¹ e 25000 mg L⁻¹, o rendimento sofreu redução significativa para 1,32 mol H₂/mol glicose e 0,63 mol H₂/mol glicose, respectivamente (Figura 4.46 e Tabela 4.38). No entanto, a produção volumétrica de hidrogênio, para o TDH de 1 h (apresentou

maior produção), aumentou de $0,76 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ para $1,58 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ com o aumento da concentração de glicose de 2000 mg L^{-1} para 10000 mg L^{-1} ; quando aumentou a concentração de glicose para 25000 mg L^{-1} , reduziu a produção volumétrica de hidrogênio para $0,68 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (Figura 4.46 e Tabela 4.38).

Nos reatores operados sem adição de alcalinidade (TDH de 2 h), o comportamento do rendimento foi diferente em relação aos reatores contendo adição de alcalinidade. Observou-se que o rendimento reduziu de $2,49 \text{ mol H}_2/\text{mol glicose}$ para $0,60 \text{ mol H}_2/\text{mol glicose}$, com o aumento da concentração de glicose de 2000 mg L^{-1} para 25000 mg L^{-1} (Figura 4.46 e Tabela 4.37). No entanto, a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de $0,97 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ para $1,46 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ com o aumento da concentração de glicose de 2000 mg L^{-1} para 10000 mg L^{-1} ; quando aumentou a concentração para 25000 mg L^{-1} a produção volumétrica de hidrogênio reduziu para $0,61 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (Figura 4.46 e Tabela 4.37).

A condição operacional que apresentou maior produção volumétrica de hidrogênio ($1,58 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$) foi a 10000 mg L^{-1} de glicose com adição de alcalinidade (R10CA) e TDH de 1 h. No entanto, a produção volumétrica é considerada um parâmetro secundário para análise de desempenho de reatores na produção de hidrogênio. Entretanto, a condição ótima para produção de hidrogênio foi a 4000 mg L^{-1} com adição de alcalinidade (R4CA) e TDH de 2 h. Nesta condição, o rendimento ($2,52 \text{ mol H}_2/\text{mol glicose}$) foi o maior em relação a todos os outros reatores.

Estas constatações indicam que o aumento excessivo da concentração do substrato representa um impacto negativo sobre o rendimento da produção de hidrogênio, o qual está de acordo com outros estudos (ZHANG *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2007) avaliaram a produção de hidrogênio sob diferentes concentrações de glicose (10000 mg L^{-1} , 20000 mg L^{-1} e 30000 mg L^{-1}). Estes autores verificaram que aumentando a concentração de glicose de 10000 mg L^{-1} para 30000 mg L^{-1} , o rendimento da

produção de hidrogênio reduziu levemente de 1,19 mol H₂/mol glicose para 1,10 mol H₂/mol glicose, com uma média de 1,16 mol H₂/mol glicose. Enquanto a produção volumétrica de hidrogênio aumentou significativamente, alcançando valor máximo de 2,36 L h⁻¹ L⁻¹, para a maior concentração de glicose aplicada (30000 mg L⁻¹). O conteúdo de hidrogênio foi constante, representando cerca de 59,2% no biogás durante todo o ensaio, indicando que a composição do biogás foi independente da concentração do substrato.

A Figura 4.47 mostrou que nos reatores operados sem adição de alcalinidade, o conteúdo de hidrogênio aumentou significativamente de 35% para 77% com o aumento da concentração de glicose de 2000 mg L⁻¹ para 4000 mg L⁻¹. Após aumentar a concentração de glicose para 10000 mg L⁻¹ e 25000 mg L⁻¹, o conteúdo foi praticamente constante, atingindo valores próximos a 60%. Para os reatores operados com adição de alcalinidade, o conteúdo de hidrogênio no biogás aumentou de 40% até estabilizar em valores próximos a 58%, com o acréscimo da concentração de glicose de 2000 mg L⁻¹ para 25000 mg L⁻¹. No estudo realizado por Zhang *et al.* (2007), o conteúdo de hidrogênio no biogás foi semelhante aos reatores operado com adição de alcalinidade durante a operação com concentração de glicose variando entre 4000 mg L⁻¹ e 25000 mg L⁻¹. Estes pesquisadores encontraram resultados similares aos reatores sem adição de alcalinidade e com concentração de glicose variando entre 10000 mg L⁻¹ e 25000 mg L⁻¹.

4.3 Balanço de carbono

Para calcular o balanço de carbono nos reatores foram calculadas as DQO dos metabólitos produzidos. A equação 4.5 apresenta como foi calculada.

$$\begin{aligned}
DQO.produtos = & \\
& a \left(\frac{mmol.acetato}{1} \right) \cdot 64 \frac{mgDQO}{mmol.acetato} \\
& + b \left(\frac{mmol.bu\ tan\ ol}{1} \right) \cdot 160 \frac{mgDQO}{mmol.bu\ tan\ ol} \\
& + c \left(\frac{mmol.propionato}{1} \right) \cdot 112 \frac{mgDQO}{mmol.propionato} \\
& + d \left(\frac{mmol.me\ tan\ ol}{1} \right) \cdot 48 \frac{mgDQO}{mmol.me\ tan\ ol} \\
& + e \left(\frac{mmol.e\ tan\ ol}{1} \right) \cdot 64 \frac{mgDQO}{mmol.e\ tan\ ol}
\end{aligned} \tag{4.5}$$

Onde:

a , b , c , d e e são as concentrações medidas do acético, butírico, propiônico, metanol e etanol, respectivamente.

A glicose foi calculada baseada na equação abaixo:

$$DQO.glicose = f \left(\frac{mg.gli}{1} \right) \frac{192.mgDQO}{180mg} \tag{4.6}$$

Onde:

f é a concentração efluente de glicose medida.

A diferença entre a DQO medida e a DQO baseada nos metabólitos solúveis produzidos, pode ser atribuída a possível presença de outros metabólitos solúveis não detectáveis pelo método cromatográfico utilizado. A equação abaixo representa como foi realizado o cálculo dessa diferença:

$$DQO.outros = DQO.medida - (DQO.produtos + DQO.glicose)$$

Seguem abaixo as reações químicas utilizadas para esses cálculos:

$$\text{DQO}_t = 1,066 \text{ g O}_2/\text{g ac. Acético}$$

$$\text{DQO}_t = 1,818 \text{ g O}_2/\text{g ac. butírico}$$

$$\text{DQO}_t = 1,5135 \text{ g O}_2/\text{g ac. propiônico}$$

$$\text{DQO}_t = 1,391 \text{ g O}_2/\text{g etanol}$$

$$\text{DQO}_t = 1,343 \text{ g O}_2/\text{g biomassa}$$

$$\text{DQO}_t = 1,065 \text{ g O}_2/\text{g glicose}$$

A Tabela 4.39 apresenta os valores médios e desvio padrão da DQO afluyente, efluyente e eficiência para todos os reatores.

A DQO afluyente representa a glicose adicionada na composição da água residuária e a matéria carbonácea presente na uréia. A DQO efluyente representa a matéria carbonácea no efluyente que foi oxidada. A matéria carbonácea presente no efluyente consiste de glicose não consumida, dos metabólitos solúveis como os ácidos orgânicos, solventes e outros intermediários e, a biomassa desprendida do material suporte.

Tabela 4.39 - Média e desvio padrão da DQO afluyente e efluente, e redução da DQO para todos os reatores.

TDH (h)	Reator	DQO afluyente (mg L^{-1})	DQO efluente (mg L^{-1})	Eficiência (%)
8	R2SA	2395 ± 156	1504 ± 208	37 ± 10
6		2443 ± 124	1527 ± 135	37 ± 10
4		2628 ± 170	1997 ± 178	24 ± 7
2		2698 ± 202	1996 ± 265	26 ± 6
1		2395 ± 95	1916 ± 100	20 ± 2
8	R2CA	2563 ± 156	1656 ± 208	35 ± 10
6		2351 ± 124	1707 ± 135	27 ± 10
4		2399 ± 170	1894 ± 178	21 ± 7
2		2550 ± 202	2014 ± 265	21 ± 6
1		2261 ± 95	1878 ± 100	17 ± 2
8	R4SA	4216 ± 210	3444 ± 153	18 ± 6
6		4140 ± 206	3190 ± 146	23 ± 9
4		4139 ± 270	3444 ± 165	17 ± 4
2		4487 ± 220	3805 ± 191	15 ± 2
1		4312 ± 226	3680 ± 136	15 ± 4
8	R4CA	4832 ± 148	3853 ± 194	20 ± 3
6		5007 ± 254	3981 ± 164	20 ± 5
4		5015 ± 236	4058 ± 158	19 ± 4
2		5305 ± 220	4101 ± 210	23 ± 2
1		4722 ± 233	4033 ± 235	15 ± 3
8	R10SA	11298 ± 954	8704 ± 457	23 ± 5
6		10439 ± 843	8233 ± 419	21 ± 6
4		10693 ± 977	8639 ± 433	19 ± 3
2		10175 ± 799	8855 ± 447	13 ± 2
1		10969 ± 901	9163 ± 512	16 ± 2
8	R10CA	11162 ± 554	7918 ± 367	29 ± 6
6		10640 ± 952	8156 ± 412	23 ± 4
4		11300 ± 865	9301 ± 533	18 ± 3
2		10747 ± 674	9031 ± 498	16 ± 4
1		11372 ± 899	9526 ± 422	16 ± 3
8	R25SA	26126 ± 1024	22200 ± 978	15 ± 3
6		26447 ± 1201	23906 ± 883	10 ± 2
4		27285 ± 1392	22545 ± 791	17 ± 2
2		26116 ± 1273	23740 ± 943	9 ± 1
1		28216 ± 1321	25242 ± 967	11 ± 2
8	R25CA	26700 ± 1319	21754 ± 1034	19 ± 4
6		26579 ± 1348	20325 ± 934	24 ± 5
4		27117 ± 1426	20335 ± 1004	25 ± 6
2		26480 ± 1384	22274 ± 1265	16 ± 3
1		28196 ± 1428	25278 ± 1358	10 ± 1

Para calcular o balanço de carbono, calculou-se a DQO efluente teórica com base nas relações estequiométricas para oxidação da glicose, do ácido acético, do ácido butírico e do ácido propiônico, da biomassa, do etanol, e do metanol. A Tabela 4.40 apresenta os valores da

DQO teórica da glicose remanescente, dos metabólitos solúveis, da biomassa e apresenta também a diferença entre a DQO teórica total e a DQO medida para todos os reatores.

Tabela 4.40 - Média das DQO teóricas dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida.

TDH (h)	Reator	DQO _t glicose (mg L ⁻¹)	DQO _t acético (mg L ⁻¹)	DQO _t butírico (mg L ⁻¹)	DQO _t propiónico (mg L ⁻¹)	DQO _t biomassa (mg L ⁻¹)	DQO _t etanol (mg L ⁻¹)	DQO _t metanol (mg L ⁻¹)	DQO _t Total (mg L ⁻¹)	DQO efluente (mg L ⁻¹)	DQO _{efluente} - DQO _t Total
8	R2SA	220	242	746	0	134	127	0	1469	1504	35
6		237	240	747	0	129	126	0	1479	1527	48
4		257	498	962	0	128	137	0	1981	1997	16
2		149	567	1055	0	107	75	0	1954	1996	42
1		231	478	985	0	134	74	0	1903	1916	13
8	R2CA	17	320	300	151	121	487	0	1396	1656	260
6		35	426	345	272	107	348	0	1534	1707	172
4		48	533	364	212	101	348	0	1605	1894	289
2		107	554	364	136	97	278	0	1536	2014	479
1		530	277	500	227	114	161	0	1810	1878	68
8	R4SA	946	245	1382	0	192	278	0	3043	3444	401
6		475	192	1000	0	157	1238	0	3062	3190	127
4		901	320	1563	0	161	417	0	3363	3444	81
2		666	320	1763	0	155	876	0	3780	3805	25
1		1394	235	964	0	181	556	0	3330	3680	350
8	R4CA	469	400	1227	76	144	278	0	2594	3853	1259
6		247	640	1773	38	134	348	0	3179	3981	802
4		164	800	1773	45	148	174	0	3103	4058	955
2		994	821	1700	76	134	278	0	4003	4101	98
1		1262	579	1336	113	168	146	0	3605	4033	428
8	R10SA	4514	746	545	0	148	1238	1125	8317	8704	387
6		5807	490	727	0	157	835	120	8136	8233	96
4		6935	320	727	0	140	320	0	8442	8639	197
2		6659	373	909	0	134	696	0	8771	8855	83
1		6639	320	700	0	168	765	113	8704	9163	459
8	R10CA	3793	746	109	0	175	1669	675	7167	7918	751
6		6870	480	273	0	165	139	0	7927	8156	229
4		5967	693	909	0	160	1113	450	9292	9301	9
2		6581	512	1182	0	138	556	0	8970	9031	61
1		7207	373	991	0	177	765	0	9513	9526	13
8	R25SA	17177	853	309	0	148	2087	1500	22073	22200	127
6		16590	666	291	0	145	4590	1485	23767	23906	138
4		19454	458	455	0	141	1634	300	22442	22545	103
2		21122	373	636	0	134	1148	150	23564	23740	176
1		22996	256	727	0	168	904	0	25051	25242	190
8	R25CA	19162	512	336	0	181	1252	0	21443	21754	311
6		11730	1279	545	0	165	4869	1500	20088	20325	237
4		12818	800	127	0	148	4451	1950	20294	20335	41
2		19988	378	633	0	134	765	90	21988	22274	285
1		23235	320	545	0	191	751	0	25042	25278	236

4.3.1 Discussão sobre o balanço de carbono nos reatores

Para os reatores (R2SA e R2CA) operados com 2000 mg L^{-1} de glicose, observou-se uma diferença, entre a DQO medida e a DQO teórica relacionada aos metabólitos totais e biomassa, variando entre 16 mg L^{-1} e 479 mg L^{-1} . Nos reatores (R4SA e R4CA) operados com 4000 mg L^{-1} de glicose, essa diferença variou entre 25 mg L^{-1} e 1259 mg L^{-1} . Os dois reatores (R10SA e R10CA) operados com 10000 mg L^{-1} de glicose, apresentou uma diferença variando entre 9 mg L^{-1} e 751 mg L^{-1} . Já os reatores operados com 25000 mg L^{-1} de glicose, essa diferença foi entre 41 mg L^{-1} e 311 mg L^{-1} . Essas diferenças constatadas podem ser atribuídas à presença de outros metabólitos não detectados como o ácido láctico, ácido fórmico, entre outros. A possível não detecção desses ácidos é decorrente do método cromatográfico adotado (extração por headspace), pois somente os ácidos voláteis são detectados.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do material suporte

As Figuras 4.48 a 4.51 apresentam as micrografias obtidas através da microscopia eletrônica de varredura das partículas de argila expandida amostradas ao final de cada fase de operação dos reatores.

Durante a operação do reator anaeróbio de leito fluidificado as morfologias predominantes encontradas foram bacilos retos e ovalados. Ainda, encontraram-se morfologias semelhantes à *Clostridium sp.* Essas estruturas são as mais conhecidas para a produção de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2007; KOSKINEN *et al.*, 2007). A presença desses grupos morfológicos decorre provavelmente da utilização de ácidos orgânicos, como acético, butírico, e do metabolismo hidrogenotrófico para a produção de H_2 e CO_2 .

Figura 4.48 – Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R2SA: coco bacilos, bacilos retos (TDH de 8 h), (b) R2SA: bacilos retos de vários comprimentos, semelhantes à *Clostridium sp.* (TDH de 2 h), (c) R2CA: bacilos retos e ovalados (TDH de 8 h), (d) R2CA: bacilos retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).

Figura 4.49 – Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R4SA: cocos, bacilos retos (TDH de 8 h), (b) R4SA: bacilos retos e ovalados, semelhantes à *Clostridium sp.* (TDH de 2 h), (c) R4CA: bacilos retos (TDH de 8 h), (d) R4CA: bacilos curvos, retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).

Figura 4.50 – Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R10SA: bacilos retos (TDH de 8 h), (b) R10SA: bacilos retos e ovalados (TDH de 2 h), (c) R10CA: bacilos retos (TDH de 8 h), (d) R10CA: bacilos retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).

Figura 4.51 – Micrografia das células presentes no biofilme das partículas de argila expandida para os reatores (a) R25SA: bacilos retos, estruturas semelhantes à *Clostridium* sp. (TDH de 8 h), (b) R25SA: bacilos retos (TDH de 2 h), (c) R25CA: bacilos retos e ovalados (TDH de 8 h), (d) R25CA: bacilos retos (TDH de 2 h) (aumento: 3000x).

A produção biológica de hidrogênio está altamente relacionada aos microrganismos dominantes e com as condições operacionais nos processos anaeróbios (ZHANG *et al.*, 2007). Apesar da Figura 4.48 mostrar que os microrganismos dominantes no biofilme são semelhantes às espécies de *Clostridium* sp., o maior rendimento da produção de hidrogênio de 2,52 mol H₂/mol glicose, obtido pelo reator R4CA, foi superior ao máximo obtido por Zhang *et al.* (2007) (1,19 mol H₂/mol glicose), Koskinen *et al.* (2007) (1,35 mol H₂/mol glicose), Shida (2008) (2,29 mol H₂/mol glicose) e Barros (2009) (2,15 mol H₂/mol glicose), ambos utilizando cultura mista. Destes, Zhang *et al.* (2007), Shida (2008) e Barros (2009), observaram semelhantes morfologias presentes no biofilme a todos os oito reatores utilizados neste estudo. Já Koskinen *et al.* (2007), através da técnica de biologia molecular, verificaram a presença de *Clostridium butyricum*.

De acordo com os estudos apresentados na literatura, é provável que o baixo pH influencie no rendimento de produção de hidrogênio pelas bactérias (ZHANG *et al.*, 2007). Ainda, os estudos indicam que o máximo rendimento de hidrogênio ocorre quando o pH está entre 5,2 e 5,7, porém reduz quando o pH atinge valores inferiores a 4,7 (FANG e LIU, 2002; LAY, 2000). Segundo Dabroc *et al.* (1992), a atividade da enzima hidrogenase, presente em espécies *Clostridium* sp., é inibida pelo baixo pH. No entanto, a atividade dessa espécie poderia ser notada até mesmo em pH igual ou inferior a 4,0 (KIM *et al.*, 2004).

Esta constatação também se confirma neste estudo, o qual o reator com adição de alcalinidade R4CA (pH entre 4,92 e 5,69) apresentou rendimento superior (2,52 mol H₂/mol glicose) em relação ao reator sem adição de alcalinidade R4SA (pH entre 3,26 e 3,70), o qual apresentou rendimento de 1,78 mol H₂/mol glicose.

Com as observações microscópicas permitiu-se concluir que a argila expandida pode ser utilizada como meio suporte para o desenvolvimento e formação do biofilme em reatores anaeróbios de leito fluidificado utilizados para a produção de hidrogênio.

4.5 Avaliação da diversidade microbiana através da técnica de biologia molecular

Através das análises de clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene RNAr 16S do consórcio microbiano foram obtidos 101 clones.

Os clones identificados estão apresentados na Tabela 4.41. A Figura 4.52 ilustra as porcentagens dos gêneros de bactérias identificadas.

Entre os clones analisados 26% foram relacionados como pertencentes aos gêneros *Clostridium*, 24% a Firmicutes não cultivadas, 1% a Bacteroidetes não cultivados, 1% a Proteobacteria não cultivada, 27% a *Veillonellaceae*, 2% a *Chryseobacterium* não cultivada, 12% a *Enterobacter* e 7% a *Klebsiella*.

Segundo Kawagoshi *et al.* (2005), as principais bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio incluem as espécies *Clostridium*, *Enterobacter* e *Bacillus*.

Tabela 4.41 – Identificação dos clones do Domínio *Bacteria*.

UTO	Nº de Clones	Clone	Microrganismo	Acesso	Similaridade (%)	N. de pares	Referência
1	2	36,60	Bactéria não cultivada da família Veillonellaceae	FJ393139	93	284	Borole <i>et al.</i> (2008) Não publicado
2	1	39	Bactéria não cultivada da família Veillonellaceae	FJ393139	89	272	Borole <i>et al.</i> (2008) Não publicado
3	18	59, 37, 111, 94, 19, 17, 71, 74, 120, 6, 100, 106, 93, 112, 13, 56, 80, 99	Bactéria não cultivada da família Veillonellaceae	FJ393127	95	450	Borole <i>et al.</i> (2008) Não publicado
4	4	32, 47, 108, 67	Bactéria não cultivada da família Veillonellaceae	EF544607	96	453	Porsch <i>et al.</i> (2009)
5	1	107	Bactéria não cultivada da família Veillonellaceae	EU331373	91	459	Li e Krumholz (2008)
6	16	92, 24, 65, 90, 114, 70, 28, 78, 84, 104, 102, 33, 115, 88, 5, 96	<i>Chryseobacterium</i> sp.	FJ436422	97	460	Whang <i>et al.</i> (2008) Não publicado
7	1	15	Bactéria não cultivada da família Bacteroidetes	AJ583211	97	407	Nedelkova (2003) Não publicado
8	1	116	Bactéria não cultivada da família Clostridiaceae	AY648564	89	393	Briones <i>et al.</i> (2007)
9	2	11, 82	<i>Clostridium nitrophenolicum</i>	AM261414	97	472	Suresh <i>et al.</i> (2007)
10	3	27, 118, 22	Bactéria não cultivada da família Clostridiaceae	AY648564	95	525	Briones <i>et al.</i> (2007)
11	1	29	Bactéria não cultivada da família Clostridiaceae	AY607209	96	453	Lueders <i>et al.</i> (2004)
12	1	91	<i>Clostridium butyricum</i>	EF533982	98	483	Kwon <i>et al.</i> (2007) Não publicado
13	1	50	Bactéria não cultivada da família Firmicutes	FJ665892	93	293	Cosseau <i>et al.</i> (2009) Não publicado
14	6	10, 87, 14, 16, 48, 26	<i>Enterobacter</i> sp.	FJ868806	100	475	Senthilkumar <i>et al.</i> (2009) Não publicado

Tabela 4.41 – Identificação dos clones do Domínio *Bacteria*. (Continuação)

UTO	Nº de Clones	Clone	Microrganismo	Acesso	Similaridade (%)	N. de pares	Referência
15	6	89, 113, 110, 23, 73, 64	<i>Klebsiella</i> sp.	FJ422735	99	490	Zhang <i>et al.</i> (2008) Não publicado
16	3	44, 101, 20	<i>Enterobacter</i> sp.	FJ189785	99	468	Math <i>et al.</i> (2008) Não publicado
17	1	109	Bactéria não cultivada da família Proteobacteria	DQ512845	98	416	Saha e Chakrabarti (2006) Não publicado
18	4	66, 76, 54, 46	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	AB362643	99	476	Tanaka <i>et al.</i> (2007) Não publicado
19	2	49, 85	uncultured Veillonellaceae bacterium	FJ393127	94	461	Borole <i>et al.</i> (2008) Não publicado
20	1	4	<i>Enterobacter</i> sp.	FJ611880	98	459	Rezzonico <i>et al.</i> (2009) Não publicado
21	1	9	Bactéria não cultivada da família Proteobacteria	EU560818	93	461	Chen <i>et al.</i> (2008) Não publicado
22	1	61	Bactéria não cultivada da família Proteobacteria	FJ393071	95	402	Borole <i>et al.</i> (2008) Não publicado
23	1	25	Bactéria não cultivada da família Proteobacteria	AJ575691	99	436	Burkert <i>et al.</i> (2003)
24	14	83, 119, 86, 69, 63, 7, 30, 21, 103, 31, 38, 95, 18, 43	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	AB374516	100	478	Fujita <i>et al.</i> (2008) Não publicado
25	1	8	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	D16269	92	480	Suzuki e Yamasato (1994)
26	1	72	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	AB374516	94	485	Fujita <i>et al.</i> (2008) Não publicado
27	3	79, 34, 105	Bactéria não cultivada da família Firmicutes	FN257632	98	471	Hery <i>et al.</i> (2009) Não publicado

Tabela 4.41 – Identificação dos clones do Domínio *Bacteria*. (Continuação)

UTO	Nº de Clones	Clone	Microrganismo	Acesso	Similaridade (%)	N. de pares	Referência
28	1	98	<i>Clostridium</i> sp.	DQ196630	98	478	Bowman <i>et al.</i> (2006)
29	1	117	Bactéria não cultivada da família Clostridiaceae	FJ205828	98	461	Krober <i>et al.</i> (2009)
30	1	12	Bactéria não cultivada da família Bacteroidetes	GQ049287	94	443	Grice <i>et al.</i> (2009)
31	1	55	Bactéria não cultivada da família Bacteroidetes	FJ393103	99	347	Borole <i>et al.</i> (2009)
32	2	53, 68	<i>Chryseobacterium</i> sp.	AM159535	91	468	Não publicado Friedrich e Lipski (2005) Não publicado

Figura 4.52 – Porcentagem de distribuição filogenética dos clones do consórcio microbiano da identificação de fragmentos do RNAr 16 S para o Domínio *Bacteria*.

Aproximadamente 26% dos clones apresentaram similaridade com *Clostridium* sp. (98%). Diversos estudos descrevem as espécies de *Clostridium*, como as responsáveis pela produção fermentativa de hidrogênio, bacilos gram positivos, formadores de endósporo, sobrevivem em pH próximos a 4,0 (FANG *et al.*, 2006). Estas espécies produzem hidrogênio, ácidos orgânicos (LIN *et al.*, 2008) e alcoóis a partir de carboidratos (UENO *et al.*, 2001). São microrganismos que podem ser encontrados em sedimentos marinhos nas profundidades dos oceanos, ambientes termofílicos e no trato intestinal de animais (LEE *et al.*, 2007; MAINTINGUER, 2009). Além disso, essas espécies fixam nitrogênio atmosférico, enquanto outras realizam metabolismo fermentativo.

Cerca de 7% dos clones apresentaram similaridade com *Klebsiella* sp. (99%), espécie envolvida com a produção de hidrogênio a partir de carboidratos (HUNG *et al.*, 2007). Fernandes (2008) relata que no estudo realizado por Hung *et al.* (2007) indicam que *Klebsiella* sp. não está diretamente relacionado com a produção de hidrogênio, mas com rotas

de consumo de O₂ criando condições favoráveis para a produção anaeróbia de hidrogênio via *Clostridium* sp. A presença deste microrganismo é admissível, pois decorrente da ausência de mecanismos específicos para manter condições de anaerobiose no reator, além da possível microaeração provocada pelo bombeamento do meio.

Dos clones observados, 12% estão relacionados com espécie de *Enterobacter* sp. (99%). De acordo com Peixoto (2008) e Fernandes (2008), esta espécie está associada com a rota de utilização do NADH, que envolve a geração de hidrogênio por meio da enzima hidrogenase pelo processo de reoxidação do NADH que é produzido via glicólise (SHIN *et al.*, 2007).

Apenas 2% dos clones estão relacionados com a espécie *Chryseobacterium* sp. (97%). De acordo com Dworkin *et al.* (2006), são bacilos gram negativos, sem motilidade. Esta espécie tem sido utilizada como redutora de nitrato, além de crescer em condições anaeróbias. Além disso, também é aeróbia, embora possa crescer na presença de 5% (v/v) de CO₂.

Observou-se que 77% (*Clostridium* a 27%, *Veillonellaceae* não cultivada a 26% e Firmicutes não cultivada a 24%) das espécies são da família Firmicutes. Esta filogenia, na maioria, possui uma parede celular gram positiva, têm a forma de coco ou de bacilo. Diversos membros deste grupo produzem endósporos (DWORKIN *et al.*, 2006).

A família da Proteobacteria não cultivada e dos Bacteroidetes não cultivados apresentaram apenas 1% dos seus clones relacionados. A Proteobacteria é um filo composto por bactérias gram-negativas e é definido principalmente pela sequência genética 16S rRNA.

As Proteobacterias são gram negativas. Apresenta também, uma grande variedade de tipos de metabolismo, sendo, na maioria, anaeróbias, mas há muitas exceções. A Proteobacteria divide-se em cinco grupos, usualmente consideradas classes, segundo os estudos de sequências de rRNA. Estes grupos denominam-se, segundo as letras gregas, de alfa a ípsilon (DWORKIN *et al.*, 2006).

Bacteroidetes é um filo do reino Bacteria que engloba três grandes grupos, divididos em três classes, cada uma com uma única ordem: Bacteroides, Flavobacterias e Sphingobacterias. São bactérias vetores de doenças diversas, como a colite, enterecolite, diverticulite. Que apesar de apresentarem certa similaridade em sua característica patogênica, causam males diferentes. Sobrevivem em áreas termais nas profundezas do mar, algumas vivem no solo, produzindo húmus; nas águas, ajudando a decomposição de elementos orgânicos (DWORKIN *et al.*, 2006).

A Figura 4.53 apresenta a árvore filogenética de consenso obtida com *primers* para o Domínio *Bacteria* proveniente das sequências obtidas da clonagem e sequenciamento do consórcio microbiano utilizado no reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com glicose para a produção de hidrogênio. Os valores dos coeficientes de similaridade verificados entre os clones e o Banco de Dados NCBI, variaram de 89 a 100% e indicaram presença de espécies relacionadas filogeneticamente, a partir da avaliação parcial de sequências do gene RNAr 16S. Foi acrescentada como *out group* sequência de *Thermotoga maritima* (NC000853).

Figura 4.53 – Árvore filogenética de consenso baseada nas sequências dos clones do consórcio microbiano com *primers* para Domínio *Bacteria*. Foi acrescentada como *out group* sequência de *Thermotoga marítima* (NC000853).

As condições operacionais impostas no reator favoreceram a presença dos gêneros *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, reconhecidos na literatura como produtores de hidrogênio, oriundos do inóculo de suinocultura (MAINTINGUER, 2009). Peixoto (2008) e Fernandes (2008) também identificaram espécies de *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter* de amostras de reatores de leito fixo e fluxo ascendente visando à produção de gás hidrogênio. Peixoto (2008) utilizou como material suporte polietileno de baixa densidade, alimentado com água residuária de indústria de refrigerantes (1992 mg DQO L⁻¹), com pH próximo a 5,5 e TDH de 0,5 h. Fernandes (2008) utilizou três reatores com materiais suporte diferentes (argila expandida, carvão vegetal e polietileno de baixa densidade reciclável), alimentados com sacarose (890,62 mg/L), meio Del Nery, pH 5,5, a 25°C e TDH de 0,5 h e 2,0 h. No caso de Peixoto (2008) e Fernandes (2008), o inóculo foi obtido pelo processo de fermentação natural do meio de alimentação, preparado com água de abastecimento, mantido em repouso durante 3 dias, em recipiente aberto.

4.6 Considerações finais

Este trabalho demonstrou que o hidrogênio pode ser produzido a partir da conversão de substratos orgânicos, incentivando o potencial de utilização de processos fermentativo para a produção de hidrogênio. A estabilidade durante a operação contínua por longa duração do RALF para a produção de hidrogênio pode ser garantida pelo método de tratamento prévio do inóculo, material suporte e inóculo propostos neste estudo. O biofilme formado favoreceu a produção mesofílica do hidrogênio, uma vez que o tratamento térmico possibilitou a eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos, e mantiveram as células acidogênicas com capacidade de formar endósporos, estruturas de resistência a condições desfavoráveis.

O rendimento máximo teórico da produção de hidrogênio prevê ácido acético como metabólito final da fermentação. Os ácidos orgânicos obtidos foram, principalmente, acético e butírico nos ensaios realizados com 2000 mg L⁻¹ e 4000 mg L⁻¹ de glicose. Esta constatação confirmou, no presente trabalho que, a produção elevada de hidrogênio esteve associada com o predomínio dos metabólitos solúveis da fermentação, tais como, ácido acético e ácido butírico, como observado por Zhang *et al.* (2007), Koskinen *et al.* (2007), Leite *et al.* (2008), Fernandes (2008), Peixoto (2008), Shida (2008), Barros (2009).

A produção biológica de hidrogênio decorrente do consórcio de gêneros de bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas, identificadas principalmente como *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Estas espécies identificadas também foram observadas nos trabalhos desenvolvidos por Koskinen *et al.* (2007), Fernandes (2008), Maintinguer *et al.* (2008) e Maintinguer (2009). Tal constatação pode comprovar que estas espécies produziram hidrogênio nas condições estudadas.

CAPÍTULO 5

5.1 Conclusões

Baseado nos resultados experimentais pode-se concluir que a fermentação da glicose nos reatores anaeróbios de leito fluidificado contendo 2000 mg L^{-1} , 4000 mg L^{-1} e 10000 mg L^{-1} de glicose apresentaram desempenho satisfatório para produção de H_2 . No entanto, nos reatores contendo 25000 mg L^{-1} de glicose, o rendimento foi limitado.

Em ambos os reatores, a produção volumétrica de hidrogênio aumentou com o incremento da taxa de carregamento orgânico e com a redução do TDH, com exceção dos reatores operados com 25000 mg L^{-1} de glicose. Também, verificou-se uma correlação linear entre a produção volumétrica de hidrogênio e a taxa de carregamento orgânico em todos os reatores. A produção volumétrica máxima foi obtida com taxa de carregamento orgânico de $1010,38 \text{ kg m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, correspondendo ao reator operado com 10000 mg L^{-1} de glicose, com adição de alcalinidade em TDH de 1 h.

O rendimento, em todos os oito reatores, aumentou com o incremento da taxa de carregamento orgânico até atingir um limite, e logo após reduziu significativamente. O rendimento máximo foi obtido quando o reator (R4CA) foi operado com $114,72 \text{ kg m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, com adição de alcalinidade, correspondendo ao TDH de 2 h e 4000 mg L^{-1} de glicose.

Verificou-se que o rendimento, na produção volumétrica de hidrogênio e na distribuição dos metabólitos solúveis, em ambos os reatores, foram influenciados pelo aumento da concentração de glicose. Os reatores operados com altas concentrações de glicose (10000 mg L^{-1} e 25000 mg L^{-1}) apresentaram maiores proporções de solventes como metabólitos solúveis.

De maneira semelhante, observou-se que a adição de alcalinidade influencia na distribuição dos metabólitos solúveis nos reatores. Verificou-se que, somente, os reatores operados com concentração de glicose entre 2000 mg L⁻¹ e 4000 mg L⁻¹, a adição de alcalinidade provocou o aparecimento do ácido propiônico. Então, pode-se atribuir que tanto valores baixos de pH e altas concentrações de glicose, podem inibir a presença de ácido propiônico.

O conteúdo de hidrogênio no biogás aumentou com a redução do TDH em todos os reatores, sendo que o valor máximo (77%) foi obtido pelo reator operado com 4000 mg L⁻¹ de glicose, sem adição de alcalinidade em TDH de 1 h.

O método de enriquecimento do inóculo mostrou-se eficiente, pois não foi detectada presença de metano no biogás, em ambos os reatores.

O reator operado com 4000 mg L⁻¹, com adição de alcalinidade, apresentou a distribuição mais favorável dos metabólitos solúveis para a produção de hidrogênio, o qual predominou o ácido acético e butírico. Neste mesmo reator, o rendimento da produção de hidrogênio foi superior aos outros reatores.

As análises de biologia molecular por meio da clonagem e sequenciamento das amostras do reator contendo 2000 mg L⁻¹ de glicose, com adição de alcalinidade, permitiram identificar bactérias semelhantes a *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. A produção biológica de hidrogênio pode ser atribuída ao consórcio de bactérias que estiveram presentes nas condições estudadas, identificados principalmente como espécies de *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, reconhecidos na literatura como espécies produtoras de hidrogênio.

5.2 Sugestões

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

- a) Estudar a produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado sob condições termofílicas;
- b) Estudar a produção de hidrogênio utilizando outras fontes de carbono em reator anaeróbico de leito fluidificado;
- c) Realizar a avaliação da comunidade microbiana através da técnica PCR e DGGE;
- d) Aplicar água residuária real para produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado;
- e) Estudar a fase acetogênica;
- f) Avaliar a variação da concentração do agente alcalinizante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMAN, I.; JANSSEN, M.; ROCHA, J.; WIJFFELS, R. H. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1195–208, 2002.
- ANNACHHATRE, A. P.; BHAMIDIMARRI, S. M. R. Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: process startup considerations. *Biotech. Adv.*, v. 10, p. 69-91, 1992.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; ANGELOPOULOS, K.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 110–119, 2008.
- APHA. Standard Methods for the examination for water and wastewater, 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation; 1998.
- BAGHCHEHSARAEI, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; REID, G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*, v. 33, n. 15, p. 4064-4073, 2008.
- BARROS, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. São Carlos. Dissertação (Mestrado) DEQ-UFSCar, 2009.
- BOWMAN, K.S.; MOE, W.M.; RASH, B.A.; BAE, H.S.; RAINEY, F.A. Bacterial diversity of an acidic Louisiana groundwater contaminated by dense nonaqueous-phase liquid containing chloroethanes and other solvents. *Journal FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 58, n. 1, p. 120-133, 2006.
- BRIONES, A.M.; DAUGHERTY, B.J.; ANGENENT, L.T.; RAUSCH, K.D.; TUMBLESON, M.E.; RASKIN, L. Microbial diversity and dynamics in multi- and single-compartment anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams. *Journal Environ. Microbiol.*, v. 9, n. 1, p. 93-106, 2007.

- BURKERT, U.; WARNECKE, F.; BABENZIEN, D.; ZWIRNMANN, E.; PERNTHALER, J. Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Journal Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 11, p. 6550-6559, 2003.
- CAI, M. L.; LIU, J. X.; WEI, Y. S. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 38, p. 3195–3202, 2004.
- CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN, P.J. Biohydrogen Production with Fixed-Bed Bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1167–1174, 2002.
- CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 57, p. 56–64, 2001.
- CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; LIN, M. C. Acid–base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 58, p. 224–228, 2002.
- CHOU, C. H.; WANG, C. W.; HUANG, C. C.; LAY, J. J. Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. *Int J Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1550–1558, 2008.
- DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol.*, v. 58, n. 4, p. 1233–9, 1992.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy*, v. 33, p. 6046–6057, 2008.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*, v. 26, p. 13–28, 2001.
- DEL NERY, V. Utilização de Lodo Anaeróbio Imobilizado em Gel no Estudo de Partida de Reatores de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo. São Carlos. Dissertação (Mestrado). SHS-EESC-USP, 1995.
- DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile Acids by Direct Titration. *Journal of Water Pollution Control Federation.*, v. 33, n. 4, p. 357-365, 1961.

- DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. *The Prokaryotes*. Springer, 2006.
- FANG, H.H.P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 1, p. 87-93, 2002.
- FANG, H.H.P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy*, v. 31, p. 683-692, 2006.
- FERNANDES, B.S. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. São Carlos. 116 p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 2008.
- GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; AHRING, B. K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *Int J Hydrogen Energy*, v. 31, n. 9, p. 1164–1175, 2006.
- GRICE, E.A.; KONG, H.H.; CONLAN, S.; DEMING, C.B.; DAVIS, J.; YOUNG, A.C.; BOUFFARD, G.G.; BLAKESLEY, R.W.; MURRAY, P.R.; GREEN, E.D.; TURNER, M.L.; SEGRE, J.A. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Journal Science*, v. 324, n. 5931, p. 1190-1192, 2009.
- GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, 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. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, p. 5488-5491, 2000.
- GOTTSCHALK, G. *Bacterial Metabolism*, second ed. Springer-Verlag, New York, 1986.
- HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1185–1193, 2002.
- HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int J Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1339–47, 2002.
- HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int J Hydrogen Energy*, v. 32, p. 172–84, 2007.

- HUNG, C. H.; LEE, K. S.; CHENG, L. H.; HUANG, Y. H.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, n. 3, p. 693-70, 2007.
- 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*, v. 111, n. 3, p. 297-309, 2004.
- IYER, P.; BRUNS, M. A.; ZHANG, H. S.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 66, n. 2, p. 166-173, 2004.
- JOHNSTON, B.; MAYO, M. C.; KHARE, A. Hydrogen: the energy source for the 21st century. *Technovation*, v. 25, p. 569-585, 2005.
- KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 569-582, 2006.
- KATAOKA, N.; MIYA, A.; KIRIYAMA, K. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Sci. Technol.* v. 36, n. 6-7, p. 41-47, 1997.
- KAWAGOSHI, Y.; HINO, N.; FUJIMOTO, A.; NAKAO, M.; FUJITA, Y.; SUGIMURA, S.; FURUKAWA, K. Effect of Inoculum Conditioning on Hydrogen Fermentation and pH Effect on Bacterial Community Relevant to Hydrogen Production. *Journal of Bioscience e Bioengineering*, v. 100, n. 5, p. 524-530, 2005.
- KHANAL, S.K.; CHEN, W.H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy*, v. 29, p. 1123-1131, 2004.
- KIM, I.S.; HWANG, M.H.; JANG, N.J.; HYUN, S.H.; LEE, S.T. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *Int. J. Hydrogen Energy*. v. 29, n. 11, p. 1133-40, 2004.
- 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 Biochem*, v. 41, p. 199-207, 2006.

- KINDZIERSKI, W.B.; FEDORAK, P.M.; GRAY, M.R.; HRUDEY, S.E. Activated carbon and synthetic resins as support material for methanogenic phenol-degrading consortia-comparison of surface characteristics and initial colonization. *Water Environmental Research.*, v. 64, p. 766-775, 1992.
- KOSKINEN, P. E. P.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, L. A. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, v. 97, n. 4, p. 742-758, 2007.
- KOSOUROV, S.; TSYGANKOV, A.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M. L. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnol Bioeng.*, v. 78, p. 731-740, 2002.
- KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnol Lett.*, v. 29, p. 685-695, 2007.
- KROBER, M.; BEKEL, T.; DIAZ, N.N.; GOESMANN, A.; JAENICKE, S.; KRAUSE, L.; MILLER, D.; RUNTE, K.J.; VIEHOVER, P.; PUHLER, A.; SCHLUTER, A. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal J. Biotechnol.*, v. 142, n. 1, p. 38-49, 2009.
- KUMAR, N.; DAS, D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microbiol Technol.*, v. 29, p. 280-287, 2002.
- KURODA, M.; YUZAWA, M.; SAKAKIBARA, Y.; OJAMURA, M. Methanogenic bacteria adhered to solid supports. *Water Research.* v. 22, p. 653-656, 1988.
- LAMED, R. J.; LOBOS, J. H.; SU, T. M. Effect of stirring and hydrogen production on fermentation products of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol.*, v. 54, p. 1216-1221, 1988.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques. In *Bacterial Systematics* ed. Stackenbrandt, E. and Goodfellow, M. 1991. p. 115-148. New York: John Wiley and Sons, Inc.

- LAY, J. J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 68, p. 269–278, 2000.
- LAY, J. J.; LEE, Y. J.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.*, v. 33, p. 2579–2586, 1999.
- LEE, K. S.; WU, J. F.; LO, Y. S.; LO, Y. C.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, v. 87, p. 648–657, 2004.
- LEE, Y-J; ROMANEK, C.S.; WIEGEL, J. *Clostridium aciditolerans* sp. Nov., an acid-tolerant spore-forming anaerobic bacterium from constructed wetland sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 311-315, 2007.
- 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. *Int J Hydrogen Energy*, v. 33, p. 579-586, 2008.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 29, p. 173–185, 2003.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*, v. 29, p. 173–85, 2004.
- 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.
- LI, X.; KRUMHOLZ, L.R. Influence of nitrate on microbial reduction of pertechnetate. *Environ. Sci. Technol.*, v. 42, n. 6, p. 1910-1915, 2008.
- LIN, C. Y.; CHANG, R. C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J Chem Technol Biotechnol.*, v. 74, n. 6, p. 498–500, 1999.
- LIN, C. N.; WU, S. Y.; CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicon-gel-immobilized anaerobic sludge. *Int J Hydrogen Energy*, v. 31, p. 2200-2210, 2006.

- LIN, C.Y.; WU C.C.; HUNG, C.H. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy*, v. 33, p. 43-50, 2008.
- LIN, C. N.; WU, S. Y.; CHANG, J. S.; CHANG, J. S. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3298–3301, 2009.
- LIU, W.T.; CHAN, O.N.; FANG, H.H.P. (2002). Microbial community dynamics during start up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Research*, v.36, p.3203-3210.
- LO, Y.C.; CHEN, W.M.; HUNG, C.H.; CHEN, S.D.; CHANG, J.S. Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res*, v. 42, p. 827–842, 2008.
- LOGAN, B. E.; OH, S. E.; KIM, I. S.; VAN GINKEL, S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol.*, v. 36, p. 2530–2535, 2002.
- LUEDERS, T.; POMMERENKE, B.; FRIEDRICH, M.W. Stable-Isotope Probing of Microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits: Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. *Journal Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 10, p. 5778-5786, 2004.
- 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. Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbio em batelada aplicado à produção de hidrogênio. São Carlos. Tese (Doutorado) SHS-EESC-USP, 2009.
- MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy.*, v. 33, p. 279-286, 2008.
- MELIS, A.; ZHANG, L.; FORESTIER, M.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen

- evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, v. 122, p. 127–135, 2000.
- MESSING, J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, v. 101, p. 20-78, 1983.
- MOHAN, S. V. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *Int J Hydrogen Energy.*, v. 34, n. 17, p. 7460-7474, 2009.
- MOMIRLAN, M.; VEZIROGLU, T. N. The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. *Int J Hydrogen Energy.*, v. 30, p. 795–802, 2005.
- MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere*, v. 64, p. 350-358, 2006.
- MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H₂ producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 40, p. 947-953, 2007.
- NANDI, R.; SENGUPTA, S. Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit Rev Microbiol.*, v. 24, p. 61–84, 1998.
- NISHIO, N.; NAKASHIMADA, Y. High rate production of hydrogen/methane from various substrates and wastes. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, v. 90, p. 63–87, 2004.
- NOIKE, T.; MIZUNO, O. Hydrogen fermentation of organic municipal wastes. *Water Sci Technol.*, v. 42, n. 12, p. 155–162, 2000.
- OH, S. E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol.*, v. 37, n. 22, p. 5186–5190, 2003.
- OH, S. E.; IYER, P.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. E. Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 87, p. 119–127, 2004.

- ORTEGA, F.S.; ROCHA, K.M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V.C. Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via “gelcasting” em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. *Cerâmica.*, v. 47, n. 304, p. 199–203, 2001.
- PEIXOTO, G. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes. São Carlos. Dissertação (Mestrado) SHS-EESC-USP, 2008.
- PORSCH, K.; MEIER, J.; KLEINSTEUBER, S.; WENDT-POTTHOFF, K. Importance of different physiological groups of iron reducing microorganisms in an acidic mining lake remediation experiment. *Journal Microb. Ecol.*, v. 57, n. 4, p. 701-717, 2009.
- REN, N.; WANG, B.; HUANG, J. C. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 54, p. 428–433, 1997.
- RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation.* v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.
- SHIDA, G. M. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado. São Carlos. Dissertação (Mestrado) SHS-EESC-USP, 2008.
- SHIN, J. H.; YOON, J. H.; AHN, E. K.; KIM, M. S.; SIM, S. J.; PARK, T. H. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.32, p. 192–199, 2007.
- SURESH, K.; PRAKASH, D.; RASTOGI, N.; JAIN, R.K. *Clostridium nitrophenolicum* sp. nov., a novel anaerobic p-nitrophenol-degrading bacterium, isolated from a subsurface soil sample. *Journal Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 57, p. 1886-1890, 2007.
- SUZUKI, T.; YAMASATO, K. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Journal FEMS Microbiol. Lett.*, v. 115, n. 1, p. 13-17, 1994.
- SVESHNIKOV, D. A.; SVESHNIKOV, N. V.; RAO, K. K.; HALL, D. O. Hydrogen metabolism of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. *FEBS Lett.*, v. 147, p. 297–301, 1997.

- TAGUCHI, F.; MIZUKAMI, N.; SAITO-TAKI, T.; HASEGAWA, K. Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. strain No. 2. Can. J. Microbiol. v. 41, p. 536–540, 1995.
- UENO, Y., HARUTA, S., ISHII, M., IGARASHI, Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. Applied Microbiology Biotechnology, v. 57, p. 555-562, 2001.
- VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. Environ Sci Technol, v. 35, p. 4726-4730, 2001.
- VAN GINKEL, S.W.; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. Water Research., v. 39, n. 16, p. 3819-3826, 2005.
- VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; VAZOLLER, R. F.; FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. Appl Microbiol Biotechnol., v. 48, p. 534-538, 1997.
- WANG, Y.; MU, Y.; YU, H.Q. Comparative Performance of Two Upflow Anaerobic Biohydrogen-Producing Reactors Seeded with Different Sludges. International Journal of Hydrogen Energy., v. 32, p. 1086–1094, 2007.
- WANG, J.L.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. Int J Hydrogen Energy., v. 33, p. 5392–5397, 2008.
- WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. Int J Hydrogen Energy., v. 34, p. 799-811, 2009.
- WU, S. Y.; LIN, C. N.; CHANG, J. S.; LEE, K. S.; LIN, P. J. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactor. Biotechnol Prog., v. 19, p. 828-832, 2003.
- YU, H. Q.; ZHENG, X. J.; HU, Z. H.; GU, G. W. High-rate anaerobic hydrolysis and acidogenesis of sewage sludge in a modified upflow reactor. Water Science and Technology., v. 48, n.4, p.69-75, 2003.

ZHAO, Q. B.; YU, H. Q. Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. *Bioresour Technol.*, v. 99, p. 1353–1358, 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. *Int J Hydrogen Energy*, v. 32, p. 185-191, 2007.

ZHANG, Z. P.; SHOW, K.Y.; TAY, J. H.; LIANG, D. T.; LEE, D. J. Biohydrogen Production with Anaerobic Fluidized Bed Reactors—A Comparison of Biofilm-Based and Granule-Based Systems. *Int J Hydrogen Energy*, v. 33, 1559-1564, 2008.