ADRIANA FERREIRA MALUF BRAGA

**Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios
termofílicos**

São Carlos

2014

VERSÃO CORRIGIDA

ADRIANA FERREIRA MALUF BRAGA

**Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios
termofílicos**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

São Carlos

2014

VERSÃO CORRIGIDA

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

B813p Braga, Adriana Ferreira Maluf
 Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios
 termofílicos / Adriana Ferreira Maluf Braga; orientador
 Marcelo Zaiat. São Carlos, 2014.

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

 1. Biohidrogênio. 2. Acidogênese. 3.
 Solventogênese. 4. UASB. 5. Reator tubular. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ADRIANA FERREIRA MALUF BRAGA.**

Título da tese: "Avaliação da produção de hidrogênio em reatores anaeróbios termofílicos".

Data da defesa: 29/04/2014

Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. **José Alberto Domingues Rodrigues**
(Instituto Mauá de Tecnologia/IMT)

Profa. Dra. **Magali Christe Cammarota**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

Prof. Dr. **Luiz Olinto Monteggia**
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS)

Profa. Dra. **Paula Loureiro Paulo**
(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS)

Resultado:

Aprovado

APROVADO

APROVADO

APROVADO

APROVADO

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Aos meus pais, Doracy e José Luiz, por sempre terem me incentivado a seguir os meus sonhos e pelo apoio incondicional e incansável durante todo o desenvolvimento dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, chamado de muitos nomes diferentes, mas que de fato representa uma mesma entidade que deu origem ao universo que nos cerca e nos deu a racionalidade e a curiosidade para tentarmos entendê-lo.

A minha família, especialmente, meus pais, José Luiz Maluf Braga e Doracy Ribeiro Ferreira, minha avó, Neusa Salamene Maluf (*in memoriam*), minha irmã, Alessandra Ferreira Braga, meu cunhado, Wagner de Oliveira Carrilho e meu sobrinho, Ângelo Luiz Braga Carrilho, pelo carinho, pelos momentos renovadores, pelos preciosos ensinamentos e por serem a minha fortaleza e motivação para seguir em frente independente dos obstáculos.

Ao professor Marcelo Zaiat, pela orientação, por estar sempre disposto a compartilhar seu conhecimento e experiência, dando a abertura para discussões, por confiar no meu trabalho e se tornando um grande conselheiro e amigo nesse período.

À aluna de iniciação, Mariana Reis, pelo suporte durante essa pesquisa e pela amizade.

À Escola de engenharia de São Carlos e o Departamento de Hidráulica e Saneamento por permitir a execução desta pesquisa.

À Fapesp pelo apoio financeiro à pesquisa e concessão das bolsas de doutorado (Processo 2010/05495-0) e de estágio e pesquisa no exterior (Processo 2012/21917-7).

À minha família em São Carlos, Taís Arriero Shinma e Aline da Silva Ribeiro, que se tornaram minhas irmãs de coração, me ensinaram muito, me apoiaram em todos os momentos, até nos ensaios em batelada durante a madrugada, choramos

juntas, rimos juntas e selamos uma amizade que o tempo não apaga. Ao meu outro irmão de coração, Antônio Djalma Nunez Ferraz Jr., pelas produtivas discussões sobre o projeto, pelo exemplo de competência e praticidade, pela ajuda nas madrugadas de medição de biogás, pelos conselhos sobre a vida, por ser muito companheiro (nos momentos de riqueza e de pobreza), sempre com muito bom humor. Aos compadres Marjolly Priscilla Shinzato Bais e Leandro Guimarães Bais Martins por toda a amizade e carinho, pelos conselhos nas decisões difíceis, pelo exemplo de generosidade, por me acolherem nos períodos pré e pós Dinamarca e ao meu afilhado Caio Shinzato Bais por ter trazido mais alegria a esse final de doutorado. Ao amigo Patrick Yuri Shinzato, pelas discussões filosóficas sobre a vida e a pesquisa, pela ajuda na parte computacional, por aguentar as minhas chatices aqui e no Velho Mundo e ser companheiro até no Pólo Norte! Aos amigos Vinicius Carvalho Rocha e Eloá Cristina Figueirinha Pelegrino, que também fazem parte dessa família, com direito à almoços de domingo, sessões de filmes e jogos, nas quais sempre surgiam ideias e pontos de vista interessantes sobre os mais diversos assuntos, me fazendo ver o quão importante esses momentos de descontração são para a saúde mental de qualquer pesquisador, hehehe...

À Melida Del Pilar Anzola Rojas pelo exemplo de coragem e determinação, pela amizade e suporte nos assuntos científicos e pessoais, por me incentivar a fazer o intercâmbio, pela companhia no congresso da China, o qual foi uma aventura desde antes de sairmos do solo brasileiro.

À Bruna de Souza Moraes, pela amizade que nasceu nos corredores do LPB, se solidificou em solo dinamarquês e continua depois do regresso, pelo exemplo de profissionalismo, pelas conversas produtivas, pelos momentos de confidências e pelas aventuras inesquecíveis! Skål!!

Ao Jesus García Sánchez, pela amizade e apoio em todos os momentos, pela contribuição nas diferenças finitas, pelos sábios conselhos e pelas dicas de espanhol, hehehe...

À Vivian Maria Carminato, pelo ombro amigo e sugestões tanto em questões pessoais quanto relativas à pesquisa, por me receber em sua casa e me fazer sentir parte da família no período que me hospedou.

Aos amigos Mara Rúbia de Lima e Silva, Mariana Fronja Carosia, Carla Eloísa Diniz dos Santos e Theo Syrto Octavio de Souza, colegas de trabalho, companheiros em momentos sérios e de diversão, amizades que foram surgindo e crescendo ao longo do doutorado, que agregaram ainda a Elisa Uliana e Milena Lima e Silva, e agora, no final desse processo, vejo que a amizade desse grupo foi um grande apoio nesse processo e será para a vida toda.

À Priscila Rossetto Camiloti e ao Eduardo Dellosso Penteado, pelo carinho e cumplicidade desde o começo, entramos juntos no grupo e aprendemos muito uns com os outros, sinto-me muito feliz e orgulhosa em ver o crescimento de vocês e sei que esse laço se manterá pelos anos vindouros!

À Livia Silva Botta, por ser alguém com quem sempre pude contar dentro e fora do laboratório, devido ao seu coração gigante e sua competência no trabalho, e pelos momentos divertidíssimos.

Aos Professores Eugênio Foresti, Maria Bernadete Varesche e Wiclef Dymurgo, pelas contribuições indiretas durante a convivência no LPB e, em especial, à professora Márcia Damianovic, pelas contribuições diretas na banca de qualificação.

Aos amigos que passaram pelo LPB e aos que ainda estão por lá, desculpem não citar o nome de cada um, pois são muitos e eu poderia deixar alguém de fora, mas saibam que sou grata pelas conversas inspiradoras e produtivas durante os cafés, por tornarem o ambiente de trabalho um lugar tão agradável e divertido, espaço de muitas teorias malucas sobre tudo, mas das quais sempre podemos tirar algumas verdades.

Às técnicas do LPB, Eloisa Pozzi, Isabel Kimiko Sakamoto e Carolina Aparecida Sabatini Mirandola pelo suporte durante o desenvolvimento do projeto e, em especial, à Maria Angela Tallarico Adorno, responsável pela cromatografia, por me socorrer em momentos críticos, fossem eles à noite ou aos fins de semana. Aos técnicos Fernando Garutti Moura pelo suporte na parte de informática e seu Edson na parte elétrica.

Aos funcionários da segurança e limpeza do bloco da Engenharia Ambiental, em especial à dona Rosa, ao por serem sempre muito prestativos.

Aos funcionários do Campus 1, Maria Auxiliadora de C. Altieri Pin (mais conhecida como Sá), Rosemeire Aparecida de Jesus, Priscila Carla Toselli de Almeida, Fernanda Maria Struzziatto Machado, Flávia Gialorenço Canova e André Canale Garcia pelo suporte e solicitude nas questões administrativas e de informática.

I would like to thank the University of Southern Denmark (SDU) for welcoming me to internship, professor Knud Villy Christensen for supervising me and for valuable discussions throughout development of the project in Denmark and professor Birgir Norddahl for informal conversations and suggestions that somehow contributed to the project. Tak skal du have.

I'm also thankful to Chandrakant Malwade, Behnaz Razi Parjikolaei, Maria Salud Camilleri Rumbau, Rime Bahij El-Houri, Theoharis Ouzounis, Theopoula Gkenou, Nataša Čereković, Ioanna Mavrokefalidou, Ana Filipa Gomes, Fábio Gomes, Agata Zarebska and Nicolas Givaudan for the friendship and support during my stay in Denmark , you've made this period be very special for me and I've learned a lot with each of you.

Por mais que tente não conseguirei agradecer aqui a todos que os que contribuíram de forma direta e indireta ao projeto e aos amigos me deram suporte durante esses quatro anos, mesmo de longe, mas isso não diminui a importância e nem a gratidão que sinto por vocês!

“Nada é tão perigoso ao desenvolvimento da mente humana quanto supor que nossa visão científica alcançou seu máximo, que não há mistérios na natureza, que nossos triunfos estão completos e que não há novos mundos para se conquistar”.

Humphry Davy

RESUMO

BRAGA, A. F. M. **Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios termofílicos.** Tese (Doutorado), Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 118 p. São Carlos, 2014.

A digestão anaeróbia termofílica é uma opção vantajosa para efluentes descartados a altas temperaturas, além de estimular rotas mais eficientes de produção de H_2 . No entanto, os resultados da literatura divergem bastante, os rendimentos de H_2 são inferiores ao valor teórico possível e poucos estudos avaliaram diferentes configurações para indicar a mais eficiente. Assim, este estudo avaliou a produção de H_2 a partir da sacarose em três tipos de reator: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), reator tubular de fluxo ascendente com leito empacotado (TCS) e sem material suporte (TSS), operados a 55°C . Os tempos de detenção hidráulica (TDH) aplicados ao reator UASB foram 12, 6 e 2 h e aos reatores TCS e TSS foram 2 e 0,5 h. Pré-tratamento térmico (100°C por 15 min) foi aplicado ao inóculo metanogênico do UASB e TCS e TSS foram auto inoculados. O efeito de nutrientes e a concentração nutricional ótima para a produção de H_2 foram investigados através de ensaios em batelada. Com TDH de 2 h, o material suporte afetou a transferência de massa, resultando em menor teor de H_2 no biogás quando presente, porém, maior conversão de sacarose e produção de H_2 . O pré-tratamento térmico não inibiu a metanogênese, sendo as condições operacionais mais importantes para a seleção dos microrganismos. TCS e TSS com TDH de 0,5 h apresentaram produção de H_2 similar e o material suporte afetou apenas as rotas metabólicas. Entre todas as operações, TCS e UASB com TDH de 2 h alcançaram os maiores valores de rendimento de H_2 (Y_{H_2}), respectivamente, $1,99 \pm 0,36$ e $2,56 \pm 0,84 \text{ molH}_2\text{.mol-sac}^{-1}$, através da via metabólica do etanol. TCS2 também demonstrou estabilidade e, apesar de o U2 ter gerado maiores porcentagens de H_2 no biogás, pode ser apontado como o mais eficiente para a produção de H_2 . A relação C:N:P, Fe^{+2} e Ni^{+2} tiveram efeito significativo sobre a produção de H_2 , e Y_{H_2} ótimo foi estimado para concentrações de $4,53 \text{ mgFe}^{+2}.\text{L}^{-1}$ e $0,045 \text{ mgNi}^{+2}.\text{L}^{-1}$.

Palavras-chave: Biohidrogênio. Acidogênese. Solventogênese. UASB. Reator tubular

ABSTRACT

BRAGA, A. F. M. **Hydrogen production in anaerobic thermophilic reactors**. Tese (Doutorado), Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 118 p. São Carlos, 2014.

The thermophilic anaerobic digestion is a suitable option for wastewater discharged at high temperatures; in addition, it is suitable for more efficient pathways for H_2 production. However, the results found in literature have divergences; the H_2 yields are lower than the theoretical possible value and only few studies evaluated different types of reactors and defined the more advantageous one. Therefore, this study evaluated H_2 production from sucrose in three types of reactor: upflow anaerobic sludge blanket (UASB), upflow tubular reactor with packed-bed (TCS) and without support materials (TSS), operated at 55°C. The hydraulic retention time (HRT) applied to UASB reactor was 12, 6 and 2h and to TCS and TSS was 2 and 0.5h. Thermal pretreatment (at 100°C, for 15 min) was applied to the methanogenic inoculum of UASB and TCS and TSS was inoculated through natural fermentation process. The effect of nutrients and the optimal concentration of nutrients for H_2 production were evaluated through batch assays. At HRT of 2h, the support material affected the mass transferring, leading to lower content of H_2 in the biogas when it is used; however, in this condition it was found higher sucrose conversion and H_2 production. The operational conditions showed to be more efficient for methanogenesis than pretreatment. TCS and TSS at HRT of 0.5h presented similar H_2 production and the support material affected only the metabolic pathways. Among all the conditions assessed, TCS and UASB at HRT of 2h reached the highest values of H_2 yield highest Y_{H_2} , respectively, 1.99 ± 0.36 and $2.56 \pm 0.84 \text{ molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$, through ethanol pathway. TCS2 demonstrated stability production also and, despite the U2 have achieved higher percentage of H_2 in biogas, it can be pointed out as more efficient for H_2 production. The ratio C:N:P, Fe^{+2} and Ni^{+2} showed significant effect on H_2 production, and the optimal Y_{H_2} was estimated for $4.53 \text{ mgFe}^{+2}.\text{L}^{-1}$ e $0.045 \text{ mgNi}^{+2}.\text{L}^{-1}$.

Keywords: Biohydrogen, Acidogenesis, Solventogenesis, UASB, Tubular reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dimensões e esquema do reator tubular.	54
Figura 2 - Dimensões e esquema do reator UASB.	55
Figura 3 – Material suporte cortado e gráfico de sua granulometria.	57
Figura 4 – Reatores operando em fluxo contínuo. A – UASB; B – leito fixo.	59
Figura 5 – Curvas E_{θ} função de θ obtidas para cada operação.	71
Figura 6 – Grânulos utilizados para a inoculação do reator (A) e grânulos ao final da operação (B).	74
Figura 7 - Porcentagem de H_2 e CH_4 no biogás (A), pH e a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente (B) durante as operações em reator UASB: USU, partida do reator; U12, UASB com TDH de 12h; U6, UASB com TDH de 2.	75
Figura 8 – Visão geral do desempenho do reator UASB na produção de H_2 em todas as etapas: USU, partida do reator; U12, UASB com TDH de 12h; U6, UASB com TDH de 2.. VMH: vazão molar de H_2 ; PVH: produção volumétrica de H_2 ; CS: conversão de sacarose; Y_{H_2} : rendimento de H_2	78
Figura 9 – Concentração dos produtos metabólicos solúveis (PMS) produzidos através da acidogênese e solventogênese em reator UASB: USU, partida do reator; U12, UASB com TDH de 12h; U6, UASB com TDH de 2.	79
Figura 10 – Conversão de sacarose (CS) e a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente no reator tubular com leito empacotado e operado com TDH de 2h (A) e 0,5h (B).	81
Figura 11 - Visão geral do desempenho do reator TCS na produção de H_2 . Porcentagem de H_2 no biogás e VMH - vazão molar de H_2 (A – TDH de 2h e B – TDH de 0,5h); Y_{H_2} - rendimento de H_2 e pH (C – TDH de 2h e D – TDH de 0,5h).	82
Figura 12 - Concentração dos produtos metabólicos solúveis (PMS) produzidos no reator tubular com leito empacotado e TDH de 2 h (TCS2) e 0,5h (TCS).	84

Figura 13 - Conversão de sacarose (CS) e concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente do reator tubular sem suporte e operado com TDH de 2 h (A) e 0,5 h (B).	86
Figura 14 - Visão geral do desempenho do reator TSS na produção de H ₂ . Porcentagem de H ₂ no biogás e VMH - vazão molar de H ₂ (A – TDH de 2h e B – TDH de 0,5h); YH ₂ - rendimento de H ₂ e pH (C – TDH de 2h e D – TDH de 0,5h)	87
Figura 15 - Concentração dos produtos metabólicos solúveis (PMS) produzidos no reator tubular sem material suporte e TDH de 2h (TSS2) e 0,5h (TSS).	89
Figura 16 – Principais variáveis obtidas com os reatores operados com TDH de 2h: A – porcentagem de H ₂ no biogás; B – PVH, produção volumétrica de H ₂ ; C – YH ₂ , rendimento de H ₂ ; D – PMS, produto metabólico solúvel: EtOH (entanol), MeOH (metanol), Hbu (ácido butírico), Hpr (ácido propiônico), Hac (ácido acético), Hfo (ácido fórmico), Hla (ácido láctico).	90
Figura 17 - Principais variáveis obtidas com os reatores operados com TDH de 0,5h: A – porcentagem de H ₂ no biogás; B – PVH, produção volumétrica de H ₂ ; C – YH ₂ , rendimento de H ₂ ; D – PMS, produto metabólico solúvel: EtOH (entanol), MeOH (metanol), Hbu (ácido butírico), Hpr (ácido propiônico), Hac (ácido acético), Hfo (ácido fórmico), Hla (ácido láctico).	92
Figura 18 – Agrupamento das comunidades microbianas nas operações do reator UASB: nos dias 110 (U12A), 211 (U12B), 282 (U6) e 366 (U2).	100
Figura 19 – Agrupamento das comunidades microbianas nas operações dos reatores tubular com leito empacotado (TCS), tanto no leito empacotado (LE: TCS2LE, para TDH de 2 h, e TCS0,5LE para TDH de 0,5 h) quanto no compartimento de acúmulo de biomassa (CA: TCS2CA, para TDH de 2, e TCS0,5CA para TDH de 0,5); tubular sem material suporte (TSS) e UASB com TDH de 2 h (U2).	101
Figura 20 – Diagramas de Pareto mostrando os efeitos de cada nutriente sobre a velocidade molar de produção de H ₂ (A) e rendimento de H ₂ (B).	103
Figura 21 – Superfícies de resposta das variáveis VPH (A) e YH ₂ (B) em função de seus respectivos fatores influentes.	105
Figura 22 – Superfície de resposta para a variável YH ₂ em relação às concentrações de Fe ²⁺ e Ni ²⁺	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de operação dos reatores na fase 1.	59
Tabela 2 – Concentrações e nutrientes testados no planejamento Plackett-Burman.	68
Tabela 3 – Concentrações utilizadas no planejamento pelo método da diagonal de maior inclinação.	68
Tabela 4 – Valores para a região ótima testados no planejamento Composto Central.	69
Tabela 5 – Valores para a região ótima testados no segundo experimento planejamento Composto Central.	69
Tabela 6 – Dados experimentais dos ensaios hidrodinâmicos.	72
Tabela 7 – Valores médios obtidos para as variáveis de produção de H_2 ao longo da operação do reator UASB.	76
Tabela 8 – Valores médios obtidos para as variáveis da produção de H_2 durante o período de estabilidade das operações TCS2 e TCS0,5.	83
Tabela 9 - Valores médios obtidos para as variáveis da produção de H_2 durante o período de estabilidade para TSS2 e durante toda a operação de TSS0,5.	88
Tabela 10 – Valores médios dos coeficientes de rendimento dos PMS (YPMS).	93
Tabela 11 – Balanço estequiométrico de H_2 , baseado em 1 mol de sacarose convertida.	96
Tabela 12 – Avaliação da estabilidade e principais PMS produzidos nas configurações de reatores testadas no presente estudo.	99
Tabela 13 – Avaliação da estabilidade e principais PMS produzidos nas configurações de reatores testadas no presente estudo.	99
Tabela 14 – Matriz <i>Plackett-Burman</i> e os valores de VPH e Y_{H_2} para cada ensaio.	102

Tabela 15 – Resultados obtidos com o planejamento pelo método da diagonal de maior inclinação.....	104
Tabela 16 – Matriz do planejamento <i>Composto Central</i> e resultados obtidos.....	105
Tabela 17 – Matriz do planejamento <i>Composto Central</i> variando apenas Fe^{+2} e Ni^{+2} e resultados obtidos.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis Of Variance</i>)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CS	Conversão de Sacarose
CSTR	Reatores de Mistura Completa (<i>Continuous Stirred Tank Reactor</i>)
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DP	Desvio Padrão
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DTR	Distribuição de Tempo de Residência
EP	Erro Padrão
EPS	Exopolissacarídeo
EtOH	Etanol
Hac	Ácido acético
Hbu	Ácido butírico

Hfo	Ácido fórmico
Hla	Ácido lático
Hpr	Ácido propiônico
IPCC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>)
MeOH	Metanol
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NFOR	NADH:Ferredoxina Oxidoreductase (<i>NADH: Ferredoxin Oxidoreductase</i>)
PCR	Reação em Cadeia De Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFL	Lise Piruvato:Formiato (<i>Pyruvate:Formate Lyase</i>)
PFOR	Piruvato:Ferredoxina Oxidoreductase (<i>Pyruvate: Ferredoxin Oxidoreductase</i>)
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Poli-β-Hidroxibutirato
PMS	Produto Metabólico Solúvel
PVH	Produção Volumétrica de Hidrogênio
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico (<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>)
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
SVT	Sólidos Voláteis Totais
TCS	Tubular Com Leito Empacotado (Tubular Com Suporte)
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica

TRC	Tempo de Retenção Celular
TSS	Tubular Sem Material Suporte (Tubular Sem Suporte)
UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e escoamento ascensional (<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>)
VMH	Vazão Molar de Hidrogênio
VMPH	Velocidade Molar de Produção de Hidrogênio
YH ₂	Coeficiente de Rendimento de Hidrogênio
YPMS	Coeficiente de Rendimento do Produto Metabólico Solúvel

LISTA DE SÍMBOLOS

$\overline{\theta}_h$	TDH médio
C_{sf}	Concentração de sacarose no efluente
C_{so}	Concentração de sacarose no meio afluyente
MM_s	Massa molar da sacarose
v_s	Velocidade molar de sacarose convertida
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μL	microlitro
μm	micrômetro
atm	Atmosfera
C:N:P	Relação carbono-nitrogênio-fósforo
C:N	Relação carbono-nitrogênio
C:P	Relação carbono- fósforo
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Sacarose
CaCl_2	Cloreto de cálcio
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Ácido butírico
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	Ácido propiônico
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Etanol

$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$	Ácido láctico
CH_3COCOOH	Piruvato
CH_3COOH	Ácido acético
CH_3COSCoA	Acetil Coenzima A
CH_3OH	Metanol
CH_4	Metano
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Uréia
C_i	Concentração no instante i
cm	Centímetro
$C_{\text{máx}}$	Concentração máxima
Co^{+2}	Cobalto na forma iônica
CO_2	Dióxido de carbono
CoASH	Coenzima A
CoCl_2	Cloreto de cobalto
d	Dia
D	Diâmetro
D/uL	dispersão longitudinal
dt	Derivada em função do tempo
E_θ	E dividido pelo TDH médio
Fd	Ferredoxina
FdH_2	Ferredoxina reduzida

Fe	Ferro
Fe ⁺²	Ferro na forma de íon ferroso
FeCl ₃	Cloreto férrico
FeSO ₄	Sulfato ferroso
F _m	Fator de calibração do medidor
g	Grama
h	hora
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
h _c	Altura de cada compartimento
HCl	Ácido clorídrico
HCOOH	Ácido fórmico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L	Litro
Mg	Magnésio
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	minuto

xxx

mm	Milímetro
N	Número de tanques-em-série
Na	Sódio
Na ⁺²	Sódio na forma iônica
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
n _{CH4}	Número de mols de CH ₄
n _{CO2}	Número de mols de CO ₂
n _{H2}	Número de mols de H ₂
Ni	Níquel
Ni ⁺²	Níquel na forma iônica
NiSO ₄	Sulfato de níquel
p	Nível descritivo
PA	Padrão
i _V L	Índice de vazios do leito
P _p	Porcentagem que passou
P _r	Porcentagem retida
Q _g	<i>Vazão de biogás</i>
sac	Sacarose
Se ²	Selênio na forma iônica
SeO ₂	Óxido de selênio

t	Tempo
TCS0,5	Tubular com leito empacotado e TDH de 0,5h
TCS2	Tubular com leito preenchido e TDH de 2h
TSS0,5	Tubular sem suporte e TDH de 0,5h
TSS2	Tubular sem material suporte e TDH de 2h
U12	UASB com TDH de 12h
U2	UASB com TDH de 2h
U6	UASB com TDH de 6h
USU	Partida (<i>start up</i>) UASB
v_{asc}	Velocidade ascensional
V_c	Volume dos compartimentos
V_{lp}	Volume do leito preenchido
V_{lv}	Volume de leito vazio
V_m	Volume de gás marcado pelo medidor
Zn	Zinco
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco
Δ	Incrementos na concentração
θ	Tempo dividido pelo TDH médio
σ^2	Variância
$\sigma\theta^2$	Variância adimensional

SUMÁRIO

Agradecimentos	ix
Resumo	xv
Abstract.....	xvii
Lista de Figuras.....	xix
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxiii
Lista de Símbolos.....	xxvii
Sumário	xxxiii
1. Introdução	37
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. Revisão Bibliográfica.....	43
3.1. Rotas metabólicas de produção de hidrogênio por via anaeróbia fermentativa.....	43
3.2. Influência da temperatura no processo fermentativo	45

3.3.	Influência da configuração do reator e tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de H_2	46
3.4.	Efeito das condições nutricionais para a produção de H_2	49
4.	Materiais e Métodos	53
4.1.	Etapas experimentais	53
4.2.	Reatores.....	53
4.3.	Substrato Sintético	56
4.4.	Material suporte	56
4.4.1.	<i>Granulometria do material suporte</i>	56
4.4.2.	<i>Índice de vazios</i>	57
4.5.	Inoculação dos reatores.....	58
4.6.	Protocolo experimental da etapa 1 – Operação de reatores contínuos 58	
4.7.	Ensaio hidrodinâmicos.....	60
4.8.	Métodos Analíticos	62
4.9.	Cálculos das variáveis de produção de H_2	63
4.10.	Análises microbiológicas.....	65
4.11.	Métodos Estatísticos	66
4.12.	Protocolo experimental da etapa 2 – Verificação da condição nutricional ótima.....	66
4.12.1.	<i>Planejamento fatorial do experimento em batelada</i>	67
5.	Resultados e Discussão	71
5.1.	Etapa 1 – Operação de reatores	71
5.1.1.	<i>Ensaio hidrodinâmicos</i>	71
5.1.2.	<i>Influência do TDH na operação do reator UASB</i>	74
5.1.3.	<i>Influência do TDH na operação do reator tubular com leito empacotado</i> 80	

5.1.4.	<i>Influência do TDH na operação do reator tubular sem leito empacotado</i>	85
5.1.5.	<i>Influência do tipo de reator na produção de hidrogênio.....</i>	89
5.1.6.	<i>Considerações sobre rotas metabólicas.....</i>	92
5.1.7.	<i>Definição da melhor configuração</i>	98
5.1.8.	<i>Análise microbiológica nos reatores</i>	100
5.2.	Etapa 2 – Verificação da condição nutricional ótima	101
6.	Conclusões.....	109
7.	Sugestões para trabalhos futuros	111
8.	Referências Bibliográficas	113

1. INTRODUÇÃO

A relação entre as atividades antrópicas, entre elas a queima de combustíveis fósseis, e as mudanças climáticas vem sendo tema de grandes discussões no campo científico, tendo sido confirmada no relatório de 2013 do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC). Assim, a necessidade de transição da matriz energética mundial para alternativas limpas e sustentáveis deve se tornar uma das questões prioritárias dos governos ao redor do mundo. Nesse contexto, a geração de energia a partir do gás hidrogênio aparece como excelente opção, pois sua combustão gera apenas água. No entanto, a forma e fontes de produção do gás hidrogênio são determinantes para o cumprimento do objetivo de sustentabilidade no uso desse carreador energético.

O gás hidrogênio pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis (reforma do gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos, gaseificação do carvão), de fontes renováveis (hidrólise a partir da energia solar, energia eólica, energia hidroelétrica) e por processos biológicos (fotossinteticamente, por foto-fermentação ou fermentação anaeróbia).

Dentre os processos utilizados, os biológicos têm se destacado nos últimos anos, principalmente pelo custo mais baixo e por permitirem a geração de hidrogênio a partir de matérias-primas renováveis, como resíduos orgânicos por bactérias fermentativas e de CO₂ por microrganismos autótrofos fotossintetizantes. As duas vias, fotossintética e fermentativa, têm sido amplamente estudadas. No entanto, a produção fotossintética de hidrogênio é limitada pela baixa eficiência que as bactérias apresentam na utilização da luz (Hallenbeck, 2009). Para este mesmo autor, outro problema é a concomitante produção de oxigênio no processo, visto que misturas hidrogênio/oxigênio altamente explosivas podem ser geradas, além das

enzimas hidrogenases, que atuam na formação do hidrogênio serem altamente sensíveis ao oxigênio.

O uso do processo fermentativo parece ser mais promissor tecnicamente e vários trabalhos têm levantado as vantagens e desvantagens de tal tecnologia. Para Wang & Wan (2009), as vantagens da produção por via fermentativa são: alta velocidade de produção de hidrogênio e operação simples, além da possibilidade de utilizar várias substâncias orgânicas como substratos, como o caso da utilização de águas residuárias ricas em carboidratos, as quais servirão para a produção de energia e ainda receberão tratamento parcial. Porém, entre os desafios da produção de H_2 por via fermentativa ainda estão a manutenção de produção contínua e estável do H_2 , bem como a obtenção de altos rendimentos, próximos aos previstos estequiometricamente. Além disso, as condições ambientais e nutricionais que afetam o processo não estão totalmente definidas na literatura científica.

As condições ambientais e nutricionais nas quais o consórcio microbiano será desenvolvido podem estimular ou inibir a expressão gênica de enzimas ligadas à produção e consumo de H_2 , estimular o crescimento dos microrganismos, selecionar espécies, atuar na termodinâmica das reações e nas limitações à transferência de massa do sistema. Assim, estudos sobre condições nutricionais são fundamentais para entendimento e aprimoramento dos processos biológicos aplicados à produção de gás hidrogênio a partir de diversas fontes orgânicas, ainda mais quando resíduos ou despejos de um processo produtivo são utilizados, devido à variabilidade da composição da matéria-prima. Entre os fatores que determinam as condições ambientais impostas aos microrganismos estão o tipo de reator e o tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado a ele, pois definem a forma de crescimento da biomassa (disperso ou aderido), intensidade de mistura e contato entre biomassa, substrato e os produtos da fermentação. Portanto, estudos comparativos entre diferentes configurações de reatores, nos quais o substrato e demais fatores ambientais sejam os mesmos, são imprescindíveis para a melhoria do processo fermentativo visando à produção de hidrogênio.

Muitos pesquisadores tem se dedicado a avaliar tais condições quando águas residuárias são usadas e muitos avanços foram conseguidos nos últimos anos. No entanto, pesquisas nessa direção com aplicação de condições termofílicas são

escassas na literatura, principalmente porque as águas residuárias são geralmente lançadas em temperaturas menores que 40°C. Alguns despejos, entretanto, são lançados a altas temperaturas, como a vinhaça gerada na etapa de destilação na produção do bioetanol, e os processos termofílicos poderiam ser aplicados nesses casos, justificando estudos fundamentais nessa área.

Assim, considerando a escassez de dados na literatura sobre processos anaeróbios termofílicos aplicados à produção de hidrogênio, esta pesquisa avaliou a operação de reatores acidogênicos à temperatura termofílica, buscando uma configuração de reator eficiente e condições nutricionais adequadas para viabilizar a produção de H₂.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal desse projeto foi avaliar as condições de operação para produção de hidrogênio em reatores anaeróbios termofílicos (55°C), com vistas a obter subsídios técnicos para indicar a configuração de reator mais adequada, entre o reator tubular, com e sem leito empacotado, e o reator de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB).

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do projeto foram:

- Avaliar a influência da configuração do reator no rendimento e na produção de hidrogênio, operando reatores UASB e tubular com e sem material suporte, todos operando a 55°C;
- Analisar os efeitos da configuração do reator e tempo de detenção hidráulica (TDH) nas rotas metabólicas estabelecidas no sistema;
- Estabelecer os melhores TDH e carga orgânica volumétrica (COV) para operação de cada reator;
- Testar diferentes concentrações de micronutrientes (Fe, Ni, Mg, Co, Se, Zn) e macronutrientes (P, N), determinando a composição capaz de melhorar a atividade das bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Rotas metabólicas de produção de hidrogênio por via anaeróbia fermentativa

Um rendimento teórico de $8 \text{ molH}_2 \cdot \text{sacarose}^{-1}$ pode ser obtido pela via fermentativa anaeróbia, assumindo que carreadores comuns de elétrons, como NADH, ferredoxina reduzida e formiato, realizam a transferência de elétrons aos prótons (Thauer, Jungermann, & Decker, 1977). Contudo, o processo de fermentação anaeróbia pode gerar diferentes rendimentos de H_2 (YH_2), dependendo do substrato e da rota metabólica desenvolvida pelo consórcio microbiano. Após hidrólise dos carboidratos, segue-se a glicólise dos monossacarídeos, que pode render 4 mols de NADH, no caso da sacarose (formada por uma molécula de glicose e uma de frutose) como substrato (Equação 1). O piruvato resultante pode ser utilizado pelos microrganismos na maioria das vezes através da rota lise piruvato:formiato (PFL – *pyruvate:formate lyase*) (Equações 2-3) e/ou piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR – *pyruvate: ferredoxin oxidoreductase*) (Equações 4-5) para produzir H_2 . Assim, essas etapas podem resultar em 4 mols de H_2 quando a NADH é oxidada pelo NADH:ferredoxina oxidoreductase (NFOR – *NADH: ferredoxin oxidoreductase*) (Equação 6), pela redução direta pela hidrogenase (Equação 7) ou outra rota, mais 4 mols gerados pela produção de Acetil-CoA, se o ácido acético for o produto final (Equação 8) (Hallenbeck, Abo-Hashesh, & Ghosh, 2012; Cai, Jin, Monis, & Saint, 2011; Sinha & Pandey, 2011).

Glicólise

Rota metabólica PFL

Rota metabólica PFOR

Reação NFOR

Oxidação direta por hydrogenase

Ácido acético via Acetyl-CoA

A rota via PFL é comumente associada a microrganismos facultativos, enquanto que a PFOR é encontrada na maioria dos anaeróbios estritos (Cai, Jin, Monis, & Saint, 2011). Microrganismos que não possuem a rota PFOR são incapazes de liberar o hidrogênio da NADH na forma molecular (H_2) via NFOR, sendo necessária sua oxidação à NAD^+ por meio da produção de produtos metabólicos como ácido butírico (Equação 9), propiônico (Equação 10) e etanol (Equação 11) (N. Ren, Li, Li, Wang, & Liu, 2006; Tanisho & Ishiwata, 1995).

Ácido butírico via Acetyl-CoA *Ácido propiônico via piruvato* *Etanol via Acetyl-CoA* **3.2. Influência da temperatura no processo fermentativo**

Na prática, os baixos Y_{H_2} obtidos através da fermentação estão também associados ao fato da formação de H_2 catalisada pela hidrogenase ser afetada pelo tipo de carreador intracelular de elétrons e poder ser interrompida pelo acúmulo de H_2 (Chou, Jenney, Adams, & Kelly, 2008). Segundo Angenent, Karim, Al-Dahhan, Wrenn, & Domínguez-Espinosa (2004), a produção de hidrogênio utilizando ferredoxina continua enquanto a pressão parcial de hidrogênio se mantiver inferior a 0,3 atm; para a NADH o valor deve ser inferior a $0,6 \times 10^{-4}$ atm. Como a solubilidade do H_2 é inversamente proporcional à temperatura, sistemas operados na faixa termofílica (40 à 60°C) permitem maior transferência do H_2 para o biogás que aqueles trabalhando em temperaturas mesofílicas (25 à 40°C). Contudo, conforme apontado por Sinha & Pandey (2011), o aumento da temperatura de conversão da glicose altera a constante de equilíbrio da reação levando ao aumento da concentração de H_2 na fase líquida. Portanto, o aumento da temperatura pode melhorar a produção de H_2 se o sistema permitir a transferência do H_2 adicional para biogás.

Kongjan, Min, & Angelidaki (2009) afirmam que a utilização da temperatura termofílica extrema (70°C) para a fermentação de hemicelulose hidrolisada por cultura mista favoreceu a produção de hidrogênio via rota do acetato. Para esses

autores, o resultado se deve às melhores condições termodinâmicas e maior tolerância dos microrganismos termofílicos à alta pressão parcial de hidrogênio.

Testando diferentes temperaturas de operação (20, 37 e 55°C) em reatores de mistura contínuos, Karlsson, Vallin, & Ejlerstson (2008) obtiveram melhor rendimento a 55°C, porém, a maior velocidade de produção ocorreu a 37°C.

Além disso, trabalhando à temperatura de 55°C, Luo, Karakashev, Xie, Zhou, & Angelidaki (2011) verificaram a inibição da homoacetogênese em ensaios em batelada utilizando substrato sintético à base de glicose. A homoacetogênese é uma rota de consumo de H₂ e produção de ácido acético (Equação 12) utilizada por microrganismos hidrogenotróficos facultativos, que podem crescer heterotroficamente, utilizando substratos orgânicos como açúcares, álcoois e alguns ácidos orgânicos, ou autotroficamente a base de H₂, CO₂ ou CO (Saady, 2013). Porém, ainda há muitas incertezas sobre os fatores que levam à mudança de rota metabólica dos microrganismos homoacetogênicos e que determinam sua dominância dentro do consórcio microbiano. Diminuição da relação substrato/microrganismo, aumento da pressão parcial de H₂ e deficiências nutricionais são algumas das hipóteses (Saady, 2013). Assim, o menor requerimento de substrato para o crescimento de microrganismos termofílicos em relação aos mesofílicos e as diferenças entre as espécies adaptadas a cada faixa de temperatura, podem minimizar a ocorrência de homoacetogênese, permitindo produção contínua e mais estável do gás hidrogênio.

3.3. Influência da configuração do reator e tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de H₂

A configuração do reator exerce grande influência nos processos biológicos que ocorrem em seu interior, uma vez que determina a hidrodinâmica do sistema e, assim, os processos de transferência de massa e a forma de crescimento da biomassa (suspensa, em grânulos ou aderida) no sistema.

A maioria dos estudos voltados para a produção de H_2 vem sendo realizada em reatores de mistura (em inglês *continuous stirred tank reactor* - CSTR), por permitir melhor contato entre biomassa e substrato e diminuir a resistência à transferência de massa no reator, permitindo a transferência do H_2 do meio líquido para gasoso. No entanto, nos reatores CSTR a biomassa fica suspensa no meio líquido e o tempo de retenção celular (TRC) é igual ao tempo de detenção hidráulica (TDH), limitando a concentração de biomassa no sistema (Wang & Wan, 2009). Contudo, de acordo com Hawkes, Hussy, Kyazze, Dinsdale, & Hawkes (2007), microrganismos consumidores de H_2 podem ser inibidos ao se aplicar baixos tempos de detenção hidráulica (TDH) aos reatores. Dessa forma, reatores com biomassa imobilizada são uma alternativa, sejam eles com biomassa granular ou aderida ao meio suporte, pois são capazes de operar com baixos TDH, mas mantendo o TRC alto, o que permite a manutenção de biomassa acidogênica especializada.

Babu, Mohan, & Sarma (2009) encontraram resultados superiores de produção de H_2 em reatores com biofilme, se comparados com reatores de crescimento disperso. Show et al. (2010), estudando reatores com células imobilizadas e suspensas, obtiveram melhores resultados para a produção de H_2 utilizando processo com lodo granular. Entre os reatores com biomassa imobilizada mais comuns estão os reatores de leito empacotado e o UASB.

Os reatores de leito empacotado (também chamados leito fixo), com partículas biocatalíticas imobilizadas, têm sido largamente usados pela indústria. Por exemplo, enzimas imobilizadas são utilizadas para a isomerização da glicose nesse tipo de reator, os quais também são utilizados para a hidrólise seletiva da penicilina (Bailey & Ollis, 1986).

Uma forma primitiva de reator de leito fixo foi descrita por Young & McCarty (1969) para a produção de metano por substrato sintético à base de carboidratos e proteínas, utilizando rochas como suporte de biomassa. Esses reatores, denominados originalmente de filtros anaeróbios, são geralmente tratados com o modelo de escoamento pistonado e, nas configurações mais comuns para o tratamento de efluentes, partículas suporte inertes são adicionadas ao reator e a biomassa adere por meio da formação de biofilmes. O material, o formato e tamanho das partículas interferem na área superficial disponível para a aderência microbiana

e no escoamento do fluido entre as partículas, podendo levar à formação de caminhos preferenciais e pequenas zonas de recirculação interna.

Reatores UASB são amplamente conhecidos por permitirem a auto imobilização dos microrganismos através formação de lodo granular, resultando em um sistema robusto de tratamento para efluentes com alta carga orgânica, que permite operações com baixo TDH e alto TRC. Sistemas de tratamento utilizando reatores UASB em duas fases, ou seja, acoplando um reator para acidogênese e um segundo para metanogênese, têm sido utilizados para garantir a manutenção das condições ambientais específicas para cada comunidade microbiana (Fox & Pohland, 1994).

No entanto, o enfoque na produção de metano deixou uma lacuna no conhecimento sobre o desempenho de reatores de leito empacotado e UASB na produção de H_2 e os efeitos das condições operacionais em sua eficiência, principalmente quando se trata de operação sob condição termofílica.

Para adquirir esse conhecimento, alguns estudos utilizando reatores UASB para a produção de H_2 foram desenvolvidos nos últimos anos, contudo ainda são poucos e apresentam divergências para consolidar os resultados. Gavala, Skiadas, & Ahring (2006), operando reator UASB a 35°C , não encontraram diferença significativa no rendimento de H_2 (Y_{H_2}) ($0.7\text{molH}_2\text{-mol-sac}^{-1}$) quando submeteram o reator a TDH de 12 a 2 h, utilizando glicose como substrato. Yu & Mu (2006), operando UASB alimentado com substrato à base de sacarose, observaram aumento no Y_{H_2} ao aumentar o TDH de 3 h para 14 h, atingindo a valor máximo de $2.02\text{molH}_2\text{-mol-sac}^{-1}$, decrescendo com o aumento do TDH para 30 h. Akutsu et al. (2009), notaram efeito negativo na produção de H_2 ao impor decréscimo gradual do TDH de 48 h para 3 h ao reator UASB alimentado com amido e operando a 55°C , sendo o valor máximo obtido igual a $1.7\text{molH}_2\text{-mol-sac}^{-1}$ com TDH de 48 h. Dong et al. (2011), alimentando reator UASB termofílico (55°C) com substrato à base de sacarose, variaram o TDH entre 50 e 12 h e obtiveram apenas uma pequena flutuação nos valores de Y_{H_2} (2.42 a $3.06\text{molH}_2\text{-mol-suc}^{-1}$). Jung, Kim, Lee, & Shin (2012) variando o TDH do reator UASB entre 12 h e 2 h, para a produção de H_2 a partir de efluente de fábrica de café a 55°C , encontraram Y_{H_2} máximo de ($4.96\text{molH}_2\text{-mol-suc}^{-1}$) com TDH de 6 h.

Em relação aos reatores de leito empacotado, embora estudos em temperatura mesofílica tenham apresentado a viabilidade do uso desta configuração (Chang, Lee, & Lin, 2002), tem sido observada a queda na produção de H_2 após períodos que variam de 15 a 23 dias de operação (Fernandes et al., 2013; Lima, Moreira, & Zaiat, 2013; Penteado, Lazaro, Sakamoto, & Zaiat, 2013; Lima & Zaiat, 2012). A possível causa apontada seria a presença de microrganismos consumidores de H_2 e/ou mudança de rota metabólica da própria comunidade produtora de H_2 devido à diminuição do substrato disponível (relação substrato/microrganismos).

Kongjan & Angelidaki (2010), realizaram estudo comparativo entre as configurações UASB e filtro anaeróbio com suporte plástico, operados à 70°C, para produção de hidrogênio a partir de hemicelulose hidrolisada. Utilizando TDH de 24 h e 12 h, e COV de 3,9 e 7,8 g-açúcar.h⁻¹.L⁻¹, a operação com TDH de 24 h e 3,9 g-açúcar.h⁻¹.L⁻¹ foi a mais adequada e o reator UASB apresentou os melhores resultados de produção de H_2 (821,4 ± 24,1 mL- H_2 .d⁻¹.L⁻¹ e 212,0 ± 24,1 mL- H_2 .g-açúcar⁻¹). Porém, poucos estudos foram realizados comparando reatores UASB e de leito empacotado e, uma vez que o substrato, a temperatura de operação, pH inicial afetam a produção de H_2 , mais estudos devem ser realizados visando a comparação entre as configurações, sob as mesmas condições operacionais, para apontar a mais adequada.

3.4. Efeito das condições nutricionais para a produção de H_2

Compreender as necessidades de macro e micronutrientes das bactérias produtoras de hidrogênio, relacionadas algumas vezes com as atividades enzimáticas, também tem sido o foco de muitos estudos, como abordado a seguir. No entanto, os resultados divergem bastante e os testes são desenvolvidos, em sua maioria, em batelada e condições mesofílicas.

Lee, Miyahara, & Noike (2001) realizaram testes em batelada com temperatura mesofílica (37°C), para verificar o efeito do ferro nas atividades das bactérias produtoras de H_2 . Os pesquisadores variaram a concentração de Fe_2^+ de 0 a 1762,4 mg.L⁻¹, e encontraram o melhor rendimento com 352,8 mg Fe_2^+ .L⁻¹, porém a máxima produção de hidrogênio ocorreu quando utilizado 1762,4 mg Fe_2^+ .L⁻¹.

Em teste em batelada, utilizando glicose a 35°C, Wang & Wan, (2008a) variaram a concentração de Fe_2^+ no meio entre 0 e 15000 mg.L^{-1} . Nas concentrações de 300 e 350 $\text{mgFe}_2^+.\text{L}^{-1}$, a presença de Fe_2^+ foi capaz de aumentar a produção de H_2 em 55,7% e seu rendimento em 58,3% ($2,22 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1} \text{ glic}^{-1}$), respectivamente. No entanto, concentrações maiores causaram o declínio na produção de hidrogênio. Segundo esses autores, isso pode ser explicado pelo ferro ser fundamental para a produção do carregador de elétrons ferredoxina nas hidrogenases, assim, em faixa de concentração apropriada, o Fe_2^+ pode aumentar a atividade das hidrogenases.

Para encontrar a composição de nutrientes mais adequada para a produção de hidrogênio, Lin & Lay (2005) realizaram testes em batelada a 35°C. Esses autores observaram que os nutrientes que mais afetam a biomassa nessas condições são o magnésio, sódio, zinco e ferro. Assim, os mesmos aplicaram o método Taguchi aos dados e encontraram a composição otimizada para os nutrientes principais (em mg.L^{-1} : 120 $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, 1000 NaCl , 0.5 ZnCl_2 e 3 $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$), a qual aumentou o rendimento, a velocidade de produção e a porcentagem de hidrogênio no biogás em 30%, 66% e 66%, respectivamente.

Xiaolong, Minghua, Hanqing, Qinqin, & Lecheng (2006) realizaram testes em batelada, na temperatura mesofílica (37°C), com lodo de reator UASB tratando efluentes ácidos. Variando a concentração de íons de sódio entre 0 e 16 g.L^{-1} , os autores observaram as melhores velocidades de degradação de sacarose e produção de hidrogênio na faixa de 1 a 2 $\text{gNa}^{+2}.\text{L}^{-1}$. Os autores afirmam, ainda, que em menores concentrações, a quantidade de íons de sódio disponível no meio pode não ser suficiente para o crescimento das bactérias produtoras de hidrogênio, e em excesso, porém, a atividade enzimática desses microrganismos é afetada.

Wang & Wan (2008) verificaram que à temperatura de 35°C, Ni_2^+ na concentração 0,1 mg.L^{-1} pode melhorar o rendimento do hidrogênio, alcançando 2,38 mol de H_2 / mol de glicose. Entretanto, em concentrações da ordem de 20 a 50 $\text{mgNi}_2^+.\text{L}^{-1}$, o rendimento chega a ser menor que na ausência desse metal.

Othong, Poonsuk, Intrasingkha, Dhamwichukorn, & Birkeland (2008), verificaram significativa relação entre a concentração de ferro e a razão C/N. Em

testes em batelada com efluente de fábrica de óleo de palma a 60°C, esses autores encontraram que as concentrações que permitiam a máxima produção de hidrogênio (6,5 LH₂/ L efluente) com maior eficiência na remoção de DQO (58%) são: 257 mg Fe⁺².L⁻¹, razão C/N de 74 e C/P de 559. Em teste em batelada mesofílica (35°C), Lin & Lay (2004) encontraram que a razão C/N de 47 era a que permitia o melhor rendimento de H₂ (4,8mol H₂/mol sacarose).

Em experimentos em batelada a 35°C, Liu et al. (2011) testaram o uso de lixiviado de uma unidade de compostagem como complementação nutricional para a produção de H₂ utilizando glicose e efluente de indústria de sucos. Os autores demonstraram que a produção de H₂ pode ser melhorada quando há a cofermentação do efluente com o lixiviado, tornando-se uma alternativa de baixo custo para adequar o efluente tratado às necessidades nutricionais do consórcio microbiano em relação ao nitrogênio e os outros micronutrientes.

Assim, uma abordagem possível para melhorar a produção de hidrogênio e seu rendimento seria a operação de reatores em fluxo contínuo, associando a otimização dos nutrientes que, como mostra a literatura, exercem grande influência sobre a atividade da biomassa. Além disso, a operação à temperatura termofílica (55°C) pode selecionar populações microbianas que, nessas condições, apresentem a via da produção de acetato como preferencial e superem as limitações termodinâmicas. O tratamento termofílico tem, ainda, a vantagem de reduzir custos de resfriamento de efluentes lançados a altas temperaturas, como o caso da vinhaça (gerada na produção de etanol), efluentes de fábricas de celulose e papel e produtoras de óleo de palma, entre outros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Etapas experimentais

A pesquisa foi realizada em duas etapas. A primeira contou com operação de reatores anaeróbio ascendente de manta de lodo (UASB - *upflow anaerobic sludge blanket*), tubular com leito empacotado (TCS - tubular com suporte) e tubular sem material suporte (TSS - tubular sem suporte), alimentados continuamente sob diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH), para avaliar a influência do tipo de reator e TDH na produção de H_2 . A segunda etapa foi realizada em batelada para verificar a influência de micro e macronutrientes na produção de H_2 e encontrar a condição nutricional ótima.

4.2. Reatores

Os reatores tubular, com fluxo ascendente (Figura 1), e UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) (Figura 2) foram projetados em escala de bancada com volumes úteis aproximados de 3,8 L e 3,6 L, respectivamente.

Figura 1 – Dimensões e esquema do reator tubular.

O reator tubular era composto por três compartimentos: 1- entrada de afluente e acúmulo de sólidos, 2- leito fixo, delimitado por grades de inox com malha de 0,2 cm que apoiam o material suporte e 3- headspace e saída do efluente.

4. Materiais e Métodos

Figura 2 - Dimensões e esquema do reator UASB.

O reator UASB apresentava igualmente três compartimentos, a saber: 1- entrada do afluente e leito de lodo, 2- manta de lodo e 3- separador trifásico, em formato de funil invertido, e saída do efluente. Para evitar a perda de biogás, a saída do efluente em ambos os reatores ocorria através de conduto afogado. O reator UASB possuía, ainda, duas saídas de biogás, uma para a coleta na parte interna do separador trifásico e outra na parte externa.

Havia 6 pontos de amostragem ao longo dos reatores, além de suas saídas convencionais. O reator de leito fixo possuía um ponto de amostragem no compartimento de entrada e 5 ao longo do leito, e o reator UASB possuía 3 pontos no leito de lodo e 3 na manta de lodo.

4.3. Substrato Sintético

O substrato utilizado era composto por sacarose ($1781,24\text{mg.L}^{-1}$), ureia ($11,51\text{mg.L}^{-1}$), bicarbonato (500mg.L^{-1}) e solução padrão de nutrientes ($0,25\text{mL.L}^{-1}$). A solução padrão de nutrientes conforme (Del Nery, 1987) e continha (g.L^{-1}): $\text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2,00; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10,00; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1,00; $\text{CoCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,16; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 8,24; KH_2PO_4 , 21,44; K_2HPO_4 , 5,20; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11,04 ; SeO_2 , 0,036. Além disso, o pH foi ajustado para 6,5 com HCL PA ($0,22 \text{ mL.L}^{-1}$) (Lima & Zaiat, 2012).

4.4. Material suporte

O material suporte utilizado no reator tubular com leito empacotado eram aparas de polietileno de baixa densidade, cedidas pela empresa Interplás, sediada em São Carlos. As aparas foram retiradas durante a limpeza das máquinas que fazem a extrusão do plástico obtido da reciclagem e produzem os fios de polietileno que, posteriormente, são cortados para servirem de matéria-prima na produção de sacos plásticos.

4.4.1. *Granulometria do material suporte*

Após a obtenção do material, o mesmo foi cortado e sua granulometria é apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Material suporte cortado e gráfico de sua granulometria.

O ensaio granulométrico foi realizado no Departamento de Geotecnia da EESC – USP. Após seco em estufa de 100°C, o material foi homogeneizado e quarteado manualmente para redução da amostra. Para o peneiramento, realizado através de processo mecânico por 15 minutos, foi utilizado 1/8 do material de preenchimento do leito do reator. Assim, conforme os resultados do ensaio, 72% do material componente do leito apresenta dimensão inferior a 9,52 mm e superior a 6,35 mm.

4.4.2. Índice de vazios

Para a determinação do índice de vazios do leito fixo do reator tubular foi utilizada a Equação 13. Assim, a fim de encontrar o volume do leito vazio (V_{lv}), o volume útil total do reator sem o material suporte foi medido e foram descontados os volumes dos compartimentos (V_c) de entrada e saída, dados pela Equação 14, na qual h_c é a altura de cada compartimento e D , o diâmetro do reator.

$$iv_L(\%) = \frac{V_{lv}}{V_{lv}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

$$V_c = \pi \times \frac{D^2}{4} \times h_c \quad \text{Equação 14}$$

Após a disposição do material suporte no interior do reator, o volume útil total do reator foi novamente medido e, descontados os volumes dos compartimentos de entrada e saída, obteve-se o volume do leito preenchido (V_p). Os valores encontrados para os volumes do leito fixo vazio e preenchido foram 2,58 L e 1,03 L, respectivamente, e 40% para o índice de vazios do leito.

4.5. Inoculação dos reatores

O método de auto inoculação foi aplicado ao reator tubular, o qual consiste em recircular por 5 dias meio sintético, previamente fermentado em recipiente aberto por 3 dias (Leite, Fernandes, Pozzi, Barboza, & Zaiat, 2008). O reator UASB, por sua vez, teve um terço de seu volume preenchido com lodo proveniente de reator UASB metanogênico termofílico, que trata a vinhaça da usina de açúcar e álcool São Martinho (Pradópolis, SP). O inóculo passou por pré-tratamento térmico a 100°C por 15 minutos (Hawkes, 2002) antes de ser colocado no reator. Em seguida, aplicou-se a recirculação por 5 dias de meio fermentado. Dessa maneira, pretendeu-se adaptar o lodo do reator UASB e estimular o crescimento de bactérias acidogênicas no interior dos reatores, as quais estão naturalmente presentes no ar.

4.6. Protocolo experimental da etapa 1 – Operação de reatores contínuos

Nessa fase, os reatores TCS, TSS e UASB foram operados variando o tempo de detenção hidráulica (TDH) e, conseqüentemente, a carga orgânica volumétrica (COV) aplicada, conforme a Tabela 1.

4. Materiais e Métodos

Tabela 1 – Condições de operação dos reatores na fase 1.

Sigla	Reator	TDH (h)	COV (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	v _{asc} ^(a) (cm.h ⁻¹)	Duração (dias)
USU ^(b)	UASB	12	4	4,8	57
U12		12	4	4,8	154
U6		6	8	9,5	71
U2		2	24	28,5	84
TCS2	TCS	2	24	20,7	139
TCS0,5		0,5	96	82,8	64
TSS2	TSS	2	24	37,6	96
TSS0,5		0,5	96	150,4	94

^(a) Velocidade ascensional do líquido.

^(b) USU se refere a partida do reator UASB, definida pela presença de CH₄ no biogás e até que os valores de perda de biomassa, pH e conversão de sacarose se tornassem estáveis.

Os reatores tubular e UASB foram operados em fluxo contínuo e mantidos em câmara com temperatura controlada a 55°C (Figura 4). A alimentação utilizada foi substrato sintético com solução de nutrientes padrão (apresentada em 4.3).

Figura 4 – Reatores operando em fluxo contínuo. A – UASB; B – leito fixo.

O monitoramento dos reatores ocorreu através das seguintes variáveis: composição e vazão do biogás; pH, DQO, sacarose, ácidos orgânicos voláteis e álcoois presentes no efluente dos reatores; além da perda de biomassa. Ao final, testes estatísticos foram aplicados aos resultados para avaliar o rendimento, a eficiência na produção de hidrogênio e composição de subprodutos gerados na

condição padrão, bem como para indicar o reator e a condição mais eficiente para a produção de H_2 .

4.7. Ensaios hidrodinâmicos

O método utilizado nos ensaios hidrodinâmicos foi o de estímulo-reposta com injeção degrau (Fogler, 1999; Levenspiel, 1999), com introdução de NaCl (10 g.L^{-1}) na corrente de alimentação, que nesse período era composta apenas por água de torneira. No caso do reator UASB, os ensaios para os três TDH avaliados (12, 6 e 2 horas) foram realizados após a inoculação do reator e antes da partida do reator com efluente sintético. Assim, procurou-se considerar o a influência do lodo, dotado de grânulos e materiais inertes, no escoamento do reator, evitando, contudo, que a exposição ao ambiente salino alterasse a atividade ou composição do consórcio microbiano durante as operações. Já no reator tubular, como foi adotado o procedimento de auto inoculação no início de cada operação, não havia biomassa aderida nessa etapa e os ensaios foram realizados antes das operações. Foram realizados novos ensaios ao final das etapas de operação para verificar as mudanças no escoamento decorrentes do crescimento e/ou perda de biomassa.

Para a aquisição dos dados da variação da concentração salina nos reatores, utilizou-se uma sonda de condutividade conectada à calculadora TI 89 Titanium da Texas Instruments, que por sua vez estava acoplada à interface de aquisição de dados CBL 2, da Texas Instruments. Foram coletados 600 dados durante período igual a três vezes os TDH teóricos aplicados aos reatores, representados pela razão entre o volume do reator e a vazão aplicada.

Os dados de concentração do traçador (NaCl), na injeção degrau, forneceram curvas-resposta sempre crescentes até que se atingiu a concentração de traçador aplicada. Para que fosse possível obter os parâmetros desejados, a curva de concentração do traçador em função do tempo precisou ser trabalhada. Inicialmente a curva-resposta foi normalizada, gerando a curva F, cujos valores foram calculados através da Equação 15 (Levenspiel, 1999).

$$F_i = \frac{C_i}{C_{\text{máx}}} \text{ Equação 15}$$

Na Equação 15, C_i é o valor da concentração de NaCl no instante i e $C_{\text{máx}}$ é o valor máximo da concentração de NaCl detectado.

Em seguida, a curva F foi ajustada para a equação sigmoide de Boltzmann, no programa Origin 8.0. Com os valores ajustados, a curva F foi transformada em uma curva de distribuição de tempo de residência (DTR), a curva E , composta pelos valores das derivadas dos pontos de F em função do tempo (Equação 16) (Levenspiel, 1999). Assim, com os valores da curva E foi possível determinar os valores de TDH médio ($\bar{\theta}_h$) (Equação 17), a variância (σ^2) (Equação 18) e a variância adimensional (σ_θ^2) (Equação 19) (Levenspiel, 1999).

$$E = \frac{dF}{dt} \text{ Equação 16}$$

$$\bar{\theta}_h = \frac{\int_0^\infty tE \, dt}{\int_0^\infty E \, dt} \text{ Equação 17}$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^\infty (t - \bar{\theta}_h)^2 E \, dt}{\int_0^\infty E \, dt} \text{ Equação 18}$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{\theta}_h^2} \text{ Equação 19}$$

Levenspiel (1999) apresenta o modelo de tanques em série e o modelo de dispersão longitudinal para representar o escoamento em reatores não ideais. Para esse autor, quanto maior número de reatores em tanques-em-série (N – Equação 20) mais próximo o reator está do fluxo pistonado ideal. Valores de N a partir de 30 já permitem a modelagem do reator como pistonado. Comparando com modelo de dispersão, o coeficiente de dispersão longitudinal (D/uL – Equação 21) com tendência a zero indica que a dispersão pode ser negligenciada, assim, o modelo pistonado é adequado e valores de D/uL tendendo ao infinito, tornam o modelo de mistura completa mais apropriado para representar o padrão de fluxo (Levenspiel, 1999).

$$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2} \text{ Equação 20}$$

$$\frac{D}{\mu L} = \frac{\sigma_6^2}{2} \text{ Equação 21}$$

Para se encontrar a porcentagem de recuperação do traçador foi realizada a integração da área do gráfico da concentração em função do tempo, e a multiplicação do valor encontrado pela vazão aplicada ao reator. Neste trabalho, todos os cálculos de derivadas e integrais foram realizados no programa Origin 8.0.

4.8. Métodos Analíticos

Para a determinação de sólidos voláteis totais (SVT) na biomassa, concentração de sólidos em suspensão voláteis (SSV) e de demanda química de oxigênio (DQO), foram utilizadas as metodologias preconizadas em American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation (2005). A leitura da absorbância das amostras de DQO foi feita no comprimento de onda 620 nm utilizando espectrofotômetro HACH modelo 890.

O volume de biogás produzido foi medido com medidor de vazão milliGascounter (Ritter). A análise da composição do biogás gerado por cada reator (H_2 , CO_2 e CH_4) foi realizada no cromatógrafo a gás Shimadzu GC 2010 nas seguintes condições:

Coluna capilar: Carboxen 1010, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,53 mm e espessura da coluna de 0,30 μm .

Gás de arraste: Argônio.

Temperatura inicial do injetor: 200°C.

Temperatura inicial do detector: 230°C.

Vazão do gás de make up (Ar): 12 mL.min⁻¹.

Detector: condutividade térmica.

Volume de amostra: 200 μL .

A análise de sacarose e metabólitos solúveis foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu, composto por: bomba LC-10ADvp, válvula solenoide FCV-10ALpv, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10ADvp, detector UV com arranjo de diodos SPD-M10ADvp, detector de índice refrativo diferencial-RID-10A. As condições cromatográficas foram as seguintes:

Coluna de troca iônica: Aminex HPX-87H, comprimento de 0,3 m, diâmetro interno de 7,8 mm;

Fase móvel: H₂SO₄;

Fluxo: 0,5mL.min⁻¹;

Detector de UV: Arranjo de diodos 205 nm;

Detector de índice refrativo diferencial: fotodiodo de 4-partições.

Volume de amostra: 100 µm

Temperatura de trabalho do forno: 43°C

Temperatura máxima de trabalho: 70°C.

4.9. Cálculos das variáveis de produção de H₂

Os cálculos das variáveis de produção de H₂ foram realizados a partir das equações seguintes, utilizando o programa Excel 2010, sendo os valores de volume apresentados nas condições padrão de temperatura e pressão (CPTP).

Vazão molar de sacarose convertida (v_s):

$$v_s [mmol.h^{-1}] = \frac{Q \cdot (C_{So} - C_{Sf})}{MM_s} \text{ Equação 22}$$

Na qual, C_{So} é a concentração de sacarose no meio afluente, C_{Sf} a concentração de sacarose no efluente e MM_s é a massa molar da sacarose.

Vazão de biogás (Q_g):

$$Q_g [mL \cdot h^{-1}] = \frac{V_m \cdot F_m}{t} \text{ Equação 23}$$

Na qual, V_m é o volume de gás marcado pelo medidor, o F_m é o fator de calibração do medidor obtido por calibração com bolhometro padrão e t é o tempo da medida.

Distribuição em porcentagem de hidrogênio ($\%_{H_2}$), dióxido de carbono ($\%_{CO_2}$) e metano ($\%_{CH_4}$) no biogás:

$$\%_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n} \text{ Equação 24}$$

$$\%_{CO_2} = \frac{n_{CO_2}}{n} \text{ Equação 25}$$

$$\%_{CH_4} = \frac{n_{CH_4}}{n} \text{ Equação 26}$$

Nas quais, n_{H_2} , n_{CO_2} e n_{CH_4} correspondem à quantidade de cada um dos gases contéudos no biogás: hidrogênio, dióxido de carbono e metano, respectivamente. Esse conteúdo foi medido por cromatografia e calculado pelas curvas de calibração do cromatógrafo. O valor de n corresponde ao número de mols totais no volume v_i de amostra de gás injetado, calculado a partir dos dados cromatográficos.

Vazão molar de hidrogênio (VMH):

$$VMH [mmol \cdot h^{-1}] = Q_g \cdot \frac{n_{H_2}}{v_i} \text{ Equação 27}$$

Rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}):

$$Y_{H_2} [molH_2 \cdot mol - sac^{-1}] = \frac{VMH}{v_s} \text{ Equação 28}$$

Produção volumétrica de hidrogênio (PVH):

$$PVH [mL_{H_2} \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}] = \frac{Q_g \cdot \%_{H_2}}{V} \text{ Equação 29}$$

4.10. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas da biomassa desenvolvida em cada operação e do lodo utilizado para a inoculação do reator UASB foram realizadas para verificar as mudanças na comunidade microbiana devido às condições operacionais. As amostras foram coletadas nos seguintes dias operacionais do reator UASB: 110 (U12A), 211 (U12B), 282 (U6) e 366 (U2). Em todas as coletas, a amostragem foi composta, contendo parcelas dos três pontos de coleta ao longo do leito de lodo. Para o reator tubular sem material suporte, a amostra de cada operação (TSS2 para TDH de 2 h, e TSS0,5 para TDH de 0,5 h) foi composta das parcelas coletas ao longo de todo o reator, no último dia de operação. No caso do reator tubular com leito empacotado, as amostras, também retidas no último dia de operação, foram compostas, mas separadas entre os pontos ao longo do leito empacotado (TCS2LE, para TDH de 2 h, e TCS0,5LE, para TDH de 0,5 h) e os pontos do compartimento de acúmulo (TCS2CA, para TDH de 2 h, e TCS0,5CA, para TDH de 0,5 h).

O DNA foi extraído das amostras de acordo com o protocolo modificado de Griffiths et al (Griffiths, Whiteley, O'Donnell, & Bailey, 2000), através de agitação com pérolas de vidro, clorofórmio, fenol e solução tampão. A purificação dos fragmentos de DNA foi realizada com GFX 96 Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, a amplificação dos fragmentos 16S rRNA para o domínio bactéria (968fGC – 1392R) foi obtida através de reação em cadeia de polimerase (PCR) (Nübel et al., 1996). Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando concentração de gradientes de 45% e 65%, 75V à 60°C por 16h (Muyzer, de Waal, & Uitterlinden, 1993). O gel de DGGE foi deixado em solução de brometo de etídio por 20 min e em seguida colocado no equipamento Eagle Eye TM III (Stratagene), sob luz UV de 254nm e conectado ao programa Eagle Slight para a visualização das bandas. O agrupamento das bandas foi realizado no programa Bionumerics 2.5 utilizando índice de Jaccard.

4.11. Métodos Estatísticos

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica 10. Realizaram-se os testes de Shapiro-Wilk, Lilliefors e Kolmogorov-Sminov com p-valor igual a 0,05, para testar a normalidade das distribuições dos dados obtidos para: PVH, VMH, pH, porcentagem de H₂ no biogás, porcentagem de conversão de sacarose, rendimento de H₂ e SSV. Sendo consideradas normais quando havia concordância entre os três testes. Como para todas as variáveis havia uma ou mais distribuições que não poderiam ser consideradas normais, ou o tamanho de um dos conjuntos amostrais era pequeno (inferior a 15), utilizou-se o teste não paramétrico para comparação de dois grupos amostrais independentes Wald-Wolfowitz. O teste é equivalente ao teste t de Student e utilizado quando as distribuições dos conjuntos de dados não se ajusta à normal. O teste Wald-Wolfowitz avalia se as distribuições de dados são diferentes na média e também considera a forma das distribuições, assegurando que as amostras populacionais são mutualmente independentes.

4.12. Protocolo experimental da etapa 2 – Verificação da condição nutricional ótima

Foram realizados ensaios em batelada utilizando frascos Duran de 500 mL, considerando volume útil de 250 mL, e mantidos em câmara sem agitação à 55°C. Os frascos foram inoculados com lodo produzido ao longo das quatro operações do reator tubular (com e sem material suporte e submetido a TDH de 2 h e 0,5 h), o qual, após o término da última operação, foi homogeneizado e armazenado a 4°C. A concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) nos frascos reacionais foi de $0,11 \pm 0,01 \text{ gSSV.L}^{-1}$, a mesma encontrada no reator na condição TCS2.

O substrato sintético admitido como base, para ser testado posteriormente como controle, foi aquele utilizado nas operações contínuas, alterando a concentração de sacarose para $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e assim, proporcionalmente, os demais componentes. Nos planejamentos experimentais foi alterada a composição de nutrientes, porém as concentrações de sacarose, bicarbonato e cálcio adotadas

como base, permaneceram as mesmas, assim como as relações nitrogênio/fósforo e potássio/sódio.

O pH foi do meio foi ajustado para 7,0 e, após selados, os frascos passaram por purga com N_2 para garantir o ambiente anaeróbio e, em seguida, foi retirada a amostra gasosa inicial. Ao final da fase lag, determinada em ensaio prévio, a produção molar de H_2 foi acompanhada através de amostras gasosas retiradas a cada 3 horas durante a fase exponencial, sendo esse intervalo aumentado de forma gradual até a estabilização. Ao final do experimento, foram realizadas análises para determinar a degradação da sacarose e a concentração de SSV.

4.12.1. *Planejamento fatorial do experimento em batelada*

O delineamento dos experimentos em batelada e a análise dos dados foram realizadas no programa Statistica 11, sendo que os seguintes planejamentos foram adotados: Plackett-Bruman, para identificar os nutrientes com influência significativa nas respostas consideradas; método da diagonal de maior inclinação (*Steepest Ascent*), visando, a partir das curvas de concentrações de nutrientes *versus* resposta, fornecidas pelo planejamento anterior, variar as concentrações em direção à região ótima; Composto Central, com o objetivo de encontrar os valores de concentração que otimizam as respostas consideradas, dentro da região de máximos identificada no planejamento precedente.

A princípio, as respostas consideradas foram a velocidade molar de produção de H_2 (VMPH) e o rendimento de H_2 (Y_{H_2}), por serem importantes em considerações a respeito da viabilidade econômica e eficiência do processo, respectivamente. Essas variáveis foram obtidas a partir dos parâmetros de ajuste da curva de produção de hidrogênio ao longo do experimento ao modelo de Gompertz modificado (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van't Riet, 1990), utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt aplicado ao método de mínimos quadrados.

O planejamento Plackett-Burman foi projetado de forma randômica, para ensaios em duplicata com 7 fatores, 2 níveis (inferior e superior) e ponto central, resultando em 18 ensaios (frascos). As concentrações de nutrientes adotadas no planejamento são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações e nutrientes testados no planejamento Plackett-Burman.

Nutrientes	Fatores	Valores testados para cada fator (mg.L ⁻¹)		
		Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)
CH ₄ N ₂ O	C:N:P	60:3:1	330:3:1	600:3:1
KH ₂ PO ₄				
K ₂ HPO ₄				
Na ₂ HPO ₄				
CoCl ₂ .6H ₂ O	Co ⁺²	0,005	0,0275	0,05
FeSO ₄ .7H ₂ O	Fe ²⁺	1,00	5,50	10,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	Mg ²⁺	1,00	5,50	10,00
NiSO ₄ .6H ₂ O	Ni ²⁺	0,010	0,055	0,100
SeO ₂	Se ²⁺	0,005	0,0275	0,05
ZnCl ₂	Zn ²⁺	0,010	0,055	0,100

A partir das respostas dos ensaios anteriores foram definidos os fatores com influência significativa (ANOVA com nível de significância de 5%) e ajustadas curvas lineares dos valores dos fatores significativos em função das respostas consideradas. Os coeficientes das curvas ajustadas foram utilizados para determinar os incrementos (Δ) nos valores dos fatores significativos. Os valores de Δ partem do mesmo ponto central do planejamento anterior e implicam em acréscimo no valor do fator se seu coeficiente na curva é positivo e decréscimo se for negativo. Para o fator com maior valor de coeficiente, em módulo, o valor de Δ corresponde ao mesmo incremento adotado no planejamento anterior. Para os demais, o Δ é dado pela relação entre seu coeficiente e o maior coeficiente na curva. Assim, no método diagonal de maior inclinação, foram testados 4Δ para os fatores C:N:P, Fe⁺² e Ni⁺², utilizando triplicata e os valores de concentração da Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações utilizadas no planejamento pelo método da diagonal de maior inclinação.

Ensaio	Valores testados para cada fator (mg.L ⁻¹)		
	C:N:P	Fe ⁺²	Ni ⁺²
Central	330:3:1	5,5	0,055
Central + 1 Δ	100:3:1	10,0	0,078
Central + 2 Δ	50:3:1	14,5	0,101
Central + 3 Δ	25:3:1	19,0	0,124
Central + 4 Δ	10:3:1	23,5	0,147

4. Materiais e Métodos

Uma vez verificado que a VPH e o YH_2 apresentavam picos dentro das faixas de valores testadas, seguiu-se para o experimento utilizando Composto Central. O planejamento foi elaborado de forma randômica para ensaio em duplicata, com 3 fatores, valor de rotatividade de 1,6818 e cujos pontos centrais foram as concentrações com as quais foram observados os picos de VPH e YH_2 (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores para a região ótima testados no planejamento Composto Central.

Fatores	Valores testados para cada fator (mg.L ⁻¹)				
	-1,6818	-1	0	1	1,6818
C:N:P	5:3:1	13:3:1	25:3:1	37:3:1	45:3:1
Fe ⁺²	0,50	2,53	5,50	8,47	10,50
Ni ⁺²	0,005	0,025	0,055	0,085	0,105

Como os experimentos utilizando o Composto Central produziram resultados inesperados, possivelmente por serem valores muito baixos e interferirem no crescimento da biomassa, variável não avaliada nos ensaios anteriores, novo experimento utilizando o Composto Central foi realizado apenas para a otimização da variável YH_2 a partir de Ni⁺² e Fe⁺² (Tabela 5). Como o experimento foi dividido em duas etapas, devido à limitação no número máximo de leituras possível no intervalo do período exponencial, o novo experimento foi planejado em blocos, tornando possível a avaliação da diferença causada por fatores externos. Ao se realizar a blocagem do planejamento, os coeficientes de rotatividade e ortogonalidade se igualam e apresentam valor de $\sqrt{2}$.

Tabela 5 – Valores para a região ótima testados no segundo experimento planejamento Composto Central.

Fatores	Valores testados para cada fator (mg.L ⁻¹)				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
Fe ⁺²	1,257	2,5	5,5	8,5	9,743
Ni ⁺²	0,012	0,025	0,055	0,085	0,097

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Etapa 1 – Operação de reatores

5.1.1. Ensaios hidrodinâmicos

A partir dos resultados dos ensaios hidrodinâmicos, as curvas E foram plotadas em função do tempo de ensaio e são apresentadas na Figura 5, onde os valores de ambas as variáveis foram divididas pelo TDH médio ($\overline{\theta_h}$), para que seja possível a comparação entre diferentes TDH, sendo possível visualizar a influência do TDH no tipo de escoamento do escoamento nos reatores em estudo, bem como anomalias e alterações devido à agregação de biomassa.

Figura 5 – Curvas E_θ função de θ obtidas para cada operação.

Nas análises iniciais dos reatores tubulares, o TDH de 2 h propiciou o estabelecimento de escoamento pistonado tanto na presença quanto na ausência de material suporte, como é demonstrado na Tabela 6 através do número de tanques-em-série (N), uma vez que segundo Levenspiel (1999), valores de N a partir de 30 já permitem a modelagem do reator como pistonado e dispersões inferiores a 0,01 são consideradas de pequena intensidade.

Tabela 6 – Dados experimentais dos ensaios hidrodinâmicos.

Reator	TDH ^(a) (h)	Etapa ^(b)	$\bar{\theta}_h^{(c)}$ (h)	N ^(d)	D/uL ^(e)	Recuperação do traçador ^(f) (%)	R modelo de dispersão ^(g)	
							Baixa	Alta
UASB	12	Inicial	11,4	199	0,0025	67	1,00	1,00
	6		5,9	144	0,0035	66	1,00	1,00
	2		1,8	142	0,0035	69	0,99	1,00
	2	Final	2,6	82	0,0061	55	1,00	0,99
TCS ^(h)	2	Inicial	2,1	839	0,0012	65	1,00	0,98
	0,5		0,5	15	0,0340	68	0,99	0,99
	2		1,9	38	0,0262	69	0,99	1,00
	0,5	Final	0,3	3	0,1785	81	0,99	0,95
TSS ⁽ⁱ⁾	2	Inicial	1,7	53	0,0094	68	1,00	1,00
	0,5		0,5	19	0,0271	62	0,99	0,99
	2		1,8	54	0,0093	70	1,00	1,00
	0,5	Final	0,5	7	0,0738	63	1,00	0,98

(a) TDH teórico aplicado aos reatores;

(b) Os testes foram realizados antes do reator entrar em operação (etapa inicial) e no último dia de operação (etapa final).

(c) TDH médio;

(d) Número de reatores em série;

(e) Coeficiente de dispersão longitudinal;

(f) Porcentagem da massa de traçador injetada que foi recuperada;

(g) Correlação entre as curvas DTR experimentais e as curvas de modelos teóricos para alta e baixa dispersão.

(h) Reator tubular de leito empacotado;

(i) Reator tubular sem material suporte.

Apesar de o leito empacotado ter proporcionado uma diminuição de quase 8 vezes no valor da dispersão quando aplicado TDH de 2 h, o material suporte mostrou pouca interferência quando o TDH aplicado foi de 0,5 h, e o escoamento apresentou tendência à mistura completa, provavelmente devido aos valores de v_{asc} iguais a 82,8 e 150,4 cm.h⁻¹, para TCS0,5 e TSS0,5, respectivamente. A partir os ensaios no final das operações, é possível observar que o crescimento de biomassa no TCS, para ambos os TDH, e no TSS0,5 proporcionou aumento na dispersão

longitudinal, enquanto que a agregação de biomassa nas paredes e no fundo do TSS com TDH de 2 h não afetou a dispersão. Portanto, mesmo com aumento de quase 5 vezes na velocidade ascensional, a biomassa pode aderir ao reator TSS0,5 e a elevada carga orgânica causou o crescimento de biomassa em maior proporção em relação a TSS2, levando a alteração no escoamento no interior do reator.

No reator UASB houve aumento na dispersão no final da operação, com diferença significativa ao nível de 0,05 na curva DTR comparada às curvas iniciais. Ainda assim, o modelo de escoamento pistonado é adequado para representar o reator UASB em todas as condições. Esse resultado difere de outros estudos (López & Borzacconi, 2010; T. Ren, Mu, Ni, & Yu, 2009) e do conceito usual de que reatores UASB estão mais próximos do fluxo de mistura completa (Sinha & Pandey, 2011), adotado quando ensaios hidrodinâmicos não são realizados. Essa divergência pode ser resultado da presença de biomassa durante a realização dos ensaios.

A recuperação média do traçador nos ensaios realizados foi de $67 \pm 6\%$. Os ensaios no final das operações do UASB2 e TCS0,5 resultaram em recuperações de traçador com maior diferença em relação à media, 18% inferior e 21% superior, respectivamente. Os valores obtidos para o tempo médio de residência ($\bar{\theta}_h$) para UASB2 e TCS0,5 também foram os únicos a apresentarem discrepância em relação ao valor esperado, respectivamente, 30% superior e 40% inferior.

A recuperação do traçador é um parâmetro que indica a porcentagem da massa de traçador injetada que deixou o reator, e pode ser utilizado para indicar erros no ensaio. Problemas com o traçador (como reatividade, absorção, dispersão e difusão no biofilme) aumentam seu o tempo de residência no sistema, diminuem sua recuperação ao final do ensaio e podem ser detectados comparando as curvas E (ou DTR) experimentais às curvas teóricas dos modelos de baixa e alta dispersão, conforme utilizado por Nardi, Zaiat, & Foresti (1999) para avaliação da eficiência de traçadores. Os coeficientes de correlação encontrados apresentam valores próximos a 1, demonstrando que, apesar da baixa recuperação, o traçador se mostrou satisfatório. Assim, pode-se considerar que as curvas E são adequadas para representar os fenômenos ocorridos nos reatores.

Assim, conforme Levenspiel (1999), o adiantamento no $\bar{\theta}_h$ do TCS0,5 se deve pela formação de zonas mortas, possivelmente criadas pela agregação de biomassa nos interstícios do material suporte em proporção bastante superior a TCS2, no qual não foi verificado o mesmo fenômeno.

Para o caso do pico tardio do U2 no final da operação, entre as possíveis causas apontadas por Levenspiel (1999) são: erro na medição da vazão, problemas de adsorção do traçador ou descumprimento da condição de sistema fechado. Assim, como o traçador se mostrou adequado e a condição de sistema fechado não ter sido alterada, a causa mais provável seria erro na medição de vazão. Tal erro pode ser resultado de mudanças na biomassa da condição inicial (Figura 6A) para a encontrada no final da operação (Figura 6B). Conforme a Figura 6B, a maior produção de exopolímeros pela biomassa quando exposta à diminuição do TDH pode ter causado aumento na densidade do leito de lodo, o que pode ser confirmado pelo aumento da perda de carga no reator, com necessidade de ajuste da velocidade da bomba durante a operação para a manutenção da vazão volumétrica desejada.

Figura 6 – Grânulos utilizados para a inoculação do reator (A) e grânulos ao final da operação (B).

5.1.2. *Influência do TDH na operação do reator UASB*

Após o ensaio hidrodinâmico e o período de recirculação, iniciou-se a operação do reator UASB em fluxo contínuo. Apesar do tratamento térmico da

biomassa, foi verificada a presença de CH_4 no biogás com valor máximo de 50,1% no dia 14 (Figura 7A), diminuindo gradualmente até chegar a zero no dia 56. Até o dia 47, a concentração de SSV foi de 2 a 3 vezes superior a média do período operacional restante com TDH de 12 h (Figura 7B). A v_{asc} aplicada ao reator e, consequentemente, a força de cisalhamento provavelmente desagregaram a parte da biomassa, levando ao fenômeno de lavagem (*wash out*) dos grânulos por superar sua velocidade de sedimentação (Mahmoud, Zeeman, Gijzen, & Lettinga, 2003). O estabelecimento de ambiente acidificante é confirmado pelo decréscimo no pH (Figura 7B).

Figura 7 - Porcentagem de H_2 e CH_4 no biogás (A), pH e a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente (B) durante as operações em reator UASB: USU, partida do reator; U12, UASB com TDH de 12h; U6, UASB com TDH de 2.

Após 10 dias de operação contínua de reator de mistura, Luo, Xie, Zou, Wang, & Zhou (2010) não observaram diferenças na produção de H_2 termofílica a partir de vinhaça de mandioca por lodos que passaram por diferentes pré-tratamentos e por inóculo não tratado. Em estudo desenvolvido por Penteado et al. (Penteado et al., 2013), testando diferentes inóculos em reator de leito empacotado e usando substrato a base de sacarose, o tratamento térmico não melhorou a produção de H_2 e nem inibiu a metanogênese em todos os inóculos testados. A partir do observado no presente estudo e na literatura, ainda que o tratamento térmico aumente a proporção de bactérias formadoras de esporos e conduza o esporo de *Clostridium* à germinação (Hawkes et al., 2007), condições termofílicas e outras características operacionais do sistema (baixo pH e TDH e alta v_{asc}) parecem

ser as maiores responsáveis pelo estabelecimento da comunidade microbiana desejada.

O sistema suportou aumento na COV de 4 para 24g DQO.L⁻¹.d⁻¹ com efeitos positivos sobre a produção de H₂ pois, apesar da queda no pH, a porcentagem de H₂ e a eficiência do sistema em converter sacarose foram estatisticamente superiores em U2 com valores médios iguais a 51,5 ± 5,1 e 79,3 ± 18,7%, respectivamente (Tabela 7). Em consequência disso, apesar das variações nos valores médios de YH₂ não terem sido estatisticamente significativas, foi verificado aumento significativo em VMH e PVH, seguindo uma relação de ordem -1,4 com o TDH.

Tabela 7 – Valores médios obtidos para as variáveis de produção de H₂ ao longo da operação do reator UASB.

Fase	VMH ^(a) (mmolH ₂ .h ⁻¹)	PVH ^(b) (mlH ₂ .h ⁻¹ .L ⁻¹)	YH ₂ ^(c) (molH ₂ .mol-suc ⁻¹)	CS ^(d) (%)	H ₂ no biogás ^(e) (%)
USU ^(f)	0,41 ± 0,27	1,95 ± 1,25	0,38 ± 0,46	58,63 ± 7,71	29,87 ± 11,33
U12 ^(g)	1,09 ± 0,69	5,69 ± 3,22	1,10 ± 0,76	63,77 ± 11,56	45,14 ± 5,38
U6 ^(h)	2,88 ± 1,34	15,04 ± 6,87	0,84 ± 0,72	63,37 ± 10,33	47,25 ± 4,68
U2 ⁽ⁱ⁾	14,00 ± 5,24	75,33 ± 24,65	1,73 ± 1,14	79,31 ± 18,67	51,49 ± 5,09

^(a) Vazão molar de H₂;

^(b) Produção volumétrica de H₂;

^(c) Rendimento de H₂ baseado na sacarose convertida;

^(d) Porcentagem de sacarose convertida;

^(e) Porcentagem de H₂ no biogás;

^(f) Partida do reator UASB com TDH de 12h e COV 4gDQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 22, exceto para YH₂ e CS (n=17);

^(g) UASB operando com TDH de 12h e COV 4 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 71, exceto para YH₂ e CS (n=69);

^(h) UASB operando com TDH de 6h e COV 8 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 32, exceto para YH₂ e CS (n=31).

⁽ⁱ⁾ UASB operando com TDH de 2h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 31, exceto para YH₂ e CS (n=25).

Reatores com fluxo pistonado possuem a vantagem de separação longitudinal dos metabólitos intermediários. Essa característica os torna mais resistentes a choques de carga orgânica e a inibição por produtos da fermentação. Contudo, a

falta de mistura pode resultar em maior resistência à transferência de massa. Zhang et al. (Zhang, Zhang, Chen, & Zeng, 2012a) demonstraram supersaturação em reator de mistura operando a 55°C e alimentado com solução a base de glicose. Os valores de H_2 encontrados na fase líquida foram entre 1,7 e 3 vezes maiores que os valores teóricos. Aumentando a COV e diminuindo a mistura no reator, os autores observaram que a supersaturação de H_2 aumentou e a conversão de sacarose caiu, sendo maior a influência da mistura do que da COV.

Portanto, o aumento na v_{asc} aplicada ao reator de 4,8 para 9,5 cm.h^{-1} e, posteriormente, para 28.5 cm.h^{-1} , possivelmente facilitou a transferência de massa líquido-gás, aumentando assim a porcentagem de H_2 no biogás e a CS em U2 com significância estatística. Lima & Zaiat (Lima & Zaiat, 2012) aplicaram diferentes graus de mistura em reator de leito fixo, o que modifica a v_{asc} do reator, e conseguiram otimizar a produção de H_2 através desse valor. Lee et al. 2006 (K. Lee, Lo, Lin, & Chang, 2006) avaliaram a influência do TDH e razão L/D, consequentemente v_{asc} , na produção de H_2 usando reator CIGSB (*carrier-induced granular sludge bed*) e os resultados obtidos mostraram que decréscimo no TDH e aumento na v_{asc} melhoram a produção de H_2 até um ponto ótimo.

Apesar do reator UASB ter sido capaz de produzir H_2 em todas as condições aplicadas, a eficiência do processo apresentou flutuações (Figura 8). Após período de adaptação, o aumento da COV resultava na melhora de PVM, VMH e YH_2 até um ponto de máximo, decrescendo em seguida no final de U12 e U6. Uma hipótese é de que a queda na relação substrato/microrganismos (COV específica) após em certo tempo operacional, conduza a rotas metabólicas menos eficientes. Ademais, a COV específica também varia ao longo do reator UASB devido ao seu escoamento pistonado.

Figura 8 – Visão geral do desempenho do reator UASB na produção de H₂ em todas as etapas: USU, partida do reator; U12, UASB com TDH de 12h; U6, UASB com TDH de 2.. VMH: vazão molar de H₂; PVH: produção volumétrica de H₂; CS: conversão de sacarose; YH₂: rendimento de H₂.

Na Figura 9 é apresentada a dinâmica de PMS ao longo da operação. A produção de H₂ depende dos produtos finais formados e os microrganismos podem mudar sua rota metabólica preferencial dependendo das condições (pH, COV específica, potencial redox, pressão parcial de H₂, etc.). Durante a partida do reator, a acidogênese foi a principal rota metabólica, com ácido acético, butírico e propiônico 82% dos ácidos graxos voláteis (AGV). A partir de U12 o padrão metabólico passou a ser a solventogênese.

5. Resultados e Discussões

Figura 9 – Concentração dos produtos metabólicos solúveis (PMS) produzidos através da acidogênese e solventogênese em reator UASB: USU, partida do reator; U12, UASB com TDH de 12h; U6, UASB com TDH de 2.

Os maiores valores de Y_{H_2} (em torno de $3 \text{ molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$) durante U12 ocorreram concomitantemente a concentrações de etanol e metanol representando 50% dos metabólitos e ácido butírico em torno de 18%, mas concentrações de ácido propiônico abaixo de $1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ (10%). A partir de U6, é possível notar variações nas concentrações de ácido propiônico e metanol, com a concentração de ácido láctico se tornando significativa em U2.

Os maiores valores de Y_{H_2} ocorreram a partir do dia 330, com flutuações em torno da média $2,56 \pm 0,84 \text{ molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$ e máximo de $4,06 \text{ molH}_2.\text{mol-suc}^{-1}$. Esse período pode ser considerado estacionário instável, conforme de Bailey & Ollis (1986), sendo observadas concentrações de etanol de $6,76 \pm 1,66 \text{ mmol.L}^{-1}$ e a maior concentração ácido láctico ($3,60 \pm 2,32 \text{ mmol.L}^{-1}$), mas baixas concentrações de ácido propiônico e metanol. Dong et al. (2011) encontraram valor similar de Y_{H_2} (ao redor de $2,8 \text{ molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$) em experimento com reator UASB alimentado com substrato sintético a base de sacarose. O reator foi inoculado com lodo granular metanogênico mesofílico e operado à 55°C e TDH de 12 h (COV de $20 \text{ gCOD.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). O ácido butírico foi o principal PMS, e o ácido propiônico apresentou baixa porcentagem.

Zhao et al. (2008) operaram reator UASB a 30°C , variando o TDH de 3 à 30 h. O reator foi inoculado com lodo de planta de tratamento de efluente de produção de citrato. Como no presente estudo, esses autores também não encontraram efeito

significativo do TDH em Y_{H_2} . Com COV de $21.2 \text{ gCOD.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, os autores obtiveram Y_{H_2} de $1,62 \text{ molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$, próximo ao valor médio de toda a fase U2. O ácido butírico foi o PMS mais significante, seguido de etanol. Sob condições mesofílicas (38°C), Yu and Mu (Yu & Mu, 2006) operaram um reator UASB por 3 anos usando efluente a base de sacarose. O inóculo foi proveniente e UASB tratando efluente de fábrica de citrato e o valor máximo de Y_{H_2} foi $2,88 \text{ molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$ obtido ao submeter o reator à COV de $7,11 \text{ gCOD.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (TDH de 18 h).

Como o reator UASB com TDH 2 h apresentou aumento na concentração de ácido láctico e, conforme Kongjan & Angelidaki (2010), é um sinal de sobrecarga no sistema, o reator UASB não foi operado com TDH de 0,5 h como as outras configurações.

5.1.3. *Influência do TDH na operação do reator tubular com leito empacotado*

O processo de auto inoculação foi eficiente para formação de biomassa no reator tubular com leito empacotado em temperatura termofílica independentemente do TDH. Mesmo com a prévia fermentação do substrato sintético em condição mesofílica (temperatura ambiente), a conversão de sacarose já na primeira amostragem, dia 13 para TCS2 e dia 2 para TCS0,5, apresentou valores superiores a 50% (Figura 10 A e B), pois o período de recirculação permitiu a seleção de bactérias aptas a se desenvolver na faixa termofílica e demais condições ambientais de cada operação.

5. Resultados e Discussões

Figura 10 – Conversão de sacarose (CS) e a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente no reator tubular com leito empacotado e operado com TDH de 2h (A) e 0,5h (B).

O TDH, contudo, se mostrou um fator determinante no desempenho do reator ao longo do tempo, conforme Figura 10. Após oscilações na conversão de sacarose no TCS2, a partir do dia 56 o valor de CS aumentou gradativamente até atingir 99,8% no dia 86, permanecendo estável, exceto por um declínio para 76,1% no dia 96. Já o TCS0,5 apresenta pequenas oscilações na CS até o dia 31, com valor mínimo de 18,8% no dia 27, estabilizando-se em $40,4 \pm 7,6\%$. Portanto, a biomassa que se desenvolveu no reator não foi capaz de se adequar a carga orgânica aplicada no TCS0,5 e levou à criação de zonas mortas, indicando que o crescimento e adesão da biomassa que poderia consumir a sacarose remanescente acarretou na diminuição do volume útil do reator e, portanto, do TDH real. Além disso, o escoamento com padrão de mistura completa estabelecido no TCS0,5 exige velocidades de reação mais altas para atingir a mesma eficiência de conversão que um reator em escoamento pistão. A perda de biomassa também foi afetada pelo TDH; apesar de variar em ambas as operações o TCS2 apresentou média 31% inferior ao TCS0,5.

A influência do TDH no reator tubular em relação à produção de hidrogênio é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Visão geral do desempenho do reator TCS na produção de H₂. Porcentagem de H₂ no biogás e VMH - vazão molar de H₂ (A – TDH de 2h e B – TDH de 0,5h); YH₂ - rendimento de H₂ e pH (C – TDH de 2h e D – TDH de 0,5h)

A produção de H₂ no TCS2 acompanhou o comportamento da conversão de sacarose, com oscilações em VMH e YH₂ até apresentar valores estáveis após 85 dias, respectivamente, $13,53 \pm 1,75 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,99 \pm 0,36 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol.sac}^{-1}$, em condição de pH $4,43 \pm 0,08$. A maior v_{asc} desenvolvida na condição TCS0,5 permitiu aumento de 46% no H₂ presente no biogás. Porém, com exceção do período inicial e entre os dias 27 e 35, VMH e YH₂ obtidas com TCS0,5 foram inferiores à TCS2, conforme apresentado na Tabela 8. O baixo valor de VMH em TCS0,5 poderia ter sido resultado da baixa CS, porém o valor de YH₂, obtido pela relação entre VMH e a velocidade de conversão de sacarose, demonstra que o metabolismo das bactérias nas condições ambientais estabelecidas no reator com TDH de 0,5 foi direcionado para rotas menos eficientes de produção de H₂.

5. Resultados e Discussões

Tabela 8 – Valores médios obtidos para as variáveis da produção de H₂ durante o período de estabilidade das operações TCS2 e TCS0,5.

Fase	VMH ^(a) (mmolH ₂ .h ⁻¹)	PVH ^(b) (mlH ₂ .h ⁻¹ .L ⁻¹)	YH ₂ ^(c) (molH ₂ .mol-suc ⁻¹)	CS ^(d) (%)	H ₂ no biogás ^(e) (%)
TCS2^(f)	13,53 ± 1,74	106,77 ± 12,75.87	1,99 ± 0,36	98,33 ± 5,22	42,69 ± 2,21
TCS0,5^(g)	5,25 ± 1,43	63,70 ± 16,25	0,48 ± 0,14	38,13 ± 5,02	62,28 ± 22,72

^(a) Vazão molar de H₂;^(b) Produção volumétrica de H₂;^(c) Rendimento de H₂ baseado na sacarose convertida;^(d) Porcentagem de sacarose convertida;^(e) Porcentagem de H₂ no biogás;^(f) Reator tubular com leito empacotado operando com TDH de 2h e COV 24g DQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 23, exceto para YH₂ e CS (n=22);^(g) Reator tubular com leito empacotado operando com TDH de 0,5h e COV 96g DQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 12.

O rendimento global de biomassa produzida por TCS0,5 atingiu o valor de 0,071 gSSV.g-sac⁻¹, enquanto que na operação de TCS2 o rendimento global foi 0,027 gSSV.g-sac⁻¹, e a biomassa encontrada no reator ao final da operação foi 31% menor, mesmo operando por 139 dias, enquanto que o TCS0,5 operou 64 dias. Todavia, a estimativa de produção e perda de biomassa foi realizada por meio dos sólidos suspensos voláteis, não sendo possível diferenciar biomassa de exopolímeros, que poderiam ter sido produzidos em quantidade superior pelas bactérias em TSS0,5 para se manterem no reator.

Ao analisar os PMS produzidos no reator tubular com leito empacotado (Figura 12), pode-se notar que o TDH de 0,5 h inibiu a solventogênese, rota principal na operação do TCS2 durante a estabilidade. O TCS2 a partir do dia 20 já apresentava pH inferior a 5,0, e no dia 68 atingiu 4,5, quando a concentração de etanol se encontrava em torno de 5 mmol.L⁻¹, com aumento contínuo, chegando a 9,18 mmol.L⁻¹ e representando 59,36 ± 4,05% dos PMS. Conforme literatura (Barton, 2005), o decréscimo do pH causado pela produção de ácidos como acético e butírico, por exemplo, induz o metabolismo de bactérias do consórcio microbiano à produção de solventes, de forma a impedir a acidificação maior do sistema.

Figura 12 - Concentração dos produtos metabólicos solúveis (PMS) produzidos no reator tubular com leito empacotado e TDH de 2 h (TCS2) e 0,5h (TCS).

Assim como verificado no reator UASB, o aumento da v_{asc} em TSS0,5 promoveu o aumento da transferência do H_2 para a fase gasosa. No entanto, ao contrário de U2, as variáveis relacionadas à produtividade diminuíram. Apesar do ácido acético ser a rota mais eficiente para a produção de H_2 e ter representado $47,2 \pm 8,0\%$ dos PMS em TCS0,5, o baixo rendimento indica que a rota provável para a produção desse ácido foi a homoacetogênese. Uma das hipóteses para a ocorrência da homoacetogênese é a alta COV, que permitiu a maior produção de microrganismos, ter resultado na diminuição da relação substrato/microrganismos, levando as bactérias a alterar seu metabolismo para o crescimento autotrófico.

A homoacetogênese foi identificada em diversos estudos sobre a produção de H_2 , mas as formas de inibi-la ainda não estão definidas (Saady, 2013). Embora tenha sido verificada em TCS0,5, a operação em temperatura termofílica parece ter sido suficiente para inibir o consumo de H_2 para a produção do ácido acético em TCS2,

visto que Fontes Lima, Moreira, & Zaiat, (2013) e Penteado, Lazaro, Sakamoto, & Zaiat (2013) verificaram a queda de H_2 devido à homoacetogênese em reatores mesofílicos com leito empacotado, TDH de 2h e COV de $24 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, utilizando substrato sintético a base de sacarose (Lima et al., 2013; Penteado et al., 2013). Os valores máximos encontrados por Fontes Lima, Moreira, & Zaiat, (2013) e Penteado, Lazaro, Sakamoto, & Zaiat (2013) para Y_{H_2} foram 3,22 e 6,8 $\text{mo-H}_2.\text{mol-sac}^{-1}$, respectivamente, contudo os processos não foram estáveis e Y_{H_2} decresceram até valores próximos a zero.

5.1.4. Influência do TDH na operação do reator tubular sem leito empacotado

Ao operar o reator tubular na ausência de material suporte com os mesmos TDH aplicados no TCS, testou-se a hipótese de o próprio fluxo pistonado estabelecido no reator ser capaz de manter biomassa suficiente para converter a sacarose, porém sem o acúmulo excessivo de microrganismos, como observado em TCS0,5, visto que a diminuição da relação substrato/microrganismos tem sido apontada como possível causa da mudança do metabolismo de bactérias produtoras de H_2 para a rota homoacetogênica. Além disso, buscou-se a redução da limitação à transferência do H_2 produzido para o biogás, como verificado em TCS2.

Conforme é possível visualizar na Figura 13, a CS em TSS apresentou oscilações tanto com TDH de 2 h quanto de 0,5 h, apresentando estabilidade a partir dos dias 68 e 66 dias, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as eficiências de CS, com valores médios de $34,58 \pm 4,87$ e $37,00 \pm 2,42\%$ para TSS2 e TSS0,5, respectivamente, com perda de biomassa quase duas vezes maior em TSS0,5.

Figura 13 - Conversão de sacarose (CS) e concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente do reator tubular sem suporte e operado com TDH de 2 h (A) e 0,5 h (B).

A perda de biomassa, no entanto, apresentou estabilidade apenas em TSS2, sendo 92% inferior a média obtida para TSS0,5. Ao final do experimento, o rendimento global de biomassa produzida em TSS0,5 ($0,122 \text{ gSSV.g-sac}^{-1}$), foi apenas 33% superior a TSS2, $0,092 \text{ gSSV.g-sac}^{-1}$ e a quantidade de biomassa remanescente ao final das operações foi 66% superior em TSS2, mesmo com apenas 2 dias a mais de operação.

Ao se observar a Figura 14, pode-se concluir que a estabilidade obtida por TSS0,5 na CS não é refletida na produção de H_2 . Após significativa queda na VMH para $1,01 \text{ mmolH}_2.\text{L}^{-1}$ no dia 14, no qual houve aumento da perda de biomassa, o reator aumentou a produção de H_2 a partir do dia 21, porém apresentou apenas uma fase estacionária com instabilidade. Uma vez que o modelo de escoamento de TSS0,5 se aproximou de reator de mistura completa (ao final do experimento seu N foi igual a 7), a possível causa da instabilidade foi a perda de sólidos.

5. Resultados e Discussões

Figura 14 - Visão geral do desempenho do reator TSS na produção de H_2 . Porcentagem de H_2 no biogás e VMH - vazão molar de H_2 (A – TDH de 2h e B – TDH de 0,5h); YH_2 - rendimento de H_2 e pH (C – TDH de 2h e D – TDH de 0,5h)

No caso do TSS2, a estabilidade também é observada na VMH, demonstrando que a velocidade de crescimento de biomassa e sua adesão no fundo e paredes do reator entrou em equilíbrio com a perda de biomassa. Os valores médios para as variáveis de produção de H_2 para TSS2 e TSS0,5, na fase estacionária, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios obtidos para as variáveis da produção de H_2 durante o período de estabilidade para TSS2 e durante toda a operação de TSS0,5.

Fase	VMH ^(a) (mmolH ₂ .h ⁻¹)	PVH ^(b) (mLH ₂ .h ⁻¹ .L ⁻¹)	YH ₂ ^(c) (molH ₂ .mol-suc ⁻¹)	CS ^(d) (%)	H ₂ no biogás ^(e) (%)
TSS2^(f)	5,22 ± 1,01	32,51 ± 6,86	1,36 ± 0,43	34,58 ± 4,87	58,04 ± 3,71
TSS0,5^(g)	10,81 ± 4,84	58,56 ± 20,59	0,61 ± 0,27	37,00 ± 2,42	69,65 ± 5,39

^(a) Vazão molar de H₂;^(b) Produção volumétrica de H₂;^(c) Rendimento de H₂ baseado na sacarose convertida;^(d) Porcentagem de sacarose convertida;^(e) Porcentagem de H₂ no biogás;^(f) Reator tubular sem material suporte operando com TDH de 2h e COV 24g DQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 11;^(g) Reator tubular sem material suporte operando com TDH de 0,5h e COV 96g DQO.L⁻¹.d⁻¹ – n= 11.

Da mesma forma que quando o leite empacotado foi utilizado, o aumento da mistura causado pela diminuição do TDH para 0,5 h permitiu a produção de biogás com teor de H₂ estatisticamente superior. No entanto, a rota utilizada pelo consórcio microbiano em TSS2 para a fermentação da sacarose foi mais eficiente em relação a produção de H₂. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de VMH de TSS2 e TSS0,5, resultando em YH₂ significativamente superior em TSS2.

A produção de PMS por TSS é apresentada na Figura 15 e demonstra que a menor eficiência de TSS0,5 se deve a produção de PMS com alto consumo de H₂. Apesar de inibir a produção de ácido propiônico, o metanol foi produzido em maior concentração em TSS0,5 quando comparado com TSS2: 4,62 ± 0,65 e 1,67 ± 0,16 mmol.L⁻¹, respectivamente. Além disso a produção de ácido acético foi 43% superior em TSS2.

5. Resultados e Discussões

Figura 15 - Concentração dos produtos metabólicos solúveis (PMS) produzidos no reator tubular sem material suporte e TDH de 2h (TSS2) e 0,5h (TSS).

Ambas as condições apresentaram produção de ácido lático, característica de estresse causado à comunidade microbiana. Além disso, a presença de ácido fórmico, intermediário gerado durante a quebra do piruvato e que pode ser consumido para a produção de H_2 , pode indicar contato insuficiente entre as bactérias e o substrato, durante a realização desta etapa, sendo assim, uma característica do tipo de reator independente do TDH aplicado.

5.1.5. Influência do tipo de reator na produção de hidrogênio

Os três tipos de reatores utilizados no presente trabalho (UASB, TCS e TSS) foram operados com TDH de 2 h. Apesar da origem do inóculo do reator UASB ter sido diferente, lodo de UASB metanogênico termofílico de planta de tratamento de vinhaça, enquanto os reatores TCS e TSS foram inoculados através do processo de autoinoculação, a condição U2 foi iniciada após 285 dias de operação do reator

UASB, conferindo assim características acidogênicas à biomassa. Para comparar a influência do tipo de reator, foram construídos gráficos o tipo *box-plot* (

Figura 16A, B e C) utilizando dados de porcentagem de H_2 , PVH e YH_2 e gráfico de colunas com as médias de PMS obtidos durante os períodos de estabilidade nos reatores TCS e TSS, e referente a operação do reator UASB a partir do dia 330, período considerado estacionário para YH_2 .

Figura 16 – Principais variáveis obtidas com os reatores operados com TDH de 2h: A – porcentagem de H_2 no biogás; B – PVH, produção volumétrica de H_2 ; C – YH_2 , rendimento de H_2 ; D – PMS, produto metabólico solúvel: EtOH (entanol), MeOH (metanol), Hbu (ácido butírico), Hpr (ácido propiônico), Hac (ácido acético), Hfo (ácido fórmico), Hla (ácido láctico).

Conclui-se a partir da Figura 16 que a presença de material suporte dificultou a transferência do H_2 para o biogás, conferindo ao TCS a menor porcentagem de H_2 no biogás. Entre as configurações com lodo autoimobilizado, não houve diferença estatística em relação à composição do biogás. No entanto, a PVH do TCS2 foi estatisticamente superior às obtidas com as outras configurações, sendo 228%

superior à TSS2 e 61% superior à U2, a qual foi 104% superior à TSS2. Em relação ao rendimento de produção de H_2 , representado pela variável YH_2 , o TCS2 também se mostrou superior à TSS2, porém estatisticamente igual a U2, o qual não pode ser considerado estatisticamente diferente de TSS2. O etanol foi o principal PMS em todas as configurações, porém em menor porcentagem em U2 e TSS2, nos quais as rotas de produção de ácido láctico e metanol, respectivamente, foram significativas resultando em valores inferiores de YH_2 .

Um dos fatores que pode ter contribuído para a instabilidade no U2, verificado na Figura 16 pela ampla faixa interquartil, foi o fato do biogás não ser liberado de forma constante e sim formar bolhas que se acumulavam no interior do leito de lodo até expandirem ao tamanho mínimo para sua liberação, além da dificuldade de manter a vazão constante, devido ao aumento gradativo da perda de carga pelo aumento na concentração do lodo.

Os gráficos *box-plot* e de colunas (Figura 17) também foram construídos para as configurações operadas com TDH de 0,5h, com dados da fase estacionária de TCS0,5 e TSS0,5. Foi possível observar que apesar de a solventogênese ter sido a rota principal em TSS0,5, com alta produção de metanol ($44,6 \pm 2,48\%$ dos PMS produzidos), enquanto que em TCS0,5 foi verificada a produção majoritária de ácidos, com ácido acético representando 57,1% dos ácidos, a presença de material suporte não teve efeito sobre a produção de H_2 , visto que não houve diferença estatística entre os dados de variáveis porcentagem de H_2 , PVM e YH_2 obtidos com as configurações analisadas.

Figura 17 - Principais variáveis obtidas com os reatores operados com TDH de 0,5h: A – porcentagem de H_2 no biogás; B – PVH, produção volumétrica de H_2 ; C – YH_2 , rendimento de H_2 ; D – PMS, produto metabólico solúvel: EtOH (entanol), MeOH (metanol), Hbu (ácido butírico), Hpr (ácido propiônico), Hac (ácido acético), Hfo (ácido fórmico), Hla (ácido láctico).

5.1.6. Considerações sobre rotas metabólicas

A partir dos dados produção de PMS, foram realizados os cálculos de coeficiente de rendimento de PMS ($YPMS$), apresentados na Tabela 10.

5. Resultados e Discussões

Tabela 10 – Valores médios dos coeficientes de rendimento dos PMS (YPMS).

Fase	YPMS (mol.mol-suc ⁻¹)						
	Hla ^(a)	Hfo ^(c)	Hac ^(c)	Hpr ^(d)	Hbu ^(e)	MeOH ^(f)	EtOH ^(g)
USU^(h)	0,00 ± 0,01	N/D	0,40 ± 0,16	0,60 ± 0,21	0,47 ± 0,28	0,08 ± 0,14	0,03 ± 0,04
U12⁽ⁱ⁾	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,24 ± 0,06	0,40 ± 0,20	0,31 ± 0,15	0,58 ± 0,23	0,64 ± 0,46
U6^(j)	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,34 ± 0,13	0,22 ± 0,07	0,52 ± 0,30	0,95 ± 0,22
U2^(k)	0,84 ± 0,62	0,08 ± 0,05	0,28 ± 0,07	0,21 ± 0,27	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,16	1,44 ± 0,28
TCS2^(l)	0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,05	0,14 ± 0,12	1,28 ± 0,20
TCS0,5^(m)	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	1,02 ± 0,11	0,06 ± 0,01	0,33 ± 0,06	N/D	N/D
TSS2⁽ⁿ⁾	0,22 ± 0,12	0,18 ± 0,05	0,46 ± 0,09	0,39 ± 0,11	0,51 ± 0,13	0,90 ± 0,18	1,21 ± 0,48
TSS0,5^(o)	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,21 ± 0,06	N/D	0,18 ± 0,10	1,25 ± 0,58	0,79 ± 0,25

(a) Ácido láctico na fase líquida;

(b) Ácido fórmico na fase líquida;

(c) Ácido acético na fase líquida;

(d) Ácido propiônico na fase líquida;

(e) Ácido butírico na fase líquida;

(f) Metanol na fase líquida;

(g) Etanol na fase líquida;

(h) Partida UASB durante toda a operação (n = 17);

(i) UASB TDH de 12 h e COV 4 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ durante toda a operação (n = 69);(j) UASB TDH de 6 h e COV 8 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ durante toda a operação (n = 31);(k) UASB TDH de 2 h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ durante toda a operação (n = 25).(l) Tubular com leito empacotado e TDH de 2 h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante a fase estável (n = 22);(m) Tubular com leito empacotado e TDH de 0,5 h e COV 96 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante a fase estável (n = 12);(n) Tubular sem suporte e TDH de 2 h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante a fase estável (n = 11);(o) Tubular sem suporte e TDH de 0,5 h e COV 96 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, a partir do dia 21 (n = 35);

A produção de ácido láctico está associada a condições de estresse a comunidade microbiana. Por ser um ácido fraco, pode ser produzido como uma resposta do metabolismo de certas bactérias à acidificação do meio (Barton, 2005). Assim, o aumento da COV na condição U2 com queda no pH estimulou a produção de ácido láctico. A produção de ácido láctico pode seguir as rotas homofermentativa (Equação 30) ou heterofermentativa (Equação 31), sendo a última em conjunto com a produção de etanol (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2012).

Ácido láctico *via* piruvato

Ácido láctico *via* heterofermentação

A solventogênese também pode ser estimulada por queda no pH e outras condições de estresse microbiano. O metanol foi detectado em células inativas de bactérias metanotróficas que, sob condições de estresse, como limitação de nitrogênio de razão $NADH/NAD^+$ superior a necessária para o crescimento, consomem 1 mol de CO_2 e 2 mols de H_2 para produzir Poli- β -Hidroxibutirato (PHB). Em períodos de privação de substrato, o PHB é então clivado em um processo que consome mais 1 mol de H_2 e resulta em metanol como produto final (Xin, Zhang, Zhang, Xia, & Li, 2007). A equação geral de produção de metanol é apresentada como Equação 32.

Metanol *via* consumo de H_2 e CO_2

Levando em consideração os valores de rendimento de PMS (YPMS) ao longo de todo o período e usando a estequiometria das Equações 1-6, 8-11 e 30-32, foi realizado o balanço global entre a produção potencial de H_2 e o H_2 utilizado na formação dos metabólitos reduzidos, para testar as possíveis rotas metabólicas estabelecidas nos reatores e conhecer o Y_{H_2} teórico.

Para os cálculos, foi considerado 1 mol de sacarose consumida. Assim, a produção de H_2 resultou da reoxidação de 4 mols de NADH produzidos durante a glicólise e a produção de H_2 conjunta com a produção de acetil-CoA, necessária para a formação dos ácidos acético e butírico e etanol. Assumiu-se a rota PFL para produção de acetil-CoA, nos casos em que o ácido fórmico foi detectado no efluente. Também foi realizado o balanço de DQO entre a DQO afluenta e a DQO efluente

correspondente à concentração de H_2 , PMS, sacarose não convertida e concentração de CH_4 , quando presente no biogás.

Através dos cálculos metabólicos, com resultados da Tabela 11, é possível fazer algumas considerações sobre as rotas metabólicas estabelecidas durante a operação do reatores UASB e tubular com e sem leito empacotado. Y_{H_2} experimental em USU foi inferior ao teórico, assim, provavelmente arqueas metanogênicas seguiram utilizaram tanta a rota acetoclástica quanto a hidrogenotrófica para a produção de CH_4 , sendo possível até 46% de produção a partir de H_2 .

Tabela 11 – Balanço estequiométrico de H₂, baseado em 1 mol de sacarose convertida.

Fase	Produção potencial de H ₂ ^(a) (mol.mol-suc ⁻¹)	H ₂ para metabólitos ^(b) (mol.mol-suc ⁻¹)	YH ₂ teórico ^(c) (mol.mol-suc ⁻¹)	Balanço YH ₂ ^{2theo} e YH ₂ ^{medido} ^(d) (mol.mol-suc ⁻¹)	Balanço de DQO ^(e) (%)
USU ^(f)	6,40	2,46	3,94	3,56	106 ± 8
U12 ^(g)	5,51	4,45	0,97	-0,13	103 ± 9
U6 ^(h)	5,60	4,58	1,00	0,16	111 ± 12
U2 ⁽ⁱ⁾	5,15	3,05	1,12	-0,61	95 ± 10
TCS2 ^(j)	5,60	3,47	2,18	0,60	93 ± 21
TCS0,5 ^(k)	5,10	1,10	4,47	3,54	132 ± 16
TSS2 ^(l)	6,78	5,21	1,14	-0,23	116 ± 10
TSS0,5 ^(m)	5,60	5,52	-0,63	-1,16	109 ± 9

(a) H₂ potencialmente produzido em conjunto com a produção de acetil CoA e reoxidação da NADH produzida durante a glicólise;

(b) H₂ utilizado na produção dos ácidos láctico, propiônico e butírico, metanol e etanol;

(c) Balanço entre H₂ produzido e consumido na produção dos produtos finais reduzidos;

(d) Balanço entre YH₂ teórico e YH₂ obtido nos experimentos (YH₂^{theo} - YH₂^{medido});

(e) Balanço entre DQO efluente e DQO efluente de H₂, CH₄, SMP e sacarose não convertida;

(f) Partida UASB (para balanço de DQO n = 17);

(g) UASB TDH de 12 h e COV 4 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO n = 69)

(h) UASB TDH de 6 h e COV 8 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO n = 31);

(i) UASB TDH de 2 h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO n = 25).

(j) Tubular com leito empacotado e TDH de 2 h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO todo o período n = 54);

(k) Tubular com leito empacotado e TDH de 0,5 h e COV 96 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO n = 26);

(l) Tubular sem suporte e TDH de 2 h e COV 24 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO n = 34);

(m) Tubular sem suporte e TDH de 0,5 h e COV 96 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante todo o período (para balanço de DQO n = 45);

Em USU, quando o reator UASB ainda apresentava produção de CH₄, o menor YH₂ obtido experimentalmente (937% inferior ao teórico) foi resultado da metanogênese hidrogenotrófica (Equação 33), que poderia representar até 46% da produção de metano. Em TCS0,5 foi obtido YH₂ 380% inferior ao possível teoricamente e, como houve a expressiva produção de ácido acético, cuja rota seria a mais favorável para a produção de H₂, presume-se que a produção desse ácido tenha ocorrido através da homoacetogênese (Equação 12). Nessa condição, até 73% da produção de ácido acético poderia ser proveniente do consumo de H₂.

Nas condições U6 e TCS2, os valores experimentais de YH₂ foram apenas 19 e 38% inferiores aos valores teóricos. Como parte do H₂ permanece dissolvido na fase líquida, mesmo em reatores termofílicos (Zhang, Zhang, Chen, & Zeng, 2012b), e depende do coeficiente de transferência de massa (K_La), intrínseco de cada reator, não é possível afirmar sobre a ocorrência de homoacetogênese. Além disso, o ácido acético correspondeu a menos de 10% dos PMS produzidos nessas condições.

Nas condições U12, U2, TSS2 e TSS0,5 o balanço de YH₂ foi negativo em, respectivamente, 12, 35, 17 e 218%, considerando que todo o H₂ seria transferido para o biogás. Como exposto na literatura (Donot, Fontana, Baccou, & Schorr-Galindo, 2012; Freitas, Alves, & Reis, 2011), uma ampla gama de microrganismos são produtores de polissacarídeos para armazenamento interno de carbono e energia, na forma de PHA, ou para proteção externa através de biofilmes, como exopolissacarídeos (EPS). A produção desse polissacarídeos é estimulada pela alta concentração de substrato, nutrientes e aumento da força de cisalhamento no interior do reator. EPS, assim como PHA, podem ser produzidos através da quebra da sacarose. No caso dos PHB, 2 mols de acetil-CoA são necessários e é provável que o excesso de H₂ nos dados experimentais venha da produção de acetil Co-A pela clivagem de piruvato, para a produção de polissacarídeos. Considerando essa hipótese, se 5, 62, 88 e 88% do piruvato remanescente fossem convertidos em acetil-CoA, em U12, U2, TSS2 e TSS0,5, respectivamente, o déficit de H₂ seria suprido.

A porção de sacarose utilizada para crescimento em sistemas termofílicos é baixa. Nas condições U2 e TCS2 esse valor correspondeu a 5 e 7%, respectivamente, conforme os balanços de DQO. Nas outras fases, a DQO efluente foi superior à afluenta, especialmente em TCS0,5, o que pode ser resultado do consumo de CO_2 dissolvido para a produção de metanol ou para a homoacetogênese.

5.1.7. Definição da melhor configuração

A escolha da melhor configuração passa pela análise de vários critérios. A porcentagem de H_2 , por exemplo, é um aspecto importante quando o destino do H_2 é a geração de eletricidade utilizando células a combustível, pois esse tipo de equipamento exige H_2 com pureza acima de 99,99% de H_2 , e como as principais técnicas de purificação do gás utilizado envolvem o processo de adsorção, quanto maior a pureza do biogás produzido maior a vida útil do material adsorvente. Em casos cuja finalidade é a geração contínua de eletricidade através de células, as variáveis PVM e YH_2 passam a ter maior peso para estimar a demanda de energia por hora que o sistema poderá suprir. Sendo assim, mesmo que apresentem menor porcentagem de H_2 no biogás, configuração com PVM e YH_2 superiores podem se tornar mais adequadas.

Portanto, a escolha da configuração passa a depender da finalidade que será dada ao biogás. A apresentação resumida dos principais resultados para definição da melhor configuração é feita através das Tabela 12 e Tabela 13. A Tabela 12 indica se houve estabilização do reator durante a operação e o principal PMS produzido. Na Tabela 13 foi atribuída a posição em ordem crescente para médias de PVH, YH_2 e porcentagem de H_2 , encontradas em cada operação e considerando as diferenças estatísticas.

As configurações TCS2 e U2 foram as que apresentaram melhor desempenho, apesar de ambas as configurações terem conduzido à rota metabólica solventogênica, com etanol em maior proporção, e apresentado porcentagens inferiores de H_2 no biogás. Contudo TCS2 apresentou os maiores valores médios para PVH e YH e produção estável de H_2 , seguido por U2, a qual não apresentou

5. Resultados e Discussões

estabilidade. Portanto, entre as configurações testadas, a TCS 2 pode ser avaliada como a mais eficiente para produção de H_2 .

Tabela 12 – Avaliação da estabilidade e principais PMS produzidos nas configurações de reatores testadas no presente estudo.

Condição	Estabilidade	Principal PMS ^(a) (%)
USU ^(b)	Ausente	Ác. acético/ ác. butírico (24,5/27,4)
U12 ^(c)	Ausente	Etanol/ metanol (25,4/24,0)
U6 ^(d)	Ausente	Etanol (39,4)
U2 ^(e)	Ausente	Etanol (43,5)
TCS2 ^(f)	Presente	Etanol (59,3)
TCS0,5 ^(g)	Presente	Ác. acético (54,2)
TSS2 ^(h)	Presente	Etanol/ metanol (25,9/20,2)
TSS0,5 ⁽ⁱ⁾	Ausente	Metanol (44,6)

(a) Principal Produto metabólico solúvel

(b) Partida UASB durante toda a operação (n = 17);

(c) UASB TDH de 12 h e COV 4gDQO.L⁻¹.d⁻¹ durante toda a operação (n = 69);

(d) UASB TDH de 6 h e COV 8gDQO.L⁻¹.d⁻¹ durante toda a operação (n = 31);

(e) UASB TDH de 2 h e COV 24gDQO.L⁻¹.d⁻¹, a partir do dia 330 (n = 15).

(f) Tubular com leito empacotado e TDH de 2 h e COV 24gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante a fase estável (n = 22);

(g) Tubular com leito empacotado e TDH de 0,5 h e COV 96gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante a fase estável (n = 12);

(h) Tubular sem suporte e TDH de 2 h e COV 24gDQO.L⁻¹.d⁻¹, durante a fase estável (n = 11);

(i) Tubular sem suporte e TDH de 0,5 h e COV 96gDQO.L⁻¹.d⁻¹, a partir do dia 21 (n = 11).

Tabela 13 – Avaliação da estabilidade e principais PMS produzidos nas configurações de reatores testadas no presente estudo

Ordenamento das médias ^(a)			
Posição	PVH ^(b)	YH ₂ ^(c)	H ₂ no biogás ^(d)
1	TCS2	TCS2 ¹	TSS0,5 ¹
2	U2/TCS0,5/TSS0,5	U2 ²	TCS0,5 ²
3	TSS2	TSS2 ³	TSS2 ³
4	U6	U12/U6	U2
5	U12	TSS0,5 ¹	U6 ¹
6	USU	TCS0,5 ²	U12 ²
7		USU ³	TCS2 ³
8			USU

(a) Ordenamento crescente das médias, considerando significância estatística de 5%. O subíndice 2 indica que a média é igual as médias com subíndices 1 e 3, as quais são diferentes entre si;^(b)

(b) Produção volumétrica de H_2 ;

(c) Rendimento de H_2 baseado na sacarose convertida;

(d) Porcentagem de H_2 no biogás.

5.1.8. Análise microbiológica nos reatores

Como apresentado na Figura 18, o efeito de lavagem (*washout*) durante USU e a acidificação do ambiente atuaram selecionando a biomassa, uma vez que o inóculo foi apenas 20% similar às comunidades estabelecidas no reator durante a operação. Além disso, a comunidade estabelecida durante U12, quando houve predominância da acidogênese, apresentou 38% de similaridade com a população encontrada no final da operação com TDH de 12h, quando a solventogênese era a rota dominante. Com a estabilização da perda de biomassa depois da partida do reator, pode-se considerar que as condições ambientais determinadas pelo decréscimo do TDH para 6 h e, em seguida, para 2 h, e as concentrações de PMS no sistema foram os maiores responsáveis pela mudança no consórcio microbiano. Essa mudança aconteceu na mesma intensidade ao se aplicar a mudança de TDH, uma vez que resultou em similaridade de 48% entre U2 e o agrupamento de U12B, ao final da operação com TDH de 12 h, e U6, os quais foram 54% similares.

Figura 18 – Agrupamento das comunidades microbianas nas operações do reator UASB: nos dias 110 (U12A), 211 (U12B), 282 (U6) e 366 (U2).

A Figura 19 apresenta o agrupamento entre as comunidades microbianas estabelecidas nas operações do reator tubular com leito empacotado, tanto no leito empacotado (LE: TCS2LE, para TDH de 2 h, e TCS0,5LE para TDH de 0,5 h) quanto no compartimento de acúmulo de biomassa (CA: TCS2CA, para TDH de 2 h, e TCS0,5CA para TDH de 0,5 h), nas operações sem material suporte e ainda a operação do reator UASB com TDH de 2 h.

Figura 19 – Agrupamento das comunidades microbianas nas operações dos reatores tubular com leito empacotado (TCS), tanto no leito empacotado (LE: TCS2LE, para TDH de 2 h, e TCS0,5LE para TDH de 0,5 h) quanto no compartimento de acúmulo de biomassa (CA: TCS2CA, para TDH de 2, e TCS0,5CA para TDH de 0,5); tubular sem material suporte (TSS) e UASB com TDH de 2 h (U2).

A característica de mistura perfeita do reator TCS0,5 é confirmada pela similaridade de 100% entre o leito do reator e o compartimento de acúmulo. O TDH mais alto, consequente menor v_{asc} , e diferentes condições ambientais desenvolvidas no reator, teve efeito seletivo sobre a comunidade microbiana no reator, sendo confirmado pela baixa similaridade entre TSS2 e TSS0,5, 18%, e TCS0,5 e TCS2CA 40%. Quando TCS0,5 foi comparado com o TCS2LE o coeficiente caiu para apenas 24%. O escoamento no reator pistonado estabelecido em TCS2 acarretou na diferenciação entre leito e compartimento de acúmulo, como é visto pela similaridade de 24% entre TCS2LE e TCS2AC, 2% inferior à similaridade do reator UASB, inoculado com lodo de origem metanogênica, em relação ao mesmo TCS2AC.

Assim, as diferentes composições de PMS encontradas nas operações dos reatores foram consequência dos diferentes consórcios microbianos adaptados a cada condição testada.

5.2. Etapa 2 – Verificação da condição nutricional ótima

A matriz utilizada no experimento baseado no arranjo *Planckett-Burman* e os valores de VMPH e YH_2 obtidos nos ensaios são apresentados na Tabela 14. O

teste ANOVA mostrou, com nível de significância de 5%, que há três fatores cujos efeitos são significativos: Fe^{+2} , Ni^{+2} e C:N:P.

Tabela 14 – Matriz *Plackett-Burman* e os valores de VPH e YH_2 para cada ensaio.

C:N: P	Níveis dos fatores						Variáveis	
	Co_2^+	Fe^{2+}	Mg^2_+	Ni^{2+}	Se^{2+}	Zn^2_+	VMPH (mmol.h^{-1})	YH_2 ($\text{molH}_2.\text{molsac}^{-1}$)
-1	-1	-1	1	1	1	-1	$0,023 \pm 0,004$	$1,12 \pm 0,34$
-1	-1	1	1	-1	-1	1	$0,033 \pm 0,012$	$1,29 \pm 0,02$
-1	1	-1	-1	1	-1	1	$0,029 \pm 0,004$	$0,90 \pm 0,17$
-1	1	1	-1	-1	1	-1	$0,037 \pm 0,004$	$1,39 \pm 0,36$
0	0	0	0	0	0	0	$0,018 \pm 0,001$	$0,68 \pm 0,06$
1	-1	-1	-1	-1	1	1	$0,011 \pm 0,011$	$0,73 \pm 0,10$
1	-1	1	-1	1	-1	-1	$0,026 \pm 0,012$	$1,83 \pm 0,34$
1	1	-1	1	-1	-1	-1	$0,007 \pm 0,003$	$0,65 \pm 0,02$
1	1	1	1	1	1	1	$0,019 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,23$

Foi estimado que o aumento da concentração de Fe^{+2} do nível inferior para o superior eleva em 4 e 6%, respectivamente, os valores de VMPH e YH_2 , da mesma forma, o aumento na concentração de Ni^{2+} proporciona aumento de 3% em YH_2 , como é possível ser visualizado nos diagramas de Pareto (Figura 20A e B). Os mesmos diagramas mostram que os valores da relação C:N:P influenciam de forma inversa o valor de VMH, permitindo um aumento de 4% quando C:N:P passa do nível 1 para -1. A inclusão de pontos centrais permitiu, ainda, a avaliação do efeito da curvatura, que na resposta rendimento demonstrou efeito negativo, sinalizando, assim, a existência de um ponto de mínimo significativo na faixa de valores escolhida para os fatores significativos.

Figura 20 – Diagramas de Pareto mostrando os efeitos de cada nutriente sobre a velocidade molar de produção de H₂ (A) e rendimento de H₂ (B).

A influência dos metais ferro e níquel era esperada, pois, conforme a literatura (Vignais & Colbeau, 2004), eles compõem o núcleo de diversas enzimas relacionadas aos metabolismos de produção e consumo de H₂. A relação C:N:P é outro fator de extrema importância para as bactérias. Os elementos carbono, nitrogênio e fósforo fazem parte da composição celular em porcentagens representativas, em geral, 50, 13 e 2,5% do peso seco sendo, portanto, indispensáveis para o crescimento celular (Madigan et al., 2012). A disponibilidade de nitrogênio e carbono também atua sobre o metabolismo dos microrganismos, podendo alterar as rotas metabólicas utilizadas por eles, bem como induzir à formação de esporos em bactérias com essa capacidade (Madigan et al., 2012).

O planejamento *Plackett-Burman* permitiu ainda o ajuste de equações lineares de VM_{PH} e YH₂ em função dos fatores significativos, resultando nas Equações 34 e 35.

$$VMH = 0,023 - 0,007R_{C:N:P} + 0,006C_{Fe+2} \quad \text{Equação 34}$$

$$YH_2 = 1,18 - 0,33C_{Fe+2} + 0,17C_{Ni+2} \quad \text{Equação 35}$$

Essas equações foram utilizadas como diagonal de maior inclinação e, assim, os três fatores significativos (Fe⁺², Ni⁺² e C:N:P) foram utilizados para a próxima etapa, com o objetivo de se aproximar das faixas de concentrações de nutrientes que fornecem o valor ótimo especificamente para cada variável. Como a

concentração de Fe^{+2} teve efeito significativo e diretamente proporcional ao aumento das variáveis VMPH e YH_2 , mas os demais fatores foram significativos para apenas uma das variáveis, buscou-se a otimização de uma faixa de concentração para cada variável. O planejamento originou as respostas presentes na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos com o planejamento pelo método da diagonal de maior inclinação.

Ensaio	Variáveis	
	VMPH (mmol.h^{-1})	YH_2 ($\text{molH}_2.\text{mol-sac}^{-1}$)
Centro	$0,031 \pm 0,001$	$1,75 \pm 0,05$
Centro + Δ	$0,073 \pm 0,008$	$1,54 \pm 0,03$
Centro + 2Δ	$0,057 \pm 0,019$	$1,46 \pm 0,24$
Centro + 3Δ	$0,118 \pm 0,004$	$1,44 \pm 0,02$
Centro + 4Δ	$0,074 \pm 0,005$	$1,55 \pm 0,04$

Ao se partir do ponto central, aumentando as concentrações de Fe^{2+} e Ni^{2+} e diminuindo a relação C:N:P não foi observado aumento no valor de YH_2 com relação ao teste anterior, sendo o maior valor dessa variável obtido no ponto central. Levando em consideração a VMPH, obteve-se incremento em seu valor até a condição centro + 3Δ , havendo decréscimo na condição centro + 4Δ . Assim, como o maior valor de YH_2 foi obtido no ponto central, foram utilizadas essas concentrações de Fe^{2+} e Ni^{2+} como nível 0 na elaboração do planejamento Composto Central, enquanto que para a relação C:N:P, fator significativo para VMPH, foi adotada a relação do ponto central + 3Δ .

Os valores obtidos para as variáveis VMPH e YH_2 com o planejamento Composto Central são apresentados na Tabela 16. O modelo quadrático se ajustou aos dados com R^2 de 0,17 para VMPH e 0,35 para YH_2 .

5. Resultados e Discussões

Tabela 16 – Matriz do planejamento *Composto Central* e resultados obtidos.

Ensaio	Níveis dos fatores			Variáveis	
	C:N:P	Fe ²⁺	Ni ²⁺	VMPH (mmol.h ⁻¹)	YH ₂ (molH ₂ .mol-sac ⁻¹)
1	-1,6818	0	0	0,189 ± 0,134	1,00 ± 0,30
2	-1	-1	-1	0,073 ± 0,174	1,09 ± 0,15
3	-1	-1	1	0,047 ± 0,005	1,15 ± 0,15
4	-1	1	-1	0,064 ± 0,019	1,28 ± 0,06
5	-1	1	1	0,073 ± 0,008	1,16 ± 0,09
6	0	-1,6818	0	0,223 ± 0,192	1,15 ± 0,10
7	0	0	-1,6818	0,070 ± 0,014	1,23 ± 0,12
C	0	0	0	0,152 ± 0,163	1,19 ± 0,19
8	0	0	1,6818	0,230 ± 0,207	1,22 ± 0,06
9	0	1,6818	0	0,114 ± 0,035	1,15 ± 0,10
10	1	-1	-1	0,069 ± 0,003	1,33 ± 0,23
11	1	-1	1	0,066 ± 0,028	1,38 ± 0,05
12	1	1	-1	0,065 ± 0,010	1,58 ± 0,23
13	1	1	1	0,034 ± 0,015	1,12 ± 0,28
14	1,6818	0	0	0,051 ± 0,042	1,09 ± 0,23

Na construção de cada superfície de resposta (Figura 21), foi adotado o nível crítico estimado pelo modelo para os fatores que não foram significativos para a variável em questão, ou seja Ni²⁺ no ajuste de VMPH e C:N:P ao ajustar HY. O valor máximo de VMPH estimado pelo modelo foi 0,199 mmol.h⁻¹ para relação C:N:P de 11:3:1 e Ni²⁺ na concentração 0,015mg.L⁻¹, contudo a concentração de Fe²⁺ crítica encontrada foi -1,98 mg.L⁻¹ (Figura 21A). No caso de YH₂, o modelo não obteve máximo, apenas um mínimo local, e o valor da variável aumenta nas regiões em que ou a concentração de Ni²⁺ ou a de Fe²⁺ se tornam negativas (Figura 21B).

Figura 21 – Superfícies de resposta das variáveis VPH (A) e YH₂ (B) em função de seus respectivos fatores influentes.

Como os ensaios foram divididos em duas etapas, devido à inviabilidade de amostrar o biogás de todos os frascos nos intervalos desejados, foi adicionada a variável bloco ao modelo para verificar se a causa da falta de ajuste dos dados foi algum fator externo, como mudança de temperatura da câmara ao longo do experimento. O modelo alterado mostrou aumento do ajuste R^2 para 0,44 em relação a YH_2 , contudo, o ponto crítico encontrado pelo modelo se manteve como mínimo local e não foi verificada melhoria com relação à VMPH. A hipótese para o comportamento das variáveis seria o fato da faixa de C:N:P adotada nos ensaios do *Composto Central* ser bastante inferior à adota no primeiro planejamento, cujo valor máximo é 1,3 vez inferior ao valor mínimo adotado em *Plackett-Burman*. Assim, a alta concentração de nitrogênio na faixa de C:N:P no terceiro planejamento, que resultou em produção de biomassa estatisticamente superior ao primeiro ensaio, pode ter levado à alteração da rota metabólica por excesso de microrganismos.

Dessa maneira, novo ensaio foi realizado utilizando blocagem no planejamento e variando apenas as concentrações de Fe^{+2} e Ni^{+2} e utilizando a relação C:N:P adotada na operação dos reatores (390:3:1). Os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Matriz do planejamento *Composto Central* variando apenas Fe^{+2} e Ni^{+2} e resultados obtidos.

Ensaio	Níveis dos fatores		YH_2 ($molH_2.mol-sac^{-1}$)
	Fe^{+2}	Ni^{+2}	
1	-1	-1	$2,13 \pm 0,04$
2	-1	1	$2,09 \pm 0,26$
C	0	0	$2,12 \pm 0,03$
3	1	-1	$1,77 \pm 0,13$
4	1	1	$1,78 \pm 0,12$
5	$-\sqrt{2}$	0	$2,41 \pm 0,08$
6	0	$-\sqrt{2}$	$2,63 \pm 0,11$
7	0	0	$2,67 \pm 0,07$
8	0	$\sqrt{2}$	$2,24 \pm 0,05$
9	$\sqrt{2}$	0	$2,69 \pm 0,35$

O modelo apresentou R^2 de 0,75 e significância para a interferência dos blocos, ou seja, condições ambientais diferentes na execução dos dois blocos interferiram no experimento. Dessa forma, foram construídas duas superfícies de resposta uma para o bloco 1 (Figura 22A) e para o bloco 2 (Figura 22B).

Figura 22 – Superfície de resposta para a variável YH_2 em relação às concentrações de Fe^{2+} e Ni^{2+} .

O teste também foi significativo para o coeficiente quadrático de Ni^{+2} , porém não foi obtida significância estatística para os demais fatores da equação. As concentrações de nutrientes que resultaram no ponto máximo de produção foram estimadas em $4,53 \text{ mgFe}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,045 \text{ mgNi}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$. O YH_2 máximo previsto pela Equação 34 variou entre 2,67 e 2,96 $\text{molH}_2 \cdot \text{mol-sac}^{-1}$, conforme eram consideradas pertencentes ao primeiro ou segundo bloco.

$$YH_2 = 2,045 + 0,274B + 0,53C_{Fe+2} - 0,007C_{Fe+2}^2 + 10,940C_{Ni+2} - 130,305C_{Ni+2}^2 + 0,180C_{Fe+2}C_{Ni+2} \quad \text{Equação 36}$$

A concentração de Fe^{+2} encontrada como ponto máximo foi em torno de 10 vezes superior à utilizada nas operações dos reatores contínuos ($0,50 \text{ mgFe}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$), já a concentração de Ni^{+2} otimizada indica um excesso de quase 2,5 vezes no substrato sintético que alimentava os reatores. Assim, produção de H_2 por reatores anaeróbios termofílicos com biomassa proveniente do processo de auto-fermentação pode ser melhorada utilizando as concentrações obtidas nos ensaios em batelada.

6. CONCLUSÕES

Através da operação de três configurações de reatores: UASB operado com TDH de 12, 6 e 2 h; tubular com leito empacotado (TCS) e tubular sem suporte (TSS) operados com TDH de 2 e 0,5h, pôde-se concluir que o TDH de 2 h foi o mais adequado para a produção de H_2 , sendo que as configurações TCS2 e U2 apresentam as melhores eficiências, com rota metabólica direcionada para a produção de etanol. Porém, por ter também demonstrado estabilidade, TCS2 pode ser apontado como a configuração mais eficiente entre as testadas.

Com TDH de 2 h, o material suporte para agregação da biomassa se mostrou diretamente relacionado com a transferência de massa, resultando em menor teor de H_2 no biogás quando presente, porém, permitindo maior contato entre os microrganismos e o substrato, o que melhorou a conversão de sacarose e resultou em maior produção de H_2 . Nesse sentido, o reator UASB apresentou uma situação intermediária entre o leito empacotado e a completa ausência de suporte, uma vez que a biomassa acidogênica pôde aderir aos grânulos de inóculo para se manter no reator, além do auxílio do dispositivo trifásico do reator. Com o TDH de 0,5 h, a presença ou ausência de material suporte teve interferência apenas no direcionamento das rotas metabólicas, mas resultou em produção de H_2 e conversão de sacarose similares.

A diminuição do TDH no reator UASB de 12 para 2 h resultou em aumento da transferência de massa sem prejudicar o processo, melhorando a eficiência na conversão de sacarose e aumentando a produção de H_2 . Já para os reatores tubulares com e sem leito empacotado, a diminuição do TDH de 2 para 0,5 h resultou em aumento da teor de H_2 no biogás, mas o consequente aumento da COV de 24 para 96 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ direcionou o metabolismo dos microrganismos às rotas de consumo de H_2 para a produção de ácido acético ou metanol, diminuindo a eficiência dos reatores na produção de H_2 .

O estudo indicou, ainda, que as condições ambientais às quais os microrganismos são submetidos em operações contínuas exerceram papel mais importante na seleção do consórcio microbiano que a origem do inóculo.

Verificou-se que o ferro e o níquel tem efeito sobre o coeficiente de rendimento de H_2 (Y_{H_2}) e o ferro e relação C:N:P afetam a velocidade molar de produção de H_2 (VMPH). As concentrações ótimas de Fe^{+2} e Ni^{+2} encontradas foram $4,53 \text{ mgFe}^{+2} \cdot L^{-1}$ e $0,045 \text{ mgNi}^{+2} \cdot L^{-1}$. O Y_{H_2} máximo previsto está na faixa entre 2,67 e 2,96 $\text{molH}_2 \cdot \text{mol-sac}^{-1}$. Já a relação C:N:P ótima não pôde ser determinada, mas os resultados indicaram que para relações inferiores a 100:3:1 o crescimento biomassa passa a ser significativamente superior e pode interferir na produção de H_2 .

Assim, espera-se que o presente estudo sirva de embasamento para a escolha da configuração de reator para produção termofílica de H_2 mais adequada ao objetivo desejado, além de contribuir para a melhoria da produção de H_2 através da complementação de nutrientes.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho apresenta alguns avanços para pesquisa em produção de H_2 em reatores termofílicos, mas deixa algumas lacunas a serem preenchidas por trabalhos posteriores:

- Operação de reator UASB utilizando a autoinoculação;
- Avaliação e quantificação da produção de polímeros em reatores sob condições de estresse;
- Determinação dos parâmetros cinéticos dos reatores estudados através da modelagem dos dados obtidos;
- Identificação das comunidades microbianas desenvolvidas nos reatores, especialmente a responsável pela produção do metanol, por ser uma rota pouco citada na literatura sobre produção de H_2 ;
- Utilização das concentrações ótimas de níquel e ferro em reatores termofílicos contínuos;
- Determinação da melhor relação C:N:P para a produção termofílica de H_2 .

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akutsu, Y., Lee, D.-Y., Chi, Y.-Z., Li, Y.-Y., Harada, H., & Yu, H.-Q. (2009). Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(12), 5061–5071. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.04.024
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (21st ed., p. 1368). Washington, DC: American Public Health Association.
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. a, & Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22(9), 477–85. doi:10.1016/j.tibtech.2004.07.001
- Babu, V. L., Mohan, S. V., & Sarma, P. N. (2009). Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3305–3312. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.011
- Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (1986). *Biochemical engineering fundamentals* (2nd ed., p. 984). New York: McGraw-Hill, Inc.
- Barton, L. L. (2005). *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes* (p. 818). New York: Springer-Verlag. doi:10.1007/b138652
- Cai, G., Jin, B., Monis, P., & Saint, C. (2011). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, 29(4), 375–87. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.02.001
- Chang, J., Lee, K., & Lin, P. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1167–1174.
- Chou, C.-J., Jenney, F. E., Adams, M. W. W., & Kelly, R. M. (2008). Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels. *Metabolic Engineering*, 10(6), 394–404. doi:10.1016/j.ymben.2008.06.007
- Del Nery, V. (1987). *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. Universidade de São Paulo.

- Dong, F., Li, W.-W., Sheng, G.-P., Tang, Y., Yu, H.-Q., & Harada, H. (2011). An online-monitored thermophilic hydrogen production UASB reactor for long-term stable operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13559–13565. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.08.010
- Donot, F., Fontana, a., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.083
- Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. M., Varesche, M. B. a, & Zaiat, M. (2013). The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(6), 1348–66. doi:10.1007/s12010-013-0262-7
- Fogler, H. S. (1999). *Elements of Chemical Reaction hngineering* (3rd ed., p. 967). New Jersey: Prentice-Hall.
- Fox, P., & Pohland, F. G. (1994). Anaerobic treatment applications and fundamentals: substrate specificity during phase separation, 66(5), 716–724.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. a M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–98. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.008
- Gavala, H., Skiadas, I., & Ahring, B. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(9), 1164–1175. doi:10.1016/j.ijhydene.2005.09.009
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5488–91.
- Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7379–7389. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.12.080
- Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 110, 1–9. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.103
- Hawkes, F. R. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1339–1347. doi:10.1016/S0360-3199(02)00090-3
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and

8. Referências Bibliográficas

- progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172–184. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.08.014
- Jung, K.-W., Kim, D.-H., Lee, M.-Y., & Shin, H.-S. (2012). Two-stage UASB reactor converting coffee drink manufacturing wastewater to hydrogen and methane. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(9), 7473–7481. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.150
- Karlsson, A., Vallin, L., & Ejlerthsson, J. (2008). Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(3), 953–962. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.10.055
- Kongjan, P., & Angelidaki, I. (2010). Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: effect of reactor configuration. *Bioresource Technology*, 101(20), 7789–96. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.024
- Kongjan, P., Min, B., & Angelidaki, I. (2009). Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70°C) by mixed culture fermentation. *Water Research*, 43(5), 1414–24. doi:10.1016/j.watres.2008.12.016
- Lee, K., Lo, Y., Lin, P., & Chang, J. (2006). Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(12), 1648–1657. doi:10.1016/j.ijhydene.2005.12.020
- Lee, Y. J., Miyahara, T., & Noike, T. (2001). Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 80(3), 227–31.
- Leite, J., Fernandes, B. S., Pozzi, E., Barboza, M., & Zaiat, M. (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 579–586. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.10.009
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical Reaction Engineering* (3rd ed., p. 668). New York: John Wiley & Sons.
- Lima, D. M. F., Moreira, W. K., & Zaiat, M. (2013). Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15074–15083. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.09.003
- Lima, D. M. F., & Zaiat, M. (2012). The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(12), 9630–9635. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.03.097
- Lin, C., & Lay, C. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(3), 285–292. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.03.002

- Lin, C. Y., & Lay, C. H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 41–45. doi:10.1016/S0360-3199(03)00083-1
- Liu, Q., Zhang, X., Zhou, Y., Zhao, A., Chen, S., Qian, G., & Xu, Z. P. (2011). Optimization of fermentative biohydrogen production by response surface methodology using fresh leachate as nutrient supplement. *Bioresource Technology*, 102(18), 8661–8. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.002
- López, I., & Borzacconi, L. (2010). UASB reactor hydrodynamics: residence time distribution and proposed modelling tools. *Environmental Technology*, 31(6), 591–600. doi:10.1080/09593331003646638
- Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1816–27. doi:10.1002/bit.23122
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., & Zhou, Q. (2010). Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource Technology*, 101(3), 959–64. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.090
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed., p. 1152). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Mahmoud, N., Zeeman, G., Gijzen, H., & Lettinga, G. (2003). Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresource Technology*, 90(1), 1–9. doi:10.1016/S0960-8524(03)00095-6
- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Nardi, I. R. de, Zaiat, M., & Foresti, E. (1999). Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 21, 469–476.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., ... Backhaus, H. (1996). Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5636–5643.
- Othong, S., Poonsuk, P., Intrasukkha, N., Dhamwichukorn, S., & Birkeland, N.-K. (2008). Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1221–1231. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.12.017

- Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., & Zaiat, M. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6137–6145. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.01.067
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., & Liu, S. (2006). Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2147–2157. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.011
- Ren, T., Mu, Y., Ni, B., & Yu, H. (2009). Hydrodynamics of Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors. *AIChE Journal*, 55(2), 516–528. doi:10.1002/aic
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172–13191. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.122
- Show, K.-Y., Zhang, Z.-P., Tay, J.-H., Liang, D. T., Lee, D.-J., Ren, N., & Wang, A. (2010). Critical assessment of anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13350–13355. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.11.110
- Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7460–7478. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.077
- Tanisho, S., & Ishiwata, Y. (1995). Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *International Journal of Hydrogen Energy*, 20(7), 541–545.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(3), 809.
- Vignais, P. M., & Colbeau, A. (2004). Molecular Biology of Microbial Hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology*, 6, 159–188.
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Effect of Fe²⁺ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1215–1220. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.12.044
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 99(18), 8864–8. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.052
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.11.015
- Xiaolong, H., Minghua, Z., Hanqing, Y., Qinqin, S., & Lecheng, L. (2006). Effect of Sodium Ion Concentration on Hydrogen Production from Sucrose by Anaerobic

- Hydrogen-producing Granular Sludge1. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(4), 511–517. doi:10.1016/S1004-9541(06)60106-7
- Xin, J.-Y., Zhang, Y.-X., Zhang, S., Xia, C.-G., & Li, S.-B. (2007). Methanol production from CO₂ by resting cells of the methanotrophic bacterium *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. *Journal of Basic Microbiology*, 47(5), 426–35. doi:10.1002/jobm.200710313
- Young, J. C., & McCarty, P. L. (1969). The anaerobic filter for waste treatment. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 41(5), R160 – R173.
- Yu, H., & Mu, Y. (2006). Biological Hydrogen Production in a UASB Reactor With Granules . II: Reactor Performance in 3-Year Operation. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5), 988–995. doi:10.1002/bit
- Zhang, F., Zhang, Y., Chen, M., & Zeng, R. J. (2012a). Hydrogen supersaturation in thermophilic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(23), 17809–17816. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.09.019
- Zhang, F., Zhang, Y., Chen, M., & Zeng, R. J. (2012b). Hydrogen supersaturation in thermophilic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(23), 17809–17816. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.09.019
- Zhao, B., Yue, Z., Zhao, Q., Mu, Y., Yu, H., Harada, H., & Li, Y. (2008). Optimization of hydrogen production in a granule-based UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(10), 2454–2461. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.03.008
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–81.