ANTÔNIO DJALMA N. FERRAZ JÚNIOR

Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico
de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo

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,
Programa de Engenharia Hidráulica e
Saneamento

Orientador:
Prof. Associado Marcelo Zaiat

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP
2013

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

F368d Ferraz Júnior, Antônio Djalma Nunes
Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em
reator acidogênico de leito fixo seguido de reator
metanogênico de manta de lodo / Antônio Djalma Nunes
Ferraz Júnior; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos,
2013.

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,
2013.

1. Vinhaça da cana de açúcar. 2. Produção de
Hidrogênio. 3. Produção de Metano. 4. Sistema único vs.
Sistema combinado. 5. Pirosequenciamento-454. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Licenciado **ANTONIO DJALMA NUNES FERRAZ JUNIOR**.

Título da tese: "Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo".

Data da defesa: 25/10/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovado

Prof^a. Dr^a. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

aprovado

Prof^a. Dr^a. **Viridiana Santana Ferreira-Leitão**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

A PROVA DO

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

Aprovado

Dr. **Antonio Maria Francisco Luiz José Bonomi**
(Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais/CNPEM)

Aprovado

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Aos meus pais, Edijaneide e Djalma, à Tia Maiza e às minhas irmãs, Naedja e Jaqueline. Eles me ensinaram que só existe uma felicidade na vida, a de amar e ser amado.

AGRADECIMENTOS

Ao ser superior, pela vida e pela oportunidade de conhecer pessoas tão valiosas, nesta importante etapa da minha vida.

À minha família, principalmente, minha mãe (Edijaneide Bezerra de Souza), meu pai (Antônio Djalma Nunes Ferraz), minhas irmãs (Naedja e Jaqueline) e à Tia Maiza pelos ensinamentos e incentivos constantes. AMO VOCÊS!

Ao Prof. Marcelo Zaiat, pela confiança em meu trabalho, pela segura ORIENTAÇÃO, pelo espírito paterno e acolhedor e pela amizade. Seu Marcelo, sinto-me privilegiado em ter sido seu orientado. MUITO OBRIGADO POR TUDO!

Aos Professores Eugênio Foresti, Márcia Damianovic, Maria Bernadete Varesche, Wiclef Dymurgo, pelas sugestões produtivas e convívio agradável durante minha permanência no laboratório.

À Professora Cláudia Etchebehere, pela receptividade em Montevideo e por ter me proporcionado momentos de aprendizado ao lado de pessoas maravilhosas (Jorge Wenzel, Angela Cabezas da Rosa, Daniela Senatore e Cecilia Callejas).

À Bruna Moraes, um exemplo de competência! Obrigado pela amizade, pelos conselhos pessoais, pela companhia em Ouro Preto e pelas sugestões pertinentes e muito bem-vindas na minha tese. “*Beautifula*, a Produção confirma isso!”

À minha “irmã véa” Adriana Braga, outro exemplo de competência! Nos conhecemos no dia da matrícula do doutorado e a partir deste dia construímos uma linda amizade. Drica, gostaria de agradecer pela cumplicidade, por toda a força dada durante o doutorado e pelos bons momentos compartilhados: na padaria, tomando nosso bom e velho pingado as “8 horas” da manhã; no laboratório; em Dubai; e em Seoul.

Aos meus “*bunitos*” favoritos, Priscila Camiloti e Eduardo Penteado. Eu e a Drica comentamos na defesa de vocês o quanto vocês haviam crescido como pesquisadores. Tenho muito orgulho de vocês! Nesses 3 anos e meios, nossa conexão foi tão grande que até aprendemos a nos comunicar por olhares: “Isso mesmo, Pri e Dú. Neste

momento sei exatamente o que vocês pensaram!” Bom, gostaria de agradecer pela amizade, pela atenção e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À minha amiga Mirian Koyama, pela amizade, pelo interesse em seu projeto de iniciação científica e pela operação dos meus reatores no período que estive no Canadá. Ao Moacir Araújo, pela amizade e por supervisionar o trabalho da Mirian, quando precisei. À Sátiva Villar e ao Tales Abreu, estagiários da Universidade Estadual da Paraíba, por me acompanharem no laboratório com dedicação.

À minha “Iéia” (Lívia Botta), pela amizade sincera, pelas nossas saudáveis conversas e pela companhia em Ouro Preto, Dubai e Seoul. “O *bixo véi ranzinza* aqui, ainda vai te encher, por muito e muito tempo. *Puro!*”

Aos companheiros de natação e de viagem (Ouro Preto e Montevideu), Tiago Palladino e ao Filipe Vasconcelos. Às “*Marceletes*”, Vivian Carminato e Mélida del Pilar, e à “*Marciete*”, Carla Diniz (ICarly), segundo o Prof. Eugênio, pelas conversas produtivas e bem-humoradas. À Mara Rúbia e à Elisa Uliana, pelas nossas histórias inesquecíveis e risadas.

Ao Henrique Nascimento, à Jennifer Oliveira e à Rúbia Mota, alguns dos integrantes da república “*MistoQuente*”, pela receptividade e amizade.

Ao Fábio e à Nélia Aquino pela amizade, por compensarem a ausência da minha família na passagem de ano 2012-2013 e pelos bons momentos em Montreal.

Ao Etienne Consoni, pela amizade sincera, pelos loucos e sábios conselhos e pela divertidíssima companhia. “*Mas Dija, por que o álbum dela foi um fracasso de vendas?*” Amo você, amigo! Ao meu amigo moderador Douglas Henrique, pela paciência, generosidade e por sempre cuidar de mim nas baladas. “*Eu acho que fui aqui!*” Ao meu amigo super, ultra esforçado Júlio Cesar Souza, pela companhia e pelos melhores comentários. “Meninos, comprei meu *MacBook Air*: Hoje será um dia difícil para as inimig@s!” Ao Rafael Guazelli, pela amizade e conselhos. “Sabe Dija... Porque a turma...” Ao Leandro Rosa pelas gentilezas e pelas dancinhas nas baladas. “^{Dija, qual a boa de hoje?} Fala mais alto, Lê!” Ao Marcelo Maia, pela amizade e conselhos. “Hoje vai ter evento da EQ, Dija! Vamos?” À Letícia Ferreira pela amizade e pela dramaturgia no

relato dos fatos (:O). Ao Marcus Túlio pela amizade. “*Q, q é isso?*” À Diane Freitas pela amizade pontual. “Di-ja! Dija guaraná, dija!” Ao Lucas Matsukura pela amizade e porque: “*McDonald’s é vida!*” Ao Jorge Pelizzoni, pela amizade e pela criatividade imensurável. “Ferinha, sente a textura dessa música?” Ao Júlio Pietro pela amizade e pelos açaís. “Às vezes tenho que fazer a linha disciplinador@!” Ao Conrado Plaza, pela recepção em seu grupo de amigos, pela companhia no RU e pela ajuda com a tese. “hahahahahaha, ai Djalma!” Ao Murilo Castanho pela amizade e pela companhia no RU. “Tu *foxtex* ontem?” Ao Edilincon Albuquerque, pela companhia, pelos conselhos e pela paciência com as minhas músicas as 7 horas da manhã. “Joga isso no *mato*, menino!” À Ariadna Consoni, pelo belo sorriso e por sempre me perguntar: “Quando você começará a trabalhar?” (risos). Ao Gustavo Moraes, pela revisão das referências e pela ótima companhia. Meninos, definitivamente, minha vida em São Carlos não poderia ter sido melhor. Apreendi muito com vocês. Obrigado por TUDO!

To my friends from Canada: Ruffin’ Family (Ash, Amanda, Sthepanie and Bernadette) singing “Fantasy” by Mariah Carey will not ever be the same without you guys. To Ross’ Family (Cliff, Rosie and Adam) and Matthew Wood. To Prof. George Nakhla, Medhavi Gupta, Elsayed Elalbeshbishy, Noha El-Sayed, Hisham Hafez who taught me about tolerance, respect, adjustment, work and other values that I’ll take with me for life. Thanks to all! Awww... special thanks to my green eyes Tyler Wayne.

Ao pessoal da limpeza e da segurança do prédio da Engenharia Ambiental, em especial, à Dona Rosa.

Ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa.

Às parcerias – Universidade Federal de São Carlos (UFScar), pelas análises de caracterização dos materiais suporte e MEV; Universidad de la Republica (UDELAR), pelas análises de biologia molecular; The University of Western Ontario, pelo doutorado sanduíche.

Infelizmente não conseguirei agradecer AQUI, de forma merecida, a cada um. Entretanto, saibam que vocês contribuíram de forma direta ou indireta na minha vida pessoal e profissional:

Amigos e colegas da pós-graduação – Carolina Zampol, Daniel Fontes, Mariana Carosia, Regiane Campana, Regiane Ratti, Juliana Kawanishi, Fabrício Monteiro, Amanara Potykytã, Eloá Cristina, Flávia Martins, Guilherme Barbosa, Lênin de Matos, Elaine Schornobay, Lorena Secchin, Natália Benatto, Juliana Nóbrega, Rafael Brito, Ivie Emie, Samantha Christine, Natália Pelinson, Lucas Fuess, Dagoberto Okada, Inês Tomita, Ana Barana, Aline Zaffani, Gabriela Palhuzi, Araceli Fazzio e Davi de Andrade.

Funcionários da pós-graduação – Sá, Pavi, Rose, Elô, Carol, Janjinha e Isabel Kimiko.

Demais amigos – Carlos Eduardo Gomes, Tássio Tardelli, Wilson Lima, Beatriz Laiate, Beto Braga, Ricardo Flávio (Xarope), Priscila de Mattos, Francielle de Mattos, Sara de Rizzo, Heber Pereira, Marília Venega, Juliana Souza, Rick Pizano, Juan del Bianco e Cristovam Cerqueira.

Agradeço a todos pela receptividade e apoio.

RESUMO

FERRAZ Jr., A. D. N. **Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

A aplicação da digestão anaeróbia aparece como opção para processamento da vinhaça, visto que por meio deste processo é possível aliar a recuperação de energia (hidrogênio e metano) ao enquadramento ambiental deste resíduo sem interferir em suas qualidades como biofertilizante. Nesse sentido, este trabalho avaliou a aplicação da digestão anaeróbia da vinhaça em sistema combinado acidogênico e metanogênico. Inicialmente, avaliou-se a influência de materiais suportes (argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa e polietileno de baixa densidade) na produção de hidrogênio, em reatores de leito empacotado (APBR) operados em condição mesofílica (25°C) (Etapa 1). De uma forma geral, apenas traços de hidrogênio foram observados nos reatores preenchidos com partículas de carvão vegetal e cerâmica porosa ($2 - 7,9 \text{ mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reator}}$). Por outro lado, os valores para a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) nos reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade foram dez vezes superior ($74,3 - 84,2 \text{ mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reator}}$), todavia, estatisticamente iguais. O critério de seleção do material suporte ocorreu com base em relatos na literatura que indicaram rebaixamento do leito e entupimento da saída de reatores APBR preenchidos com argila expandida. Portanto, o polietileno de baixa densidade foi escolhido como melhor opção dentre os suportes avaliados. Não obstante, a baixa relação C/N da vinhaça associada à microaeração do sistema (presença de microrganismos anóxicos) afetou severamente os reatores APBR com diferentes materiais suportes, levando-os à falência. Na segunda etapa, adotou-se a operação dos APBR preenchidos com polietileno de baixa densidade, em condição termofílica (55°C) a fim de diminuir o rendimento da biomassa acidogênica e a solubilidade do oxigênio. Adicionalmente, foi avaliada influência da Carga Orgânica Volumétrica aplicada (COVa - $36,4 - 108,6 \text{ kg-DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$), por meio da variação do Tempo de Detenção Hidráulica (TDH - 8 – 24 h). Produção contínua de hidrogênio foi observada em todos os reatores operados em condição termofílica (Etapa 2). Nessa etapa, estabeleceu-se a condição ótima de operação com COVa de $84,2 \text{ kg-DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ e TDH de 10 h, resultando em PVH de valor $575,3 \text{ mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reator}}$ e rendimento de hidrogênio ($Y_1\text{H}_2$) de $1,4 \text{ mol-H}_2\cdot\text{mol}^{-1}_{\text{carboidratos totais}}$. Na Etapa III, essas condições foram impostas na operação do APBR, resultando em aumento de 18,2% e 14,2% nos valores de PVH e $Y_1\text{H}_2$, respectivamente, em relação aos dados obtidos na Etapa II. Em paralelo, foram operados dois reatores metanogênicos do tipo manta de lodo (UASB), compondo um sistema único (UASB) e um sistema combinado (APBR/UASB). A produção de energia no sistema combinado foi 25,7% superior ao observado no sistema único. A eficiência de remoção da matéria orgânica total e solúvel aumentou de $60,7 \pm 0,3\%$ e $72,6\% \pm 1,2\%$ no sistema único e $74,6 \pm 0,3\%$ e $96,1 \pm 1,7\%$ no sistema combinado, respectivamente, sob COVa de $25 \text{ kg-DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (calculada para os sistemas metanogênicos).

Palavras-chave: Vinhaça da cana de açúcar, Produção de hidrogênio, Produção de metano, Sistema único vs. Sistema combinado, Pirosequenciamento-454.

ABSTRACT

FERRAZ Jr., A. D. N. **Anaerobic digestion of sugar cane vinasse in acidogenic fixed bed reactor followed by methanogenic reactor sludge blanket type.** 2013. 162 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

Anaerobic digestion application appears as an option for sugar cane vinasse processing, since via this process it is possible to combine the energy recovery (hydrogen and methane) to the environmental framework of this residue without interfering in their qualities as biofertilizer. In this sense, this study evaluated the application of anaerobic digestion of vinasse in two-stage system (acidogenic and methanogenic). Initially, it was evaluated the influence of support material (expanded clay, charcoal, porous ceramics, and low-density polyethylene) on hydrogen production in acidogenic packed bed reactors (APBR) operated under mesophilic condition (25°C) (Phase 1). In general, only traces of hydrogen were observed in APBR filled with charcoal and porous ceramics particles ($2 - 7.9 \text{ mL-H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reactor}}$). On the other hand, in APBR with expanded clay and low-density polyethylene as support, the values for volumetric hydrogen production (VHP) were ten times higher ($74.3 - 84.2 \text{ mL-H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reactor}}$), however, statistically equal. The selection criteria of support material was based on reports in the literature that indicated bed lowering and clogging in APBR outlet with expanded clay as support. Therefore, the low-density polyethylene was chosen as the best support among those evaluated. Nevertheless, the low C/N ratio of vinasse associated to microaeration condition in the systems (presence of microorganisms anoxic) severely affected the APBR with different support materials, leading them to bankruptcy. In the second phase, it was adopted the operation of APBR filled with low density polyethylene in thermophilic conditions (55°C) in order to reduce the acidogenic biomass yield and oxygen solubility. Moreover, it was evaluated the influence of organic loading rate (OLR - 36.4 to $108.6 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) by hydraulic retention time varying (HRT - $8 - 24 \text{ h}$). Continuous hydrogen production was observed in all reactors operated at 55°C (Phase 2). In this phase, it was established the optimum condition of operation, OLR of $84.2 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ and HRT of 10 h , resulting in values for PVH and hydrogen yield (Y_{H_2}) of $575.3 \text{ mL-H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reactor}}$ and $1.4 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{total carbohydrates}}$, respectively. In Phase III, these conditions were imposed on the operation of the APBR, resulting in an increase of 18.2% and 14.2% in the values of PVH and Y_{H_2} , respectively, compared to the data obtained in Phase II. In parallel, two methanogenic reactors were operated (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket – UASB type), which composed a single stage system (UASB) and a two-stage system (APBR/UASB). The energy production in the two-stage system was 25.7% higher compared to the single stage system. The values for total and soluble organic matter removal were $60.7 \pm 0.3\%$ and $72.6 \pm 1.2\%$ to single stage system and $74.6 \pm 0.3\%$ and $96.1 \pm 1.7\%$ to two-stage system, respectively, at OLR of $25 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (calculated for the methanogenic reactors).

Keywords: sugar cane vinasse, hydrogen production, methane production, Single stage vs. Two stage, 454-pyrosequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Princípio de detecção de fluorescência baseado no SYBR Green I, aplicado na técnica de PCR em tempo real.....	25
Figura 2.2 - Curva de amplificação obtida a partir da diluição seriada do DNA proveniente de um clone com o gene da enzima [FeFe]-hidrogenase (clone A10) de concentração conhecida. A. Curva para determinação da linha de Threshold. B. Curva para determinação do Crossing-Threshold (CT) em função de log (n° de cópias).....	26
Figura 2.3 - Resumo ilustrativo do sequenciamento na plataforma 454.....	30
Figura 2.4 - Fluxograma dos procedimentos necessários para a análise de T-RFLP....	31
Figura 4.1 - Fluxograma geral dos experimentos realizados durante a primeira etapa do trabalho.....	36
Figura 4.2 - Fluxograma geral dos experimentos realizados durante a segunda etapa do trabalho.....	37
Figura 4.3 - Fluxograma geral dos experimentos realizados durante a terceira etapa do trabalho.....	38
Figura 4.4 - Materiais suporte para imobilização da biomassa acidogênica. A. argila expandida; B. carvão vegetal; C. cerâmica porosa; D. polietileno de baixa densidade.....	39
Figura 4.5 - Descrição esquemática dos reatores utilizados nos experimentos. A. Reator anaeróbio de leito fixo empacotado (APBR). B. Perfil do reator de manta de lodo (UASB) do sistema único. C. Reator de manta de lodo (UASB) do sistema único. D. Reator de manta de lodo (UASB) do sistema combinado.....	41
Figura 4.6 - Fluxograma simplificado da geração de vinhaça e outros subprodutos. ...	42
Figura 4.7 - Desenho esquemático do aparato experimental utilizado nas etapas 1 e 2. 1. Refrigerador (4°C); 2. Reservatório (20l); 3. Bomba peristáltica; 4. Câmara termostática; 5. Reatores acidogênicos de leito empacotado (APBR); 6. Selo hídrico; 7. Medidor de volume de gás.....	46
Figura 4.8 - Desenho esquemático do aparato experimental utilizado na etapa 3. 1. Refrigerador (4°C); 2. Alimentação dos reatores acidogênico de leito empacotado (APBR) e UASB – Sistema único; 3. Alimentação do reator UASB - Sistema combinado; 4. Bomba peristáltica; 5. Câmara termostática; 6. Reator acidogênico de leito empacotado (APBR); 7. Reator UASB - Sistema combinado; 8. Reator UASB – Sistema único; 9. Selo hídrico; 10. Medidor de volume de gás.	48
Figura 5.1 - Variação temporal do pH afluente e efluente (A); Conversão da DQO total (B); Conversão da DQO solúvel (C) e conversão dos carboidratos totais (D) ao longo do período experimental dos reatores com diferentes materiais suporte (Etapa 1).	64
Figura 5.2 - Composição do biogás ao longo do período experimental (Etapa 1). A. argila expandida, B. carvão vegetal, C. cerâmica porosa e D. polietileno de baixa densidade.....	64

- Figura 5.3** - Variação temporal da Produção de hidrogênio ($\text{mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}$) (A); Produção Volumétrica de Hidrogênio – PVH ($\text{mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\text{reator}$) (B); Rendimento de hidrogênio – HY ($\text{mL-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\text{vinhaça}$) (C) e Rendimento de hidrogênio - HY ($\text{mol-H}_2\cdot\text{mol}^{-1}\text{carboidratos totais}$) (D) ao longo do período experimental dos reatores com diferentes materiais suporte (Etapa 1). 65
- Figura 5.4** - Número de cópias do gene funcional *Fe-Fe hydrogenase (Fe-hyd)* nos dias 10, 20 e 30 de operação dos reatores preenchidos com argila expandida e polietileno de baixa densidade (Etapa 1). 68
- Figura 5.5** - Curva E obtida em ensaios hidrodinâmicos do tipo degrau para determinação do TDH real nos reatores com diferentes suportes (Etapa 1). A. Início da operação dos reatores. B. Final da operação dos reatores, após 30 dias de operação. 72
- Figura 5.6** - Análise de T-RFLP dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1). A. Análise de cluster por meio do índice estatístico de Jaccard. B. Análise da abundância relativa em matriz bidimensional. 76
- Figura 5.7** - MEV da superfície dos materiais suportes utilizados nos reatores APBR (Etapa 1). A. Células randômicas sobre a superfície da argila expandida (aumento de 4000x). B. Estruturas poliméricas de fixação (aumento de 8000x da superfície do polietileno de baixa densidade). C. Possível estrutura polimérica de transporte líquido e gasoso (aumento de 4000x da superfície do carvão vegetal). D. Aumento de 4000x da superfície do carvão vegetal. E. Aumento de 8000x da superfície da cerâmica. F. Aumento de 1000x da superfície do polietileno de baixa densidade. 83
- Figura 5.8** - Variação temporal do pH afluente e efluente (A); Conversão da DQO total (B); Conversão da DQO solúvel (C) e conversão dos carboidratos totais (D) ao longo do período experimental dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2). 85
- Figura 5.9** - Composição do biogás ao longo do período experimental dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2). A. RT 24, B. RT 16, C. RT 12 e D. RT 8. 86
- Figura 5.10** - Variação temporal da Produção de hidrogênio ($\text{mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}$) (A); Produção Volumétrica de Hidrogênio – PVH ($\text{mL-H}_2\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\text{reator}$) (B); Rendimento de hidrogênio – HY ($\text{mL-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\text{vinhaça}$) (C) e Rendimento de hidrogênio - HY ($\text{mol-H}_2\cdot\text{mol}^{-1}\text{carboidratos totais}$) (D) ao longo do período experimental dos reatores termofílico submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2). 87
- Figura 5.11** - Ajuste polinomial de ordem 3. A. Relação Rendimento de hidrogênio ($Y_1 \text{ H}_2$) e COVa. B. Relação Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e COVa. 90
- Figura 5.12** - Curva E obtida em ensaios do tipo degrau para TDH médio dos reatores mesofílicos e termofílicos, em início e fim de operação (Etapa 2). A. TDH - 24 h; B. TDH - 16 h; C. TDH - 12 h; e D. TDH - 8 h. 91

Figura 5.13 - Análise de T-RFLP dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2). A. Análise de cluster por meio do índice estatístico de Jaccard. B. Análise da abundância relativa em matriz bidimensional.....	97
Figura 5.14 - Número de cópias do gene funcional <i>Fe-Fe hydrogenase</i> (<i>Fe-hyd</i>) nos dias 10, 20 e 30 de operação dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).....	98
Figura 5.15 - Variação temporal do pH afluente e efluente (A); Conversão da matéria orgânica, expressa em DQO total, DQO solúvel e carboidratos totais (B) ao longo do período experimental do APBR (Etapa 3).....	99
Figura 5.16 - Variação temporal da Produção de hidrogênio e da Produção Volumétrica de Hidrogênio (PVH) ao longo do período experimental do reator APBR (Etapa 3).	101
Figura 5.17 - Variação temporal do rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}) ao longo do período experimental do reator APBR (Etapa 3).	101
Figura 5.18 - Variação temporal da COVa (A); pH efluente (B); alcalinidade parcial (C); Remoção de DQO total (D) e DQO solúvel (E) ao longo do período experimental dos UASB I e II (Etapa 3).	104
Figura 5.19 - Variação temporal da COVa (A); Produção Volumétrica de Metano – PVM (B); e rendimento de metano MY – (C e D) ao longo do período experimental dos reatores UASB I e II (Etapa 3).....	106
Figura 5.20 - Produção de hidrogênio (mL- H_2 .d-1) e Carga orgânica volumétrica específica (COVe – g-Carboidratos totais.g-SV-1.h-1)) durante o período operacional do APBR (Etapa 3).	114
Figura 5.21 - Proposta de um sistema de tratamento da vinhaça de cana de açúcar com produção contínua de hidrogênio e metano (Etapa 3). 1 e 2. Reatores acidogênicos tipo APBR. 3. Reator metanogênico tipo UASB.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Sumário da caracterização da vinhaça proveniente do xarope e melaço da cana, e do material lignocelulósico (Wilkie et al. 2000).....	7
Tabela 2.2 - Rendimento máximo de hidrogênio em reatores biológicos com diferentes suportes.	13
Tabela 2.3 - Rendimento máximo de hidrogênio em reatores biológicos submetidos a diferentes condições operacionais.....	17
Tabela 2.4 - Rendimento máximo de hidrogênio e metano em sistemas combinados. .	21
Tabela 4.1 - Características dimensionais dos materiais suportes avaliados na etapa I.	39
Tabela 4.2 - Composição da vinhaça utilizada nos experimentos.....	44
Tabela 4.3 - Condições operacionais dos reatores UASB I (sistema único) e UASB II (sistema combinado).	47
Tabela 4.4 - Análises e frequência de monitoramento.	48
Tabela 5.1 - Resumo dos principais dados obtidos no monitoramento dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).....	66
Tabela 5.2 - Distribuição taxonômica e filogenética do 16S RNAr da comunidade microbiana presente no reator preenchido com polietileno de baixa densidade (Etapa 1).	70
Tabela 5.3 - Resumo com os principais dados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).	72
Tabela 5.4 - Balanço de massa dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).	73
Tabela 5.5 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO _s dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).....	74
Tabela 5.6 - Resumo dos principais dados obtidos no monitoramento dos reatores com diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) (Etapa 2).	88
Tabela 5.7 - Resumo com os principais dados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos dos reatores submetidos a diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) (Etapa 2).	92
Tabela 5.8 - Balanço de massa dos reatores mesofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).....	93
Tabela 5.9 - Balanço de massa nos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).....	93
Tabela 5.10 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO _s para os reatores mesofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).	94
Tabela 5.11 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO _s para os reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).....	95
Tabela 5.12 - Produção teórica de hidrogênio baseada na produção dos AOV dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).	96
Tabela 13 - Resumo com os principais dados obtidos no monitoramento do APBR (Etapa 3).	102

Tabela 5.14 - Resumo com os principais dados obtidos no monitoramento dos reatores UASB I e UASB II (Etapa 3).	107
Tabela 5.15 - Balanço de massa do sistema único – UASB I (Etapa 3).	108
Tabela 5.16 - Balanço de massa do sistema combinado – APBR / UASB II (Etapa 3).	108
Tabela 5.17 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO _{solúvel} do APBR (Etapa 3).	110
Tabela 5.18 - Produção teórica de hidrogênio baseada na produção dos AOV do APBR (Etapa 3).	110
Tabela 5.19 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO _s do sistema único – UASB I (Etapa 3).	111
Tabela 5.20 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO _s do sistema combinado – APBR / UASB II (Etapa 3).	111
Tabela 5.21 - Distribuição taxonômica e filogenética do 16S RNAr da comunidade microbiana presente no APBR (Etapa 3).	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcH – Ácido acético

AnSBR – *Anaerobic sequencing batch reactor*

AOV – Ácidos orgânicos voláteis

AP – Alcalinidade parcial (a bicarbonato)

APBR – *Anaerobic packed bed reactor*

ATP – Trifosfato de adenosina

BDA – Biodegradabilidade anaeróbia da vinhaça

BSA – Albumina de soro bovino

BuH – Ácido butírico

CaC – Células a combustível

CaH – Ácido capróico

CCD – *Charge-couple device*

CCDM – Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais

COAe – Carga orgânica aplicada específica

COT – Carbono Orgânico Total

COVa – Carga orgânica volumétrica aplicada

CSTR – *Continuous stirred tank reactor*

Ct – *Crossing-Threshold*

dATP – desoxiAdenosina trifosfatada

DBO₅ – Demanda Biológica de Oxigênio no 5º dia

dCTP – desoxiCitosina trifosfatada

DEMA – Departamento de Engenharia dos Materiais

dGTP – desoxiGuanosina trifosfatada

DIC – Detector de ionização de chama

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DQO_s – Demanda Química de Oxigênio solúvel

DQO_t – Demanda Química de Oxigênio total

dTTP – desoxiTimidina trifosfatada

EDTA – Ácido etilenodiamino tretra-acético

EESC – Escola de Engenharia de São Carlos

EtOH – Etanol

EVA – Etileno acetato de vinila

Fe-Hyd – Número de cópias da enzima/gene funcional Fe-Fe hidrogenase

GIGSB – Reator de manta de lodo granular induzido por carreadores de carvão ativado

IBRCSs – Reator produtor de hidrogênio com sistema integrado de clarificação

INDEAR – Instituto de Agrotecnología Rosário

LPB – Laboratório de Processos Biológicos

MEC – *Microbial Electrolisys Cell*

MeOH – Metanol

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MNPH – Microrganismos não produtores de hidrogênio

MPAL – Microrganismos produtores do ácido láctico

MPH – Microrganismos produtores de hidrogênio

MUAL – Microrganismos utilizadores do ácido láctico

N-CSTR - Número de reatores de mistura completa de igual volume

OAP – Organismos acumuladores de fosfatos

OD – Oxigênio Dissolvido

OTU – Organização Taxonômica Operacional

PBS – Solução salina de fosfatos

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PrH – Ácido propiônico

PTH – Produção teórica de hidrogênio

PVH – Produção volumétrica de hidrogênio

PVM – Produção volumétrica de metano

QIIME – *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

RALF – Reator anaeróbio de leito fluidizado

RM 12 – Reator mesofílico com tempo de detenção hidráulica de 12 horas

RM 16 – Reator mesofílico com tempo de detenção hidráulica de 16 horas

RM 24 – Reator mesofílico com tempo de detenção hidráulica de 24 horas

RM 8 – Reator mesofílico com tempo de detenção hidráulica de 8 horas

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAr - Ácido Ribonucleico ribossômico

RT 12 – Reator termofílico com tempo de detenção hidráulica de 12 horas

RT 16 – Reator termofílico com tempo de detenção hidráulica de 16 horas

RT 24 – Reator termofílico com tempo de detenção hidráulica de 24 horas

RT 8 – Reator termofílico com tempo de detenção hidráulica de 8 horas

SECEX – Secretaria do Comércio Exterior

SOLID – *Sequencing by oligo ligation and detection*

SSV – Sólidos suspensos totais

ST – Sólidos totais

SVT – Sólidos voláteis totais

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TDH – Tempo de detenção hidráulica

TRC – Tempo de retenção celular

T-RFLP – Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição

tSMS – *HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing*

UASB – *Upflow anaerobic sludge blanket*

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar

USP – Universidade de São Paulo

VaH – Ácido valérico

VVHP – *Very Very High Polarization*

Y_{CH_4} – Rendimento de metano

Y_{H_2} – Rendimento de hidrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS

t – Balanço de massa global

$PCI_{Biogás}$ – Poder calorífico inferior do biogás

$t_{solúvel}$ – Balanço de massa global da fração solúvel

$\%CC_2$ – Conteúdo de gás carbônico no biogás

$\%H_2$ – Conteúdo de hidrogênio no biogás

$\%CH_4$ – Conteúdo de metano no biogás

$\%N_2$ – Conteúdo de nitrogênio no biogás

DQO_{CT} – DQO equivalente à concentração dos carboidratos totais

DQO_{SSV} – DQO equivalente à concentração dos sólidos suspensos voláteis

DQO_g – DQO equivalente à produção do biogás

E_{DQO} – Eficiência de conversão da DQO

F_m – Fator de calibração do medidor

d_{jk} – Índice estatístico de jaccard

MM_s – Massa molecular da sacarose

n – Número de mol

$\Sigma DQO_{AOV+Solventes}$ – Somatória da DQO equivalente à concentração dos ácidos orgânicos voláteis e solventes

t – Tempo

Q_g – Vazão de biogás

$Q_{vinhaça}$ – Vazão de vinhaça

v_{CH_4} – Vazão molar de metano

v_C – Velocidade global de conversão dos carboidratos totais

V_i – Volume de biogás injetado no cromatógrafo

V_m – Volume de biogás no medidor

$V_{\text{útil}}$ – Volume útil do reator

v_{H_2} – Vazão molar de hidrogênio

θ_h – Tempo de detenção médio real

σ^2 – Dispersão do traçador

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μm – Micrometro

atm – Atmosfera

C – Nitrogênio

C/N – relação carbono-nitrogênio

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ – Sacarose

$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ – Ácido acético

$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ – Etanol

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ – Ácido propiônico

$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ – Ácido butírico

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – Glicose

CH_4 – Gás metano

cm – Centímetro

CO_2 – Gás carbônico

d – Dia

Fe – Ferro

g – Grama

h – Hora

H_2 – Hidrogênio molecular

H_2O – Água

kg – Quilograma

kJ – QuiloJoule

kW - Quilowatt

L – Litro

m – Metro

m/v – relação massa-volume

mg – miligrama

min – Minutos

mL – Mililitro

mmol – Milimol

mol – Mol

N – Nitrogênio

N – Número de reatores de mistura completa de igual volume

N₂ – Nitrogênio molecular

NaCl – Cloreto de sódio

ng – Nanograma

Ni – Níquel

nm – Nanômetro

N-NH₄⁺ – Nitrogênio amoniacal

NTK – Nitrogênio total Kjeldahl

P – Potência

pb – Pares de base

P-PO₄³⁺ – Fósforo na forma de fosfato

R² – Coeficiente de correlação

s – Segundos

Se – Selênio

S-SO₄²⁻ – Enxofre na forma de sulfato

W – Watt

γ – Giros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Vinhaça: Caracterização, Tratamento e Disposição	6
2.2. Produção de Biohidrogênio	8
2.3. Produção de Biohidrogênio a Partir da Vinhaça.....	16
2.4. Sistemas Combinados Acidogênico-Metanogênico Visando a Recuperação de Energia	18
2.5. Barreiras na produção biológica contínua de hidrogênio em reatores de leito fixo	22
2.6. Bases das técnicas moleculares aplicadas para o estudo dos reatores	24
2.6.1. PCR em tempo real.....	24
2.6.2. Sequenciamento massivo (pirosequenciamento-454)	27
2.6.3. T-RFLP – Terminal Fragment Length Polymorphism ou análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA.....	30
2.7. Considerações finais	32
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Materiais suporte utilizados na imobilização da biomassa acidogênica.....	39
4.2. Reatores	40
4.2.1. Reator acidogênico (APBR)	40
4.2.2. Reator metanogênico – Sistema único (UASB I).....	40
4.2.3. Reator metanogênico - Sistema combinado (UASB II)	41
4.3. Vinhaça	42
4.4. Procedimento experimental	45

4.4.1.	Inoculação - Reator acidogênico (APBR)	45
4.4.2.	Inoculação - Reatores metanogênicos (UASB I e II)	45
4.4.3.	Produção de hidrogênio em APBR.....	45
4.4.4.	Produção de metano em UASB – Sistema único e combinado.....	47
4.4.5.	Ensaio hidrodinâmico.....	48
4.5.	Métodos analíticos	49
4.5.1.	Volume de gás produzido	49
4.5.2.	Composição de biogás.....	50
4.5.3.	Determinação dos carboidratos totais.....	50
4.5.4.	Demais variáveis físico-químicas.....	50
4.5.5.	Determinação de ácidos orgânicos voláteis e solventes	50
4.5.6.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
4.5.7.	Análises moleculares	51
4.6.	Cálculos	56
4.7.	Análise estatística	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1.	ETAPA 1 – Identificação do suporte ideal para imobilização da biomassa acidogênica.....	63
5.1.1.	Desempenho dos reatores	63
5.1.2.	Produção de hidrogênio	63
5.1.3.	Abordagem geral sobre a produção de hidrogênio na Etapa 1	67
5.1.4.	Avaliação dos produtos intermediários	73
5.1.5.	Estrutura e dinâmica dos microrganismos mesofílicos acidogênicos nos reatores com diferentes materiais suportes	75
5.1.6.	Avaliação da formação do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	81
5.2.	ETAPA 2 - Identificação da melhor faixa de TDH e COV para produção de H ₂ em condição mesofílica (25°C) e termofílica (55°C).....	84

5.2.1.	Desempenho dos reatores	84
5.2.2.	Produção de hidrogênio	86
5.2.3.	Abordagem geral sobre a produção de hidrogênio na Etapa 2	90
5.2.4.	Avaliação dos produtos intermediários	94
5.2.5.	Estrutura e dinâmica dos microrganismos termofílicos envolvidos na produção de hidrogênio.....	96
5.3.	ETAPA 3 – Identificação da melhor faixa de TDH e COVa para a produção de CH ₄ em sistemas de estágio único e combinado, em condição termofílica (55°C) ...	98
5.3.1.	Desempenho do reator APBR.....	99
5.3.2.	Produção de hidrogênio	99
5.3.3.	Remoção de DQO e Produção de metano em sistema único (UASB I) e combinado (UASB II).....	103
5.3.4.	Avaliação dos produtos intermediários	109
5.3.5.	Rendimento energético a partir da vinhaça	112
5.3.6.	Abordagem geral sobre a produção de metano em sistema único e produção simultânea de hidrogênio e metano em sistema combinado	113
5.3.7.	Estrutura e dinâmica dos microrganismos termofílicos envolvidos na produção de hidrogênio.....	115
6.	CONCLUSÕES	121
7.	REFERÊNCIAS.....	123

1. INTRODUÇÃO

O volume de cana-de-açúcar processada pelas unidades produtoras da região Centro-Sul totalizou 38,79 milhões de toneladas nos últimos 15 dias de outubro de 2013, volume 7,30% superior aos 36,15 milhões de toneladas registradas no mesmo período de 2012. No acumulado desde o início da safra 2013/2014 até 1º de novembro, a moagem totalizou 510,12 milhões de toneladas, contra 455,49 milhões de toneladas apuradas até a mesma data de 2012, crescimento de 11,99% (UNICA, 2013).

Esse crescimento está amparado no fato do Brasil possuir algumas vantagens competitivas para a produção de cana-de-açúcar, açúcar e etanol: condições ambientais favoráveis e forte capacidade de crescimento; baixo custo de produção, além de forte demanda doméstica. No entanto, para que a plena sustentabilidade (econômica, ambiental e social) do processo produtivo seja alcançada, o tratamento e utilização das correntes líquidas residuárias geradas devem ser considerados.

Uma biorrefinaria (baseada na cana de açúcar) apresenta no mínimo três sistemas que devem ser analisados de forma integrada e que interferem diretamente na avaliação da sua sustentabilidade: [i] o sistema de cogeração de potência e vapor para processo, [ii] o sistema de utilização de água (captação, tratamento, disposição) e por fim, [iii] a destinação dos resíduos.

No Brasil, o destino mais comum da vinhaça é a sua aplicação direta no solo, como fertilizante na própria cultura da cana, devido ao seu teor de matéria orgânica e nutrientes, ainda que não nas proporções ideais. O problema, entretanto, está no grande volume de vinhaça já que, para cada litro de etanol produzido são gerados de 12 a 15 L de vinhaça.

Por meio de uma perspectiva econômica, a disposição no solo representa a solução mais rentável e mais simples para lançamento deste efluente volumoso no ambiente. Contudo, sabe-se que práticas contínuas de fertirrigação podem induzir impactos ambientais, como contaminação do solo e das águas subterrâneas (Cruz *et al.* 1991; Lyra *et al.* 2003); problemas de lixiviação e salinização (Madri & Díaz-Barrientos 1998; Tejada *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2010); e inibição na germinação de sementes (Díaz *et al.* 2002a; 2002b). Esses impactos indicam a necessidade de estudos que determinem a

frequência da fertirrigação e a saturação do solo, bem como, propostas de mudanças na legislação brasileira.

Independentemente do tipo de reaproveitamento previsto para a vinhaça, a associação do conceito de biorrefinaria às usinas de álcool ganha significativa importância, sendo a aplicação da digestão anaeróbia dos resíduos uma das alternativas para a consolidação dos temas [i-iii] citados anteriormente, visto que por meio deste processo é possível aliar a recuperação de energia na forma de biogás (hidrogênio e metano) ao enquadramento ambiental da vinhaça, bem como a geração de subprodutos de valor agregado.

Entretanto, as lacunas ainda existentes a respeito da digestão anaeróbia da vinhaça dificultam a aplicação e expansão desta tecnologia. Nesse contexto, este trabalho assumiu o desafio de contribuir para a sustentabilidade do etanol de primeira geração, apresentando resultados críticos para melhor avaliar a digestão anaeróbia da vinhaça.

Sabe-se que o processo anaeróbio é baseado em fundamentos amplamente conhecidos de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Além disso, requer modelos simples de reatores e baixo custo energético, quando comparados com outras tecnologias.

De uma forma geral, os reatores de leito empacotado (APBR) são uma boa alternativa para a produção de hidrogênio, pois apresentam configuração simples, não requerem agitação mecânica e nem aparatos de recirculação, quando não há necessidade de diluição. Essas características resultam em baixos custos de construção e operação. Paralelamente, o reator de manta de lodo (UASB) é uma tecnologia consolidada com vários sistemas operando em escala plena e aplicada no tratamento de águas residuárias com baixa e alta concentração de matéria orgânica.

A combinação desses dois reatores (APBR/UASB) pode integrar o enquadramento ambiental da vinhaça à recuperação de energia na forma de biogás (hidrogênio e metano), fato que pode ser de interesse para as usinas de álcool. Há poucas plantas de digestão anaeróbia combinada em escala comercial. Além disso, o rendimento do metano em sistema combinado tem sido questionado em Reith *et al.* (2003), que relata: “a

separação de fases causa efeito negativo no rendimento do metano, partindo do pressuposto de que o metano produzido na fase metanogênica não é enriquecido pelo hidrogênio produzido na fase acidogênica”.

Dessa forma, o presente estudo avaliou a produção de metano a partir da vinhaça da cana de açúcar nos processos de digestão anaeróbia em sistema único (UASB) e a produção simultânea de hidrogênio e metano em sistema combinado (APBR/UASB), e determinou se existe diferença significativa no rendimento de energia entre os sistemas (Sistema único vs. Sistema combinado).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vinhaça: Caracterização, Tratamento e Disposição

Nos últimos anos, o crescimento econômico do Brasil foi alavancado por oito principais produtos ou setores, sendo eles, soja, cana-de-açúcar, carnes em geral, petróleo, extração mineral, obras de infraestrutura e indústrias têxtil e automobilística.

Destacando-se a atividade agroindustrial da cana-de-açúcar, principalmente com a produção de açúcar e etanol, esse setor tem participação histórica e decisiva no processo de desenvolvimento do país. Inicialmente, apenas com a produção de açúcar, e desde 1973, com a produção de etanol.

Em outubro de 2013, as vendas de etanol pelas unidades produtoras da região Centro-Sul atingiram 2,23 bilhões de litros, contra 2,16 bilhões, valores verificados na mesma data de 2012. Do volume total comercializado em outubro de 2013, 170,43 milhões de litros destinaram-se às exportações e 2,06 bilhões de litros ao mercado interno, com expressivo crescimento de 19,23% em relação ao volume comercializado domesticamente na safra 2012/2013 (UNICA, 2013). Entretanto, apesar da cana de açúcar movimentar a economia nacional, o desenvolvimento do setor não foi acompanhado de ações mais estritas de controle ambiental, sendo muitas vezes questionada a sustentabilidade da produção de etanol em função de potenciais impactos ambientais, grande parte advindos da disposição da vinhaça no solo.

A vinhaça da cana de açúcar apresenta altas concentrações de matéria orgânica, sólidos suspensos, potássio, nitrogênio e fósforo, incluindo compostos de alto peso molecular e de difícil degradação como as melanoidinas¹, ácidos húmicos e tânico (FitzGibbon *et al.* 1998; Iñiguez-Covarrubias e Peraza-Luna, 2007; Chandra *et al.* 2008; Limkhuansuwan e Chaiprasert, 2010; Robles-González *et al.* 2012). Entretanto, as características da vinhaça proveniente da produção de etanol a partir da cana de açúcar são variáveis em função da matéria-prima e processo produtivo.

---

¹**Melanoidinas:** são compostos de cor marrom a preto, com alto peso molecular. Esses compostos são gerados a partir da reação que ocorre entre os aminoácidos (proteínas) e os açúcares (carboidratos). Quando esses compostos são submetidos a altas temperaturas, o grupo carbonila (=O) do carboidrato interage com o grupo amino (-NH₂) da proteína.

Wilkie *et al.* (2000) resumiram alguns dados referentes à caracterização da vinhaça gerada a partir do xarope e do melaço da cana, e da celulose. Os valores médios obtidos estão apresentados na Tabela 2.1, envolvendo a DQO, nutrientes, enxofre e pH.

Tabela 2.1 - Sumário da caracterização da vinhaça proveniente do xarope e melaço da cana, e do material lignocelulósico (Wilkie et al. 2000).

Matéria-prima	Vinhaça produzida (L) / L de etanol	DQO (g.L ⁻¹)	N _{total} (g.L ⁻¹)	P _{total} (g.L ⁻¹)	S-SO ₄ (g.L ⁻¹)	pH
Xarope da cana (n)*	16,3 ± 5,3 (2)	30,4 ± 8,2 (6)	0,63 ± 0,32 (6)	0,13 ± 0,11 (6)	1,36 ± 1,4 (5)	4,0 ± 0,5 (7)
Melaço da cana (n)*	14,0 ± 3,3 (7)	89,4 ± 30,6 (22)	1,23 ± 0,64 (20)	0,19 ± 0,3 (17)	3,48 ± 2,52 (16)	4,5 ± 0,3 (7)
Material celulósico (n)*	11,1 ± 4,14 (4)	61,3 ± 40,0 (15)	2,79 ± 0,45 (8)	28 ± 30 (5)	0,65 ± 0,12 (6)	5,3 ± 0,5 (7)

*(n) = n° de valores da literatura utilizados.

Atualmente, no Brasil, o destino mais comum da vinhaça é a sua aplicação no solo, na própria cultura da cana, devido ao seu teor de matéria orgânica e nutrientes (principalmente de potássio, mas também nitrogênio e fósforo) o que a torna um bom fertilizante composto, ainda que não nas proporções ideais. O problema, entretanto, está no grande volume de vinhaça: para cada litro de etanol produzido são gerados de 12 a 15 L deste despejo.

Por meio de uma perspectiva econômica, a disposição no solo representa a solução mais barata e mais simples para o lançamento deste efluente volumoso no ambiente. Tal lançamento está amparado pela legislação ambiental. Entretanto, sabe-se que práticas contínuas de fertirrigação, nas regiões próximas da plantação, podem induzir impactos ambientais, como: contaminação do solo e das águas subterrâneas (Cruz *et al.* 1991; Lyra *et al.* 2003); problemas de lixiviação e salinização (Madri & Díaz-Barrientos 1998; Tejada *et al.* 2009; Ribeiro et al. 2010); e inibição na germinação de sementes (Díaz *et al.* 2002a; 2002b). Esses impactos indicam a necessidade de estudos que determinem a frequência da fertirrigação e a saturação do solo, bem como, propostas de mudanças na legislação brasileira.

Além da disposição no solo (fertirrigação), outros métodos são utilizados para destinação da vinhaça: a incineração do efluente concentrado e o tratamento físico-químico (Zeng *et al.* 2009). Contudo, esses métodos apenas promovem a transferência da poluição do meio líquido para o meio sólido.

Outro método possível para a disposição da vinhaça é o tratamento biológico que pode ocorrer por vias anaeróbia e/ou aeróbia. A digestão anaeróbia tem sido considerada um dos métodos mais atrativos por integrar menores custos operacionais, economia com aeração e baixa produção de lodo à possibilidade de obtenção de subprodutos de valor comercial (ácido acético, butírico, propiônico) e a recuperação de energia na forma de biogás (H_2 e CH_4), em sistema combinado.

O tratamento anaeróbio pode ocorrer em sistema único, tendo o biogás enriquecido em metano como produto gasoso ou em sistema combinado, com duas fases, uma acidogênica seguida por metanogênica. Nesse caso, o biogás gerado na primeira fase é rico em hidrogênio e o gerado na segunda, em metano.

O tratamento combinado foi sugerido pela primeira vez por Pohland & Gosh, (1971), cuja abordagem era aumentar a estabilidade dos diferentes grupos de microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia, aumentar o controle do processo e extrair mais energia na forma de metano.

Apesar de o sistema combinado ter sido proposto na década de 1970, somente em meados da década de 1990, atenção foi dada à produção biológica de hidrogênio, por processo fermentativo.

2.2. Produção de Biohidrogênio

O hidrogênio, carreador de energia, tem sido amplamente estudado, em virtude de ser 2,75 vezes mais energético que os combustíveis fósseis (gasolina, propano, metano entre outros) e por gerar, nas células a combustível (CaC), água como único produto (Chen *et al.* 2001).

Atualmente são conhecidas várias tecnologias para produção de hidrogênio. Dentre elas encontram-se as reações de reforma e oxidação parcial de hidrocarbonetos (Dashliborun *et al.* 2013) e álcoois (Carotenuto *et al.* 2013), eletrólise (Tuomi *et al.* 2013) e produção biológica (Perna *et al.* 2013).

No entanto, os processos convencionais apresentam balanço energético desfavorável, pois necessitam de elevadas quantidades de energia para gerar altas temperaturas e pressão. Essa desvantagem incentiva ainda mais as pesquisas em produção biológica de hidrogênio que, embora não apresente um resultado conclusivo para o balanço energético, aparenta ser mais rentável.

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio de dois processos: fotossíntese (Yao *et al.* 2013) e processo fermentativo (Perna *et al.* 2013).

A eficiência da produção de hidrogênio pelo processo de fotossíntese é baixa e ocorre em função da luz, enquanto que a fermentação é tecnicamente mais simples e o hidrogênio pode ser produzido durante todo o dia (independente da luz) a partir de vários tipos de substratos presente em águas residuárias (Wang & Wan, 2009).

A produção biológica por fermentação é considerada uma das tecnologias mais atrativas, pois apresenta baixo custo, está baseada em princípios amplamente difundidos (hidrólise, acidogênese, acetogênese), requer configurações simples de reatores e menos energia para geração quando comparada a outras técnicas (Hallenbeck, 2009).

Reatores em batelada têm sido utilizados com sucesso para produção de hidrogênio. Porém sua aplicação tem sido restrita à avaliação do processo em nível laboratorial, como determinação da concentração de agente tamponante (Lin & Lay, 2004); efeito inibitório (Lee *et al.* 2012); potencial de produção de hidrogênio a partir de diferentes águas residuárias sintéticas (Kim & Kim, 2012) e reais (Fernandes *et al.* 2010).

Em contexto industrial, no entanto, e por razões práticas e econômicas de armazenamento de resíduo, biorreatores contínuos são recomendados (Guo *et al.* 2010).

Reatores com agitação possuem simplicidade operacional e têm sido utilizados em estudos de modelagem por garantir máxima mistura e homogeneidade. (Hallenbeck, 2009). Em um convencional reator de mistura, a biomassa se encontra em suspensão e homogeneizada à fase líquida. No entanto, como nesses reatores o tempo de retenção celular (TRC) é igual ao tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado, lavagem da biomassa pode ocorrer em baixos TDH (Wang & Wan, 2009). Em contraste, em reatores de crescimento aderido, TRC e TDH são independentes um do outro.

Os reatores de leito fixo são uma boa alternativa para a produção de hidrogênio, pois apresentam configuração simples, capaz de aumentar o tempo de retenção celular, implicando em maior concentração de biomassa no reator. Além disso, não requer agitação mecânica e nem aparatos de recirculação, quando não há necessidade de diluição. Essas características resultam em baixos custos de construção e operação (Leite *et al.* 2008; Perna *et al.* 2013). Nessa configuração de reator, a escolha do material suporte pode ser um fator determinante na seleção da população microbiana e no custo do sistema, sendo crucial na aplicação e no desempenho do reator (Show & Tray, 1999).

Barros & Silva (2012) avaliaram a influência de diferentes suportes (poliestireno, borracha de pneu e tereftalato de polietileno – PET) na produção de hidrogênio, utilizando reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF) alimentados com efluente sintético à base de glicose (4 g.L^{-1}). O rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{\text{H}_2 \text{ máx}}$) foi observado no RALF preenchido com borracha de pneu ($2,11 \text{ mol-H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{glicose}}$). Entretanto, no RALF preenchido com PET foi observado maior produção de etanol ($1,94 \text{ g.L}^{-1}$).

Barros *et al.* (2010) avaliaram a influência de diferentes suportes (poliestireno e argila expandida) e o tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de hidrogênio, utilizando reatores anaeróbios de leito fluidizado alimentados com efluente sintético à base de glicose. O rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{\text{H}_2 \text{ máx}}$) foi observado no RALF preenchido com argila expandida ($2,59 \text{ mol-H}_2 \text{ mol}^{-1}_{\text{glicose}}$), sob um TDH de 2 h.

Keskin *et al.* (2011) avaliaram o efeito de anéis cerâmicos e da pedra pomes na produção de hidrogênio em reatores de leito empacotado, em condição termofílica

(55°C), e alimentados com efluente sintético à base de sacarose. Os autores reportaram rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) de $4 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$ e $5 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$ para os reatores preenchidos com pedra pomes e anéis de cerâmica, respectivamente.

Keskin *et al.* (2012) compararam o desempenho de um reator de leito empacotado (esferas cerâmicas) e um reator com células em suspensão na produção de hidrogênio. Os rendimentos máximos de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) observados foram de $3,0 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$ e $0,5 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$ para os reatores de leito empacotado e em suspensão, respectivamente.

Wu *et al.* (2005) utilizaram um polímero sintético (Etileno acetato de vinila – EVA) para imobilizar e aumentar a concentração de bactérias produtoras de hidrogênio no reator. Os autores observaram, em reatores em batelada, rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) de $1,74 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$. Além disso, a produção de hidrogênio se manteve estável por quinze bateladas, indicando durabilidade e estabilidade do sistema.

Peixoto *et al.* (2011) avaliaram a influência de macro e micronutrientes na produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito empacotado, preenchidos com polietileno de baixa densidade e alimentados com efluente simulado de uma empresa de refrigerantes. Os autores observaram rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) de $3,47 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$, no reator sem adição de macro e micro nutrientes.

Fontes Lima & Zaiat (2012) avaliaram a influência do grau de mistura na produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito empacotado, preenchido com polietileno de baixa densidade e alimentado com efluente sintético à base de sacarose. Os autores observaram rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ MÁX}}$) de $4,22 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$, quando foi aplicada a razão de recirculação ($R = Q_{\text{recirculação}}/Q_{\text{afluente}}$) igual a 6.

Mais detalhes sobre os estudos envolvendo a aplicação e o desempenho dos reatores, com diferentes materiais suportes e aplicados na produção de hidrogênio são apresentados na Tabela 2.2.

Outro parâmetro importante na produção de hidrogênio é a carga orgânica volumétrica aplicada (COVa). A COVa pode ser manipulada por meio da variação da concentração inicial do substrato ou pelo Tempo de Detenção Hidráulica (TDH).

Hanfez *et al.* (2010) ressaltam a necessidade de definir uma faixa de carga orgânica ou uma carga orgânica ótima para o rendimento máximo de hidrogênio. Esses autores investigaram o impacto de seis cargas orgânicas (6,5 e 206 kg DQO.m⁻³.d⁻¹) no desempenho de um reator produtor de hidrogênio com sistema de clarificação (IBRCSs) compostos por um reator de mistura seguido de um sedimentador, como forma de dissociar o tempo de retenção celular (TRC) do TDH. O reator foi alimentado com efluente sintético à base de glicose, com um TDH fixo aplicado de 8 h, a 37°C. O sistema foi capaz de manter rendimento médio de hidrogênio (Y_{H_2}) igual a 2,8 mol H₂.mol⁻¹_{glicose} quando a faixa de COVa variou de 6,5 a 103 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹, diminuindo para 1.1 mol-H₂.mol⁻¹_{glicose} sob COVa de 206 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Tabela 2.2 - Rendimento máximo de hidrogênio em reatores biológicos com diferentes suportes.

Material suporte	Substrato	Inóculo	pH	Temperatura (°C)	TDH (h)	Rendimento de hidrogênio (max.)	Referências
Poliestireno						1,9 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{glucose}	
Borracha de pneu	Glicose	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	5,5	30	2	2,1 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{glucose}	Barros & Silva, 2012
Tereftalato de polietileno (PET)						1,9 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{glucose}	
Poliestireno						1,9 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{glucose}	
Argila expandida	Glicose	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	5,5	30	2	2,6 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{glucose}	Barros <i>et al.</i> , 2010
Anel de cerâmica						5,0 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	
Pedra pomes	Sacarose	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	5,5	55	1,5 3	4,0 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	Keskin <i>et al.</i> , 2011
Esferas de cerâmica						3,0 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	
Células em suspensão	Sacarose	Biomassa anaeróbia (reator produtor de hirogênio)	5,5	55	3 24	0,5 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	Keskin <i>et al.</i> , 2012
Acetato vinil etileno (EVA)	Sacarose	Biomassa anaeróbia (tratamento ácido)	5,5	40	4	1,7 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	Wu <i>et al.</i> , 2005
Polietileno de baixa densidade	Efluente simulado (Indústria de refrigerante)	Efluente fermentado	6,5	35	0,5	3,5 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	Peixoto <i>et al.</i> , 2011
Polietileno de baixa densidade	Sacarose	Efluente fermentado	6,5	25	2	4,2 mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{sacarose}	Fontes Lima & Zaiat, 2012

Shida *et al.* (2012) avaliaram a influência da COVa e do tamponamento na produção de hidrogênio, em reatores anaeróbios de leito fluidizado alimentados com efluente sintético à base de glicose e argila expandida como suporte. O aumento da COVa ocorreu em função da redução do TDH (19,0 para 140,6 kg DQO.m⁻³.d⁻¹). Os autores observaram rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) de 2,45 mol-H₂.mol⁻¹_{glicose} e 1,90 mol-H₂.mol⁻¹_{glicose}, nos reatores com e sem adição de tamponante, respectivamente, com COVa de 84,3 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Perna *et al.* (2013) avaliaram a influência da COVa na produção de hidrogênio, em reator anaeróbio de leito empacotado alimentado com efluente de soro de queijo e polietileno de baixa densidade como suporte. O aumento da COVa ocorreu em função do aumento da concentração inicial do substrato (22 a 37 kg DQO.m⁻³.d⁻¹). Os autores observaram rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) de 1,1 mol-H₂.mol⁻¹_{glicose} e rendimento médio de 0,7 mol-H₂.mol⁻¹_{glicose}, quando aplicado uma COVa de 37 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Mariakakis *et al.* (2011) avaliaram a influência da COVa na produção de hidrogênio, em reator de agitação contínua (30 L) alimentado com efluente sintético à base de sacarose. O aumento da COVa ocorreu em função da variação da concentração inicial do substrato e do TDH (2,2 a 33,6 kg DQO.m³.d⁻¹). Os autores observaram rendimento máximo de hidrogênio ($Y_{H_2 \text{ máx}}$) de 1,72 mol-H₂.mol⁻¹_{hexose}, quando aplicado uma COVa de 22,4 kg DQO.m³.d⁻¹ e TDH de 38 h.

Ren *et al.* (2006) avaliaram a influência da COVa na produção de hidrogênio, em reator de agitação contínua (1,48 m³), alimentado com melaço. A COVa variou de 3,1 a 68,2 kg DQO.m³.d⁻¹. Os autores observaram $Y_{H_2 \text{ máx}}$ de 26,1 mol-H₂.kg⁻¹DQO_{removida}, quando aplicado uma COVa de 28 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ e TDH de 8 h.

Shen *et al.* (2009) avaliaram a influência da COVa na produção de hidrogênio, em duas configurações de reator (agitação contínua; e biorreator de membrana), alimentados com efluente sintético à base de glicose. O aumento da COVa ocorreu em função da variação da concentração inicial do substrato e do TDH (4 a 30 kg DQO.m³.d⁻¹). Os

autores reportaram rendimentos de hidrogênio similares de $1,8 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ e $1,77 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ para o reator de mistura e para o de membrana, respectivamente.

Amorim *et al.* (2009) avaliaram o efeito da COVa na produção de hidrogênio, em reatores anaeróbios de leito fluidizado (AFBR) alimentados com efluente sintético à base de glicose e argila expandida como suporte. O aumento da COVa ocorreu em função da redução do TDH ($15,7$ a $116,6 \text{ kg DQO.m}^3.\text{d}^{-1}$). Os autores reportaram que o rendimento do hidrogênio aumentou de $1,41 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ para $2,23 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$, quando o TDH diminuiu de 8 h para 4 h (COVa - $15,7$ a $33,6 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), estabilizando entre $2,41 - 2,49 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$, quando o TDH diminuiu de 2 h para 1 h (COVa - $66,5$ a $116,6 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$).

Buitrón & Carvajal (2010) avaliaram a influência da concentração inicial do substrato, temperatura e do TDH na produção de hidrogênio, em reatores anaeróbios operando em bateladas sequenciais (AnSBR) alimentados com vinhaça da Tequila. Os autores reportaram insignificante produção de hidrogênio, quando foi aplicado TDH de 12 h a 25°C , e atribuíram a baixa produção à presença de melanoidinas que possivelmente inibiram as bactérias produtoras de hidrogênio. Por outro lado, foi observado rendimento máximo de hidrogênio de $16 \text{ mol-H}_2.\text{kg}^{-1}\text{-DQO}_{\text{removida}}$, quando aplicada uma concentração de substrato inicial de 1 g-DQO.L^{-1} , TDH de 24 h a 35°C . Os autores ainda ressaltaram que o aumento da temperatura foi um fator importante para a produção de hidrogênio. Contudo, a influência da temperatura na produção de hidrogênio não está totalmente elucidada.

Lee *et al.* (2006) investigaram o efeito da temperatura (30°C a 45°C), TDH (4 a $0,5 \text{ h}$) e COVa (4 a $35,2 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) na produção de hidrogênio, em reatores de manta de lodo granular induzido por carreadores de carvão ativado (CIGSB), alimentado com efluente sintético à base de sacarose. Os autores observaram rendimento máximo de $3,88 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$ quando aplicado um TDH e COVa de 1 h e $17,6 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a 40°C , e concluíram que a produção e o rendimento de hidrogênio aumentaram com o aumento da temperatura de 30°C a 40°C e diminuíram com o aumento da temperatura de 40°C a 45°C .

Yu *et al.* (2002) avaliaram a influência do pH (6 a 4), temperatura (20°C a 55°C), TDH (24 a 2 h) e carga orgânica volumétrica aplicada (4 a 51 kg-DQO.m⁻³. d⁻¹) na produção de hidrogênio, em reator de agitação contínua, alimentado com efluente da produção de saquê. Os autores observaram rendimento máximo de 2,14 mol-H₂.mol⁻¹_{sacarose} em pH inicial de 5,5 e quando aplicado um TDH e COVa de 2 h e 51 kg-DQO.m⁻³. d⁻¹, a 55°C.

Luo *et al.* (2010) investigaram a influência da temperatura (37°C, 60°C e 70°C) e do pH inicial (4 - 10), em experimentos em batelada com a vinhaça da mandioca. Os autores observaram rendimento máximo de hidrogênio igual a 53 mL-H₂.g⁻¹-SVT (temperatura de 60°C e pH inicial igual a 6) e concluíram que a produção de hidrogênio a partir da vinhaça da mandioca em condição termofílica (60°C) foi mais eficiente comparada com a as condições mesofílica (37°C) e termofílica extrema (70°C).

Mais detalhes sobre a influência da carga orgânica volumétrica aplicada (COVa), do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da temperatura na produção de hidrogênio, estão apresentados na Tabela 2.3.

Conforme observado nas Tabelas 2.2 e 2.3, a maioria dos estudos conduzidos para produção de hidrogênio investigou as condições de operação dos reatores biológicos utilizando efluente sintético ou simulado como substrato. Pouco se sabe sobre o comportamento de reatores alimentados com águas residuárias industriais reais.

2.3. Produção de Biohidrogênio a Partir da Vinhaça

Em relação à vinhaça da cana de açúcar proveniente da produção de etanol, há apenas um estudo consistente que demonstrou a viabilidade da digestão anaeróbia da vinhaça de cana de açúcar a metano (Souza *et al.* 1992). Entretanto, no que diz respeito à produção contínua de hidrogênio, nenhum estudo foi encontrado.

Por outro lado, testes em batelada com vinhaça de cana de açúcar confirmam a potencialidade da produção de hidrogênio. Fernandes *et al.* (2010) obtiveram rendimento máximo igual a 25 mmol-H₂.g⁻¹DQO, fato que motiva o estudo sobre a produção contínua de hidrogênio em reatores biológicos.

Tabela 2.3 - Rendimento máximo de hidrogênio em reatores biológicos submetidos a diferentes condições operacionais.

Variable	Reactor	Substrato, COV _a (kg-DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	Inóculo	pH	Temperatura (°C)	TDH (h)	Rendimento de hidrogênio (max.)	Referências
COV _a	IBRCS + CSTR	Glicose, 6,5 - 206	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	5,5 - 6,5	37	8	2,8 ± 0,3 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	Haféz <i>et al.</i> , (2010)
COV _a , TDH e Tamponamento	AFBR	Glicose, 19 - 146,6	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	6 - 7	30	8 - 1	2,4 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	Shida <i>et al.</i> , (2012)
							1,9 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	
OLR	APBR	Soro de queijo, 22 - 37	Efluente fermentado	6,5	30	24	1,1 mol-H ₂ .mol ⁻¹ lactose	Perna <i>et al.</i> , (2013)
COV _a e TDH	CSTR	Sacarose, 2,2 - 33,6	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	6,5	37	96 - 12	1,7 mol-H ₂ .mol ⁻¹ hexose	Mariakakis <i>et al.</i> , (2011)
COV _a	CSTR	Melaço, 3,1 - 68,2	Biomassa anaeróbia (controle biocinético)	5 - 6,5	35	11,4 - 4,2	26,1 mol-H ₂ .kg ⁻¹ -DQO removida	Ren <i>et al.</i> , (2006)
COV _a	CSTR MBR	Glicose, 4 - 30	Biomassa anaeróbia (controle biocinético)	5,5	23	8	1,8 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	Shen <i>et al.</i> , (2009)
							1,77 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	
COV _a e TDH	AFBR	Glicose, 15,7 - 116,6	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	5,5	30	8 - 1	2,5 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	Amorim <i>et al.</i> , (2009)
Conce ntração inicial do substrato, temperatura e TDH	AnSBR	Vinhaça da Tequila	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	5,5	25 e 35	24 e 12	16 mol-H ₂ .kg ⁻¹ -DQO removida	Butrón & Carvajal, (2010)
Temperatura, TDH e COV _a	CIGSB	Sacarose, 4 - 35,2	Biomassa anaeróbia (tratamento ácido)	6,7	30 - 45	4 - 0,5	3,9 mol-H ₂ .mol ⁻¹ sacarose	Lee <i>et al.</i> , (2006)
pH inicial, temperatura, TDH e COV _a	CSTR	Efluente da produção de saquê, 4 - 51	Biomassa anaeróbia (tratamento biocinético)	6 - 4	20 - 55	24 - 2	2,1 mol-H ₂ .mol ⁻¹ hexose	Yu <i>et al.</i> , (2002)
Temperatura e pH inicial	Batelada	Vinhaça da mandioca, 0,6 ^a	Biomassa anaeróbia (tratamento térmico)	4 - 10	37, 60 e 70	84 ^b	53 mL-H ₂ .g ⁻¹ -SSV	Luo <i>et al.</i> , (2010)

a. Relação substrato/microorganismo (S^o/X^o, g-DQO.g⁻¹ SSV)

b. Período do experimento

Vale ressaltar que o potencial poluidor da vinhaça não é resolvido no estágio de produção de hidrogênio, visto que a remoção de matéria orgânica é muito baixa no processo acidogênico (20% - 30%), necessitando da fase metanogênica para concluir o tratamento anaeróbio.

Todavia, o reator acidogênico representa apenas uma separação física dos microrganismos, cuja complementação do tratamento anaeróbio pode ser facilmente resolvida por meio de intervenções da engenharia, que consiste em acoplar um reator metanogênico ao reator acidogênico, resultando em um sistema anaeróbio de dois estágios.

Dessa forma, a digestão anaeróbia da vinhaça conseguiria aliar a adequação ambiental do resíduo à recuperação de energia, já que a vinhaça necessita de uma disposição final adequada e possui potencial para produção biológica de hidrogênio e metano devido à sua alta concentração de matéria orgânica e conteúdo nutricional, favorável ao crescimento microbiano.

2.4. Sistemas Combinados Acidogênico-Metanogênico Visando a Recuperação de Energia

Algumas pesquisas evidenciam o tratamento de efluentes industriais reais aliado à recuperação de energia na forma de biogás (hidrogênio e metano). Zhu *et al.* (2008), por exemplo, avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e metano em um sistema de dois estágios, composto por reatores de agitação contínua e alimentados com efluente simulado do processamento de batata. Os autores observaram rendimento médio de hidrogênio e metano de $30 \text{ l-H}_2\text{.kg}^{-1} \text{ ST}$ e $183 \text{ l-CH}_4\text{.kg}^{-1} \text{ ST}$, respectivamente, e rendimento energético total de $2,14 \text{ kW h.kg}^{-1} \text{ ST}$, com valor máximo de $2,74 \text{ kW h.kg}^{-1} \text{ ST}$. Entretanto, a contribuição do hidrogênio foi de apenas 5% no rendimento energético total.

Koutrouli *et al.* (2009) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e metano em um sistema de dois estágios, composto por reatores de agitação contínua e alimentados com efluente do processamento de azeitona. Os autores observaram rendimento médio de hidrogênio e metano de $0,19 \text{ mol-H}_2\text{.kg}^{-1} \text{ ST}$ (TDH = 30 h e COVa =

21,5 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹) e 0,16 l-CH₄.kg⁻¹ ST (TDH – 480 h e COVa – 3,95 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹), respectivamente.

Venetsaneas *et al.* (2009) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e metano em um sistema de dois estágios, composto por reatores de agitação contínua e alimentados com soro de queijo. Os autores observaram rendimento médio de hidrogênio e metano de 0,78 mol-H₂.mol⁻¹_{glicose} (TDH – 24 h e COVa – 30 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹) e 6,7 l-CH₄.l⁻¹_{efluente} (TDH – 480 h e COVa – 1,81 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹), respectivamente.

Luo *et al.* (2010) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e metano em um sistema de dois estágios, composto por reatores de agitação contínua e alimentados com a vinhaça da mandioca. Os autores observaram rendimento médio de hidrogênio e metano de 56,6 mL-H₂.g⁻¹ SV (TDH – 24 h e COVa – 13 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹) e 249 mL-CH₄.g⁻¹ SV (TDH – 96 h e COVa – 3,15 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹), respectivamente.

Nasr *et al.* (2011); (2012) compararam a digestão anaeróbia da vinhaça do milho em estágio único e em dois estágios. O experimento foi realizado em batelada, submetido a agitação (180 g), a 37°C. Além disso, diferentes proporções entre substrato e biomassa (S°/X°) foram avaliadas. Os autores reportaram rendimento máximo de hidrogênio de 19,5 L-H₂.L⁻¹_{vinhaça} (relação S°/X° - 4 g-DQO.g⁻¹SSV) e rendimento máximo de metano de 0,26 l-CH₄.g⁻¹-DQO_{adicionada} (relação S°/X° - 2 g-DQO.g⁻¹SSV) e 0,33 l-CH₄.g⁻¹-DQO_{adicionada} (relação S°/X° - 2 g-DQO.g⁻¹SSV), no processo de estágio único e de dois estágios, respectivamente. Por fim, os autores concluíram que no processo de dois estágios foi observado aumento energético de 18,5%, em relação ao processo de estágio único, com base no valor energético do biogás (hidrogênio e metano) produzido em cada sistema.

Chu *et al.* (2008) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e metano em um sistema de dois estágios, composto por reatores de agitação contínua, a partir de resíduos sólidos. Os autores observaram rendimento médio de hidrogênio e metano de 205 mL-H₂.g⁻¹ SV (TDH – 31,2 h e COVa – 64,4 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹) e 464 mL-CH₄.g⁻¹ SV (TDH – 120 h e COVa – 16,3 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹), respectivamente.

Hanfez *et al.* (2010) investigaram a produção simultânea de hidrogênio e metano em um sistema de dois estágios, compostos por um reator de mistura seguido de um sedimentador, como forma de dissociar o tempo de retenção celular (TRC) do TDH,

seguido de um reator de mistura metanogênico. Os autores observaram rendimento médio de hidrogênio e metano de $2,6 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ (TDH - 8 h e COVa - $22,5 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) e $368 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (TDH - 10 h e COVa - $0,6 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$), respectivamente.

Mais detalhes sobre os estudos envolvendo a produção simultânea de hidrogênio e metano são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Rendimento máximo de hidrogênio e metano em sistemas combinados.

Reatores	Substrato	pH ^a	Temperatura (°C) ^a	TDH (h) ^a	COVa (kg-DQO.m ⁻³ .d ⁻¹) ^a	Rendimento de hidrogênio (max.)	Rendimento de metano (max.)	Referências
CSTRs	Efluente simulado do processamento de batata,	5,5 / 7	35	6 / 90 - 30	50,4 / 40,8	68 l-H ₂ .kg ⁻¹ ST	225 l-CH ₄ .kg ⁻¹ ST	Zhu <i>et al.</i> , (2008)
CSTRs	Efluente do processamento de azeitona	5 / 7,5	35	30 - 7,5 / 480 - 120	21,5 / 3,95	0,19 mol-H ₂ .kg ⁻¹ ST	0,16 l-CH ₄ .kg ⁻¹ DQO	Koutrouli <i>et al.</i> , (2009)
CSTRs	Soro de queijo	5,2 / -	35	24 / 480	30 / 1,8	0,78 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	6,7 l-CH ₄ .l ⁻¹ efluente	Venetsaneas <i>et al.</i> , (2009)
CSTRs	Vinhaça de mandioca	5,4 / 7,2	37 e 55	24 / 96	13 / 3,15	56,6 ml-H ₂ .g ⁻¹ SV	249 ml-CH ₄ .g ⁻¹ SV	Luo <i>et al.</i> , (2010)
Batelada	Vinhaça de milho	5,5 / 7,2	37	72 ^b / 96 ^b	0,5 - 8 ^c / 2 - 8 ^c	-	0,26 l-CH ₄ .g ⁻¹ DQO adicionada	Nasr <i>et al.</i> , (2011); (2012)
CSTRs	Resíduos sólidos	5,5 / 7,2	55 / 35	36 / 120	64,4 / 16,3	19,5 l-H ₂ .l ⁻¹ vinhaça	0,33 l-CH ₄ .g ⁻¹ DQO adicionada	Chu <i>et al.</i> , (2008)
IBRCS / CSTR	Efluente sintético de percolado	5,5-6,5 / 7,0	37	8 / 10	22,5 / 0,6	2,6 mol-H ₂ .mol ⁻¹ glucose	368 ml-CH ₄ .g ⁻¹ DQO	Hafez <i>et al.</i> , 2010

a. Reator acidogênico / Reator metanogênico

b. Período do experimento

c. Relação substrato/microorganismo (S^o/X^o, g-DQO.g⁻¹ SSV)

2.5. Barreiras na produção biológica contínua de hidrogênio em reatores de leito fixo

Problemas como entupimento (Peixoto *et al.* 2011), produção de metano (Penteado *et al.* 2013) e instabilidade na produção de hidrogênio (Fontes Lima & Zaiat, 2012; Penteado *et al.* 2013) foram reportados em reatores de leito empacotado.

Os dois primeiros problemas podem ser facilmente resolvidos por meio de hidrojateamento e ajustes biocinéticos (meio suporte, pH, TDH e COVa), respectivamente. Entretanto, a instabilidade da produção de hidrogênio continua sendo um desafio. Várias hipóteses são relatadas na literatura, mas o real motivo para o decaimento da produção de hidrogênio ainda não foi totalmente elucidado.

Hipótese I - A primeira hipótese relaciona a instabilidade da produção de hidrogênio com o acúmulo de ácidos orgânicos no meio líquido, o que poderia levar ao aumento da permeabilidade da membrana celular (MC) das bactérias. O aumento da permeabilidade da MC poderia diminuir o pH interno das células, promovendo uma possível desnaturação da enzima [FeFe]-*hydrogenase*, responsável pela produção de hidrogênio (Kashket & Cao, 1995; Zhao *et al.* 2010).

De acordo com Sá *et al.* (2011), a enzima *hydrogenase* é classificada com base no centro catalítico: as *hydrogenases* que apresentam apenas o ferro, são denominadas [FeFe]-*hydrogenase* e as que possuem Ni, Fe e Se, [NiFe]-*hydrogenase* e [Ni-Fe-Se]-*hydrogenase*. A [FeFe]*hydrogenase* normalmente ocorre em organismos produtores de hidrogênio (classe *Clostridia*). Por outro lado, [NiFe] e [Ni-Fe-Se]-*hydrogenase* normalmente ocorre em organismos consumidores de hidrogênio (arqueias metanogênicas).

Dessa forma, os microrganismos do gênero *Clostridium*, por exemplo, dispõem de enzimas *hydrogenase* que catalisam a oxidação reversível do hidrogênio (Equação 2.1) e por esse motivo o número de cópias do gene funcional [FeFe]-*hydrogenase* é utilizado como indicador da produção de hidrogênio.

Equação 2.1

Hipótese II – Fontes Lima & Zaiat (2012) e Penteado *et al.* (2013) demonstraram por meio de reações estequiométricas, que o decaimento na produção de hidrogênio esteve associado à presença de bactérias homoacetogênicas, consumidoras de hidrogênio. Esses microrganismos, pertencentes ao gênero *Clostridium*, são relacionados ao consumo de hidrogênio por meio da rota metabólica Wood-Ljungdahl (Equação 2.2) e são capazes de reduzir o CO₂ em acetato (Tanner *et al.* 1993; Younesi *et al.* 2005; Cotter *et al.* 2009; Köpke *et al.* 2010).

Equação 2.2

Hipótese III – Uma terceira hipótese credits a instabilidade da produção de hidrogênio a baixa relação C/N favorecendo o crescimento excessivo da biomassa acidogênica, desviando a rota metabólica do hidrogênio para assimilação e crescimento celular (Anzola-Rojas, 2010). Estudos conduzidos em reatores de leito fixo e fluxo contínuo, inoculados pelo processo de fermentação natural e alimentados com água residuária sintética à base de sacarose (DQO – 2 g.L⁻¹) sob um TDH de 2 h e COVa de 24 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ indicaram que a relação C/N ideal para produção de hidrogênio foi igual a 140 (Anzola-Rojas, 2010). A autora obteve valores médios para vazão molar de hidrogênio iguais a 2,1 mmol-H₂.h⁻¹ (C/N igual a 40); 5,5 mmol-H₂.h⁻¹ (C/N igual a 90); 10,3 mmol-H₂.h⁻¹ (C/N igual a 140); e 8,4 mmol-H₂.h⁻¹ (C/N igual a 190).

Hipótese IV – A última hipótese está intimamente associada ao decréscimo da carga orgânica volumétrica específica (COVe), ou seja, diminuição da disponibilidade de substrato, considerando uma concentração de substrato inicial constante, em função do crescimento natural da biomassa acidogênica ao longo do período operacional.

As Hipóteses I e II podem ser avaliadas por meio de técnicas de biologia molecular. Para a primeira hipótese, cópias das enzimas Fe-*hidrogenase* podem ser quantificadas, por meio da PCR em tempo real, permitindo avaliar a integridade do gene funcional durante o período de operação dos reatores acidogênicos. Em relação à hipótese II, é possível aplicar o sequenciamento massivo (pirosequenciamento 454) a fim de classificar e organizar a comunidade microbiana. Além disso, é possível inferir a função de cada grupo na dinâmica da produção de hidrogênio.

Considerando a Hipótese III, sabe-se que o aumento da temperatura pode direcionar as vias metabólicas para a produção de hidrogênio (Shin *et al.* 2004; Kim & Kim, 2012). Logo, uma alternativa a ser adotada seria a avaliação da produção de hidrogênio em condição termofílica (55° C), como forma de diminuir o rendimento da biomassa acidogênica. Esta estratégia, por sua vez, poderia ser facilmente adotada à vinhaça, por se tratar de resíduo de destilação, saindo das colunas à altas temperaturas.

Para superar os problemas associados à Hipótese IV, descartes periódicos da biomassa podem ser realizados na tentativa de manter constante a COVe.

2.6. Bases das técnicas moleculares aplicadas para o estudo dos reatores

2.6.1. PCR em tempo real

O fundamento da técnica de PCR em tempo real foi transcrito e adaptado de Perna, (2011) que avaliou a produção de hidrogênio a partir do soro de queijo utilizando um reator UASB e um reator de leito fixo. Ademais, a autora aplicou a técnica de PCR em tempo real para avaliar a intensidade de produção de hidrogênio da biomassa em suspensão e aderida.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real é uma técnica molecular moderna que, como o próprio nome sugere, permite o monitoramento em tempo real da reação e a quantificação de fragmentos de DNA ou RNA (Perna, 2011).

A quantificação exata e reprodutível dos fragmentos de DNA ou RNA é baseada na emissão de sinais luminosos, oriundos da adição de compostos fluorescentes (SYBR Green ou TaqMan), que aumentam na proporção direta da quantidade de produto da PCR (Novais *et al.* 2004).

Esses compostos fluorescentes ou fluoróforos² apresentam uma propriedade de unirem-se a dupla fita de DNA, como é o caso do SYBR Green, que ao sofrer mudança

---

² **Fluoróforos:** são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de PCR em tempo real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos.

conformacional, resulta em aumento de fluorescência. O princípio de detecção do SYBR Green é apresentado na Figura 2.1.

A quantificação dos fragmentos de DNA ou RNA pode ser absoluta, quando comparada com um controle externo de concentração conhecida, ou relativa, quando a concentração de DNA ou RNA, dependendo da amostra, é comparada com a sequência branco da amostra (Bustin & Nolan, 2004).

Figura 2.1 - Princípio de detecção de fluorescência baseado no SYBR Green I, aplicado na técnica de PCR em tempo real.

Para quantificar o conteúdo do DNA de uma amostra é necessário construir uma curva de calibração (Figura 2.2A). Para tal, é necessário utilizar diluições seriadas de DNA que contenha o gene a ser quantificado, em uma ampla faixa de concentração, exponencial preferivelmente.

Em seguida, confecciona-se um gráfico correlacionando o Crossing-Threshold (C_T) em função de $\log$ (nº de cópias) e se determina o valor do coeficiente de determinação (R^2). O valor de R^2 indica a correlação entre C_T e o número de cópias que se encontram na curva. Geralmente, são aceitos valores de R^2 maiores que 0,98 (Figura 2.2A) (Bustin & Nolan, 2004).

Figura 2.2 - Curva de amplificação obtida a partir da diluição seriada do DNA proveniente de um clone com o gene da enzima [FeFe]-hidrogenase (clone A10) de concentração conhecida. A. Curva para determinação da linha de Threshold. B. Curva para determinação do Crossing-Threshold (C_T) em função de $\log$ (nº de cópias).

O valor da inclinação da curva é uma medida da eficiência da reação de amplificação e é calculado, a partir de:

Eficiência (E) = $[10 (-1/\text{inclinação})] - 1$ sendo, $E = 1$ uma reação 100% eficiente.

Os valores de intersecção com o eixo das ordenadas e o R^2 da curva também podem ser utilizados como indicadores de eficiência e sensibilidade do ensaio (Bustin & Nolan, 2004).

Determinação de Crossing-Threshold (C_T) – Inicialmente são estabelecidos os níveis de ruídos nas medidas de fluorescência para uma corrida em particular. Em seguida, algoritmos específicos da plataforma são usados para definir o nível detectável de fluorescência (Figura 2.2B).

Finalmente, o algoritmo busca nos dados de cada amostra um ponto que excede a linha de base. O ponto em que isso ocorre é definido como C_T . Este valor depende do número de cópias iniciais da amostra, da eficiência de corte ou da sonda de hibridização com fluoróforo e da sensibilidade de detecção. Além disso, o número de ciclos para detectar o nível de fluorescência é inversamente proporcional ao número de cópias iniciais de DNA ou RNA (Bustin & Nolan, 2004).

Curva de Melting – As curvas de Melting são realizadas para determinar a especificidade da reação de PCR visto que, diferentes perfis representam diferentes produtos ao final da reação.

Para construir a curva de Melting todos os produtos de PCR são elevados a 95°C de forma a assegurar que os produtos sejam completamente separados e em seguida resfriados para que ocorra uma completa hibridação. A primeira deriva da fluorescência ao longo da temperatura e proporciona uma visão clara de como o agente intercalante se perde e o intervalo de temperatura em que isso ocorre (Bustin & Nolan, 2004) (Figura 2.1).

2.6.2. Sequenciamento massivo (pirosequenciamento-454)

Dentre as novas plataformas de sequenciamento de alto rendimento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. Outros dois sistemas de sequenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da Applied Biosystems, denominada SOLiD System, e o HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing (tSMS), da Helicos (Carvalho & Silva, 2010).

Com destaque para o sequenciamento de alto rendimento (pirosequenciamento 454), tem-se, um método de sequenciamento baseado no princípio de síntese (Ronaghi *et al.* 1998), que apresenta a grande vantagem de permitir um sequenciamento representativo de genomas em uma única corrida, fato que resulta na redução de custo (Liu *et al.* 2012).

Além disso, essa técnica se diferencia do sequenciamento de Sanger (método tradicional), pois se baseia na liberação de pirofosfato e na incorporação de nucleotídeos

ao invés de terminação da cadeia com didesoxinucleotídeo³. A sequência do DNA desejado é determinada pela emissão de luz sobre a incorporação de nucleotídeos em um molde de cadeia simples. Isso ocorre pelo fato de que apenas um dos quatro possíveis nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) é adicionado ou disponível de cada vez (ROCHE 454 pyrosequencing, 2013).

Em nível reacional, a leitura da sequência nesse sistema é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido à ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera CCD (charge-coupled device) acoplada ao sistema (Figura 2.3) (Carvalho & Silva, 2010).

De acordo com Carvalho & Silva (2010), o sequenciamento é dividido em três etapas: (A) preparo da amostra, (B) PCR em emulsão e (C) Sequenciamento.

(A) O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em suas extremidades. Os fragmentos A/B são selecionados para o sequenciamento (Figura 2.3A).

(B) Os fragmentos são ligados às microesferas magnéticas por meio do pareamento com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera. Apenas um único tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera. As microesferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas onde a PCR em emulsão ocorre. Milhares de cópias do fragmento alvo são produzidas nessa fase (Figura 2.3B).

(C) As microesferas ligadas às sequências alvo fita simples são capturadas individualmente em poços no suporte de sequenciamento. São fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento, e o sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada, em cada poço de sequenciamento (Figura 2.3C).

Apesar de poucos relatos na literatura, o sequenciamento de alto rendimento tem sido utilizado no estudo de estrutura e dinâmica das comunidades microbianas de digestores anaeróbios. Albertsen *et al.* (2011) estudaram a metagenômica (plataforma de

---

³ **Didesoxinucleotídeo:** são nucleotídeos modificados que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela SNA polimerase após sua adição.

sequenciamento – Illumina) de organismos acumuladores de polifosfato (OAP) de uma planta (larga escala) aplicada a remoção de fósforo. Silva *et al.* (2013) identificaram alguns genes e vias metabólicas de degradação do fenol em sistema de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo.

Wirth *et al.* (2012) estudaram os consórcios microbianos presentes em um sistema fermentativo produtor de hidrogênio, alimentado com da silagem de milho. O sequenciamento de alto rendimento foi realizado em duas plataformas distintas (pirosequenciamento 454 e SOLiD TM). Os autores concluíram que as bases de dados gerados foram validadas, confiáveis e reprodutíveis.

Dessa forma, as plataformas de sequenciamento de nova geração são uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional das comunidades microbianas capaz de fornecer subsídios para avaliar o estágio de desenvolvimento do processo anaeróbio.

Figura 2.3 - Resumo ilustrativo do sequenciamento na plataforma 454.

2.6.3. T-RFLP – Terminal Fragment Lenth Polymorphism ou análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA

A análise de T-RFLP é uma técnica utilizada na análise de comunidades microbianas, baseada na variação do gene 16S do RNAr (Osborn *et al.* 2000). Além disso, pode ser aplicada em estudos da estrutura da comunidade microbiana, dinâmica da comunidade, em respostas às mudanças/estímulos ambientais ou em estudos da comunidade microbiana em habitat natural (Applied System, 2013).

A técnica de T-RFLP, consiste inicialmente da extração do DNA genômico, seguido da amplificação do gene 16S do RNAr, com primers fluorescentes marcados. Posteriormente, o produto da PCR é purificado e sujeito à digestão com enzima de restrição (enzimas com quatro pares de base de reconhecimento de sítios).

Após a digestão, fragmentos com terminais fluorescentes são gerados, que por sua vez, são separados e detectados em uma plataforma de eletroforese apropriada. Assim, para uma dada amostra, os fragmentos do terminal irão conter um marcador fluorescente na extremidade 5', que será detectado. A saída será uma série de picos com diferentes áreas, que representa o perfil da amostra (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Fluxograma dos procedimentos necessários para a análise de T-RFLP.

2.7. Considerações finais

Diante do exposto, fica evidente a problemática ambiental advinda da destinação inadequada do efluente mais volumoso do setor sucroalcooleiro brasileiro. O tratamento anaeróbio é sugerido como alternativa tecnológica atrativa, visto que proporciona a adequação ambiental aliada à recuperação de energia na forma de biogás sem interferir nas qualidades da vinhaça como biofertilizante.

Neste trabalho, é proposto o tratamento anaeróbio da vinhaça em dois estágios. As configurações dos reatores adotadas foram: reator de leito empacotado (APBR – fase acidogênica) e reator de manta de lodo (UASB – fase metanogênica), por serem configurações consolidadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e na digestão anaeróbia, respectivamente.

As condições operacionais estudadas (material suporte, temperatura, TDH e COV_a) também visaram elucidar alguns fatores que influenciam a produção de hidrogênio. Sabe-se que do ponto de vista econômico e tecnológico a condição mesofílica é preferível comparada a termofílica. Entretanto, a condição termofílica poderia ser adotada facilmente na produção simultânea de hidrogênio e metano a partir da vinhaça da cana de açúcar, que por se tratar de um produto que deixa as colunas de destilação a altas temperaturas (85°C - 90°C), implicaria em pouca dependência de energia para o sistema, que poderia reduzir os custos da planta de tratamento.

Finalmente, o uso das técnicas moleculares (pirosequenciamento-454, PCR em tempo real e T-RFLP) permitiram avaliar as hipóteses associadas à instabilidade na produção de hidrogênio (*item 2.2*) e o estudo da estrutura e da dinâmica microbiana, complementando a interpretação dos dados do monitoramento físico-químico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a produção biológica de hidrogênio e metano em reatores anaeróbios operados em série, acidogênico (reator de leito empacotado - APBR) e metanogênico (reator de manta de lodo - UASB), a partir da vinhaça da cana de açúcar.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Obter parâmetros operacionais para produção de hidrogênio em APBR, a partir das seguintes variáveis: meio suporte, tempo de detenção hidráulica (TDH) e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa);
- Avaliar a produção de hidrogênio em condição mesofílica (25°C) e em condição termofílica (55°C) em APBR;
- Estudar a estrutura e a dinâmica microbiana envolvida na produção de hidrogênio em condição mesofílica (25°C) e termofílica (55°C) por meio de ferramentas moleculares (PCR em tempo real, pirosequenciamento-454 e T-RFLP).
- Obter parâmetros operacionais para produção de metano em UASB, em sistema único e combinado com o APBR (acidogênico-metanogênico), a partir das seguintes variáveis: tempo de detenção hidráulica (TDH) e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa);
- Avaliar a eficiência energética, por meio do desempenho da produção de metano em sistema único (UASB) e a produção simultânea de hidrogênio e metano em sistema combinado (APBR/UASB) - Sistema único vs. Sistema combinado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos apresentados no *Item 3*, os experimentos foram divididos em 3 etapas. Na Etapa 1 foram operados quatro reatores anaeróbios acidogênicos de leito empacotado (APBR), em paralelo, sob condição mesofílica (25°C), com diferentes meios suporte (argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa e polietileno de baixa densidade), como forma de definir o melhor suporte para adesão da biomassa acidogênica (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Fluxograma geral dos experimentos realizados durante a primeira etapa do trabalho.

Após definir o melhor material suporte para a biomassa acidogênica (Etapa 1), os reatores foram operados, sob diferentes TDH (24, 16, 12 e 8 h) que resultaram em diferentes COVa (36,2; 54,3; 72,4 e 108,6 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹), respectivamente, configurando a Etapa 2. A influência desses parâmetros sob a produção de hidrogênio foi investigada em condições mesofílica (25°C) e termofílica (55°C), conforme a Figura 4.2.

Figura 4.2 – Fluxograma geral dos experimentos realizados durante a segunda etapa do trabalho.

Por fim, na Etapa 3, as melhores condições operacionais obtidas nas Etapas 1 e 2 foram impostas, na tentativa de obter produção contínua de hidrogênio. Além disso, foi acoplado ao reator acidogênico (APBR), um reator metanogênico do tipo manta de lodo ou *Upflow Anaerobic Sludge Blank* (UASB), para produção simultânea de hidrogênio e metano (sistema combinado). Em paralelo, foi operado um reator UASB de estágio único a fim de comparar a eficiência dos sistemas (estágio único e combinado) (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Fluxograma geral dos experimentos realizados durante a terceira etapa do trabalho.

4.1. Materiais suporte utilizados na imobilização da biomassa acidogênica

Na etapa I, foi avaliada a influência de quatro materiais suportes na produção de hidrogênio (Figura 4.4).

- Argila expandida (cinasita) adquirida na empresa Cinexpan Ltda;
- Carvão vegetal (produto da carbonização ou pirólise da lenha de eucalipto) – adquirido na carvoaria Vila Nery (Carvão São Carlos, São Carlos, São Paulo);
- Cerâmica porosa - adquirida na empresa Remic Refratários Ltda;
- Polietileno de baixa densidade – adquirido na usina de reciclagem de plásticos (Interplas, São Carlos, São Paulo).

Figura 4.4 - Materiais suporte para imobilização da biomassa acidogênica. A. argila expandida; B. carvão vegetal; C. cerâmica porosa; D. polietileno de baixa densidade.

Adicionalmente, os materiais suportes foram caracterizados no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM), Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Características dimensionais dos materiais suportes avaliados na etapa I.

Material suporte	Forma	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Área superficial específica (cm ² .g ⁻¹)
Argila expandida	Poliedro	5,5 ± 0,2	3,5 ± 0,1	4,2
Carvão vegetal	irregular	6 ± 0,2	4,5 ± 0,3	8,5
Cerâmica porosa	Cilindro	5,5	5	5,5
Polietileno de baixa densidade		5	4,5	9,4

4.2. Reatores

Os experimentos para a produção de hidrogênio e metano foram conduzidos em reatores anaeróbios de leito empacotado (APBR) e reator de manta de lodo (UASB), respectivamente. A descrição esquemática é apresentada na Figura 4.5.

4.2.1. Reator acidogênico (APBR)

O reator APBR foi construído em tubos de acrílico com diâmetro interno de 80 mm, diâmetro externo de 88 mm e 750 mm de comprimento. Assim, a relação entre o diâmetro das partículas e o diâmetro interno do leito do reator ($\phi_{\text{support}}/\phi_{\text{internal reactor}}$) foi de 1/8 a fim de reduzir o efeito parede (Foust et al. 1982). O reator foi dividido em 4 zonas: zona de alimentação ($L_1 = 100 \text{ mm} - 0,5L$); zona do leito ($L_2 = 500 \text{ mm} - 2,5 L$); zona de coleta do efluente ($L_3 = 100 \text{ mm} - 0,5 L$); e zona de coleta de gás ($L_4 = 50 \text{ mm} - 0,25L$), perfazendo um volume total de 3,5 L e um volume líquido (útil) de aproximadamente 2,3 L.

O leito foi separado por telas de aço inoxidável (5 mm de abertura), fixadas por hastes de 5 mm do mesmo material. As dimensões adotadas foram baseadas nos trabalhos de Peixoto *et al.* (2011) e Fontes Lima & Zaiat (2012) (Figura 4.5A).

4.2.2. Reator metanogênico – Sistema único (UASB I)

O reator anaeróbio de manta e lodo utilizado no tratamento único da vinhaça (UASB I) foi constituído por duas chapas de acrílico opostas (frontal e dorsal) de seção retangular de 780 mm de altura (L_1) e 300 mm de largura (L_2). As faixas laterais do reator (780 mm de altura – L_1 e 120 mm de largura – L_3) eram de aço inox e faziam o fechamento das placas de acrílico. A zona de entrada tinha o formato de tronco de pirâmide invertido com 50 mm de altura (L_4), provido de uma placa de aço inox perfurada para distribuição uniforme do afluente.

O corpo principal do reator, destinado ao desenvolvimento da manta de lodo, tinha um formato de prisma retangular com 450 mm de altura (L_5) e 120 mm de seção quadrada de lado (L_6). A parte superior do reator, logo acima do corpo principal, comportava o separador trifásico, com o formato de pirâmide invertida associado ao prisma retangular. Esse sistema de separação conduzia os efluentes líquido e gasoso para as

suas respectivas zonas, e permitia a sedimentação da biomassa suspensa. O volume útil do reator UASB I foi de 10 L (Figura 4.5B e 4.5C).

4.2.3. Reator metanogênico - Sistema combinado (UASB II)

O reator anaeróbico de manta e lodo utilizado no sistema combinado (UASB II), após o reator acidogênico, foi construído em tubos de acrílico com diâmetro interno de 80 mm e diâmetro externo de 88 mm.

O corpo principal do reator (L_1), destinado ao desenvolvimento da manta de lodo, tinha comprimento de 440 mm. A parte superior do reator (L_2), logo acima do corpo principal possuía diâmetro interno de 110 mm, diâmetro externo de 118 mm e comprimento de 150 mm. Essa zona do reator comportou o separador trifásico. O volume útil do reator UASB II foi de 3,4 L (Figura 4.5D).

Figura 4.5 - Descrição esquemática dos reatores utilizados nos experimentos. A. Reator anaeróbico de leito fixo empacotado (APBR). B. Perfil do reator de manta de lodo (UASB) do sistema único. C. Reator de manta de lodo (UASB) do sistema único. D. Reator de manta de lodo (UASB) do sistema combinado.

4.3. Vinhaça

A vinhaça foi proveniente da indústria sucroalcooleira (Usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo, Brasil), cujo fluxograma simplificado da geração de vinhaça é apresentado na Figura 4.6.

Figura 4.6 - Fluxograma simplificado da geração de vinhaça e outros subprodutos.

Na usina de estudo, a cana é colhida de duas formas: manual (15%) e mecanizada (85%). Em seguida, a cana é enviada para as moendas, onde há geração do caldo.

O primeiro caldo, por ser mais concentrado, é destinado à produção de açúcar e o bagaço resultante desse processo é submetido a lavagens sucessivas, como forma de extrair ao máximo a sacarose do tecido vegetal.

O caldo resultante das lavagens sucessivas do bagaço é enviado para a destilaria e o bagaço, após a sexta lavagem, é utilizado nas caldeiras para geração de energia. Dados da empresa indicam que durante o período de safra a planta gera aproximadamente 5 MW, energia excedente e suficiente para alimentar uma cidade de 40 mil habitantes.

Tanto na fábrica quanto na destilaria, o caldo recebe o mesmo tratamento que é composto por clarificação, sedimentação de areia e sólidos em suspensão, evaporação, formação e cozimento do xarope.

Na fábrica, tem-se a produção de açúcar com destaque para o açúcar do tipo VVHP (*Very Very High Polarization*), um tipo de açúcar padrão negociado no mercado internacional, e na destilaria, o xarope, agora denominado mel, é encaminhado para as dornas de fermentação (4 unidades com capacidade para 500 m³ cada), onde ocorre o processo de transformação da sacarose em etanol e subprodutos.

A fermentação ocorre em reatores do tipo batelada cuja concentração inicial do substrato é de 24°Brix⁴ (244,6 g.L⁻¹) e a concentração inicial de leveduras (SA-1, CAT-1 e PE-2) é de 1,0 x 10⁸ n° de células.mL⁻¹. Quando necessário é adicionado antibiótico (princípio ativo - monensina ou monensina sódica, dióxido de cloro e beta-ácido ou lúpulo) na concentração de 3 ppm às dornas de fermentação como forma de inibir o crescimento de bactérias que possam interferir negativamente no processo fermentativo.

Após a fermentação, inicia-se o processo de destilação cujo produto principal é o etanol. Este, pode ser classificado como anidro (aditivo da gasolina); hidratado (combustível) e industrial (produção de tintas, cosméticos e bebidas alcoólicas).

---

⁴ **Conversão (grau Brix - g.L⁻¹ de sacarose):** a conversão foi realizada com base na equação proposta por Bold *et al.* (1987) e Cardoso (2001), na qual, Concentração de sacarose (g.L⁻¹) = grau Brix x 10,13 + 1,445. Valor de referência para sucos industrializados a 20°C.

Dentre os subprodutos gerados, após o processo de destilação, pode-se mencionar o óleo fúsel, a flegmaça, a levedura e a vinhaça.

O óleo fúsel é encaminhado para as indústrias responsáveis pela produção de solventes, explosivos e etanol amílico puro. O flegmaça é utilizado na assepsia de processos ou destinado às indústrias responsáveis pela produção de fixadores. A levedura é reutilizada no processo de fermentação ou destinada à comercialização como ração animal devido à sua composição rica em proteína ($\approx 38\%$) e a vinhaça é utilizada na fertirrigação, sendo pequena parte submetida ao tratamento anaeróbio (UASB termofílico, 55°C) para geração de biogás utilizado na secagem de levedura.

A vinhaça utilizada nos experimentos foi coletada mensalmente no tanque de equalização da indústria. Logo após a coleta, o efluente foi armazenado em reservatórios plásticos de polipropileno (5 L), mantidos em freezer (-20°C) antes do uso, a fim de preservar as características físico-químicas do efluente.

A caracterização da vinhaça utilizada apresentou relação DBO_5/DQO de 0,5 e relação C/N igual a 50,3 (baseado no COT) (Tabela 4.2). Além disso, foram identificados $0,037 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, $0,47 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, $0,053 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido propiônico e $0,29 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido butírico. Os demais constituintes foram representados pelos elementos traços: cádmio ($0,002 \text{ mg.L}^{-1}$), chumbo ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$), cobre ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$), cromo total ($<0,005 \text{ mg.L}^{-1}$), ferro total ($15,7 \text{ mg.L}^{-1}$), manganês ($4,8 \text{ mg.L}^{-1}$), níquel ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$), zinco ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), cálcio (1214 mg.L^{-1}), magnésio (364 mg.L^{-1}), potássio (3625 mg.L^{-1}) e sódio (33 mg.L^{-1}).

Tabela 4.2 - Composição da vinhaça utilizada nos experimentos.

Parâmetros	Unidades	Valores
Carboidratos totais ^a	g.L^{-1}	$4,1 \pm 0,9^b$
DQO ^a Filtrada ($3 \mu\text{m}$)	$\text{g.L}^{-1} \text{ O}_2$	$35,2 \pm 2,6^c$
DQO ^a Particulada	$\text{g.L}^{-1} \text{ O}_2$	$10,4 \pm 5^d$
DQO ^a Solúvel ($0,45 \mu\text{m}$)	$\text{g.L}^{-1} \text{ O}_2$	$25,8 \pm 4,5^e$
DBO_5^a	$\text{g.L}^{-1} \text{ O}_2$	$16,7 \pm 1,1^f$
COT ^a	g.L^{-1}	$22,8 \pm 3,1^g$
Relação DBO_5/DQO Filtrada ($3 \mu\text{m}$)	-	0,5
NTK ^a	$\text{g.L}^{-1} \text{ N}$	$0,7 \pm 0,02^h$
N. Amoniacal ^a	$\text{g.L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$	$0,05 \pm 0,02^i$
Fósforo ^a	$\text{g.L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3+}$	$0,16 \pm 0,05^j$
Sulfato ^a	$\text{g.L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$	$1,4 \pm 0,3^k$

^a Valor médio $\pm$ Desvio padrão; ^b n = 12; ^c n = 12; ^d n = 12; ^e n = 12 ^f n = 6; ^g n = 6; ^h n = 6; ⁱ n = 6; ^j n = 6; ^k n = 6.

Para fins de alimentação dos reatores, a vinhaça foi filtrada em papel qualitativo (Nalgon, 80 g.m⁻², porosidade 3 µm) como forma de diminuir a quantidade de sólidos em suspensão. Em seguida, o pH do efluente foi ajustado para 6,5, por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH 50%, m/v). Vale ressaltar que para os cálculos de COV_a foi utilizado o valor da concentração da DQO Filtrada (3 µm).

4.4. Procedimento experimental

4.4.1. Inoculação - Reator acidogênico (APBR)

O inóculo foi obtido pelo processo de fermentação natural da vinhaça. Para tal, a vinhaça foi filtrada em papel qualitativo (Nalgon, 80g.m⁻², porosidade 3 µm) a fim de diminuir a interferência dos sólidos em suspensão.

Em seguida, foi ajustado o pH do efluente para 6,5, por meio da adição de hidróxido de sódio a 50% (m/v) e mantido em repouso durante três dias em câmara escura. Vale ressaltar que para a inoculação dos reatores mesofílicos e termofílicos o processo de fermentação natural foi conduzido a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e a $55 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Após o período de repouso, o efluente fermentado foi bombeado para os reatores e recirculado por um período de 5 dias (Leite *et al.* 2008; Peixoto *et al.* 2011; Fontes Lima & Zaiat, 2012).

4.4.2. Inoculação - Reatores metanogênicos (UASB I e II)

Os reatores UASB foram inoculados até um terço do seu volume com lodo termofílico de reator UASB que tratava de vinhaça da cana de açúcar da Usina São Martinho.

4.4.3. Produção de hidrogênio em APBR

A produção de hidrogênio foi avaliada em reatores acidogênicos de leito empacotado (APBR) alimentados em regime contínuo e escoamento ascendente, por meio de uma bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls, com vinhaça filtrada (3 µm) e pH ajustado igual a 6,5 com (NaOH 50%, m/v).

Na Etapa 1, quatro reatores do tipo APBR foram preenchidos distintamente com diferentes materiais suporte (argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa, e

polietileno de baixa densidade) e operados em paralelo em câmara termostatzada a 25°C. Os mesmos foram monitorados por um período de 30 dias sob um TDH de 24 h e COVa de 36,4 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹, (*item 4*).

Na Etapa 2, quatro reatores do tipo APBR foram preenchidos com polietileno de baixa densidade e operados em paralelo em câmara termostatzada a 25°C (Etapa 2 – 2/1). Os mesmos foram monitorados por um período de 30 dias sob diferentes TDH de 24; 16; 12; e 8 h que resultaram em COVa de 36,4; 54,3; 72,4; e 108,6 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹, respectivamente (*item 4*). As mesmas condições operacionais (TDH e COVa) desta fase foram reproduzidas em câmara termostatzada a 55°C, correspondendo a Etapa 2 – 2/2 (*item 4*).

Na Etapa 3, um reator do tipo APBR, preenchido com polietileno de baixa densidade, foi monitorado por um período de 60 dias sob um TDH de 10,2 h e COVa de 84,2 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ e temperatura de 55°C (*item 4*).

O aparato experimental (Etapas 1 e 2), foi composto por um reservatório de 20 L que permaneceu em ambiente refrigerado (4°C) como forma de preservar as características iniciais da vinhaça e por medidores de volume de gás gerado (MilligasCounter da Ritter) acoplados a selos hídricos (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Desenho esquemático do aparato experimental utilizado nas etapas 1 e 2. 1. Refrigerador (4°C); 2. Reservatório (20l); 3. Bomba peristáltica; 4. Câmara termostática; 5. Reatores acidogênicos de leito empacotado (APBR); 6. Selo hídrico; 7. Medidor de volume de gás.

4.4.4. Produção de metano em UASB – Sistema único e combinado

A produção de metano foi avaliada em reatores metanogênicos (UASB) alimentados em regime contínuo, por meio de uma bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls, com vinhaça *in natura* (UASB I – Sistema único) e com vinhaça pré-acidificada, ou seja, após fase acidogênica em APBR (UASB II – Sistema combinado).

A operação dos reatores UASB I e II foi dividida em quatro fases (Tabela 4.3). Nos 27 primeiros dias (fase I), os reatores UASB I e II foram alimentados com vinhaça filtrada (3 μm) e vinhaça pré-acidificada (efluente do APBR), respectivamente, sem ajuste de pH. Além disso, os reatores foram submetidos a uma COVa inicial de $15 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e temperatura de 55°C .

Visto que a alcalinidade parcial do meio (alcalinidade ao bicarbonato) não foi capaz de manter o reator tamponado na fase I, uma fonte externa de tamponamento foi adicionada (fase II), sendo mantida a COVa de $15 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Concentrações de $12,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $6,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram adicionadas ao afluente dos reatores UASB I e II, respectivamente. Tais valores correspondem às concentrações mínimas capaz de elevar o pH afluente para valores entre 6,8 – 7,2 (pH ótimo para reatores metanogênicos).

Devido a esse problema operacional, as fases I e II foram consideradas fases de adaptação. Durante as fases III e IV, a COVa aos reatores foi aumentada para $20 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e $25 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. É importante mencionar que o início da operação do UASB II considerou a estabilidade operacional do APBR, com base na curva de eficiência de conversão da DQO total, variável adotada para o cálculo de COVa. O valor da COVa foi calculada e fixa para os dois reatores metanogênicos (UASB I e II), conforme exposto na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Condições operacionais dos reatores metanogênicos: UASB I (sistema único) e UASB II (sistema combinado).

Fase de operação	TDH ^a (h)	COVa ($\text{kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)	Tempo de operação (d)	NaHCO_3^a ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ afluente)
Fase I	56/39	15	0 – 27	-
Fase II	56/39	15	28 – 71	12,5/6,25
Fase III	42/29	20	72 - 137	12,5/6,25
Fase IV	34/23	25	138 - 180	12,5/6,25

^a Reatores UASB I / UASB II.

O aparato experimental (Etapa 3) foi composto por dois reservatórios (vinhaça *in natura* – 20 L e vinhaça acidificada, efluente do APBR – 10 L), que permaneceram em ambiente refrigerado (4°C) como forma de preservar as características da vinhaça, e por medidores de volume de gás (MilligasCounter Ritter) (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Desenho esquemático do aparato experimental utilizado na etapa 3. 1. Refrigerador (4°C); 2. Alimentação dos reatores acidogênico de leite empacotado (APBR) e UASB – Sistema único; 3. Alimentação do reator UASB - Sistema combinado; 4. Bomba peristáltica; 5. Câmara termostática; 6. Reator acidogênico de leite empacotado (APBR); 7. Reator UASB - Sistema combinado; 8. Reator UASB – Sistema único; 9. Selo hídrico; 10. Medidor de volume de gás.

A Tabela 4.4 apresenta as variáveis físico-químicas monitoradas durante o experimento, bem como, a frequência de análises.

Tabela 4.4 - Análises e frequência de monitoramento.							
Análises	Frequência (semanal)						
Produção de biogás							
Composição do biogás							
pH							
Demanda Química de Oxigênio							
Carboidratos totais							
Ácidos Orgânicos Voláteis e Solventes							
Sólidos Suspensos Voláteis - SSV							

4.4.5. Ensaio hidrodinâmico

Os ensaios hidrodinâmicos foram conduzidos nos reatores acidogênicos mesofílicos e termofílicos, no início e no final da operação como forma de obter o Tempo de Detenção Hidráulica real (θ_h) e avaliar a mudança no comportamento do escoamento. Para isso, o reator foi preenchido com água de abastecimento e em seguida alimentado com solução-traçador (10 g.L⁻¹ de cloreto de sódio) na forma de degrau. O efluente do

reator foi monitorado pelo período equivalente a três vezes o TDH teórico, por uma sonda de condutividade acoplada a um sistema aquisição de dados (CBL 2^{TM} – TI 89 Texas Instruments). Após esse procedimento foi obtida a curva C (Concentração de traçador x Tempo). Devido à grande quantidade de pontos gerados durante o monitoramento do ensaio hidrodinâmico, a curva C foi ajustada pelo modelo sigmoidal de Boltzmann e a curva E (derivada obtida da curva C), representou a distribuição do TDH real.

O TDH médio real foi determinado de acordo com a Equação 4.1 (Levenspiel, 2000).

$$\theta_h = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) \cdot dt} \quad \text{Equação 4.1}$$

Na qual (θ_h) é o TDH médio real, C a concentração do traçador e t o tempo.

A variância (σ^2) das curvas, que indica a dispersão da distribuição, foi calculada com a Equação 4.2 (Levenspiel 2000):

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - \theta_h)^2 \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) \cdot dt} \quad \text{Equação 4.2}$$

A partir do cálculo da variância adimensional (δ_θ^2) (Equação 4.3), utilizou-se o modelo de tanques de mistura completa em série e calculou-se o número de reatores de mistura completa de igual volume (N) com a Equação 4.4 (Levenspiel 2000):

$$\delta_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{\theta_h^2} \quad \text{Equação 4.3}$$

$$N = \frac{1}{\delta_\theta^2} \quad \text{Equação 4.4}$$

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Volume de gás produzido

O volume de gás produzido foi mensurado com auxílio do medidor de volume de gás Milligas Counter da Ritter.

4.5.2. Composição de biogás

A análise da composição do biogás gerado – hidrogênio (H_2); dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) - foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com uma coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,32 mm) e detector de condutividade térmica. A temperatura do injetor, do detector foi mantida em 220°C e 230°C, respectivamente, e a rampa de aquecimento da coluna foi de 130°C a 135°C, a 46°C.min⁻¹. A vazão do gás de arraste (Argônio) utilizado foi de 5,66 mL.min⁻¹ e o volume de amostra injetado foi de 500 µL.

4.5.3. Determinação dos carboidratos totais

A concentração dos carboidratos totais foi determinada pelo método fenol-sulfúrico proposto por Dubois *et al.* (1956). Após desidratação do açúcar pelo ácido sulfúrico e complexação dos produtos formados com o fenol, a absorbância da solução foi medida na região visível (490 nm) e substituída na equação gerada a partir da curva padrão de sacarose (1% m/v) de intervalo de 20 a 180 mg C₁₂H₂₂O₁₁.L⁻¹.

4.5.4. Demais variáveis físico-químicas

As análises de pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram realizadas baseadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

4.5.5. Determinação de ácidos orgânicos voláteis e solventes

As análises de ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), e solventes (metanol, etanol e n-butanol) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HP-INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura de filme).

As amostras foram preparadas em frasco-padrão (amostrador COMBI-PAL) de vidro com capacidade de 10 mL com fita veda-rosca, tampa rosqueável e septo de silicone com 18 mm de diâmetro, previamente seco em estufa a 100°C por aproximadamente 30 min para retirada de umidade.

Em seguida, foi adicionado, ao frasco, 1 g de cloreto de sódio (NaCl); 2 mL de amostra; 70 μL de solução de isobutanol (1g.L^{-1} – padrão interno para acetona e alcoóis); 100 μL de solução de ácido crotônico (700 mg.L^{-1} – padrão interno para ácidos) e 200 μL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 mol.L^{-1} . A determinação dos limites de detecção foi realizada por meio de cálculos estatísticos, com os resultados das curvas de calibração.

As amostras foram inseridas no amostrador automático (COMBI-PAL) cujas condições foram: tempo de aquecimento da amostra (13 min); temperatura do bloco de aquecimento (100°C); volume de amostra injetada (400 μL); temperatura da seringa (100°C); tempo de lavagem da seringa com N_2 (3 min).

As condições cromatográficas foram: rampa de temperatura do forno 35°C (0 min) 2°C.min^{-1} 38°C (0 min) $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ 75°C (0 min) $35^\circ\text{C.min}^{-1}$ 120°C (1 min) $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ 170°C (2 min); temperatura do injetor (250°C); temperatura do detector (280°C); razão de split: 1,0; fluxo do gás de arraste (H_2) - $1,6\text{ mL.min}^{-1}$; fluxo do make-up ou gás auxiliar (N_2) - 30 mL.min^{-1} ; fluxos dos gases da chama - ar sintético (300 mL.min^{-1}) e H_2 (30 mL.min^{-1}).

4.5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os meios suportes, da etapa I, foram analisados ao final do ciclo de operação de cada reator por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) segundo a técnica desenvolvida por Nation (1983) e adaptada por Araújo (1994) para biofilmes constituídos de bactérias. Para tal, foi utilizado um microscópio Philips, Modelo XL30 FEG e o software de captura de imagens Link ISIS.

4.5.7. Análises moleculares

4.5.7.1. Amostragem

Amostras da biomassa acidogênica foram coletadas para as análises moleculares da zona de alimentação, onde foi observado acúmulo de biomassa, e dos cinco pontos distribuídos ao longo do reator APBR. Essas amostras foram coletadas em três tempos (dias 10, 20 e 30 de operação). Em seguida, 0,2 g da biomassa úmida de cada ponto

amostral foram pesadas, resultando em uma amostra composta (1,2 g de biomassa úmida).

Para a análise de T-RFLP (apenas Etapa 1), a biomassa aderida ao meio suporte foi coletada ao final da operação. Massa de 20-30 g do material suporte foi transferido para frascos de borosilicato contendo solução salina a base de fosfatos (PBS 1x - 20 mL), seguido de sonicação (40 W por 15 min) e agitação (150 γ por 10 min, a 25°C). As células foram separadas por centrifugação (6000 γ por 5 min, a 25°C) e em seguida armazenadas a -20°C até a extração.

4.5.7.2. *Extração do DNA total*

A extração do DNA total foi realizada por meio de lise mecânica utilizando pérolas de vidro, seguido da recuperação e purificação do DNA com fenol-clorofórmio, conforme o protocolo de Griffiths *et al.* (2000). A qualidade do DNA foi aferida por eletroforese em gel de agarose (1,2%) em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (Tris 1x - 4,84 g Tris, 1,14 mL ácido acético e 0,74 g EDTA para 1 L de dH_2O) corado com *Blue Green Loading Dye I*. Uma segunda purificação do DNA foi realizada por meio do kit de purificação (Illustra CFX PCR DNA e Gel Band Purification – GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante a fim de eliminar ou reduzir possíveis interferentes para PCR.

4.5.7.3. *Quantificação do gene funcional Fe-hydrogenase por PCR em tempo real*

As amostras para quantificação do gene funcional Fe-hydrogenase foram selecionadas com base na produção de hidrogênio. O número de cópias do gene *Fe-hydrogenase* (Fe-Hyd) nas amostras de DNA foram determinadas utilizando o método proposto por Fang *et al.* (2006).

A solução para PCR em tempo real foi composta por 10 μ L de SYBR *Green mix* (Rotor Gene SYBR Green RT-PCR kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), 1 μ L dos *primers* (HydA-F 5'-TCACCACAACAAATATTTGGT-3' e HydA-R 5'-GCTGCTTCCATAACTCC-3') e 8 μ L do DNA genômico. As condições do ciclo de temperatura foram: Hold – 50°C por 120 s; Hold 2 – 95°C por 60 s; 30 Ciclos – 95°C por

30 s; 52°C por 30 s; e 72°C por 30 s; Melt – Rampa (1°C) 55°C – 95°C por 5 s, conforme Fang *et al.* (2006).

A curva de calibração foi construída utilizando diluições sucessivas (1:10) do padrão, produto de PCR do gene de um *Fe-Hyd* do clone A10. Este produto de PCR foi obtido pela amplificação do *Fe-hydrogenase* inserido no plasmídeo usando os *primers* para o plasmídeo (T3 e T7), conforme Cole *et al.* (2009).

O clone foi anteriormente obtido da biblioteca Fe-Hyd (Cole *et al.*, 2009). De acordo com Blast X search NCBI (Cole *et al.* 2009), a sequência inserida no clone A10 apresentou 60% de homologia com o *Fe-hydrogenase* do *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 (número de acesso YP 001036773).

Os resultados foram analisados usando o software Rotor-Gene™ 6000 real-time rotary analyzer (version 1.7). A reação foi realizada em duplicata, a média e o desvio padrão foram determinados. A quantificação do DNA foi realizada por meio do fluorômetro (Qubit2.0, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

O cálculo para obtenção do número de cópias de Fe-Hyd presente no padrão foi realizado conforme procedimento a seguir:

A região do gene *Fe-Hyd* utilizado na reação possui 313 pb. Considerando que o peso molecular de um par de base apresenta 660 g.mol⁻¹, tem-se 313 pb * 660 g.mol⁻¹pb → 2,06 x 10⁵ g.mol⁻¹ *Fe-Hyd*.

A concentração do DNA do padrão foi medida sem diluir com o equipamento Qubit (Qiagen) segundo as especificações do fabricante. Concentração do DNA do padrão medido com o Qubit → 1,76 x 10⁻⁸ g.μL⁻¹.

Logo, tem-se: (1,76 x 10⁻⁸ g DNA.μL⁻¹) / (2,06 x 10⁵ g.mol⁻¹ *Fe-Hyd*) → 8,52 x 10⁻¹⁴ mol *Fe-Hyd*.μL⁻¹

Logo, 8,52 x 10⁻¹⁴ mol hyd.μL⁻¹ * 6,02 x 10²³ moléculas.mol⁻¹ → 5,13 x 10¹⁰ moléculas *Fe-Hyd*.μL⁻¹

→ *8 μL de amostra na reação, tem-se o número de cópias de *Fe-Hyd* na reação de PCR.

4.5.7.4. Sequenciamento de alto rendimento (Pirosequenciamento-454)

Duas amostras mesofílicas (10° e 30° dia de operação do reator preenchido com polietileno de baixa densidade – Etapa 1) e duas amostras termofílicas (30° e 60° dia de operação do reator preenchido com polietileno de baixa densidade – Etapa 3) foram selecionadas para a análise do gene 16S do RNAr por sequenciamento massivo (454- pirosequenciamento). Os *primers* F 563 e R 802 (região V4) foram utilizados em um equipamento 454 GS-FLX (Roche Life Science) no Instituto de Agrotecnologia Rosario – INDEAR, Rosario, Argentina (www.indear.com).

As análises das sequências foram realizadas pelo serviço de bioinformática da INDEAR, utilizando o software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) e RDP pipeline. As sequências homo polímeras de tamanho igual ou maior que seis e/ou pelo menos um par de base com tamanho ambíguo foram removidas. Como resultado, 96% das sequências avaliadas apresentaram 280 pb. As unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram determinadas utilizando o método UCluster (Edgar, 2010) por meio do software QIIME. Sequências representativas de cada OTU foram classificadas por meio da ferramenta RDP-classifier, adotando similaridade igual ou maior que 97% (Claesson *et al.* 2009).

4.5.7.5. Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (T-RFLP)

A composição microbiana dos reatores com diferentes materiais suportes (Etapa 1) e diferentes condições operacionais, em condição termofílica, foi analisada por T-RFLP (Etapa 2 – 2/2). Para a Etapa 1, as amostras corresponderam à biomassa aderida ao meio suporte e foram coletadas no último dia de operação dos reatores (dia 30). Na Etapa 2 – 2/2 foram utilizadas as amostras compostas, cujo processo de coleta foi descrito anteriormente.

O gene 16S do RNAr foi amplificado por meio de primers específicos 27F (marcado com 6-carboxi-fluoresceína, na posição 5') e 1492R (Muyzer *et al.* 1995).

Cada solução para PCR foi composta por 31 µL de água, 5 µL de tampão 10x, 3 µL de MgCl₂ (Invitrogen, 50 mM), 0,5 µL Albumina de soro bovino - BSA, 4 µL DNTp (2,5

mM cada), 2 µL 27F Lab (10 uM), 2 µL 1492R Lab (10 uM), 0,3 µL Taq polimerase (Invitrogen, 500U/ µL) e 2,2 µL de amostra. As condições do ciclo de temperatura foram: 94°C - 5min, 30 ciclos (94°C – 1 min, 55°C – 1 min, 72°C – 3 min), 72°C - 7 min e 4°C – 10 min.

A purificação do produto da PCR, quantificação, digestão com a enzima de restrição *MspI* (sítio de corte – 5' - C CGG - 3') e purificação do fragmento foi realizado de acordo com Pyck *et al.* (2010).

A separação e a detecção dos fragmentos foram realizadas em sequenciador 3130 (Applied Biosystems) com marcador interno Liz Gene Scan-1000 (Applied Biosystems) no Instituto Pasteur de Montevideú, Uruguai, serviço de sequenciamento.

Os cromatogramas foram analisados por meio do software Peak Scanner (versão 1.0) e a padronização foi realizada conforme Dunbar *et al.* (2001). As análises de Cluster foram realizadas por meio do software PAST (Hammer, 2001), aplicando o índice estatístico de Jaccard, conforme a equação 4.5.

$$d_{jk} = \frac{M}{M+N}$$

Equação 4.5

A equação binária de Jaccard considera a presença e ausência dos microrganismos, na qual M representa o número de fragmentos de terminal (cepas) na amostra 1 e o N o número de fragmentos de terminal (cepas) na amostra 2.

Em seguida, o tamanho, a intensidade e a posição dos fragmentos (cepas) foram visualizados em forma gráfica (matriz bidimensional) como mapa de calor por meio do software PAST (Hammer, 2001). Nesta imagem, foi utilizada uma escala de cinza, com branco para o valor mais baixo e preto para o mais elevado. Os valores ausentes foram representados como branco.

4.6. Cálculos

De acordo com os resultados obtidos nas análises previamente descritas, utilizou-se o Microsoft Excel para os cálculos da Equação 4.6 a Equação 4.23, valores máximos, valores médios e desvio padrão. Cada equação está apresentada com as respectivas unidades de medida.

Vazão de biogás produzido no reator (Q_g):

$$Q_g \text{ (mL.h}^{-1}\text{)} = \frac{V_m \cdot F_m}{t} \quad \text{Equação 4.6}$$

Na qual, V_m é o volume de gás obtido no medidor, F_m é o fator de calibração do medidor obtido através de bolhômetro padrão e t é o intervalo de tempo da medida.

Distribuição em porcentagem de hidrogênio ($\%H_2$), nitrogênio ($\%N_2$), metano ($\%CH_4$) e dióxido de carbono ($\%CO_2$) no biogás:

$$\%_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n} \quad \text{Equação 4.7}$$

$$\%_{N_2} = \frac{n_{N_2}}{n} \quad \text{Equação 4.8}$$

$$\%_{CH_4} = \frac{n_{CH_4}}{n} \quad \text{Equação 4.9}$$

$$\%_{CO_2} = \frac{n_{CO_2}}{n} \quad \text{Equação 4.10}$$

Na qual, n_{H_2} , n_{N_2} , n_{CH_4} e n_{CO_2} são os números de mol de cada gás contidos no biogás: hidrogênio, nitrogênio, metano e dióxido de carbono, respectivamente. O valor de n corresponde ao número de mols totais na amostra de gás injetado. Vale ressaltar que no presente trabalho os resultados apresentados se encontram nas condições padrão de temperatura e pressão (0°C e 1 atm).

Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}):

$$v_{H_2} (mmol.h^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%H_2}{V_i} \quad \text{Equação 4.11}$$

Vazão molar de metano (v_{CH_4}):

$$v_{CH_4} (mmol.h^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%CH_4}{V_i} \quad \text{Equação 4.12}$$

Na qual, V_i representa o volume da amostra de biogás injetada no cromatógrafo.

Produção Volumétrica de Hidrogênio (PVH):

$$PVH (mL_{H_2}.h^{-1}.L^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%H_2}{V_{util}} \quad \text{Equação 4.13}$$

Produção volumétrica de Metano (PVM):

$$PVM (mL_{CH_4}.h^{-1}.L^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%CH_4}{V_{util}} \quad \text{Equação 4.14}$$

Na qual, V_{util} é o volume útil do reator.

Velocidade global de conversão dos carboidratos totais (v_C), com base na curva padrão de sacarose:

$$v_C (mmol.h^{-1}) = \frac{Q \cdot (C_0 - C_F)}{MM_S} \quad \text{Equação 4.15}$$

Na qual, C_0 é a concentração de carboidratos totais no afluente, C_F a concentração de carboidratos totais no efluente e MM_S é a massa molar da sacarose .

Rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}):

$$Y_{1H_2} (molH_2.mol_{carboidratos\ totais}^{-1}) = \frac{v_{H_2}}{v_C} \quad \text{Equação 4.16}$$

$$Y_{2H_2} (mLH_2.L_{vinhaça}^{-1}) = \frac{Q_g \cdot \%H_2}{Q_{vinhaça}} \quad \text{Equação 4.17}$$

Na qual, $Q_{vinhaça}$ é a vazão de vinhaça.

$$Y_{3H_2} (mmolH_2.g_{DQO\ total\ convertida}^{-1}) = \frac{v_{H_2}}{Q_{vinhaça} \cdot (DQO_{total\ A} - DQO_{total\ E})} \quad \text{Equação 4.18}$$

Na qual, $DQO_{total A}$ é o valor da DQO total afluente e $DQO_{total E}$ é o valor da DQO total efluente.

$$Y_{H_2} \left(mmolH_2 \cdot g_{DQO\text{ solúvel convertida}}^{-1} \right) = \frac{v_{H_2}}{Q_{vinhaça} \cdot (DQO_{solúvel A} - DQO_{solúvel E})} \quad \text{Equação 4.19}$$

Na qual, $DQO_{solúvel A}$ é o valor da DQO solúvel afluente e $DQO_{solúvel E}$ é o valor da DQO solúvel efluente.

Rendimento de metano (Y_{CH_4}):

$$Y_{CH_4} \left(mLCH_4 \cdot g_{DQO\text{ removida}}^{-1} \right) = \frac{Q_{g-CH_4}}{Q_{vinhaça} \cdot (DQO_{total A} - DQO_{total E})} \quad \text{Equação 4.20}$$

$$Y_{CH_4} \left(mLCH_4 \cdot L_{vinhaça}^{-1} \right) = \frac{Q_{g-CH_4}}{Q_{vinhaça}} \quad \text{Equação 4.21}$$

Os balanços de massa global (t) e da fração solúvel ($t_{solúvel}$) para os reatores acidogênicos e metanogênicos foram calculados como forma de identificar o direcionamento do fluxo de energia no processo e validar a confiabilidade dos dados (Equação 4.22 e 4.23), como:

$$t (\%) = \left(\frac{DQO_{solúvel E} + DQO_g + DQO_{SSV}}{DQO_{total A}} \right) * 100 \quad \text{Equação 4.22}$$

$$t_{solúvel} (\%) = \left(\frac{DQO_{solúvel E} + EDQO_{AOV+Solventes} + DQO_{CT}}{DQO_{solúvel A}} \right) * 100 \quad \text{Equação 4.23}$$

Na qual, DQO_g representa a DQO equivalente à produção de hidrogênio (8 g-DQO. $g^{-1}H_2$, a 25°C ou 55°C) e metano (4 g-DQO. $g^{-1}CH_4$, a 55°C); e DQO_{SSV} a DQO equivalente a concentração da biomassa efluente, aderida e sedimentada na zona de alimentação (1,42 g-DQO. $g^{-1}VSS$). A concentração da biomassa aderida e sedimentada foi considerada apenas para o APBR. Em complemento, $EDQO_{AOV+Solventes}$ representa a somatória da DQO equivalente à concentração dos ácidos e solvente medidos (ácido acético – 1,07 g-DQO. $g^{-1}AcH$; ácido propiônico – 1,51 g-DQO. $g^{-1}PrH$; ácidos n-butírico e butírico – 1,82 g-DQO. $g^{-1}BuH$; ácidos n-valérico e valérico – 2,00 g-DQO. $g^{-1}VaH$; ácido capróico – 2,20 g-DQO. $g^{-1}CaH$; etanol

– 1,39 g-DQO.g⁻¹EtOH; e metanol – 2,0 g-DQO.g⁻¹MeOH) e DQO_{CT} a DQO equivalente à concentração dos carboidratos totais efluente (1,12 g-DQO.g⁻¹CT).

A biodegradabilidade anaeróbia da vinhaça (BDA) foi calculada a partir do rendimento de metano obtido nos experimentos e com base no rendimento teórico de metano ($Y_{CH_4 \text{ teórico}} = 350 \text{ mL-CH}_4\text{.g}^{-1}\text{DQO}_{\text{removida}} - \text{STP}$) e na Equação 4.24, proposta por Raposo *et al.* (2011) e apresentada por Nasr *et al.* (2012):

$$BDA_{\text{vinhaça}} (\%) = \left(\frac{Y_{CH_4}}{Y_{CH_4 \text{ teórico}}} \right) * 100 \quad \text{Equação 4.24}$$

Na qual, $Y_{CH_4 \text{ teórico}}$ é o rendimento de metano teórico a 55°C.

A energia gerada pelo biogás foi calculada com base na Equação 4.25:

$$P (W.L_{\text{vinhaça}}^{-1}) = \frac{PCI_{\text{Biogás}}}{\%_{\text{Biogás}}} (E_{DQO} \cdot Q_{\text{vinhaça}} \cdot DQO_{\text{total A}}) \cdot Y_{CH_4} \quad \text{Equação 4.25}$$

Na qual, $PCI_{\text{Biogás}}$ é o poder calorífico inferior, $\%_{\text{Biogás}}$ a fração volumétrica de hidrogênio ou metano no biogás, E_{DQO} é a eficiência de conversão de DQO total. O valor do $PCI_{\text{Biogás}}$ para o hidrogênio e metano foi de 142 kJ.g⁻¹hidrogênio (equivalente a 12,8 kJ.L⁻¹hidrogênio) (Cai *et al.* 2004) e 50 kJ.g⁻¹metano (equivalente a 35,8 kJ.L⁻¹hidrogênio) (Ogden, 2002), respectivamente.

Cálculo da carga orgânica volumétrica específica ($COVe$):

O fator de crescimento da biomassa pela unidade de massa do substrato ($Y_{x/s}$), em g-SSV.g⁻¹ carboidratos totais, foi calculado após o 60º dia de operação do APBR, de acordo com a Equação :

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{Cx_{ad} + Cx_s + Cx_{ar}}{Cct} \quad \text{Equação 4.26}$$

Na qual, Cx_{ad} é a concentração de biomassa aderida e/ou intersticial (mg); Cx_s é a concentração de biomassa suspensa no líquido drenado no final da operação (mg); Cx_{ar} é a concentração de biomassa arrastada naturalmente pelo sistema (mg) dada pela

Equação 4.27 e; C_{ct} é a concentração de carboidratos totais consumida (mg) durante o tempo de operação dada pela Equação 4.29.

A quantidade total de biomassa arrastada (Cx_{ar}) pode ser estimada por médio da integral da vazão mássica em função do tempo (Equação 4.27).

$$Cx_{ar} = \int Wx \cdot dt \quad \text{Equação 4.27}$$

Na qual, Wx é a vazão mássica de biomassa saindo do sistema, e esta dada em g-SSV.h⁻¹ (Equação 4.28)

$$Wx = SSV \cdot Q \quad \text{Equação 4.28}$$

Do mesmo modo, a quantidade total de substrato (carboidratos totais) consumido C_{ct} pode ser estimada por meio da integral do substrato consumido em função do tempo (Equação 4.29).

$$C_{ct} = \int Q_{ct} \cdot dt \quad \text{Equação 4.29}$$

Na qual, Q_{ct} é a concentração de substrato consumido pela vazão do sistema, esta dada em mg carboidratos totais .h⁻¹ (Equação 4.30).

$$Q_{ct} = Q_{vinhaça}(C_0 - C_f) \quad \text{Equação 4.30}$$

Os ensaios hidrodinâmicos, realizados no começo e no final de cada operação, demonstraram que, com o crescimento da biomassa no leito, o escoamento que no começo era tipo pistão tende à mistura completa. Portanto a vazão mássica de biomassa (Q_w) em mg-SSV.h⁻¹ foi definida pela Equação 4.31.

$$Q_w = Q_{ct} \cdot Y_{x/s} \quad \text{Equação 4.31}$$

Desta forma, foi possível calcular a concentração de biomassa dentro do reator (Cx_n) em mg-SV.L⁻¹ em um determinado tempo pela Equação 4.32:

$$Cx_n = \left(\frac{\int Q_w \cdot dt}{V_{útil}} \cdot \%Cx_{ad} + Cx_s \right) + Cx_{n-1} \quad \text{Equação 4.32}$$

Na qual, Cx_n é a concentração de biomassa no tempo; V_{util} é o volume útil do reator; $\%Cx_{ad}$ é a fração de biomassa aderida e/ou intersticial e Cx_{n-1} é a concentração de biomassa no tempo menos um.

Finalmente, a carga orgânica volumétrica específica ($COVe$), em g-Carboidratos totais.g-SV⁻¹.h⁻¹ pode ser calculada pela Equação 4.33.

$$COVe = \frac{COV}{Cx_n} \quad \text{Equação 4.33}$$

Na qual, COV é a carga orgânica volumétrica em mg-Carboidratos totais.L⁻¹.h⁻¹.

4.7. Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente, por meio do teste de homocedasticidade a fim de identificar a distribuição dos dados (teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov). Aplicou-se o teste de Mann-Whitney para a série de dados não paramétrico e o teste Tukey para a série de dados paramétrico. Adotou-se um nível de significância de 5%, conforme proposto em Dagnelie, (1973).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ETAPA 1 – Identificação do suporte ideal para imobilização da biomassa acidogênica

5.1.1. Desempenho dos reatores

Os reatores de leito empacotado (APBR) com diferentes suportes foram operados, em paralelo, durante 30 dias, sob um TDH e COVa de aproximadamente 24 h e 36,4 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹, respectivamente, e temperatura de 25°C.

O valor médio do pH afluente foi $6,5 \pm 0,1$ e do efluente foi de 5,7; 5,6; 5,4; e 5,5 para os reatores com argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa e polietileno de baixa densidade como suporte, respectivamente (Figura 5.1A). O valor do pH efluente foi característico de sistemas fermentativos aplicados a produção de hidrogênio (pH $\approx 5,5$).

A conversão da DQO total (DQO_t) e solúvel (DQO_s) compreendeu a faixa entre 37,3% e 40,1% (Figura 5.1B) e 13,1% e 16,7% (Figura 5.1C), respectivamente. O alto valor da conversão da DQO_t pode estar associado ao processo de sedimentação dentro do reator, visto que o processo de filtração do afluente foi computado neste valor. Em complemento, a conversão média dos carboidratos totais foi de $65,5 \pm 0,2\%$ (argila expandida), $74,4 \pm 0,1\%$ (carvão vegetal), $71,8 \pm 0,1\%$ (cerâmica porosa), e $66,2 \pm 0,2\%$ (polietileno de baixa densidade), resultando principalmente na produção de ácidos orgânicos voláteis totais (ácido acético, butírico, propiônico) (Figura 5.1D).

5.1.2. Produção de hidrogênio

Os diferentes materiais suportes avaliados apresentaram forte influência na produção de hidrogênio, com altos valores observados para os reatores preenchidos com partículas de argila expandida e polietileno de baixa densidade e baixos valores para os reatores com partículas de carvão vegetal e cerâmica porosa como suporte.

A composição do biogás apresentou valores máximos de hidrogênio de 39,1% (argila expandida), 26,5% (carvão vegetal), 4% (cerâmica porosa) e 46,3% (polietileno de baixa densidade). Além disso, durante o período experimental, não

foi observado metano na composição do biogás, indicando que o tipo de inoculação aplicada (efluente fermentado) foi viável nos sistemas acidogênicos (Figura 5.2).

Figura 5.1 - Variação temporal do pH afluente e efluente (A); Conversão da DQO total (B); Conversão da DQO solúvel (C) e conversão dos carboidratos totais (D) ao longo do período experimental dos reatores com diferentes materiais suporte (Etapa 1).

Figura 5.2 - Composição do biogás ao longo do período experimental (Etapa 1). A. argila expandida, B. carvão vegetal, C. cerâmica porosa e D. polietileno de baixa densidade.

Traços de hidrogênio foram observados nos reatores preenchidos com partículas de carvão vegetal e cerâmica porosa. Por outro lado, nos reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade, a produção de hidrogênio aumentou progressivamente nos cinco primeiros dias, alcançando valores máximos no 6º dia, seguido do período de queda de produção, e atingindo valores nulos no 13º dia (Figuras 5.3A e 5.3B e Tabela 5.2).

No período de produção de hidrogênio, a faixa do pH efluente para os reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade estava compreendida entre 6,2 e 6,0 e os valores de conversão dos compostos orgânicos ainda não haviam se estabilizados.

Os maiores valores de produção de hidrogênio (Figuras 5.3A e 5.3B) e rendimento de hidrogênio (Figura 5.3C e 5.3D) foram observados no reator com polietileno de baixa densidade, seguido pelos reatores com argila expandida, carvão vegetal e cerâmica porosa (Tabela 5.1).

Figura 5.3 - Variação temporal da Produção de hidrogênio ($\text{mL-H}_2\text{d}^{-1}$) (A); Produção Volumétrica de Hidrogênio – PVH ($\text{mL-H}_2\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\text{reator}$) (B); Rendimento de hidrogênio – HY ($\text{mL-H}_2\text{L}^{-1}\text{vinhaça}$) (C) e Rendimento de hidrogênio - HY ($\text{mol-H}_2\text{mol}^{-1}\text{carboidratos totais}$) (D) ao longo do período experimental dos reatores com diferentes materiais suporte (Etapa 1).

É importante ressaltar que apesar do crescente interesse na produção biológica de hidrogênio, ainda não há uma padronização nas unidades das variáveis, dificultando a apresentação e a comparação dos dados. Uma visão geral do monitoramento dos reatores com diferentes suportes e diferentes formas de apresentação dos dados é apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Resumo dos principais dados obtidos no monitoramento dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).

Variáveis e parâmetros	Valores	Argila expandida	Carvão vegetal	Cerâmica porosa	Polietileno de baixa densidade
pH	Médio	5,7	5,6	5,4	5,5
Conversão DQO _t (%)	Médio	38,1	40,1	38,2	37,3
	Máximo	46,3	44,6	43,8	50,4
Conversão DQO _s (%)	Médio	14,4	16,7	13,1	15,9
	Máximo	26	24,5	25	35,6
Conversão carboidratos totais (%)	Médio	65,5	74,4	71,8	66,2
	Máximo	76,3	80,7	78	79,1
Conteúdo de H ₂ no biogás (%)	Médio	11,7	3,5	1,0	11,3
	Máximo	39,1	26,5	4	46,3
$\dot{V}_{H_2}$ (mmol-H ₂ .d ⁻¹) ^a	Médio	7,6	0,8	0,2	8,62
	Máximo	41,3	8,33	1,0	52,1
Q _{H2} (mL-H ₂ .d ⁻¹) ^a	Médio	170,9	18,1	4,5	193,6
	Máximo	929,2	187,1	23,6	1171,8
PVH (mL-H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹ _{reator}) ^a	Médio	74,3	7,9	2,0	84,2
	Máximo	404,0	81,4	10,3	509,5
Y _{1 H2} (mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{carboidratos total}) ^a	Médio	0,5	0,04	0,01	0,6
	Máximo	2,6	0,4	0,05	3,2
Y _{2 H2} (mL-H ₂ .L ⁻¹ _{vinhaça}) ^a	Médio	74,3	7,9	2,0	84,2
	Máximo	404,0	81,4	10,3	509,5
Y _{3 H2} (mmol-H ₂ .g-DQO _t ⁻¹ _{convertida}) ^a	Médio	0,3	0,0	0,0	0,3
	Máximo	1,6	0,3	0,0	1,8
Y _{4 H2} (mmol-H ₂ .g-DQO _s ⁻¹ _{convertida}) ^a	Médio	2,0	0,1	0,1	2,5
	Máximo	17,6	1,3	0,7	18,5

^a Condições padrão para temperatura e pressão (0 °C e 1 atm).

O teste de normalidade indicou a distribuição dos dados do monitoramento (produção de hidrogênio e rendimento de hidrogênio) como dados não paramétrico para todos os reatores monitorados. Aplicando o teste de Mann-Whitney (indicado para dados não paramétrico) com nível de significância de 5%, foram observados dois grupos estatisticamente iguais: reatores não produtores de hidrogênio (carvão vegetal e cerâmica porosa) e os reatores produtores de hidrogênio (argila expandida e polietileno de baixa densidade).

Sabe-se que tanto o polietileno de baixa densidade quanto a argila expandida são materiais de fácil obtenção e baixo custo ($1,60 - 1,85 \text{ USD.kg}^{-1}$ vs. $1,10 - 1,79 \text{ USD.kg}^{-1}$)⁵ (Callister, Jr. & Rethwisch, 2010). Entretanto, junto ao aspecto econômico se deve incluir a condição operacional, como parâmetro de seleção do material suporte.

Fernandes (2008) avaliou a produção de hidrogênio em APBR preenchido com argila expandida e alimentado com efluente sintético à base de sacarose (2 g.L^{-1}) a 25°C . A inoculação foi do tipo fermentação natural e o TDH aplicado variou de 0,5 a 2 h. A autora relatou fragmentação da argila expandida ao longo do processo (89 dias de operação) fato, que resultou no rebaixamento do leito e no entupimento da saída dos reatores, indicando as desvantagens no emprego desse material. Com base nisso, o polietileno de baixa densidade seria o material mais apropriado para a produção de hidrogênio, dentre os avaliados.

5.1.3. Abordagem geral sobre a produção de hidrogênio na Etapa 1

Uma explicação para os baixos valores observados para a produção de hidrogênio e rendimento de hidrogênio nos reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade, e valores traços para as mesmas variáveis nos reatores com carvão vegetal e cerâmica porosa é sugerida por FitzGibbon *et al.* (1998); Íñiguez-Covarrubias & Peraza-Luna, (2007); Chandra *et al.* (2008); Limkhansuwan & Chaiprasert, (2010), que associaram possível inibição ou redução das atividades dos microrganismos com a presença de melanoidinas e de compostos fenólicos.

Buitrón & Carvajal (2010) avaliaram a influência do efeito da temperatura (25 e 35°C), do Tempo de Detenção Hidráulica (12 e 24 h) e da concentração inicial da vinhaça oriunda do processo de destilação da Tequila ($0,5 - 5 \text{ g-DQO.L}^{-1}$) na produção de hidrogênio em reatores operados em bateladas sequenciais inoculados com lodo de cervejaria, pré-tratado com choque térmico (104°C por 24 h). Esses autores constataram que quando as condições com THD de 12 h a 25°C foram aplicadas, insignificante produção de biogás foi produzida. Entretanto, foi observada a produção de hidrogênio sob um TDH de 24 h e temperatura de 25°C e

---

⁵ **Preço da argila expandida tipo 0 (0 – 5 mm):** Cotação realizada junto a Terrafort Comércio Agrícola e Construções Ltda. e a Cinexpan Indústria e Comercio de Argila Expandida Ltda., em 18/09/2013.

35°C. A máxima Produção Volumétrica de Hidrogênio (PVH_{máxima}) de 1.212 mL-H₂.d⁻¹.L⁻¹ e uma média de hidrogênio compondo o biogás de 29,2 ± 8.8% foram obtidos quando o reator foi alimentado com 3 g-DQO.L⁻¹, temperatura de 35°C e TDH de 12 h.

Os valores encontrados por Buitrón & Carvajal (2010) foram 2,4 vezes superiores ao deste trabalho cuja PVH_{máxima} foi de 509,5 mL-H₂.d⁻¹.L⁻¹ e a porcentagem média de hidrogênio no biogás foi de 11,3% (reator com polietileno de baixa densidade). Entretanto, a concentração inicial da vinhaça de Tequila foi de apenas 3 g-DQO.L⁻¹.

Ainda em relação ao decaimento da produção de hidrogênio, algumas hipóteses foram testadas para explicar tal instabilidade. Considerando a Hipótese I, descrita previamente no item 2.5, foi determinado o número de cópias da enzima *Fe-Fe hydrogenase*, enzima associada a produção de hidrogênio, nos reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade, referente aos dias 10, 20 e 30 de operação (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Número de cópias do gene funcional *Fe-Fe hydrogenase* (*Fe-hyd*) nos dias 10, 20 e 30 de operação dos reatores preenchidos com argila expandida e polietileno de baixa densidade (Etapa 1).

Apesar do decréscimo do número de cópias da enzima *Fe-Fe hydrogenase* induzir a validação da Hipótese I, divergência entre esses dados e o estudo da estrutura e da dinâmica dos microrganismos acidogênicos por pirosequenciamento-454 foram observadas, quanto a desnaturação da enzima.

Inicialmente, observou-se que o decréscimo do número de cópias da enzima *Fe-Fe hydrogenase* acompanhou o decréscimo da abundância relativa dos microrganismos produtores de hidrogênio (MPH) no sistema. Em seguida, os microrganismos dominantes (52,6%) no final da operação do APBR preenchido com polietileno de baixa densidade pertenceram à família *Comamonadaceae*, que é constituída por microrganismos não produtores de hidrogênio (MNPH) indicando, portanto, ausência da enzima *Fe-Fe hydrogenase*. Logo, o decaimento do número de cópias do Fe-hyd, ocorreu devido à substituição dos MPH por MNPH que apresentaram abundância relativa de 73,4% e 22,5% no início da operação e 11,8% e 69,2% ao final da operação, respectivamente (Tabela 5.2).

Adicionalmente, nem a Hipótese II pôde ser validada, pois no período de produção nula de hidrogênio, a abundância relativa do gênero *Clostridium* (microrganismos que podem atuar como homoacetogênicas) foi de apenas 5,3%, não permitindo inferir sobre a dominância da via metabólica Wood-Ljungdahl no sistema.

A terceira hipótese, que credita a instabilidade da produção de hidrogênio ao excesso de nitrogênio (baixa relação C/N – 32,5, baseada no COT), resultando no crescimento excessivo da biomassa acidogênica por meio do desvio da rota metabólica do hidrogênio para assimilação e crescimento celular, é suportada pelos ensaios hidrodinâmicos dos reatores. O comportamento hidrodinâmico dos reatores APBR com diferentes suportes para imobilização da biomassa acidogênica foi avaliado no início e no final da operação, sem biomassa e com biomassa, respectivamente, para tempo de detenção hidráulica teórico de 24 h (Figura 5.5). O erro experimental máximo foi de 3,2%. Os valores médios para os TDH real, obtidos nos ensaios hidrodinâmicos, foram de 24,3 h (inicial) e 20,9 h (final) (Tabela 5.3). Essa diminuição, de aproximadamente 3,5 h, no TDH real aplicado esteve associada à perda de volume útil do reator, resultante da grande geração de biomassa no sistema em um curto período de tempo (30 dias).

Tabela 5.2 - Distribuição taxonômica e filogenética do 16S RNAr da comunidade microbiana presente no reator preenchido com polietileno de baixa densidade (Etapa 1).

Táxon				Abundância relativa¹ (%)		Função³	
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PEBD - 10º dia²		
Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Denitrobacterium	0,0	0,3	MCH
		Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	0,3	0,2	MM
Bacteroidites	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	0,2	0,3	MC
				Xylanibacter	0,4	0,2	MPH
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ethanoligenens	0,3	0,6	-
			Clostridiaceae	Oscillibacter	0,0	0,1	MPH
				Clostridium	12,8	5,3	MPH
			Veillonellaceae	Pectinatus	54,1	3,1	MPH
				Megasphaera	3,3	2,6	MPH
				Propionispora	3,2	0,8	MPH
				Schwartzia	0,0	1,5	-
				Dialister	0,1	1,3	MNPH
			Lachnospiraceae	Anaerosporeobacter	0,4	0,4	-
				Leuconostocaceae	Weissella	0,0	0,1
Lactobacillus	1,9	11,1			DL		
Lactobacillaceae	Paralactobacillus	0,0		0,1	-		
	Pediococcus	0,2		0,2	-		
Proteobacteria	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	0,6	1,0	DL
			Streptococcaceae	Lactococcus	0,3	1,6	DL
				Gluconacetobacter	0,0	1,0	MNPH
			Acetobacteraceae	Acetobacter	0,4	0,2	MNPH
				não identificada	3,6	12,7	MNPH
			Rhodospirillales	não identificada	18,0	52,6	MNPH
				Burkholderiales	Comamonadaceae	0,9	3,9

1 - Abundância relativa baseado no número total de sequências.

2 - Amostras do reator com polietileno de baixa densidade no 10° e 30° dia de operação.

3 - Função dos microrganismos: Microrganismos produtores de hidrogênio (MPH); Microrganismos não produtores de hidrogênio (MNPH); Microrganismos consumidores de hidrogênio (MCH); Microrganismos competidores (MC); Microrganismos mutualísticos (MM) e Divergência de literatura (DL).

Com base no ajuste das curvas experimentais obtidas em modelos matemáticos uni-paramétricos para representação do escoamento no reator (N-CSTR em série⁶) (Tabela 5.3), observou-se que o crescimento excessivo da biomassa implicou também na mudança no regime de escoamento em todos os reatores (do pistonado para o mais próximo do regime de mistura completa) sendo mais expressivo no reator com polietileno de baixa densidade. Tal mudança (regime de escoamento) foi observada por Anzola-Rojas (2010) que variou a relação C/N (40 – 190) em reatores APBR preenchidos com polietileno de baixa densidade, inoculados pelo processo de fermentação natural e alimentados com água residuária sintética à base de sacarose ($\text{DQO} = 2 \text{ g.L}^{-1}$) sob um TDH e COVa de 2 h e $24 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. A autora concluiu que sob excesso de nitrogênio, o crescimento da biomassa foi maior com efeitos negativos sobre a produção de hidrogênio, enquanto carência de nitrogênio permitiu o controle do crescimento da biomassa e resultou em maiores produtividades de hidrogênio, validando a Hipótese III deste trabalho.

---

⁶ O modelo de N-reatores de mistura completa em série (N-CSTR em série) fornece uma ideia sobre o comportamento do reator, se este fosse constituído por uma série de reatores de mistura completa de igual volume. Segundo Levenspiel (2000), quando $N > 30$ considera-se reator mais próximo ao escoamento pistonado e quando $N < 30$ considera-se o reator mais próximo ao escoamento de mistura completa.

Figura 5.5 - Curva E obtida em ensaios hidrodinâmicos do tipo degrau para determinação do TDH real nos reatores com diferentes suportes (Etapa 1). A. Início da operação dos reatores. B. Final da operação dos reatores, após 30 dias de operação.

Tabela 5.3 - Resumo com os principais dados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).

Reatores	Início de operação		Final de operação	
	$\Theta_{h_{início}}$	N-CSTR em série	$\Theta_{h_{final}}$	N-CSTR em série
Argila expandida	24,8	57	21,5	7
Carvão vegetal	23,6	62	22,6	9
Cerâmica porosa	24,1	124	19,2	98
Polietileno de baixa densidade	24,8	993	20,2	2

Na Tabela 5.4 são apresentados os valores para o balanço de massa dos reatores com diferentes suportes. O balanço de massa foi realizado com base na DQO afluente e efluente e na DQO equivalente do gás hidrogênio ($8 \text{ g-DQO.g}^{-1}\text{H}_2$ a 25°C) e da biomassa efluente ($1,42 \text{ g-DQO.g}^{-1}\text{SSV}$) (item 4.7). Os produtos detectados pelos métodos analíticos aplicados representaram de 76,4% a 91,4%, do valor total da DQO medida, sendo que a contribuição no balanço de massa referente à produção de hidrogênio da biomassa gerada nos reatores foi de aproximadamente 0,2% e 19,7%, respectivamente. Apesar de ter sido observada a presença de biomassa em suspensão na zona de alimentação, 97,6% da biomassa acidogênica

esteve presente no leito reacional dos reatores com diferentes suportes, indicando que os reatores APBR atuaram como reatores de biomassa aderida.

Tabela 5.4 - Balanço de massa dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).

Variáveis mensuradas	Argila expandida	Carvão vegetal	Cerâmica porosa	Polietileno de baixa densidade
DQO _t afluente (g.L ⁻¹)	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	21,5 ± 4,9	22,6 ± 4,6	23,2 ± 4,8	21,1 ± 3,9
Q _{H2} (L.d ⁻¹) ^a	0,19 ± 0,3	0,02 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,21 ± 0,4
Q _{H2} (g-DQO.d ⁻¹) ^b	0,07 ± 0,2	0,01 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,15 ± 0,2
SSV _{efluente} (g-DQO.L ⁻¹)	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,5	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,3
Massa do material suporte (g)	1425 ± 0,0	1304 ± 0,0	3030 ± 0,0	1674 ± 0,0
SSV _{aderido} (mg.g ⁻¹ suporte)	182 ± 43	175 ± 62	122 ± 16	124,6 ± 0,02
SSV _{aderido} (g-VSS.run ⁻¹)	259,4 ± 61,3	228,2 ± 0,0	369,7 ± 0,0	208,6 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-VSS.d ⁻¹)	8,6 ± 2	7,6 ± 0,0	12,3 ± 0,0	7 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-DQO.d ⁻¹)	12,3 ± 2,9	10,8 ± 0,0	17,5 ± 0,0	9,9 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.L ⁻¹)	13,1 ± 0,1	11,7 ± 0,1	14,2 ± 0,1	11,1 ± 0,2
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.run ⁻¹)	6,6 ± 0,1	5,9 ± 0,1	7,1 ± 0,1	5,6 ± 0,1
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.d ⁻¹)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-DQO.d ⁻¹)	0,3 ± 0,0	0,28 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,26 ± 0,0
t (%) ^c	80,2	82,2	91,4	76,4

a. ^a Valor de produção de hidrogênio a 25°C. b. Baseado em 8 g-DQO.g⁻¹H₂; c. Baseado em 1.42 g-DQO.g⁻¹SSV; d. Balanço de massa (%) = ((DQOs efluente (gDQO.d⁻¹) + H₂ (gDQO.d⁻¹) + SSV efluente (gDQO.d⁻¹) + SSV_{aderida} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{zona alimentação} (gDQO.d⁻¹)/(DQOt afluente (gDQO.d⁻¹)).

5.1.4. Avaliação dos produtos intermediários

Neste estudo, não foi possível observar uma relação clara entre a produção de hidrogênio e a concentração dos produtos intermediários (Tabela 5.5), pois, as maiores concentrações de ácido acético (AcH) e butírico (BuH) (rotas preferenciais para produção de hidrogênio - Equação 5.1 e 5.2) foram observadas nos reatores cuja produção de hidrogênio foi nula (reator com partículas de carvão vegetal e cerâmica porosa) (Antonopoulou *et al.* 2008).

Nos reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade, a produção de hidrogênio pela fermentação do tipo AcH/BuH (essencialmente em pH 5-6) também foi dominante. Além disso, houve uma pequena contribuição da fermentação do tipo acetato/etanol (produção de ácido acético e etanol - EtOH - simultaneamente

com a produção de H_2 e CO_2 – Equação 5.3), mesmo em pH superior a 4,5 (Das & Veziroglu, 2001).

Produção de EtOH e AcH – $C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2H_2 + 2_2CO + C_2H_4O_2 + C_2H_6O$ Equação 5.3

Tabela 5.5 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO_s dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1).

Variáveis mensuradas	Argila expandida	Carvão vegetal	Cerâmica porosa	Polietileno de baixa densidade
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	21,5 ± 4,9	22,6 ± 4,6	23,2 ± 4,8	21,1 ± 4,9
MeOH(g.L ⁻¹)	0,03 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,12 ± 0,0	0,02 ± 0,0
EtOH(g.L ⁻¹)	0,17 ± 0,1	0,06 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,16 ± 0,0
AcH (g.L ⁻¹)	0,77 ± 0,4	1,97 ± 0,4	1,79 ± 0,4	0,86 ± 0,5
PrH (g.L ⁻¹)	1,48 ± 0,7	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,45 ± 0,7
BuH (g.L ⁻¹)	1,39 ± 0,7	1,58 ± 0,5	1,75 ± 0,4	1,24 ± 0,5
VaH(g.L ⁻¹)	0,35 ± 0,4	0,28 ± 0,1	0,32 ± 0,2	0,34 ± 0,3
CaH(g.L ⁻¹)	0,07 ± 0,1	0,05 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,05 ± 0,02
AOV + solventes (gDQO.L ⁻¹)	6,7 ± 3,8	7,9 ± 2,3	8,3 ± 2,4	6,4 ± 3,3
Carboidratos efluente (g.L ⁻¹)	1,32 ± 0,6	0,98 ± 0,3	1,08 ± 0,4	1,29 ± 0,7
Carboidratos efluente (gDQO.L ⁻¹)	1,5 ± 0,7	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,8
tsolúvel (%)	38,2	39,7	40,9	37,3

Outra via metabólica observada foi a do ácido propiônico (PrH). De acordo com a equação estequiométrica proposta por Antonopoulou *et al.* (2008), a produção do PrH é desfavorável para a produção de hidrogênio, pois para cada mol de ácido propiônico produzido, dois mols de hidrogênio são consumidos (Equação 5.4). Além disso, essa via metabólica (produção de PrH) também foi dominante em todos os reatores, fato que contribuiu para a baixa produção de hidrogênio em todos os reatores.

Produção de PrH – $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$ Equação 5.4

É importante mencionar que apesar da produção de hidrogênio (objetivo deste trabalho) ter sido pontual nos reatores com argila expandida e polietileno de baixa densidade e nula nos reatores preenchidos com partículas de carvão vegetal e cerâmica porosa, altas concentrações de compostos orgânicos de interesse comercial foram produzidas (Tabela 5.5).

Em Bengtsson *et al.* (2008) foram observadas concentrações similares de ácidos orgânicos voláteis (AOV). Esses autores avaliaram a produção de AOV em sistemas de fermentação contínua alimentados com soro de queijo (pH e TDH de 5,2 e 48 h, respectivamente) e efluente do processamento de papel (pH e TDH de 5,7 e 48 h,

respectivamente). Contudo, vale ressaltar que neste trabalho o TDH aplicado foi duas vezes menor comparando com as condições operacionais impostas por esses autores.

Sreethawong *et al.* (2010) operaram reatores em batelada sequencial alimentados com efluente de manipueira, sob condição mesofílica (35°C), relação carbono igual a 22 e COVa de 37,5 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Esses autores observaram concentrações de AOV similares a este trabalho e concluíram que para melhorar a produção de hidrogênio é necessário minimizar ou inibir a produção dos ácidos propiônico e valérico.

O balanço de massa para DQO_s considerou apenas a concentração de carboidratos efluente, a concentração dos AOV e solventes. Compostos solúveis como, glicerol, melanoidinas entre outros, não foram monitorados, implicando em valores baixos (entre 37,3% e 40,9%) para a DQO_s dos metabólitos em relação à DQO medida (Tabela 5.5).

5.1.5. Estrutura e dinâmica dos microrganismos mesofílicos acidogênicos nos reatores com diferentes materiais suportes

Análise de T-RFLP – Os microrganismos aderidos e nos interstícios do leito dos reatores com diferentes materiais suportes foram organizados em dendogramas com base no índice estatístico de Jaccard (presença e ausência de microrganismos) (Figura 5.6A).

Dois grupos foram identificados, sendo que o primeiro agrupamento considerou os microrganismos dos reatores não produtores de hidrogênio (carvão vegetal e cerâmica porosa) com 38% de similaridade. Esse ramo, por sua vez, apresentou similaridade de 35% e 18% com os microrganismos dos reatores produtores de hidrogênio (argila expandida e polietileno de baixa densidade), respectivamente. A baixa similaridade entre os reatores confirma a influência dos diferentes materiais suportes na seleção dos microrganismos.

O agrupamento dos dados da análise de T-RFLP em matriz bidimensional (mapa de calor) possibilitou a visualização do número, tamanho e posição dos fragmentos de terminal marcado ou cepas que compuseram o perfil de amostra de cada reator. O

número de cepas foi também associado à abundância relativa dos microrganismos (Figura 5.6B).

Dessa forma, a diversidade de microrganismos foi diretamente proporcional à produção de hidrogênio e ao rendimento de hidrogênio (polietileno de baixa densidade > argila expandida > carvão vegetal > cerâmica porosa), reafirmando a aplicação do polietileno de baixa densidade em sistemas fermentativos para produção de hidrogênio.

Figura 5.6 - Análise de T-RFLP dos reatores com diferentes suportes (Etapa 1). A. Análise de cluster por meio do índice estatístico de Jaccard. B. Análise da abundância relativa em matriz bidimensional.

Taxonomia – Um total de 5511 sequências (polietileno de baixa densidade – 10° dia) e 5154 sequências (polietileno de baixa densidade – 30° dia) foram obtidas a partir do sequenciamento de alto rendimento por pirosequenciamento-454.

As sequências foram afiliadas em 7 grupos filogenéticos (*Coriobacteriales*, *Bifidobacteriales*, *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Lactobacillales*, *Rhodospirillales* e *Burkholderiales*). Notavelmente, o filo *Firmicutes* (77,1%) foi dominante na produção pontual de hidrogênio e o filo *Proteobacteria* (70,4%) foi dominante no período de produção nula de hidrogênio, conforme apresentado anteriormente na Tabela 5.2.

Entretanto, a descrição dos grupos filogenéticos se limitou as ordens *Clostridiales*, *Lactobacillales* e *Burkholderiales*, cuja abundância relativa foi superior a 10% do número total de sequência. Portanto, essas ordens englobaram os microrganismos de maior importância no sistema, e serão descritas separadamente e relacionadas aos resultados obtidos com mais detalhes a seguir.

Ordem Clostridiales – A maioria dos microrganismos deste grupo é Gram-positivo, formador de esporos e apresenta forma de bacilos. Entretanto, a família *Ruminococcaceae*, mais especificamente, o gênero *Ethanoligenens* (vastamente estudado) é composto por microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, mesofílicos e móveis. O gênero *Ethanoligenens* é reconhecido como produtor de hidrogênio que utiliza a fermentação alcoólica como rota metabólica principal (Ren *et al.* 1997; Xing *et al.* 2006; Tang *et al.* 2012). Apesar de baixa abundância relativa (0,3%) esses microrganismos possivelmente contribuíram para a produção simultânea de hidrogênio, etanol e ácido acético, conforme discutido previamente no item 4.5. O mesmo pode ser atribuído ao gênero *Oscillibacter* (abundância relativa – 0,1%), porém associado à produção do ácido n-valérico (Bertin *et al.* 2010).

A família *Clostridiaceae*, em particular o gênero *Clostridium*, são os microrganismos que apresentam maior potencial de produção de hidrogênio. As espécies mais reportadas e estudadas são *C. acetobutylicum* (Cappelletti *et al.* 2011). *C. butyricum* (Wang & Jin, 2009); *C. beijerinckii* (Ye *et al.* 2012); *C. thermocellum* (Ellis *et al.* 2012); e *Clostridium cellulolyticum* (Jiao *et al.* 2012). Entretanto, neste trabalho, a abundância relativa desse gênero foi baixa (10° e 30° dia de operação do reator com polietileno de baixa densidade, 12,8% e 5,3%, respectivamente). Esse fato pode estar associado ao processo de inoculação do reator e as condições operacionais impostas, implicando que tais variáveis, não permitiram a seleção e a manutenção dos microrganismos potencialmente produtores de hidrogênio no sistema.

Por outro lado, a família *Veillonellaceae* foi dominante no sistema no 10° dia de operação. De acordo com Hung *et al.* (2011), essa família pode desempenhar importante papel na produção, consumo e competição pelo hidrogênio, merecendo atenção em futuras pesquisas.

Castelló *et al.* (2009) operaram um sistema fermentativo por 250 dias (reator UASB - 4.6 L) utilizando soro de queijo como substrato. Esses autores concluíram que a baixa produção volumétrica de hidrogênio ($122 \text{ mL-H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}}$) esteve associado à presença de organismos produtores de hidrogênio com baixo rendimento, tais como, *Megasphaera* e *Pectinatus*, além de organismos não produtores de hidrogênio.

Neste trabalho, o gênero *Pectinatus* foi dominante (54,1%) no início e não dominante (3,1%) no final de operação do reator com polietileno de baixa densidade. Assim, a presença desses microrganismos poderia explicar a baixa produção volumétrica de hidrogênio ($84,2 \text{ mL-H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}}$) e o baixo rendimento de hidrogênio ($0.64 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{carboidratos totais}}$).

Há poucos relatos na literatura sobre o gênero *Propionispora*; entretanto, sabe-se que as espécies *P. vibrioides* e *P. hippei* (95% e 93% de similaridade com as OTUs 277 e 574, respectivamente) são organismos Gram-negativos e formadores de esporos, responsáveis pela conversão de açúcares (frutose, sorbitol, manitol e xilitol) em ácido propiônico, ácido acético, gás carbônico e pequenas quantidades de hidrogênio (Biebl *et al.* 2000; Aboud-Zeid *et al.* 2004).

Koskinen *et al.* (2007) avaliaram a comunidade microbiana de um reator de leito fluidizado (FBR) alimentado com efluente sintético à base de glicose e identificaram a *Schwartzia succinivorans* (bactéria do rúmen - 93% de similaridade com a OTU 534), com capacidade de crescimento aderido e em suspensão. Segundo os autores, sua abundância coincidiu com a baixa produção de hidrogênio e concentrações elevadas de ácido propiônico (PrH). Apesar da alta concentração de PrH em todos os reatores ($\approx 1.4 \text{ g.L}^{-1}$) do presente trabalho, a abundância relativa desse microrganismo foi baixa (1,5%).

Pouco se sabe sobre os gêneros *Dialister*, *Anaerosporobacter* e *Weissella*; porém o gênero *Dialister* foi citado como microrganismo não produtor de hidrogênio em um ASBR (Arooj *et al.* 2007). O gênero *Anaerosporobacter* foi reportado em estudo de viabilidade do uso de licor de fermentação da palha de arroz, durante o processo de fermentação a seco na produção de biofloculantes (Zhao *et al.* 2012). O gênero *Weissella*, mais especificamente a *Weissella soli* (99% de similaridade com a OTU 30) foi detectada juntamente com outras espécies de clostrídeos em reator produtor de hidrogênio, inoculado com consórcio termotolerante, oriundo de uma estação de tratamento de óleo de palma (Yossan *et al.* 2012). De acordo com Yossan *et al.* (2012) a *W. soli* esteve presente nas condições de maior produção de hidrogênio ($76 \text{ mL.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ a 45°C) e maior rendimento de hidrogênio ($27,1 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$).

Ordem Lactobacillales – Essa ordem foi representada pelas famílias, Lactobacillaceae, Enterococcaceae e Streptococcaceae.

Os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* são compostos por microrganismos produtores de ácido láctico (MPAL), porém, há uma divergência na literatura sobre a função desses microrganismos em sistemas produtores de hidrogênio.

Alguns autores relatam o efeito inibitório dos MPAL na produção de hidrogênio. Noike *et al.* (2002) observaram que o *Lactobacillus paracasei* (99% de similaridade com a OTU 573) e o *Enterococcus durans* (99% de similaridade com a OTU 180) inibiram a produção de hidrogênio por *Clostridium*. Jo *et al.* (2007) corroboram que a relação hidrogênio e ácido láctico foi inversamente proporcional na presença desses microrganismos. Segundo Ohnishi *et al.* (2010), há uma competição de substrato entre as MPAL e as microrganismos produtores de hidrogênio (MPH), o que pode acarretar na instabilidade no sistema. Outros autores também reportaram que as BPAL podem estar associadas com a produção de pequenas quantidades de hidrogênio, por meio da acidificação do meio (Li & Fang, 2007).

Hafez *et al.* (2010) observaram a presença de *Lactococcus sp.* em um reator produtor de hidrogênio com sistema integrado de clarificação (IBRCSs) e em um reator de mistura quando foram impostas altas cargas orgânicas, de 154 e 206 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹.

Um fato interessante é relatado por Ohnishi *et al.* (2010), que observaram o consumo de ácido láctico e a produção contínua de hidrogênio, atribuindo esse evento a presença de microrganismos utilizadores do ácido láctico (MUAL), tal como, a *Megasphaera elsdenii* (98% de similaridade com a OTU 526). Outro exemplo de relação intraespecífica é descrito por Asada *et al.* (2006), que estudaram a produção de hidrogênio em bactérias fotossintéticas (*Rhodobacter spahaeroides RV*) utilizando o *Lactobacillus delbrueckii* como co-cultura.

Em relação aos demais gêneros da família *Lactobacillaceae* (*Paralactobacillus* e *Pediococcus*), nenhum artigo relacionado à produção hidrogênio foi encontrado.

O grupo Proteobacteria é caracterizado por microrganismos não produtores de hidrogênio. Neste trabalho, foram detectadas sequências afiliadas às classes α -proteobacteria e β -proteobacteria. A classe α -proteobacteria foi representada pela ordem *Rhodospirillales* e a classe β -proteobacteria por sequências não identificadas similares à ordem *Burkholderiales* e à família *Comamonadaceae*, sendo as sequências

não identificadas para a família *Comamonadaceae* as mais abundantes (52.6%) no final da operação do reator com partículas de polietileno de baixa densidade.

Ordem *Burkholderiales* – Sequências do gene 16S RNAr afiliadas à essa ordem têm sido reportadas em estudos com água doce, solos e biorreatores, se demonstrando eficientes na mineralização da matéria orgânica (Niemi *et al.* 2009).

No que diz respeito a reatores produtores de hidrogênio, sequências não identificadas da ordem *Burkholderiales* foram detectadas em um reator fototrófico, cuja fonte de carbono utilizada foi o ácido acético e butírico (Li *et al.* 2008), e em um lodo anaeróbio após tratamento químico com concentração superior a 0,15% de clorofórmio (Ning *et al.* 2012).

Bactérias afiliadas a família *Comamonadaceae* (56% das sequências no final da operação do reator com polietileno de baixa densidade) foram isoladas de uma cultura adaptada e aplicada na redução de Fe^{3+} (Sikora *et al.* 2011).

Liu *et al.* (2012) isolaram duas linhagens de *Comamonadaceae* capazes de reduzir o BrO_3 na presença de NO_3^- , e Sadaie *et al.* (2007) relatam os microrganismos da família *Comamonadaceae* como desnitrificantes primários, sob condição anóxica ($< 1\text{mg-O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) em lodos ativados de uma planta de tratamento de uma fábrica de processamento de alimentos.

A configuração ideal do reator anaeróbio aplicado à produção de hidrogênio deveria considerar a remoção de oxigênio dissolvido do efluente antes da entrada no reator, evitando o desenvolvimento de bactérias microaerofílicas, não produtoras de hidrogênio. Porém, Hung *et al.* (2011) ressaltam que essa tarefa seria extremamente difícil devido ao baixo TDH aplicado em sistemas acidogênicos produtores de hidrogênio e ao tamanho das unidades industriais.

Em relação ao gênero *Schlegelella*, Elabanna *et al.* (2003) reportam que esses microrganismos produzem e degradam poli-3-hidroxibutirato (poli-hidroxialcanoatos) utilizando-os como fonte de carbono. Schlegel *et al.* (1961) e Anderson & Dawes, (1990) complementam que esses microrganismos podem ser indicadores de condições desfavoráveis para crescimento bacteriano.

Considerando que a abundância relativa no final da operação do APBR com polietileno de baixa densidade como suporte foi de 12,4% de MPH e 71,7% de MNPH e com base nos estudos da estrutura e da dinâmica funcional desses microrganismos associados aos dados do monitoramento, é possível inferir que a condição microaerofílica no reator inibiu o crescimento do grupo de MPH (ordem *Clostridiales*) e favoreceu o desenvolvimento do grupo de MNPH (ordem *Burkholderiales*, especialmente da família *Comamonadaceae*), que muito possivelmente já se encontrava no inóculo do reator (fermentação natural da vinhaça) por ser constituído de microrganismos que habitam o solo e água doce.

Ao mesmo tempo, o excesso de nitrogênio (baixa relação C/N igual a 32,5, baseado no COT), contribuiu com a grande geração de biomassa nos reatores, que resultou na perda de volume útil do reator, conseqüentemente, na diminuição do TDH real aplicado e na mudança do regime de escoamento. Assim, a associação desses fatores (baixa relação C/N e microaeração no sistema, com base na abundância dos microrganismos anóxicos) afetaram severamente os reatores APBR com diferentes materiais suportes, levando-os à falência.

5.1.6. Avaliação da formação do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A análise do biofilme por microscopia de contraste eletrônica de varredura (MEV) (Figura 6.4) revelou que o material suporte influenciou diretamente na estrutura do biofilme desenvolvido nos reatores.

Inicialmente, foram observadas células bacilares distribuídas de forma randômica sob a superfície da argila (Figura 5.7A). O real motivo para a ausência de microcolônias não foi identificado. Entretanto, deve-se levar em consideração que a formação de biofilme é um processo ordenado, complexo, não totalmente compreendido e ocorre a partir da regulação de genes específicos em função da resposta celular aos estímulos ambientais (Wood *et al.* 2011).

Por outro lado, o polietileno de baixa densidade apresentou estágio intermediário de formação do biofilme, quando foi possível identificar estruturas especiais da membrana celular (fibrilas e polímeros), aumentando a interação entre a membrana

e a superfície sólida, e consolidando, assim, a fixação irreversível dos microrganismos sobre o suporte (van Loosdrecht *et al.* 1990) (Figura 5.7B).

Outra estrutura polimérica observada (Figura 5.7C) foi a presença de possíveis canais entre as células que permitem o fluxo de líquido e gás, além da dispersão de nutrientes e compostos excretados pela célula (Stoodley *et al.* 2002). Esses mesmos autores acrescentam que o biofilme pode se agregar em camada menos espessa ou em arranjos tridimensionais, como pode ser observado para os suportes de carvão vegetal (Figura 5.7D), cerâmica porosa (Figura 5.7E) e polietileno de baixa densidade (Figura 5.7F).

O carvão vegetal e a cerâmica porosa, por sua vez, apresentaram aglomerados de células (bacilares e flageladas) dispersas sobre a superfície, presumindo possível estabilização no processo de formação do biofilme, consequentemente a última fase de colonização do biofilme, conforme sugerido por van Loosdrecht *et al.* (1990).

Apesar do carvão vegetal e da cerâmica porosa permitirem a estabilização no processo de formação do biofilme no período de 30 dias, os mesmos selecionaram uma diversidade menor de microrganismos em comparação com a argila expandida e o polietileno de baixa densidade (*item 5.1.5*) não sendo favoráveis para produção de hidrogênio. Por outro lado, a maior diversidade de microrganismos com crescimento em suspensão e em biofilme em processo intermediário de formação selecionados pela a argila expandida e o polietileno de baixa densidade, respectivamente, foi favorável à produção de hidrogênio.

Figura 5.7 - MEV da superfície dos materiais suportes utilizados nos reatores APBR (Etapa 1). A. Células randômicas sobre a superfície da argila expandida (aumento de 4000x). B. Estruturas poliméricas de fixação (aumento de 8000x da superfície do polietileno de baixa densidade). C. Possível estrutura polimérica de transporte líquido e gasoso (aumento de 4000x da superfície do carvão vegetal). D. Aumento de 4000x da superfície do carvão vegetal. E. Aumento de 8000x da superfície da cerâmica. F. Aumento de 1000x da superfície do polietileno de baixa densidade.

5.2. ETAPA 2 - Identificação da melhor faixa de TDH e COVa para produção de H₂ em condição mesofílica (25°C) e termofílica (55°C).

Mediante os interferentes negativos na produção de hidrogênio observados nas Etapa 1 (baixa relação C/N cooperado com microaeração no sistema), adotou-se a operação dos reatores em condição termofílica (55°C) a fim de diminuir o rendimento da biomassa acidogênica e a solubilidade do oxigênio. Essa estratégia operacional apresenta viabilidade, do ponto de vista da engenharia, uma vez que vinhaça deixa as colunas de destilação na faixa de temperatura entre 85°C e 90°C.

Em relação a operação dos reatores em condição mesofílica, destaca-se as altas concentrações de AOV de interesse comercial produzido a 25°C (Etapa 1), sendo este o motivo da investigação de outras faixas de TDH e COVa nessa temperatura na Etapa 2.

Como forma de facilitar a apresentação dos dados e a leitura do texto (Etapa 2), siglas foram atribuídas aos reatores de acordo com os parâmetros operacionais. Assim, tem-se a sigla RM para os reatores mesofílicos e RT para reatores termofílicos. Em relação ao TDH aplicado, tem-se, a sigla RM ou RT seguido do TDH teórico. Por exemplo, o reator termofílico com TDH teórico aplicado de 12 h foi denominado **RT 12**.

5.2.1. Desempenho dos reatores

Os reatores de leito empacotado (APBR) submetidos a diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) foram operados, em paralelo, durante 30 dias. Os reatores foram preenchidos com partículas de polietileno de baixa densidade (melhor suporte definido na Etapa I) e operados sob diferentes TDH de 24; 16; 12; e 8 h, que resultaram em COVa de 36,4; 54,3; 72,4; e 108,6 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹, respectivamente.

Inicialmente, os reatores foram operados em condição mesofílica (25°C). Visto que não foi observada produção de hidrogênio nos reatores RM 16, RM 12 e RM 8, os reatores foram desmontados, com base na estabilização da curva de eficiência de conversão dos carboidratos totais. Em seguida, a operação desses reatores foi iniciada em condição termofílica (55°C).

A média do pH afluente foi $6,5 \pm 0,1$. Durante o período experimental, o pH efluente dos reatores mesofílicos se manteve estável, em 5,6, a partir do 6º dia (dados não apresentados) e igual a 5,0 a partir do 10º dia para os reatores termofílicos (Figura 5.8A). O valor do pH efluente foi característico de sistemas fermentativos aplicados a produção de hidrogênio ($\text{pH} \approx 5,5$).

A conversão média da DQO_t e DQO_s compreendeu a faixa entre 29,7% e 37,3% (dados não apresentados) e 15,3% e 18,6% para os reatores mesofílicos (dados não apresentados) e 26,2% e 33,3% (Figura 5.8B) e 14,4% e 24,2% (Figura 5.8C) para os reatores termofílicos, respectivamente.

A conversão da matéria orgânica, expressa na forma de DQO e carboidratos totais, resultaram principalmente na produção de ácidos orgânicos voláteis totais (ácido acético, butírico, propiônico), sendo a conversão dos carboidratos totais de aproximadamente 66,4% (dados não apresentados) e 76,1% (Figura 5.8D) nos reatores mesofílicos e termofílicos, respectivamente.

Figura 5.8 - Variação temporal do pH afluente e efluente (A); Conversão da DQO total (B); Conversão da DQO solúvel (C) e conversão dos carboidratos totais (D) ao longo do período experimental dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

É importante mencionar que apesar dos dados referentes ao monitoramento dos reatores RM 16, RM 12 e RM 8 não estarem apresentados em figuras, por apresentarem comportamento operacional semelhante aos reatores termofílicos e, portanto, não acrescentarem informações suplementares ao trabalho, os mesmos estão disponibilizados na Tabela 5.6.

5.2.2. Produção de hidrogênio

As diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) avaliadas apresentaram forte influência na produção de hidrogênio, com altos valores observados para os reatores termofílicos e valores baixos e nulos para os reatores mesofílicos.

A composição do biogás apresentou valor médio de hidrogênio de aproximadamente $11,3 \pm 16,8\%$ e $36,2 \pm 5,8\%$ nos reatores mesofílicos e termofílicos, respectivamente. Além disso, durante o período experimental, não foi observado metano na composição do biogás, indicando que o tipo de inoculação aplicada (efluente fermentado) foi viável para o sistema acidogênico (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Composição do biogás ao longo do período experimental dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2). A. RT 24, B. RT 16, C. RT 12 e D. RT 8.

Apenas traços de hidrogênio foram observados no RM 24. Em relação aos demais reatores mesofílicos (RM 16, RM 12, RM 8) não foi detectado hidrogênio na composição do biogás. Por outro lado, em todos os reatores termofílicos foi observada a produção contínua de hidrogênio durante todo o período experimental (30 dias) (Figuras 5.10) (Tabela 5.6).

Nos reatores termofílicos, a produção de hidrogênio (Figuras 5.10A e 5.10B) e o rendimento de hidrogênio (Figura 5.10C e 5.10D) aumentaram com o aumento da COVa entre 36,2 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ e 72,4 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹. Entretanto, observou-se decréscimo de 63,9% e 42,8% na produção de hidrogênio e no rendimento de hidrogênio, respectivamente, quando a COVa foi de 108,6 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ (Tabela 5.6).

Figura 5.10 - Variação temporal da Produção de hidrogênio (mL-H₂.d⁻¹) (A); Produção Volumétrica de Hidrogênio – PVH (mL-H₂.d⁻¹.L⁻¹ reator) (B); Rendimento de hidrogênio – HY (mL-H₂.L⁻¹ vinhaça) (C) e Rendimento de hidrogênio - HY (mol-H₂.mol⁻¹ carboidratos totais) (D) ao longo do período experimental dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

Uma visão geral do monitoramento dos reatores com diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) e diferentes formas de apresentação dos dados são abordadas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Resumo dos principais dados obtidos no monitoramento dos reatores com diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) (Etapa 2).

Parâmetros e variáveis		Condições operacionais							
		TDH (h)							
		24		16		12		8	
		COVa (kg-DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)							
		36,2		54,3		72,4		108,6	
	RM ^b	RT	RM ^c	RT	RM ^c	RT	RM ^c	RT	
pH	Médio	5,5	5,3	5,6	5,1	5,6	4,9	5,6	5,0
Conversão DQO t (%)	Médio	37,3	33,3	32,4	31,2	31,7	29,1	29,7	26,2
	Máximo	50,4	40,3	37,4	39,2	37,8	43,5	33,8	45,2
Conversão DQO s (%)	Médio	15,9	24,2	18,6	22,6	16,8	19,2	15,3	14,4
	Máximo	35,6	31	38,2	31	32,1	36,8	27,7	39,1
Conversão carboidratos totais (%)	Médio	66,2	67,3	65,3	79,4	72,8	78,8	61,4	78,8
	Máximo	79,1	76,5	80,7	72,3	78,0	74,6	79,1	71,8
Conteúdo de H ₂ no biogás (%)	Médio	11,3	24,3	0,0	30,6	0,0	36,2	0,0	36,9
	Máximo	46,3	64,4	0,0	41,6	0,0	98,5	0,0	74,6
v_{H_2} (mmol-H ₂ .d ⁻¹) ^a	Médio	8,62	4,8	0,0	34,6	0,0	57,9	0,0	37,0
	Máximo	52,1	7,9	0,0	53,8	0,0	104,7	0,0	94,0
Q _{H2} (mL-H ₂ .d ⁻¹) ^a	Médio	193,6	101,1	0,0	762,2	0,0	1211,7	0,0	899,0
	Máximo	1171,8	176,4	0,0	1208,2	0,0	2353	0,0	2112
PVH (mL-H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹ reator) ^a	Médio	84,2	43,9	0,0	331,4	0,0	526,8	0,0	391,0
	Máximo	509,5	76,7	0,0	525,3	0,0	1023	0,0	918,2
Y _{1 H2} (mol-H ₂ .mol ⁻¹ carboidratos total) ^a	Médio	0,6	0,3	0,0	1,1	0,0	1,4	0,0	0,6
	Máximo	3,2	0,7	0,0	1,7	0,0	2,4	0,0	1,4
Y _{2 H2} (mL-H ₂ .L ⁻¹ vinhaça) ^a	Médio	84,2	43,0	0,0	226,9	0,0	277,8	0,0	128,3
	Máximo	509,5	75,2	0,0	359,6	0,0	516	0,0	301,4
Y _{3 H2} (mmol-H ₂ .g-DQO _t ⁻¹ convertida) ^a	Médio	0,3	0,2	0,0	0,9	0,0	1,0	0,0	0,4
	Máximo	1,8	0,5	0,0	1,6	0,0	2,5	0,0	1,0
Y _{4 H2} (mmol-H ₂ .g-DQO _s ⁻¹ convertida) ^a	Médio	2,5	0,7	0,0	1,9	0,0	1,8	0,0	0,8
	Máximo	18,5	4,8	0,0	4,7	0,0	5,7	0,0	1,7

a. Condições padrão para temperatura e pressão (0 °C e 1 atm); b. Dados apresentados no item 4.3; c. Por motivos estratégicos os reatores RM 16, RM 12 e RM 8 foram operados por 15 dias, período de estabilização, com base na conversão dos carboidratos totais.

O teste estatístico considerou os dados gerados a partir do monitoramento dos reatores termofílicos, visto que a produção contínua de hidrogênio foi observada apenas nesses reatores. Os resultados do teste de normalidade indicaram distribuição normal para as variáveis, produção de hidrogênio e rendimento de hidrogênio (Y_{H2}) e distribuição diferente da normal para a variável produção volumétrica de hidrogênio (PVH).

Para as variáveis de distribuição normal (produção de hidrogênio e Y_{H_2}) foi aplicado o teste Tukey com nível de significância de 5%. O teste indicou diferença entre os grupos, implicando que as condições ótimas experimentais para a produção de hidrogênio e Y_{H_2} foram, temperatura de 55°C; TDH de 12 h e COVa de 72,4 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Para a variável diferente da normal (PVH) foi aplicado o teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. O teste indicou que a produção volumétrica de hidrogênio foi igual para os RT 16, RT 12 e RT 8.

Vale ressaltar que as variáveis: produção de hidrogênio e Y_{H_2} são mais utilizadas em termos de rendimento de processo e de investigação científica. Por outro lado, a variável PVH é geralmente adotada em dimensionamento e projetos.

Logo, as condições: temperatura de 55°C; TDH de 8 h; e COVa de 108,6 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ resultariam em reatores de menor volume capazes de produzir hidrogênio por litro de reator igual, estatisticamente, às condições impostas nos RT 16 e RT 12.

Como forma de identificar uma COVa ótima (entre 72,4 e 108,6 kg DQO.m⁻³.d⁻¹), que forneça valores máximos de Y_{H_2} e PVH, uma função polinomial foi ajustada aos dados experimentais (Y_{H_2} : $y = -2,9 + 0,11924x - 8,77568E-4x^2 + 7,02673E-7x^3$ $R^2 = 1$; PVH: $y = -557,1 + 13,62x + 0,14x^2 - 0,00176x^3$ $R^2 = 1$) (Figura 5.11).

Em seguida, as funções foram derivadas e valores máximos para Y_{H_2} e PVH foram obtidos. Logo, foi observado que as condições: TDH de 10 h e COVa de 84,2 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ resultariam na diminuição do TDH em 2 h e no aumento da PVH em 9,2%, sob o mesmo rendimento, em relação aos dados obtidos no monitoramento do RT 12 (melhor condição da Etapa 2).

Figura 5.11 - Ajuste polinomial de ordem 3. A. Relação Rendimento de hidrogênio ($Y_{1 H_2}$) e COVa. B. Relação Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e COVa.

5.2.3. Abordagem geral sobre a produção de hidrogênio na Etapa 2

Ao contrário da condição mesofílica, foi possível produzir hidrogênio continuamente, a partir da vinhaça em condição termofílica (55°C).

Considerando a hipótese III (excesso de nutriente favorece o crescimento excessivo da biomassa), a estratégia operacional adotada nesta etapa, foi capaz de diminuir o rendimento da biomassa, redirecionando a via metabólica do hidrogênio para a produção na forma de biogás e não para a assimilação e crescimento celular, conforme discutido na Etapa 1.

Essa hipótese foi sustentada novamente pela análise do comportamento hidrodinâmico dos APBR em diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa), que foi realizada no início e no final da operação, sem biomassa e com biomassa, respectivamente, e cujo o erro dos ensaios variou de 0,6 a 5,2% (Figura 5.12 e Tabela 5.7)

Figura 5.12 - Curva E obtida em ensaios do tipo degrau para TDH médio dos reatores mesofílicos e termofílicos, em início e fim de operação (Etapa 2). A. TDH - 24 h; B. TDH - 16 h; C. TDH - 12 h; e D. TDH - 8 h.

A diminuição do TDH real no final da operação dos reatores foi associada à perda de volume útil do reator, resultante da grande geração de biomassa no sistema em um curto período de tempo (30 dias para RM 24 e demais reatores termofílicos e um período de 15 dias para RM 16, RM 12 e RM 8) (Tabela 5.7).

Tal mudança pode ser confirmada a partir do ajuste das curvas experimentais em modelo uni-paramétrico (N-CSTR em série), no qual, o crescimento em excesso da biomassa nos reatores mesofílicos, implicou na mudança de regime de escoamento dos reatores (regime pistonado para o mais próximo do regime de mistura completa). Em contraste, nos reatores termofílicos, a mudança do regime de escoamento, ocasionada pelo crescimento da biomassa não foi tão expressiva. No entanto, em uma operação a longo prazo, o crescimento natural da biomassa possivelmente implicará na diminuição da carga orgânica específica, interferindo de forma negativa na produção de hidrogênio (Hipótese IV).

Dessa forma, estratégias operacionais tais como, frequência e formas de descarte, por retro lavagem ou gravidade, e/ou modificações na configuração do APBR (leito ordenado em coluna) devem ser consideradas em pesquisas futuras.

Tabela 5.7 - Resumo com os principais dados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos dos reatores submetidos a diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa) (Etapa 2).

Reatores	Início de operação		Final de operação	
	$\Theta_{h_{início}}$	N-CSTR em série	$\Theta_{h_{início}}$	N-CSTR em série
RM 24 ^a	24,8	57	20,2	2
RT 24			22,7	132
RM 16	16,1	356	14,4	1
RT 16			15,1	745
RM 12	11,4	419	9,7	13
RT 12			10,9	419
RM 8	7,6	607	6,3	43
RT 8			7,0	241

a. Dados apresentados no *item 4.3*;

Nas Tabelas 5.8 e 5.9 são apresentados os valores para o balanço de massa dos reatores submetidos a diferentes condições operacionais (temperatura, TDH e COVa). O balanço de massa foi realizado com base na DQO afluenta e efluente e na DQO equivalente do gás hidrogênio (8 g-DQO.g⁻¹H₂ a 25°C e 55°C) e da biomassa efluente (1,42 g-DQO.g⁻¹SSV) (*item 4.7*). Os produtos detectados pelos métodos analíticos aplicados representaram de 62,5% a 78,9%, do valor total da DQO medida, sendo que a contribuição no balanço de massa referente à produção de hidrogênio e à biomassa gerada nos reatores foi de aproximadamente 0% e 14,3%, respectivamente, nos reatores mesofílicos, e 0,5% e 5,1%, respectivamente, nos reatores termofílicos. Apesar de ter sido observado a presença de biomassa em suspensão na zona de alimentação, valores superiores a 97% da fração correspondente a biomassa esteve presente no leito reacional em todos os reatores, indicando que os reatores APBR atuaram como reatores de biomassa aderida.

Além da redução no rendimento da biomassa observada nos reatores termofílicos (65,8%) em relação à condição mesofílica, outras vantagens da condição termofílica são relatadas na literatura, tais como, fatores como maior eficiência na hidrólise dos sólidos particulados, redução do efeito inibitório da alta pressão parcial do hidrogênio pela redução da solubilidade do biogás e resistência à contaminação por microrganismos autóctones e MNPH (Talabardon *et al.* 2000; Zabranska *et al.* 2000; Weiland, 2010).

Tabela 5.8 - Balanço de massa dos reatores mesofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

Variáveis mensuradas	RM 24 ^a	RM 16	RM 12	RM 8
DQO _t afluente (g.L ⁻¹)	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	21,1 ± 3,9	21,9 ± 3,5	22,8 ± 3,7	23,7 ± 3,2
Q _{H2} (L.d ⁻¹)	0,21 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Q _{H2} (g-DQO.d ⁻¹) ^b	0,15 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
SSV _{efluente} (g-DQO.L ⁻¹) ^c	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,0
Massa do material suporte (g)	1674 ± 0,0	1670 ± 0,0	1674 ± 0,0	1673 ± 0,0
SSV _{aderido} (mg.g ⁻¹ suporte)	124,6 ± 0,02	94,0 ± 0,0	90,7 ± 0,0	88,0 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-VSS.run ⁻¹)	208,6 ± 0,0	157 ± 0,0	151,8 ± 16,7	147,2 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-VSS.d ⁻¹)	7 ± 0,0	10,5 ± 0,0	10,1 ± 1,1	9,8 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-DQO.d ⁻¹) ^c	9,9 ± 0,0	14,9 ± 0,0	14,4 ± 1,6	13,9 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.L ⁻¹)	11,1 ± 0,2	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.run ⁻¹)	5,6 ± 0,1	4,1 ± 0,0	3,9 ± 0,1	3,4 ± 0,1
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.d ⁻¹)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-DQO.d ⁻¹) ^c	0,26 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
† (%) ^d	76,4	78,9	78,4	77,7

a. Dados apresentados no item 5.4; b. Baseado em 8 g-DQO.g⁻¹H₂; c. Baseado em 1.42 g-DQO.g⁻¹SSV; d. Balanço de massa (%) = ((DQOs efluente (gDQO.d⁻¹) + H₂ (gDQO.d⁻¹) + SSV efluente (gDQO.d⁻¹) + SSV_{aderida} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{zona alimentação} (gDQO.d⁻¹)/(DQOt afluente (gDQO.d⁻¹)).

Tabela 5.9 - Balanço de massa nos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

Variáveis mensuradas	RT 24	RT 16	RT 12	RT 8
DQO _t afluente (g.L ⁻¹)	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	19,6 ± 3,2	20,0 ± 1,7	20,9 ± 3,1	22,1 ± 2,2
Q _{H2} (L.d ⁻¹)	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,6
Q _{H2} (g-DQO.d ⁻¹) ^a	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,5	0,6 ± 0,4
SSV _{efluente} (g-DQO.L ⁻¹) ^b	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,3
Massa do material suporte (g)	1674 ± 0,0	1674 ± 0,0	1677 ± 0,0	1675 ± 0,0
SSV _{aderido} (mg.g ⁻¹ suporte)	30,1 ± 0,0	32,6 ± 0,0	35,7 ± 0,0	37 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-VSS.run ⁻¹)	50,4 ± 0,0	54,7 ± 0,0	59,8 ± 0,0	61,9 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-VSS.d ⁻¹)	1,7 ± 0,0	1,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	2,1 ± 0,0
SSV _{aderido} (g-DQO.d ⁻¹) ^b	2,4 ± 0,0	2,6 ± 0,0	2,8 ± 0,0	2,9 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.L ⁻¹)	2,5 ± 0,2	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.run ⁻¹)	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.d ⁻¹)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
SSV _{z. alimentação} (g-DQO.d ⁻¹) ^b	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
† (%) ^c	67,4	64,4	62,5	62,5

a. Baseado em 8 g-DQO.g⁻¹H₂; b. Baseado em 1.42 g-DQO.g⁻¹SSV; c. Balanço de massa (%) = ((DQOs efluente (gDQO.d⁻¹) + H₂ (gDQO.d⁻¹) + SSV efluente (gDQO.d⁻¹) + SSV_{aderida} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{zona alimentação} (gDQO.d⁻¹)/(DQOt afluente (gDQO.d⁻¹)).

Destacando a redução da solubilidade do biogás e a microaeração do sistema, conforme discutido na Etapa 1, muito possivelmente a condição termofílica diminuiu a interferência negativa do oxigênio no sistema (inibição dos MPH e crescimento de MNPH), possibilitando a produção contínua de hidrogênio em todos os reatores a 55°C.

5.2.4. Avaliação dos produtos intermediários

Apesar de ter sido observada produção pontual de hidrogênio no RM 24 e produção nula de hidrogênio nos RM 16, RM 12 e RM 8, altas concentrações de compostos orgânicos de interesse comercial foram produzidas (Tabela 5.10).

Os valores para as concentrações de ácidos orgânicos voláteis (AOV) do RM 8, por exemplo, foram similares aos reportados por Bengtsson *et al.* (2008). Esses autores avaliaram a produção de AOV em sistemas de fermentação contínua alimentados com soro de queijo (pH e TDH de 5,2 e 48 h, respectivamente) e efluente do processamento de papel (pH e TDH de 5,7 e 48 h, respectivamente). Contudo, o TDH aplicado em RM 8 foi seis vezes menor comparando com as condições operacionais impostas por esses autores.

Tabela 5.10 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO_s para os reatores mesofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

Variáveis mensuradas	RM 24 ^a	RM 16	RM 12	RM 8
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	21,1 ± 3,9	21,9 ± 3,5	22,8 ± 3,7	23,7 ± 3,2
MeOH(g.L ⁻¹)	0,08 ± 0,0	0,0	0,0	0,0
EtOH(g.L ⁻¹)	0,16 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
AcH (g.L ⁻¹)	0,86 ± 0,5	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,3	2,3 ± 0,7
PrH (g.L ⁻¹)	1,45 ± 0,7	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,3	1,5 ± 1,0
BuH (g.L ⁻¹)	1,24 ± 0,5	1,6 ± 0,5	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,8
VaH(g.L ⁻¹)	0,34 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1
CaH(g.L ⁻¹)	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
AOV + solventes (gDQO.L ⁻¹)	6,42 ± 3,2	6,34 ± 1,81	6,74 ± 1,2	9,71 ± 3,9
Carboidratos efluente (g.L ⁻¹)	1,29 ± 0,7	0,98 ± 0,3	1,08 ± 0,4	1,29 ± 0,7
Carboidratos efluente (gDQO.L ⁻¹)	1,44 ± 0,8	1,1 ± 0,3	1,21 ± 0,4	1,44 ± 0,7
t_{solúvel} (%)	37,3	34	34,8	47,1

a. Dados apresentados no item 5.4;

Tanto nos reatores mesofílicos quanto nos reatores termofílicos, a produção de hidrogênio pela fermentação do tipo acetato/butirato (fermentação essencialmente em pH 5-6 – Equação 5.1 e 5.2 – item 5.1.4) foi dominante (Tabela 5.11). Ao mesmo tempo, houve uma pequena contribuição da fermentação do tipo

acetato/etanol (produção de ácido acético e etanol simultaneamente com a produção de H_2 e CO_2 – Equação 5.3 – item 5.1.4), mesmo em pH superior a 4,5. (Das & Veziroglu, 2001).

Outra via metabólica observada foi a do ácido propiônico, que de acordo com a equação estequiométrica proposta por Antonopoulou *et al.* (2008), a produção do ácido propiônico é desfavorável para a produção de hidrogênio, pois para cada mol de ácido propiônico produzido, dois moles de hidrogênio são consumidos (Equação 5.4 – item 5.1.4). Além disso, essa via metabólica (produção de ácido propiônico) esteve presente em todos os reatores, fato que contribuiu também para a baixa produção de hidrogênio.

Tabela 5.11 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO_s para os reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

Variáveis mensuradas	RT 24	RT 16	RT 12	RT 8
DQO_s efluente ($g.L^{-1}$)	$19,6 \pm 3,2$	$20,0 \pm 1,7$	$20,9 \pm 3,1$	$22,1 \pm 2,2$
MeOH($g.L^{-1}$)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
EtOH($g.L^{-1}$)	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
AcH ($g.L^{-1}$)	$2,0 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$
PrH ($g.L^{-1}$)	$0,8 \pm 0,5$	$1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$
BuH ($g.L^{-1}$)	$0,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,6$
VaH($g.L^{-1}$)	$0,4 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$
CaH($g.L^{-1}$)	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
AOV + solventes ($gDQO.L^{-1}$)	$6,7 \pm 2,75$	$7,64 \pm 2,2$	$8,93 \pm 2,7$	$10,1 \pm 1,82$
Carboidratos efluente ($g.L^{-1}$)	$1,32 \pm 0,6$	$0,98 \pm 0,3$	$1,08 \pm 0,4$	$1,29 \pm 0,7$
Carboidratos efluente ($gDQO.L^{-1}$)	$1,62 \pm 0,8$	$1,23 \pm 0,38$	$1,35 \pm 0,5$	$1,62 \pm 0,9$
$t_{solúvel}$ (%)	42,6	44,3	49,2	53,2

A produção teórica de hidrogênio com base na produção dos AOV considerou as principais vias metabólicas (fermentação tipo AcH/BuH e fermentação via PrH) nos reatores termofílicos (Tabela 5.12).

Os valores para a produção de hidrogênio foram bem menores em comparação com a produção teórica de hidrogênio a partir dos AOV ($\approx 17\%$). Ueno *et al.* (2007) mencionam que para se maximizar a produção biológica de hidrogênio é necessário diminuir a quantidade de produtos orgânicos, ou seja, minimizar a distribuição de elétrons. Entretanto, essa tarefa pode ser extremamente difícil, visto que o efluente industrial em questão apresenta uma composição altamente complexa.

Tabela 5.12 - Produção teórica de hidrogênio baseada na produção dos AOV dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

Reator	Q_{H_2} a 55°C (L-H ₂ .d ⁻¹)	Produção teórica de hidrogênio (L-H ₂ .d ⁻¹)			Produção teórica total de hidrogênio - PTH (L-H ₂ .d ⁻¹)	Relação Q_{H_2}/PTH (%)
		AcH	BuH	PrH		
RM 24	0,09	4,1	0,6	- 0,6	4,2	2,2
RM 16	0,77	4,5	1,3	- 1,0	4,9	15,9
RM 12	1,23	7,0	2,1	- 1,5	7,5	16,4
RM 8	0,89	4,9	6,1	- 2,5	8,5	10,5

Em contrapartida, Lee *et al.* (2010) reportam que o aumento do rendimento de bioenergia de 17% para valores superiores a 80% pode ocorrer por meio da integração de um sistema microbiológico capaz de converter os produtos orgânicos solúveis em água para uma maior produção de energia útil, ao mesmo tempo que permite enquadrar o efluente às normas ambientais. Esses autores ainda acrescentam que o sistema metanogênico, as células microbianas (MEC – *Microbial Electrolysis Cell*) ou o sistema fototrófico anóxico podem ser opções de pós-tratamento. Outra opção seria a o melhoramento da tecnologia de coleta rápida e eficiente do gás H₂, assim que produzido.

Visto que neste trabalho foi monitorada apenas a concentração de carboidratos totais _{efluente}, AOV e solventes, e que os demais compostos solúveis como glicerol, melanoidinas entre outros, não foram monitorados, baixos valores (entre 34% e 53,2%) para o fechamento do balanço de massa da DQO _s foram observados (Tabelas 5.10 e 5.11).

5.2.5. Estrutura e dinâmica dos microrganismos termofílicos envolvidos na produção de hidrogênio

Análise de T-RFLP – Os microrganismos aderidos e nos interstícios do leito dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa foram organizados em dendogramas com base no índice estatístico de Jaccard (presença e ausência dos microrganismos) (Figura 5.13A).

Dois grupos foram identificados. O primeiro agrupamento considerou os reatores (RT 8 e RT 12) com 56% de similaridade. Esse ramo, por sua vez, apresentou similaridade de 19% e 11% com os reatores RT 16 e RT 24, respectivamente. A baixa similaridade

entre os reatores confirma a influência das diferentes condições operacionais na seleção de microrganismos envolvidos na produção de hidrogênio (Figura 5.13B).

O agrupamento dos dados da análise de T-RFLP em matriz bidimensional (mapa de calor) possibilitou a visualização do número, tamanho e posição dos fragmentos de terminal marcado ou cepas, que compuseram o perfil de amostra de cada reator. O número de cepas foi também associado à abundância relativa dos microrganismos, cuja abundância foi diretamente proporcional à produção de hidrogênio (RT 12 > RT 8 > RT 16 > RT 24), reafirmando os dados do monitoramento.

Figura 5.13 - Análise de T-RFLP dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2). A. Análise de cluster por meio do índice estatístico de Jaccard. B. Análise da abundância relativa em matriz bidimensional.

Esses dados são corroborados por meio da avaliação do número de cópias da enzima *Fe-Fe hydrogenase* (Figura 5.14). O número de cópias dessa enzima aumentou com o aumento da COVa entre 36,2 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ e 72,4 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹. Porém, observou-se um decréscimo de aproximadamente 52,8% no número de cópias da enzima *Fe-Fe hydrogenase*, quando a COVa foi de 108,6 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹.

Considerando que as amostras destinadas as análises de T-RFLP e PCR em tempo real foram as mesmas, o decréscimo do número de cópias da enzima *Fe-Fe hydrogenase* não pôde ser associado à inibição da mesma, pois a similaridade entre as amostras (RT 8 e RT 12) foi relativamente baixa (56%). Logo, a diminuição dos valores de produção e rendimento de hidrogênio resultou da seleção dos microrganismos.

Figura 5.14 - Número de cópias do gene funcional *Fe-Fe hydrogenase* (*Fe-hyd*) nos dias 10, 20 e 30 de operação dos reatores termofílicos submetidos a diferentes TDH e COVa (Etapa 2).

5.3. ETAPA 3 – Identificação da melhor faixa de TDH e COVa para a produção de CH₄ em sistemas de estágio único e combinado, em condição termofílica (55°C)

Nesta etapa a produção de metano a partir da vinhaça da cana de açúcar foi avaliada no processo de digestão anaeróbia em sistema único (UASB I) e em sistema combinado (APBR / UASB II), investigando o efeito da fase acidogênica com a produção de hidrogênio para a produção de metano em reatores contínuos em condição termofílica (55°C).

A operação dos sistemas em paralelo (Sistema único vs. Sistema combinado) permitiu também avaliar a hipótese presente em Reith *et al.* (2003), de que “a separação de fases causa efeito negativo no rendimento do metano, partindo do pressuposto de que o metano produzido na fase metanogênica não é enriquecido pelo hidrogênio produzido na fase acidogênica”.

5.3.1. Desempenho do reator APBR

O APBR preenchido com partículas de polietileno de baixa densidade foi monitorado por um período de 60 dias sob um TDH de 10,2 h, conforme definido na etapa anterior como condição ótima e COVa de $84,2 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

Durante o período experimental, o valor médio do pH afluente e efluente do APBR foi de $6,5 \pm 0,1$ e $5,5 \pm 0,3$, respectivamente (Figura 5.15A). O valor do pH efluente foi característico de sistemas fermentativos aplicados a produção de hidrogênio (pH $\approx 5,5$).

A conversão média da matéria orgânica, expressa na forma de DQO_t, DQO_s e carboidratos totais, foi estável e apresentou valores iguais a $31,3 \pm 4,5\%$, $19,2 \pm 5,0\%$ e $73 \pm 2,1\%$ respectivamente (Figura 5.15B).

Figura 5.15 - Variação temporal do pH afluente e efluente (A); Conversão da matéria orgânica, expressa em DQO total, DQO solúvel e carboidratos totais (B) ao longo do período experimental do APBR (Etapa 3).

5.3.2. Produção de hidrogênio

Os valores para TDH e COVa (10 h e $84,2 \text{ kg-DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) obtidos a partir da função polinomial ajustada a partir dos dados experimentais da Etapa II foram impostos na operação do APBR na Etapa 3. Os mesmos foram capazes de aumentar a produção (PVH) e o $Y_{1 \text{ H}_2}$ em 18,2% e 14,2%, respectivamente, em relação aos dados obtidos no monitoramento do RT 12 (melhor condição da Etapa 2, ver item 5.2.2.) (Figura 5.16,

Figura 5.17 e Tabela 5.13). Esses valores foram superiores aos esperados pelo modelo que previa aumento de apenas 9,2% na PVH, sob o mesmo Y_{1H2} .

A composição do biogás apresentou valor médio de hidrogênio de aproximadamente $38,7 \pm 11,8\%$ (dados não apresentados). Além disso, durante o período experimental, não foi observado metano na composição do biogás, indicando que o tipo de inoculação aplicada (efluente fermentado) foi viável para o sistema acidogênico.

Figura 5.16 - Variação temporal da Produção de hidrogênio e da Produção Volumétrica de Hidrogênio (PVH) ao longo do período experimental do reator APBR (Etapa 3).

Figura 5.17 - Variação temporal do rendimento de hidrogênio (Y_{H2}) ao longo do período experimental do reator APBR (Etapa 3).

Entretanto, instabilidade na produção de hidrogênio foi observada a partir do 46º dia de operação, quando a produção de hidrogênio diminuiu alcançando valores nulos no 60º dia de operação. Esse evento retoma ao grande desafio na produção biológica de hidrogênio, cujo real motivo para o decaimento da produção de hidrogênio ao longo do tempo ainda não foi totalmente elucidado (Lima Fonte & Zaiat, 2012; Penteado *et al.* 2013).

Após o 60º dia de operação do APBR, o reator continuou sendo alimentado apenas para fornecer efluente acidificado para o UASB II, sendo que as concentrações para DQO t e a DQO s continuaram sendo determinadas para fins de cálculo da COV a ao UASB II.

Tabela 5.13 - Resumo com os principais dados obtidos no monitoramento do APBR (Etapa 3).

Variáveis e parâmetros	Valor	Condições operacionais
		TDH – 10 h
		COV a – 84,2 kg-DQO.m ⁻³ .d ⁻¹
pH	Médio	5,5
Conversão DQO t (%)	Médio	31,3
	Máximo	46,3
Conversão DQO s (%)	Médio	19,2
	Máximo	46,3
Conversão carboidratos totais (%)	Médio	73
	Máximo	87,8
Conteúdo de H ₂ no biogás (%)	Médio	38,7
	Máximo	91,1
$\dot{V}_{H_2}$ (mmol-H ₂ .d ⁻¹) ^a	Médio	70,3
	Máximo	154,9
Q _{H2} (mL-H ₂ .d ⁻¹) ^a	Médio	1677,7
	Máximo	5252,6
PVH (mL-H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹ _{reator}) ^a	Médio	761,7
	Máximo	2283,8
$Y_{1 H_2}$ (mol-H ₂ .mol ⁻¹ _{carboidratos total}) ^a	Médio	1,6
	Máximo	3,7
$Y_{2 H_2}$ (mL-H ₂ .L ⁻¹ _{vinhaça}) ^a	Médio	12,7
	Máximo	28,1
$Y_{3 H_2}$ (mmol-H ₂ .g-DQO _t ⁻¹ _{convertida}) ^a	Médio	1,1
	Máximo	2,7
$Y_{4 H_2}$ (mmol-H ₂ .g-DQO _s ⁻¹ _{convertida}) ^a	Médio	3,2
	Máximo	9,6

a. Condições padrão para temperatura e pressão (0 °C e 1 atm).

5.3.3. Remoção de DQO e Produção de metano em sistema único (UASB I) e combinado (UASB II)

A operação dos reatores UASB I (sistema único) e UASB II (sistema combinado) foi dividida em quatro fases (Figura 5.18A). Durante os 27 primeiros dias foi aplicado uma COVa inicial de $15 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (fase I), visto que a alcalinidade parcial do meio (alcalinidade ao bicarbonato) não foi capaz de manter o reator tamponado na fase I, uma fonte externa de tamponamento foi adicionada (fase II), sendo mantida a COVa de $15 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Devido a esse problema operacional, as fases I e II foram consideradas fases de adaptação. Durante as fases III e IV, a COVa aos reatores foi aumentada para $20 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e $25 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

Além disso, é importante mencionar que o início da operação do UASB II considerou a estabilidade operacional do APBR, com base na curva de eficiência de conversão da DQO total, variável adotada para o cálculo de COVa (valor fixo para os reatores UASB I e UASB II). Logo, a partida desse reator (UASB II) iniciou a partir do 13º dia de operação do APBR, quando o desvio padrão da concentração efluente da DQO_t foi de 1,8.

O aumento da COVa por meio da redução do TDH dos reatores metanogênicos e a adição de NaHCO_3 ao afluente do UASB I (sistema único) e II (sistema combinado) apresentaram forte influência na remoção da matéria orgânica.

Na fase I os valores do pH efluente do UASB I e II foram de $5,7 \pm 0,3$ e $6,5 \pm 0,3$, respectivamente, indicando acidificação do reator e resultando na redução da eficiência de remoção de DQO_t e DQO_s . Após ajuste do pH afluente (entre 6,8 e 7,2), por meio da adição de NaHCO_3 , os valores do pH efluente do UASB I e II compreenderam a faixa entre 8,3 e 8,5 (Figuras 5.18B e 5.18C), refletindo no aumento da eficiência de remoção da DQO_t e DQO_s .

Figura 5.18 - Variação temporal da COVa (A); pH efluente (B); alcalinidade parcial (C); Remoção de DQO total (D) e DQO solúvel (E) ao longo do período experimental dos UASB I e II (Etapa 3).

Considerando apenas os reatores metanogênicos (UASB I e II), a eficiência de remoção da DQO_t e da DQO_s foi similar e aumentou com o aumento da COVa ($15 - 25 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), alcançando valores de $60,7 \pm 0,3\%$ e $72,6 \pm 1,2\%$ (UASB I) e $63,0 \pm 1,5\%$ e $72,6 \pm 1,7\%$ (UASB II), respectivamente, ao final da operação (Figuras 5.18D e 5.18E).

Entretanto, avaliando os sistemas de tratamento (único e combinado) foi observada eficiência de remoção da DQO_t e DQO_s de $74,6 \pm 0,3\%$ e $96,1 \pm 1,7\%$, respectivamente, ao final da operação do sistema combinado. Esses valores são superiores aos observados no sistema único (Figuras 5.18D e 5.18E).

A concentração dos carboidratos totais efluente foi inferior a 15 mg.L^{-1} (valor mínimo detectado pelo método), indicando que a conversão dos carboidratos para ambos os reatores foi superior a 98,5% (dados não apresentados).

O aumento da COVa por meio da redução do TDH dos reatores metanogênicos e a adição de NaHCO_3 ao afluente do UASB I e II apresentaram forte influência na produção de metano (Figura 5.19).

Após adição de NaHCO_3 ao afluente do UASB I e II (fase II), a composição de metano compondo o biogás aumentou de 17% (ambos reatores) para 61% (UASB I) e 68,8% (UASB II) (Tabela 5.14).

Figura 5.19 - Variação temporal da COVa (A); Produção Volumétrica de Metano – PVM (B); e rendimento de metano MY – (C e D) ao longo do período experimental dos reatores UASB I e II (Etapa 3).

A produção e o rendimento de metano aumentaram com o aumento da COVa entre 15 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ e 25 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ (Figura 5.19A - 5.19D). Além disso, a produção volumétrica de metano foi superior no sistema combinado, indicando que a separação da fase acidogênica aumentou a extração de energia do processo.

Considerando o rendimento teórico máximo de metano por grama de DQO (348,7 mL-CH₄.g⁻¹DQO) e o rendimento médio obtido no final dos experimentos (UASB I – 234,2 mL-CH₄.g⁻¹DQO e UASB II- 306 mL-CH₄.g⁻¹DQO), é possível confirmar que a extração de energia no sistema combinado aumentou 20% em comparação com o sistema único (Tabela 5.14).

Tabela 5.14 - Resumo com os principais dados obtidos no monitoramento dos reatores UASB I e UASB II (Etapa 3).

Variáveis mensuradas	Valores	Condições operacionais							
		UASB I				UASB II			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
pH	Médio	5,7	8,3	8,4	8,4	6,5	8,3	8,4	8,5
Remoção DQO _t (%)	Médio	23,1	50,2	58,7	60,7	22	38,8	59,4	63
	Máximo	24,1	54	62,8	62,8	29,3	41,3	61,2	65,7
Remoção DQO _s (%)	Médio	24,7	58,2	68,7	74,2	40,2	59,6	67,1	72,6
	Máximo	32,6	60,1	70,2	78,2	50,7	63,6	67,9	74,9
Remoção carboidratos totais (%)	Médio	>98,5	>98,5	>98,5	>98,5	>98,5	>98,5	>98,5	>98,5
Conteúdo de CH ₄ no biogás (%)	Médio	17,6	62,2	62,2	58,4	17,4	51,1	68	75,9
v_{CH_4} (mmol-CH ₄ .h ⁻¹) ^a	Médio	2,5	31,8	46,8	48,8	2,1	10,3	20,1	21,8
	Máximo	4,4	33,1	48,9	51,3	3,3	11,3	20,4	22,2
Q _{CH4} (mL- CH ₄ .h ⁻¹) ^a	Médio	38,8	593	869,6	905,9	38,6	192,9	352,7	380,6
	Máximo	24,5	616,9	933,8	966,2	136,5	210,9	380,6	413,8
PVM (mL- CH ₄ .h ⁻¹ .L ⁻¹ _{reator}) ^a	Médio	3,8	57,6	84,4	87,9	11,5	57,2	104,7	116,8
	Máximo	23,8	59,9	90,7	93,8	40,5	62,6	112,9	122,8
Y _{1 CH4} (mL- CH ₄ .g-DQO ⁻¹ _{removida}) ^a	Médio	26,6	178,7	225,7	234,2	91,4	227,1	293	306
	Máximo	165,6	189,5	253,9	250,9	198,4	283,6	305,5	316
Y _{2 CH4} (mL- CH ₄ .L ⁻¹ _{vinhaça}) ^a	Médio	212,3	3242	3588	2952	443	2215	3162	2778
	Máximo	447	3373	3737	3168	698	2422	3273	2854

a. Condições padrão para temperatura e pressão (0 °C e 1 atm).

Nas Tabelas 5.15 e 5.16 são apresentados os valores para o balanço de massa dos sistemas único (UASB I) e combinado (APBR / UASB II). O balanço de massa foi calculado com base na DQO afluente e efluente e na DQO equivalente do gás hidrogênio (8 g-DQO.g⁻¹H₂ a 25°C e 55°C) e da biomassa efluente (1,42 g-DQO.g⁻¹SSV) (item 4.7)

Tabela 5.15 - Balanço de massa do sistema único – UASB I (Etapa 3).

Variáveis mensuradas	UASB I			
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
DQO _t afluente (g.L ⁻¹)	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6	35,2 ± 3,6
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	19,4 ± 1,4	10,8 ± 0,5	8,1 ± 0,3	6,7 ± 0,5
Q _{CH4} (L.d ⁻¹)	0,9 ± 1,3	14,2 ± 0,4	20,9 ± 1,1	21,7 ± 1,2
Q _{CH4} (g-DQO.d ⁻¹) ^a	2,6 ± 3,7	40,7 ± 1,1	59,9 ± 3,2	62,2 ± 3,4
SSV _{efluente} (g-DQO.L ⁻¹) ^b	11,8 ± 0,3	11,4 ± 0,8	13,3 ± 1,6	14,6 ± 0,6
† (%) ^c	90,3	89,4	89,9	84,7

a. Baseado em 4 g-DQO.g⁻¹CH₂; b. Baseado em 1.42 g-DQO.g⁻¹SSV; d. Balanço de massa (%) = ((DQOs_{efluente} (gDQO.d⁻¹) + CH₄ (gDQO.d⁻¹) + SSV_{efluente} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{aderida} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{zona alimentação} (gDQO.d⁻¹)/(DQOt_{afluente} (gDQO.d⁻¹)).

Tabela 5.16 - Balanço de massa do sistema combinado – APBR / UASB II (Etapa 3).

Variáveis mensuradas	APBR	UASB II			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
DQO _t afluente (g.L ⁻¹)	35,2 ± 3,6	24,2 ± 1,8	24,2 ± 1,8	24,2 ± 1,8	24,2 ± 1,8
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	20,9 ± 1,8	12,5 ± 1,7	8,4 ± 0,7	6,9 ± 0,2	5,7 ± 0,4
Q _{H2} (L.d ⁻¹) ^a	1,7 ± 1,1	-	-	-	-
Q _{H2} (g-DQO.d ⁻¹)	1,2 ± 0,8	-	-	-	-
Q _{CH4} (L.d ⁻¹)	-	0,9 ± 0,4	4,6 ± 0,3	8,5 ± 0,7	9,7 ± 0,2
Q _{CH4} (g-DQO.d ⁻¹) ^b	-	2,6 ± 1,1	13,2 ± 0,9	24,4 ± 2	27,8 ± 0,6
SSV _{efluente} (g-DQO.L ⁻¹)	1,2 ± 0,8	8,9 ± 1,1	9,4 ± 0,7	8,4 ± 0,9	8,8 ± 0,6
Massa do material suporte (g)	1683	-	-	-	-
SSV _{aderido} (mg.g ⁻¹ suporte)	41	-	-	-	-
SSV _{aderido} (g-VSS.run ⁻¹)	69 ± 0,0	-	-	-	-
SSV _{aderido} (g-VSS.d ⁻¹)	1,2 ± 0,0	-	-	-	-
SSV _{aderido} (g-DQO.d ⁻¹) ^c	1,6 ± 0,0	-	-	-	-
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.L ⁻¹)	3,3 ± 0,1	-	-	-	-
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.run ⁻¹)	1,7 ± 0,1	-	-	-	-
SSV _{z. alimentação} (g-SSV.d ⁻¹)	0,1 ± 0,0	-	-	-	-
SSV _{z. alimentação} (g-DQO.d ⁻¹) ^c	0,1 ± 0,0	-	-	-	-
† (%) ^d	64,3	93,5	99,6	99,3	93

a. Baseado em 8 g-DQO.g⁻¹H₂; b. Baseado em 4 g-DQO.g⁻¹CH₂; c. Baseado em 1.42 g-DQO.g⁻¹SSV; d. Balanço de massa (%) = ((DQOs_{efluente} (gDQO.d⁻¹) + H₂ ou CH₄ (gDQO.d⁻¹) + SSV_{efluente} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{aderida} (gDQO.d⁻¹) + SSV_{zona alimentação} (gDQO.d⁻¹)/(DQOt_{afluente} (gDQO.d⁻¹)).

Os produtos detectados pelo métodos analíticos aplicados representaram de 64,3% a 99,6%, do valor total da DQO medida, sendo que a contribuição no balanço de massa referente à produção de hidrogênio e à biomassa gerada no reator APBR foi de aproximadamente 0,6% e 4,3%, respectivamente. Apesar de ter sido observada a presença de biomassa em suspensão na zona de alimentação, valor superior a 97,5% da fração correspondente a biomassa esteve presente no leito reacional, indicando que o reator APBR atuou como reator de biomassa aderida.

Em contraste, nos reatores metanogênicos (UASB I e II) a contribuição no balanço de massa referente à produção de metano e à biomassa foi de aproximadamente 30% e 35%, respectivamente.

5.3.4. Avaliação dos produtos intermediários

A produção de hidrogênio pela fermentação do tipo AcH/BuH (fermentação essencialmente em pH 5-6 – Equação 5.1 e 5.2 – *item 5.1.4*) foi dominante na operação do APBR (TDH 10 h e COVa de 84,2 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹) (Tabela 5.17).

Outra via metabólica observada foi a do ácido propiônico que, de acordo com a equação estequiométrica proposta por Antonopoulou *et al.* (2008) é desfavorável para a produção de hidrogênio, pois para cada mol de ácido propiônico produzido, dois moles de hidrogênio são consumidos, fato que contribuiu também para a baixa produção de hidrogênio (Equação 5.4 - *item 5.1.4*).

Conforme mencionado no *item 5.2.4*, os valores para as concentrações de ácidos orgânicos voláteis (AOV) do APBR foram similares aos reportados por Bengtsson *et al.* (2008). Contudo, o TDH aplicado neste trabalho foi quase cinco vezes menor comparando com as condições operacionais impostas por esses autores.

Visto que neste trabalho foi monitorada apenas a concentração de carboidratos totais _{efluente}, AOV e solventes, e que os demais compostos solúveis como glicerol, melanoidinas entre outros, não foram monitorados, observou-se um baixo valor (48,5%) para o balanço de massa da DQO _{solúvel} (Tabelas 5.17).

Tabela 5.17 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO_{solúvel} do APBR (Etapa 3).

Variáveis mensuradas	APBR
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	20,9 ± 1,8
MeOH(g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0
EtOH(g.L ⁻¹)	0,08 ± 0,0
AcH (g.L ⁻¹)	2,8 ± 0,52
PrH (g.L ⁻¹)	0,7 ± 0,07
BuH (g.L ⁻¹)	2,3 ± 0,09
VaH(g.L ⁻¹)	0,21 ± 0,0
CaH(g.L ⁻¹)	0,17 ± 0,1
AOV + solventes (gDQO.L ⁻¹)	9,1 ± 1,13
Carboidratos efluente (g.L ⁻¹)	0,94 ± 0,0
Carboidratos efluente (gDQO.L ⁻¹)	1,05 ± 0,0
t_{solúvel} (%)	48,5

A produção teórica de hidrogênio com base na produção dos AOV considerou as principais vias metabólicas (fermentação tipo acetato/butirato e fermentação via propionato) (Tabela 5.18).

Tabela 5.18 - Produção teórica de hidrogênio baseada na produção dos AOV do APBR (Etapa 3).

Reator	Q _{H2} a 55°C (L-H ₂ .d ⁻¹)	Produção teórica de hidrogênio (L-H ₂ .d ⁻¹)			Produção teórica total de hidrogênio - PTH (L-H ₂ .d ⁻¹)	Relação Q _{H2} /PTH (%)
		AcH	BuH	PrH		
APBR	2,11	13,7	3,8	1,1	16,4	12,8

Conforme citado no *item* 5.2.4, os valores para a produção de hidrogênio foram bem menores em comparação com a produção teórica de hidrogênio a partir dos AOV ($\approx 13\%$). Em contrapartida, a minimização da distribuição dos elétrons e o aumento do rendimento energético foram constatados nos reatores metanogênicos (UASB I e II), pois, enquanto os ácidos de cadeias maiores (butírico, valérico e capróico) foram convertidos a ácido acético, o ácido acético foi convertido a metano (aceptor final de elétrons do sistema anaeróbio) (Tabelas 5.19 e 5.20). Destaque deve ser dado ao UASB II (sistema combinado), no qual as concentrações de AOV foram menores, indicando melhor conversão a metano.

Tabela 5.19 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO_s do sistema único – UASB I (Etapa 3).

Variáveis mensuradas	UASB I			
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	19,4 ± 1,4	10,8 ± 0,5	8,1 ± 0,3	6,7 ± 0,5
MeOH(g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
EtOH(g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
AcH (g.L ⁻¹)	3,89 ± 0,06	2,25 ± 0,18	2,68 ± 0,5	2,47 ± 0,2
PrH (g.L ⁻¹)	1,76 ± 0,13	1,80 ± 0,17	1,93 ± 0,15	1,8 ± 0,09
BuH (g.L ⁻¹)	3,44 ± 0,25	2,66 ± 0,35	1,35 ± 0,28	0,82 ± 0,33
VaH(g.L ⁻¹)	0,54 ± 0,0	0,43 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,02 ± 0,0
CaH(g.L ⁻¹)	0,41 ± 0,0	0,16 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,01 ± 0,0
AOV + solventes (gDQO.L ⁻¹)	15,06 ± 0,71	11,18 ± 1,10	8,5 ± 1,2	6,91 ± 0,97
Carboidratos efluente (g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
Carboidratos efluente (gDQO.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
tsolúvel (%)	77,61	103,5	104,9	103,2

Tabela 5.20 - Concentração média dos produtos intermediários e balanço de massa para a DQO_s do sistema combinado – APBR / UASB II (Etapa 3).

Variáveis mensuradas	UASB II			
	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
DQO _s efluente (g.L ⁻¹)	12,5 ± 1,7	8,4 ± 0,7	6,9 ± 0,2	5,7 ± 0,4
MeOH(g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
EtOH(g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
AcH (g.L ⁻¹)	2,5 ± 0,34	2,59 ± 0,3	3,54 ± 0,2	3,40 ± 0,36
PrH (g.L ⁻¹)	1,20 ± 0,01	1,23 ± 0,1	1,47 ± 0,01	1,31 ± 0,01
BuH (g.L ⁻¹)	2,15 ± 0,27	1,76 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,07 ± 0,0
VaH(g.L ⁻¹)	0,26 ± 0,0	0,17 ± 0,03	0,10 ± 0,0	0,06 ± 0,0
CaH(g.L ⁻¹)	0,21 ± 0,0	0,14 ± 0,01	0,04 ± 0,0	0,03 ± 0,0
AOV + solventes (gDQO.L ⁻¹)	9,36 ± 0,87	8,47 ± 0,58	6,77 ± 0,3	5,93 ± 0,4
Carboidratos efluente (g.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
Carboidratos efluente (gDQO.L ⁻¹)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
tsolúvel (%)	75,1	100,8	98,1	103,9

Considerando que o fechamento do balanço de massa da DQO_s a partir da Fase II, para ambos os reatores, foi próximo a 100%, acredita-se que os compostos solúveis não mensurados (glicerol e melanoidinas) foram convertidos a AOV. Esse fato pode ser sustentado pelo baixo valor ($\approx 75\%$) observado para o fechamento do balanço de massa da DQO_s na Fase I, cuja fase é representada pela instabilidade do sistema. Entretanto, mesmo presumindo que os compostos acima mencionados foram convertidos a AOV, estudos de toxicidade do efluente tratado devem ser realizados.

Ainda nesse contexto, foi observado que a biodegradabilidade anaeróbia da vinhaça (BDA_{vinhaça} – Equação 4.24) aumentou de 66% (sistema único) para 87,4% (sistema combinado). Esses valores foram superiores aos reportados em Nasr *et al.* (2012) que

observaram aumento da biodegradabilidade da vinhaça filtrada de milho de 88,2% (sistema único) para 99% (sistema combinado) e reforçam a necessidade da fase acidogênica como forma de aumentar a biodegradabilidade da vinhaça de cana de açúcar.

5.3.5. Rendimento energético a partir da vinhaça

Para comparar o desempenho do sistema único (UASB I) e do sistema combinado (APBR + UASB II), além de justificar o potencial energético da vinhaça, foram realizados cálculos teóricos de conversão energética, com base nos dados obtidos neste trabalho.

Foi observado que um litro de vinhaça em um sistema único de digestão anaeróbia e fluxo contínuo gerou 36,2 W. Em contraste, um litro de vinhaça em um sistema combinado de digestão anaeróbia e fluxo contínuo gerou 45,5 W, sendo 1,5 W correspondente a produção de hidrogênio no primeiro estágio e 44,2 W, correspondente a produção de metano no segundo estágio. A partir desses dados, é possível confirmar que a extração de energia no sistema combinado aumentou 25,7% em comparação com o sistema único.

Ademais, esse valor foi superior a Nasr *et al.* (2012) que observaram um aumento de 18,5% no processo de dois estágios, em relação ao processo de estágio único, com base no valor energético do biogás (hidrogênio e metano) produzido em cada sistema, e a Luo *et al.* (2011) que observaram um aumento de 11% na eficiência energética global em um sistema combinado termofílico comparado com um sistema termofílico de estágio único.

5.3.6. Abordagem geral sobre a produção de metano em sistema único e produção simultânea de hidrogênio e metano em sistema combinado

Na perspectiva ambiental (Problemática I), a vinhaça após a fase acidogênica apresentou ácidos de cadeias curtas que facilitaram a conversão dos mesmos a metano, aumentando a eficiência de remoção da matéria orgânica total e solúvel de $60,7\% \pm 0,3$ e $72,6\% \pm 1,2$ (sistema único) para $74,6\% \pm 0,3$ e $96,1\% \pm 1,7$ (sistema combinado), respectivamente.

Em Souza *et al.* (1992), único relato disponível na literatura sobre a digestão anaeróbia da vinhaça de cana de açúcar, é reportado valor similar para remoção de DQO_t de 71,7%, quando a $COVa$ foi de $26,5 \text{ kg-DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Entretanto, não há dados disponíveis para a remoção da DQO_s .

Na perspectiva energética (Problemática II), a produção de hidrogênio não foi competitiva com a produção de metano. Todavia, o hidrogênio, em CaC , é uma fonte de energia ideal em comparação com o metano. Adicionalmente, a reação de produção de hidrogênio é rápida e conforme exposto, a inserção do primeiro estágio do sistema combinado resultou em aumento na produção e no rendimento de metano em 20% em comparação com o sistema único.

Entretanto, o desafio maior, ainda, está associado ao decaimento da produção de hidrogênio. Conforme abordado no *item 5.2.3*, o crescimento natural da biomassa, em uma operação a longo prazo, interferiu de forma negativa na produção de hidrogênio por meio da diminuição da $COVe$, ou seja, diminuição da disponibilidade de substrato, considerando uma concentração de substrato inicial constante (*Hipótese IV*).

A $COVe$ foi calculada por meio da estimativa de crescimento da biomassa acidogênica no reator APBR em função da quantidade total de substrato consumido (carboidratos totais) durante o período operacional (Figura 5.20). Vale ressaltar que para a estimativa de crescimento da biomassa acidogênica foram consideradas as concentrações da biomassa aderida e/ou intersticial, em suspensão e arrastada naturalmente pelo sistema.

Figura 5.20 - Produção de hidrogênio (mL-H₂.d⁻¹) e Carga orgânica volumétrica específica (COVe – g-Carboidratos totais.g-SV⁻¹.h⁻¹) durante o período operacional do APBR (Etapa 3).

Os valores para a COVe correspondentes ao período de produção contínua de hidrogênio compreenderam a faixa entre 0,72 e 1,38 g-Carboidratos totais.g-SV⁻¹.h⁻¹, sendo a COVe de 1,22 g-Carboidratos totais.g-SV⁻¹.h⁻¹ correspondente a máxima produção de hidrogênio (5.252,6 mL-H₂.d⁻¹). Dessa forma, estratégias operacionais tais como, frequência e formas de descarte da biomassa e/ou modificações na configuração do APBR devem ser consideradas em pesquisas futuras a fim de manter a COVe constante ($\approx 1,22$ g-Carboidratos totais.g-SV⁻¹.h⁻¹).

Adicionalmente o presente trabalho propõe outra alternativa para a implementação de um sistema com produção contínua de hidrogênio utilizando a vinhaça de cana de açúcar como substrato. Tal sistema prevê o reinício da operação e é apresentado a seguir:

A planta de produção simultânea de hidrogênio e metano é constituída por dois reatores acidogênicos (APBR) interligados a um reator metanogênico (UASB) por um *by-pass* (Figura 5.21).

Figura 5.21 - Proposta de um sistema de tratamento da vinhaça de cana de açúcar com produção contínua de hidrogênio e metano (Etapa 3). 1 e 2. Reatores acidogênicos tipo APBR. 3. Reator metanogênico tipo UASB.

Na qual, o APBR I é operado por 40 dias, sendo os 10 primeiros dias correspondentes a fase de adaptação (5 dias de recirculação interna da vinhaça fermentada mais 5 dias correspondente à fase transiente de produção de hidrogênio) e 30 dias de produção contínua de hidrogênio. Ao passo que o APBR II, é iniciado no 30º dia de operação do APBR I (fase de adaptação – 10 dias), completando o ciclo de produção contínua de hidrogênio. Ponderando que a safra da cana de açúcar equivale a um período de aproximadamente 170 dias, este ciclo se repetiria duas vezes. Todavia, estudos de viabilidade econômica devem ser realizados.

5.3.7. Estrutura e dinâmica dos microrganismos termofílicos envolvidos na produção de hidrogênio

Taxonomia – Um total de 4142 sequências (APBR – 30º dia) e 4448 sequências (APBR – 60º dia) foram obtidas a partir do sequenciamento de alto rendimento (pirosequenciamento-454).

As sequências foram afiliadas em 5 grupos filogenéticos (*Bifidobacteriales*, *Thermoanaerobacterales*, *Clostridiales*, *Lactobacillales* e *Selenomonadales*), além de um grupo filogenético não-classificado.

Notavelmente, as sequências afiliadas às ordens *Lactobacillales* (42,7%) e *Selenomonadales* (22,2%) e não classificadas (22,5%) foram dominantes no período de produção de hidrogênio, enquanto, as sequências afiliadas às ordens *Selenomonadales* (25,5%) e não classificada (50,1%) foram dominantes no período de produção nula de hidrogênio (Tabela 5.21).

Entretanto, a descrição dos grupos filogenéticos se limitou as ordens *Clostridiales*, *Lactobacillales* e *Selenomonadales*, cuja abundância relativa foi superior a 10% do número total de sequência. Portanto, essas ordens englobaram os microrganismos de maior importância no sistema e, a seguir, serão descritas e relacionadas aos resultados obtidos na operação dos reatores.

Ordem Clostridiales - Essa ordem foi constituída pelas famílias *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiales incertae sedis III* e *Syntrophomonadaceae*.

As espécies de *Clostridium* compreendem um grupo de microrganismos heterogêneos que não compõe de forma coesa um grupo filogenético. Dessa forma, foi determinado que apenas um subconjunto das espécies de *Clostridium*, que formam um conjunto distinto na árvore do 16S RNAr, devem ser considerados como os verdadeiros representantes do gênero *Clostridium* ou seja, *Clostridium sensu stricto*, em latim, sentido amplo. No entanto, este conjunto é atualmente definido em termos filogenéticos e nenhuma característica bioquímica, molecular ou fenotípica é conhecida.

Em Gupta & Gao (2009) são relatadas análises filogenômica e comparativa com base em genomas clostrídioses sequenciados na tentativa de preencher esta lacuna e esclarecer as relações evolutivas entre as espécies de clostrídios. Os autores identificaram uma região conservada entre sete e nove aminoácidos (7-9 aa), correspondente à enzima fosfoglicerato desidrogenase, enzima que participa das reações de oxirredução, encontrada exclusivamente nos *Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* e *Caldicellulosiruptor* homólogos *saccharolyticus*, e ausente de todas as outras bactérias. Estas espécies formaram um ramo bem definido na árvore filogenética, cujo marcador molecular para este agrupamento foi capaz de fornecer um ramo separado de todos os outros clostrídios por um longo ramo. No mais, esses microrganismos são amplamente reportados na literatura como microrganismos produtores de hidrogênio (Rodrigues *et al.* 2003; Levin *et al.* 2006; Hasyim *et al.* 2011).

Tabela 5.21 - Distribuição taxonômica e filogenética do 16S RNAr da comunidade microbiana presente no APBR (Etapa 3).

Filo	Classe	Táxon		Gênero	Abundância relativa ¹ (%)		Função ²
		Ordem	Família		APBR - 30° dia	APBR - 60° dia	
Firmicutes	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	0,4	0,1	MM
		Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	Caldanaerobius	0,0	1,0	MPH
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium sensu stricto	0,2	4,9	MPH
				Caloramator	0,1	0,7	MPH
				Clostridium IV	1,2	2,2	MPH
				Clostridium XIVa	1,7	1,9	MPH
				Thermoanaerobacterium	8,0	7,2	MPH
		Lactobacillales	Lactobacillaceae	Thermohydrogenium	0,8	0,8	MPH
				Enterococcus	0,4	0,0	DL
				Lactobacillus	42,1	5,4	DL
				Lactococcus	0,2	0,1	DL
				Megasphaera	22,2	25,5	MPH
				não classificado	22,5	50,1	-
	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae				
				não classificado			
	não classificado	não classificado	não classificado				

1 - Abundância relativa baseado no número total de seqüências.

2 - Função dos microrganismos: Microrganismos produtores de hidrogênio (MPH); Microrganismos não produtores de hidrogênio (MNP); Microrganismos consumidores de hidrogênio (MCH); Microrganismos competidores (MC), Microrganismos mutualísticos (MM) e Divergência de literatura (DL).

No que diz respeito ao gênero *Caloramotor*, também pertencente à família *Clostridiaceae*, esse grupo engloba microrganismos termofílicos, anaeróbios estritos e produtores de ácido acético e etanol a partir da glicose, deste modo, microrganismos produtores de hidrogênio (Ogg & Patel, 2011). Esse gênero foi ainda reportado por Yasin *et al.* (2011) em um sistema termofílico (55°C) produtor de hidrogênio a partir de resíduos sólidos.

As famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* foram representadas pelos gêneros *Clostridium* agrupamento IV e *Clostridium* agrupamento XVI, respectivamente, reconhecidos pela produção de AOV em especial, pelo ácido butírico (Pryde *et al.* 2002; Woodmansey, 2007; Hippe *et al.* 2011). Por fim, os gêneros *Thermoanaerobacterium* e *Thermohydrogenium*, constituintes das famílias *Clostridiales Incertae Sedis III* e *Syntrophomonadaceae*, respectivamente, têm sido vastamente reportado na literatura como microrganismos produtores de hidrogênio utilizando como substratos principais a glicose, e outros materiais lignocelulósicos, tais como, a celulose e a xilose (Teplyakov *et al.* 2002; Li *et al.* 2010; Ren *et al.* 2010).

Em linhas gerais, foi observada uma baixa abundância relativa dos microrganismos com maior potencial para produção de hidrogênio, reforçando a investigação de outra forma de inoculação do reator acidogênico. Com base nos dados deste trabalho, acredita-se que apenas as condições impostas nesta etapa seriam capazes de selecionar uma população enriquecida de microrganismos produtores de hidrogênio e inibir os microrganismos consumidores de hidrogênio de um inóculo termofílico adaptado à água residuárias em questão.

É importante mencionar que as lacunas sobre a presença de microrganismos indicadores de condições microaerofílicas prosseguiram devido à presença de sequências não identificadas. Entretanto, considerando a abundância relativa dos microrganismos pertencentes à ordem *Clostridiales* (microrganismos anaeróbios estritos), observou-se um aumento dessa comunidade durante o período operacional do APBR, exceção para o gênero *Thermoanaerobacterium* que diminuiu 0,8%, indicando que ocorreu redução da solubilidade de gases no meio líquido, advinda da condição termofílica, que suavizou a ação inibitória do oxigênio em relação aos microrganismos produtores de hidrogênio.

Ordem Lactobacillales – Essa ordem foi representada pelas famílias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*.

Conforme discutido anteriormente (*item 5.1.5.*), essa ordem é constituída por microrganismos produtores de ácido láctico (MPAL), porém, divergências na literatura sobre a função desses microrganismos em sistema produtores de hidrogênio são reportadas. Dentre as funções, tem-se: (i) Efeito inibitório das MPAL na produção de hidrogênio (Noike *et al.* 2002; Jo *et al.* 2007); (ii) Produção de pequenas quantidades de hidrogênio (Li & Fang, 2007); (iii) Competição de substrato entre as MPAL e os microrganismos produtores de hidrogênio (MPH) o que levaria a uma instabilidade no sistema (Ohnishi *et al.* 2010). Entretanto, neste trabalho, muito possivelmente as MPAL estiveram associadas à produção de hidrogênio por meio da acidificação do meio, com abundância relativa de 42,1% no sistema durante o período de produção contínua de hidrogênio. Todavia, observou-se que esse valor diminuiu para 5,4% no 60º dia de operação do APBR. Os motivos que possam justificar esse decréscimo são incertos, não descartando, inclusive, possível relação com as sequências não classificadas cuja abundância aumentou de 22,5% no 30º dia para 50,1% ao final do monitoramento.

Ordem Selenomonadales – Esses microrganismos são reportados como produtores de ácido acético, propiônico, butírico e valérico, além de gás carbônico e pequenas quantidades de hidrogênio, a partir dos substratos: ácido láctico, frutose e glicose (Vos *et al.* 2009). Ohnishi *et al.* (2010) relatam o consumo de ácido láctico e a produção contínua de hidrogênio no qual, esse evento foi atribuído à presença de bactérias utilizadoras do ácido láctico (BUAP), tal como, a *Megasphaera elsdenii*, microrganismo pertencente a família *Veillonellaceae*. Embora demonstrada a importância da *Megasphaera spp.* em sistema de fermentação de hidrogênio, informações fundamentais como população e composição ainda não está claro, tanto que esse autores desenvolveram sondas específicas de hibridização (FISH) para rápida detecção e quantificação desses microrganismos (Ohnishi *et al.* 2012). Neste trabalho, a abundância relativa deste grupo de microrganismo se manteve constante no APBR durante o período operacional, mesmo com o decréscimo das BPAL.

Sequências não classificadas – O grande número de sequências não classificadas de ≈ 22% e 50% nos dias 30 e 60 de operação do APBR reforça a ideia da existência de

espécies e filos novos para serem caracterizados. Esse achado ocorre com frequência e, demonstra que existe um amplo repertório genético que apresenta potencial biotecnológico, mas ainda não foi completamente explorado.

A impossibilidade de classificação dessas sequências possivelmente esteve associada ao tamanho dos fragmentos gerados (entre 200 – 250 pb). Entretanto, novas plataformas de sequenciamento de alto rendimento já estão sendo comercializadas. A plataforma GS FLX Titanium XL⁺ (Roche), por exemplo, é capaz de gerar fragmentos de até 700 pb implicando no aumento da representatividade do genoma, consequentemente, no aumento da possibilidade de classificação taxonômica, descoberta de novos genes e dedução de vias metabólicas em bactérias não cultiváveis.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e da discussão apresentada para os experimentos realizados em APBR para produção de hidrogênio, e em reatores UASB para produção de metano, alimentados com vinhaça da cana de açúcar, conclui-se que:

- O melhor material suporte para uso em reatores acidogênicos de leito fixo, dentre os avaliados, foi o polietileno de baixa densidade. As condições operacionais que permitiram máxima produção e rendimento de hidrogênio foram: temperatura de 55°C; TDH de 10 h e COVa de 84,2 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹;
- As ferramentas moleculares, especialmente a análise de pirosequenciamento-454, permitiram identificar microrganismos indicadores de condições adversas aos microrganismos produtores de hidrogênio, em condição mesofílica, auxiliando na tomada de decisão para operação dos reatores em condição termofílica;
- Após o processo de adaptação da biomassa, máxima produção e rendimento de metano foram observadas, em TDH de aproximadamente 33 h nos sistemas único e combinado e COVa de 25 kg-DQO.m⁻³.d⁻¹ (calculada para o reator metanogênico), tanto no UASB do sistema único, quanto no UASB compondo o sistema combinado;
- A produção de energia no sistema combinado foi 25,7% superior à observada em sistema metanogênico único.

7. REFERÊNCIAS

- Abou-Zeid, D.M.; Biebl, H.; Spoer, C.; Muller, R.J. (2004) *Propionispora hippei* sp. nov., a novel Gram-negative, spore-forming anaerobe that produces propionic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(3): 951-954.
- Albertsen, M.; Hansen, L. B. S.; Saunders, A. M.; Nielsen, P. H.; Nielsen, K. L. (2011) A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. *International Society for Microbial Ecology*, 1-13.
- Amorim E.L.C, Barros A.R., Damianovic M.H.R.Z., Silva E.L. (2009) Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2):783-90.
- Anderson, A. J. Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 54, 450–472.
- Antonopoulou G, Gavalas HN, Skiadas IV, Angelopoulos K, Lyberatos G. (2008) Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresour Technol.*, 99:110-9.
- Anzola-Rojas, M. P. (2010). Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. São Carlos. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- APHA, AWWA, WEF. Standard methods for examination of water and wastewater. 21st ed.; 2005.
- APPLIED SYSTEM. Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems. Disponível em http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general_documents/cms_042272.pdf. Acessado em 19 de setembro de 2013.
- Araújo, J.C. (1994). Acompanhamento da evolução do biofilme e caracterização química e biológica em reator de leito fluidificado tratando esgoto sanitário sintético. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Arooj, M.F.; Han, S.K.; Kim, S.H.; Kim, D.H.; Shin, H.S. (2007) Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas. *Water Research* 41: 1177–1184.
- Asada, Y.; Tokumoto, M.; Aihara, Y.; Oku, M.; Ishimi, K.; Wakayama, T.; Miyake, J.; Tomiyama, M.; Kohno, H. (2006) Hydrogen production by co-cultures of *Lactobacillus* and a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11): 1509-1513.
- Barros, A.R.; Silva, E.L. (2012) Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 61: 59-65.
- Barros, A.R.B.; Amorim, E.L.C.; Reis, C.M.; Shida, M.S.; Silva, E.L.; (2010). Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effects of support material and hydraulic retention time. 35:3379-3388.

- Bengtsson, S.; Hallquist, J.; Werker, A.; Welander, T. (2008) Acidogenic fermentation of industrial wastewater: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal* 40:492-499.
- Bertin, L.; Lampis, S.; Todaro, D.; Scoma, A., Vallini, G.; Marchetti, L.; Majone, M.; Fava, F. (2010) Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. *Water Research*, 44 (15): 4537–4549.
- Biebl, H.; Schwab-Hanisch, H.; Spröer, C.; Lünsdorf, H. (2000) *Propionispora vibrioides*, nov. gen., nov. sp., a new gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols. *Arch. Microbiol.* 174:239-247.
- Buitrón, G.; Carvajal, C.; (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology* 101: 9071-9077.
- Bustin, S. A., Nolan, T. (2004). Analysis of mRNA Expression by Real- Time PCR. En K. Edwards, J. Logan, & N. Saunders, *Real- Time PCR. An Essential Guide* (págs. 125-184). London, UK: Horizon bioscience.
- Cai, M.L.; Liu, J.X.; Wei, Y.S. (2004) Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environmental Science & Technology*, 38, 3195-3202.
- Callister Jr, W. D. Rethwisch, D.G. (2010) *Materials Science and Engineering: An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc. USA, p. A34
- Cappelletti, B. M; Reginatto, V.; Amante, E. R. Antônio, R. V. (2011) Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, 36(12): 3367-3372.
- Carotenuto G., Kumar A., Miller J., Mukasyan A., Santacesaria E., Wolf E.E. (2013) Hydrogen production by ethanol decomposition and partial oxidation over copper/copper-chromite based catalysts prepared by combustion synthesis. *Catal Today*, 203:163-175.
- Carvalho, M. C. C. G.; Silva, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. (2010) *Ciência Rural*, 40(3): 735-744.
- Castelló, E.; García y Santos C.; Iglesias, T.; Paolino, G.; Wenzel, J.; Borzacconi, L.; Etchebehere, C. (2009) Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrogen Energy*, 34: 5674–5682.
- Chandra, R.; Bharagava, R. M.; Rai, V. (2008). Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation: Review. *Bioresource Technology*, 99, 4648–4660.
- Chen C.C., Lin C.Y., Chang J.S. (2001) Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:56–64.

- Chu, C-F.; Li, Y-Y; Xu, K-Q.; Ebie, Y.; Inamori, Y.; Kong, H-N (2008) A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4739-4746.
- Claesson, M. J.; O'Sullivan, O.; Wang, Q.; Nikkila, J.; Marchesi, J. R.; Smidt, H. De Vos, W.; Ross, R. P.; O'Toole, P. W. (2009) Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *Plos One*, 4(8): 6669.
- Cole J.R.; Wang Q.; Cardenas E.; Fish J.; Chai B.; Farris R.J. *et al.* (2009) The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res.*, 37:141-5.
- Cotter, J.L.; Chinn, M.S.; Grunden, A.M. (2009) Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32:369-380.
- Cruz R.L.; Righetto A.M.; Nogueira M.A. (1991) Experimental Investigation of Soil and Ground Water Impacts Caused by Vinasse Disposal. *Water Science Technology*, 24:77-85.
- Dagnelie, P. (1973). *Estatística - Teoria e métodos II*. Publicações Europa-América Ltda.
- Das, D.; Veziroglu, T.N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26: 13-28.
- Dashliborun A.M., Fatemi S., Najafabadi A.T. (2013) Hydrogen production through partial oxidation of methane in a new reactor configuration. *Int J Hydrogen Energy*, 38 (4):1901-9.
- Diaz, M.J.; Madejón, E.; López, F.; López, R.; Cabrera, F. (2002a) Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. *Process Biochemistry*, 37, 1143-1150.
- Diaz, M.J.; Madejón, E.; López, F.; López, R.; Cabrera, F. (2002b) Composting of vinasse and cotton gin waste by using two different systems. *Resources, Conservation and Recycling*, 34, 235-248.
- Dubois, S.M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.L.; rebers, P.A.; Smith, F. (1956) Colorimetric methods for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry*, (228): 13-21.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O., & Kuske, C. R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *App Environ Microbiol*, 67(1), 190-197.
- Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLST. *Bioinformatics*, August 12, 2010, 2010.

- Elabanna, K.; Lutke-Eversloh, T.; Trappen, S. V.; Mergaert, J.; Swings, J.; Steinbuchel A. (2003) *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1165-1168.
- Ellis, L.D. Holwerda, E.K.; Hogsett, D.; Rogers, S.; Shao, X.; Tschaplinski, T.; Thorne, P.; Lynd, L. R. (2012) Closing the carbon balance for fermentation by *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405). *Bioresource Technology*, 103(1): 293-299.
- Fang H, Zhang T, Ch Li. (2006) Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. *J Biotechnol*, 126:357-64.
- Fernandes B.S.; Peixoto G., Albrecht F.R.; Aguila N.K.S.; Zaiat M. (2010) Potencial to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, 14:143-8.
- FitzGibbon, F., Singh, D., McMullan, G., Marchant, R. (1998). The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. *Process. Biochemical*, 33, 799.
- Fontes Lima, D. M., Zaiat, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor, *International journal of hydrogen energy*, v. 37, p. 9630-9635, 2012.
- Foust A.S.; Wenzel L.A.; Clump C.W.; Maus L.; Andersen L.B. *Princípios das Operações Unitárias*. Ed. Guanabara Dois; 1982.
- Griffiths R.I.; Whiteley A.S.; O'donnell A.G. (2000) Rapid method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, (66): 5488-5491.
- Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrère H., Steyer J.P. (2010) Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int J Hydrogen Energy*, 35 (19):10660-73.
- Gupta, R. S.; Gao, B. (2009) Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2): 285-294.
- Hafez, H.; Nakhla, G.; El Naggar, M.H. (2010) An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10): 5010-5014.
- Hafez, H.; Nakhla, G.; Naggar, M. H; Elbeshbishy, E.; Baghchehsaraee, B. (2010) Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 81-92.
- Hallenbeck P.C. (2009) Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int J Hydrogen Energy*, 34 (17): 7379-89.

- Hammer, Ø. H. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron*, 4: 1–9.
- Hasyim, R.; Imai, T.; Reungsang, A.; O-Thong, S. (2011) Extreme-thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated digested sewage sludge culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14): 8727--8734.
- Hippe, B.; Zwielehner, J.; Liszt, K.; Lassl, C.; Unger, F.; Haslberger, A.G. (2011). Quantification of butyryl CoA:acetate CoA-transferase genes reveals different butyrate production capacity in individuals according to diet and age. *FEMS Microbiology Letters*. 316(2):130-5.
- Hung, C-H.; Chang, Y-T; Chang, Y-J (2011) Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology* 102(18): 8437-8444.
- Hung, C-H.; Chang, Y-T; Chang, Y-J (2011) Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology* 102(18): 8437-8444.
- Íñiguez-Covarrubias, G., Peraza-Luna, F., (2007). Reduction of solids and organic load concentrations in Tequila vinasses using a polyacrylamide (PAM) polymer flocculant. *Rev. Int. Contam. Ambient* 23, 17–24.
- Jiao, Y.; Navid, A.; Stewart, B. J.; McKinlay, J. B.; Thelen, M.P.; Pett-Ridge, J. (2012) Syntrophic metabolism of a co-culture containing *Clostridium cellulolyticum* and *Rhodopseudomonas palustris* for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16): 11719-11726.
- Jo, J.H.; Jeon, C.O.; Lee, D.S.; Park, J.M. (2007) Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of Biotechnology*, 131: 300–308.
- Kashket, E.R.; Cao, Z-Y (1995) Clostridial strain degeneration. *FEMS Microbiology Reviews* (17): 307-315.
- Keskin, T.; Aksoyek, E.; Azbar, N. (2011). Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed materials of ceramic ring and pumice stone. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36:15160-15167.
- Keskina, T.; Giustib, L.; Azbara, N. (2012) Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(2): 1418–1424.
- Kim, D-H.; Kim, M-S. (2012) Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(2): 2021-2027.
- Köpke, M.; Held, C. Hujer, S.; Liesegang, H.; Wiezer, A.; Wollherr, A.; Ehrenreich, A; Liebl, W.; Gottschalk, G; Dürre, P. (2010) *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *PNAS* 107(29): 13087-13092.

- Koskinen, P.E.P.; Kaksonen, A.H.; Puhakka, J.A. (2007) The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology Bioengineering*, 97: 742–758.
- Koutrouli, E.C.; Kalfas, H.; Gavala, H.N.; Skiadas, I.V.; Stamatelatou, K.; Lyberatos, G. (2009) Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresource Technology*, 100, 3718-3723.
- Lee M.J., Kim T.H., Min B., Hwang S.J. (2012) Sodium (Na⁺) concentration effects on metabolic pathway and estimation of ATP use in dark fermentation hydrogen production through stoichiometric analysis. *J Environ Manage*, 108:22-26.
- Lee, D-Y.; Ebie, Y.; Xu, K-Q.; Li, Y-Y.; Inamori, Y. (2010) Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresource Technology*, 101(1): S42-S47.
- Lee, K-S.; Lo, Y-C.; Lin, P-J.; Chang, J-S. (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.
- Leite J.A.C.; Fernandes B.S., Pozzi E., Barboza M., Zaiat M. (2008) Application of an anaerobic packed-bed reactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:579-86.
- Levenspiel, O. Chemical reaction engineering. 3.ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 2000.
- Levin, D. B.; Islam, R.; Cicek, N.; Sparling, R. (2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11): 1496-1503.
- Li, C.; Fang, H.H.P. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 37: 1–39.
- Li, R-Y; Zhang, T.; Fang, H.H.P. (2008) Characteristics of a phototrophic sludge producing hydrogen from acetate and butyrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(9): 2147-2155.
- Li, S.; Lai, C.; Cai, Y.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, M.; Wang, J.; Wang, X. (2010) High efficiency hydrogen production from glucose/xylose by the ldh-deleted *Thermoanaerobacterium* strain. *Bioresource and Technology* 101(22): 8718-8724.
- Limkhansuwani, V.; Chaiprasert, P. (2010). Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria. *Journal of Environmental Sciences*. 22, 1209-1217.
- Lin C.Y., Lay C.H., (2004) Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int J Hydrogen Energy*, 29:275-281.

- Liu, J. Yu, J. Li, D. Zhang, Y. Yang M. (2012) Reduction of bromate in a biological activated carbon filter under high bulk dissolved oxygen conditions and characterization of bromate-reducing isolates. *Biochemical Engineering Journal* 65 (15), 44-50.
- Liu, L.; Li, Y.; Li, S.; Hu, N.; He, Y.; Pong, R. Lin, D. Lu, L.; Law, M. (2012) Review: Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2012/251364.
- Luo, G., Xie, L., Zhounghai, Z. Zhou, Q., Wang, J-Y (2010) Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH, *Applied Energy*, 87, 3710-3717.
- Luo, G.; Xie, L.; Zhou, Q.; Angelidaki, I. (2011) Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102, 8700-8706.
- Lyra M.R.C.C; Rolim M.M., Silva J.A.A. (2003) Toposequence of soils fertigated with stillage: contribution towards the quality of ground water table. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, 7:525–32. (in Portuguese).
- Madrid L.; Díaz-Barrientos E. (1998) Release of metals from homogenous soil columns by wastewater from an agricultural industry. *Environ Pollution*, 101:43–8.
- Mariakakis, I.; Bischoff, P.; Krampe, J.; Meyer, C.; Steinmetz, H. (2011) Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17): 10690-700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164(3), 165-172.
- Nasr, N.; Elbeshbishy, E.; Hafez, H.; Nakhla, G.; El Naggar, M.H. (2011) Bio-hydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(20): 12761-12769.
- Nasr, N.; Elbeshbishy, E.; Hafez, H.; Nakhla, G.; Naggar, M. H. (2012) Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. *Bioresource Technology*, 102, 122-126.
- Nation, J.L. (1983). A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy, *Staining Technology*, 58, 347-351.
- Niemi, R.M.; Heiskanen, I.; Heine, R.; Rapala, J. (2009) Previously uncultured β -proteobacteria dominate in biologically granular active carbon (BAC) filters. *Water Research*, 43(20): 5075-5086.
- Ning, Y-Y; Jin, D-W; Sheng, G-P; Harada, H.; Shi, X-Y (2012) Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform. *Renewable energy*, 38(1):253-257.

- Noike, T.; Takabatake, H.; Mizuno, O.; Ohba, M. (2002) Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1367–1371.
- Novais, C. M.; Pires-Alves, M.; Silva, F. F. (2004) PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 33, 10-13.
- Ogden, J. (2002) Hydrogen – The fuel of the future? *Physcs today*, 55, 69-75.
- Ogg, C.D.; Patel, B.K. (2009) *Caloramator australicus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 95–101.
- Ohnishi, A.; Abe, S.; Bando, Y.; Fujimoto, N.; Suzuki, M. (2012) Rapid detection and quantification methodology for genus *Megasphaera* as a hydrogen producer in a hydrogen fermentation system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(3): 2239-2247.
- Ohnishi, A.; Bando, Y.; Fujimoto, N.; Suzuki, M. (2010) Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 8544–8553.
- Osborn, A. M.; Moore, R.B.; Timmis, K. N. (2000) An evaluation pf terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*. 2(1): 39-50.
- Peixoto, G.; Saavedra, N.K.; Varesche, M.B.A.; Zaiat, M. (2011). Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. (36):8953-66.
- 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.
- Perna V.; Castelló E.; Wenzel J.; Zampol C.; Fontes Lima D.M.; Borzacconi, L., *et al.* (2013) Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int J Hydrogen Energy*, 38(1):54-62.
- Perna, V. (2011) Producción de biohidrógeno a partir de suero lácteo utilizando um reactor UASB y um reactor de lecho fijo. Montevideu. (Mestrado) – Facultad de Ciencias, Universidade de la República.
- Pohland, F. G.; Ghosh, S. (1971) Developments in anaerobic treatment process. *Biotechnology and Bioengineering Symp*, 2: 85-106.
- Pryde, S.E.; Duncan, S.H.; Hold, G.L.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. (2002) The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Letters*, 217: 133–139.

- Pycke, B., Etchebehere, C., Van De Caveye, P., Negroni, A., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities. *Water Sci and Technol* SSN/ISBN: 0273-122, in press.
- Raposo, F.; Fernandez-Cegri, V. De la Rubia, M. A.; Borja, R.; Beline, F.; Cavinato, C. *et al* (2011) Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal Chem. Technol. Biotechnol.*, 86: 1088-1098.
- Reith, J.H.; Wijffels, R.H.; Barten, H. (2003) *Bio-Methane and Bio-Hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production*. Dutch Biological Hydrogen Foundation, Netherlands.
- 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): 2147-2157.
- Ren, N.Q.; Wang, B.Z.; Huang, J.C. (1997) Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnol Bioeng*, 54: 428-433.
- Ren, N-Q; Cao, G-L; Guo, W-Q; Wang, A-J; Zhu, Y-H.; Liu, B-F.; Xu, J-F (2010) Biological hydrogen production from corn stover by moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(7): 2708-2712.
- Ribeiro B.T.; Lima J.M.; Guilherme L.R.G.; Julião L.G.F. (2010) Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 67: 441-7.
- Robles-González, V.; Galínder-Mayer, J.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H. (2012) Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of biotechnology*, 157, 524-546.
- ROCHE 454 SEQUENCING. System features for GS FLX Titanium series. (November 24, 2008). Disponível em: <<http://www.454.com/products-solutions/system-features.asp>>. Acesso em: 26 de março de 2013.
- Rodrigues, R.; Valente, F. M. A.; Pereira, I. A. C.; Oliveira, S.; Rodrigues-Pousada, C. (2003) A novel membrane-bound Ech [NiFe] hydrogenase in *Desulfovibrio gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(2): 366-375.
- Ronaghi, M. et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, v.281, p.363-365, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/281/5375/363>>. Acesso em: 26 de março de 2013.
- Sá, L.R.V.; Oliveira, T.C.; Santos, T.F.; Matos, A.; Cammarota, M.C.; Oliveira, E.M.M.; Leitão, V.S.F. (2011) Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, in press.

- Sadaie, T.; Sadaie, A.; Takada, M.; Hamano, K.; Ohnishi, J.; Ohta, N.; Matsumoto, K.; Sadaie, Y. (2007) Reducing sludge production and the domination of Comamonadaceae by reducing the oxygen supply in the wastewater treatment procedure of a food-processing factory. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 791–799.
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H. & Gottschalk, G. (1961). A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Arch Mikrobiol* 38, 209–222 (in German).
- SECEX. Secretaria do Comércio Exterior. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia/estatistica>. Acessado em 10 de outubro de 2012.
- Shen, L.; Bagley, D. M.; Liss, S. N. (2009) Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(9): 3689-3696.
- Shida, G. M.; Sader, L. T.; Amorim, E. L. C.; Sakamoto, I. K.; Maintinguer, S. I.; Saavedra, N. K.; Varesche, M. B. A.; Silva, E. L. (2012) Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(22): 16925-34.
- Shin, H.S.; Youn, J.H.; Kim, S.H. (2004) Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 1355–1363.
- Show, K.Y.; and Tray, J.H. (1999). Influence of support media on biomass growth and retention in anaerobic filters. *Water Research*, 33:1471-1481.
- Sikora, A.; Wójtowicz-Sienko, J.; Piela, P.; Zielenkiewicz, U.; Tomczak-Zak, K.; Chojnacka, A.; Sikora, R.; Kowalczyk, P.; Grzesiuk, E.; Błaszczak, M.K. (2011) Selection of bacteria capable of dissimilatory reduction of Fe(III) from a long-term continuous culture on molasses and their use in a microbial fuel cell. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 305–316.
- Silva, C. C.; Hayden, H.; Sawbridge, T.; Mele, P.; Paula, S. O.; Silva, L. C. F.; Vidigal, P. M. P.; Vicentini, R.; Sousa, M. P.; Torres, A. P. R.; Santiago, V. M. J.; Oliveira, V. M. (2013) Identification of Genes and Pathways Related to Phenol Degradation in Metagenomic Libraries from Petroleum Refinery Wastewater. *PLoS ONE* 8(4): e61811. doi:10.1371/journal.pone.0061811, 2013.
- Souza, M. E.; Fuzaro, G.; Polegato, A. R. (1992) Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. *Water Science and Technology*, 25: 213-222.
- Sreethanwong, T.; Chatsiriwatana, S.; Rangsunvigit, P.; Chavadej, S. (2010). Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic compostion. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35:4092-4102.
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56(1): 187–209.

- Talabardon, M.; Schwitguebel, J.-P.; Peringer, P. (2000) Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. *J. Biotechnol.*, (76):83-92.
- Tang, J.; Yuan, Y.; Guo, W-Q; Ren, N-Q (2012) Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinense* B49. *International Journal of Hydrogen Energy* 37:741-747.
- Tanner, R.S.; Miller, L.M.; Yang, D. (1993) *Clostridium ljungdahlii* sp. Nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43(2):232-236.
- Tejada, M.; Garcia-Martinez, A.M.; Parrado, J. (2009) Effects of a vermicompost composted with beet vinasse on soil properties, soil losses and soil restoration. *Catena*, 77, 238-247.
- Teplyakov, V.V.; Gassanova, L.G.; Sostina, E.G.; Slepova, E.V.; Modigell, M.; Netrusov, A.I. (2002) Lab-scale bioreactor integrated with active membrane system for hydrogen production: experience and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12): 1149-1155.
- Tuomi S., Santasalo-Aarnio A., Kanninen P., Kallio T. (2013) Hydrogen production by methanol–water solution electrolysis with an alkaline membrane cell. *J Power Sources*, 229:32-35.
- UNICA, União da Indústria de Cana-deAçúcar. Moagem de cana de açúcar alcança 510,12 milhões de toneladas na região Centro-Sul do país. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/2500730292038663351/moagem-de-cana-alcanca-510-por-cento2C12-milhoes-de-toneladas-na-regiao-centro-sul-do-pais-por-cento0D-por-cento0A/>. Acessado em 11 de novembro de 2013.
- Ueno, Y.; Fukui, H.; Goto, M. (2007) Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environmental Science and Technology* 41(4): 1413-1419.
- Van Loodrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Zehnder, A.J.B. (1990). Influence of interferences on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54: 75-87.
- Venetsaneas, N.; Antonopoulou, G.; Stamatelatou, K.; Kornaros, M.; Lyberatos, G. (2009) Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*, 100, 3713-3717.
- Vos, P.D.; Garrity, M.G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey F.A.; *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology The Firmicutes, vol. 3 Springer (2009).
- Wang J., Wan W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy*, 34 (2):799-811.
- Wang X, Jin B. (2009) Process optimization of biological hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *J Bioscience Bioeng.*, 107(2):138-144.

- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbial Biotechnology*, 85: 849-860.
- Wilkie, A. C.; Riedesel, K.J.; Owens, J.M. (2000) Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19: 63-102.
- Wirth, R.; Kovács, e.; Maróti, G.; Bagi, Z.; Rákhely, G.; Kovács, K. (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels*, 5(41): 1-16.
- Wood, T.K.; Hong, S. H.; Ma, Q. (2011). Engineering biofilm formation and dispersal. *Trends in Biotechnology*, 29(2): 87-94.
- Woodmansey, E.J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1178–1186.
- Wu, S-Y.; Lin, C-N.; Chang, J-S.; Chang, J-S. (2005). Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: (13–14): 1375-1381.
- Xing, D.F.; Ren, N.Q.; Li, Q.B.; Lin, M.; Wang, A.J.; Zhao, L.H. (2006) *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp nov., isolated from molasses wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 755–760.
- Yao W., Song X., Huang C., Xu Q., Wu Q. (2013) Enhancing solar hydrogen production via modified photochemical treatment of Pt/CdS photocatalyst. *Catal Today*, 199:42-47.
- Yasin, N.H.M.; Rahman, N.A.A.; Man, H.C.; Yusoff, M. Z. M.; Hassan, M. A. (2011) Microbial characterization of hydrogen-producing bacteria in fermented food waste at different pH values. *International Journal of Hydrogen Energy*, 11: 9571-9580.
- Ye X, Zhang X, Morgenroth E, Finneran KT. (2012) Anthrahydroquinone-2,6-disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose, xylose, and cellobiose. *Int J Hydrogen Energy*, 37(16):11701–9.
- Yossan, S.; O-Thong, S.; Prasertsan, P. (2012) Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(18): 13806-13814.
- Younesi, H; Najafpour, G.; Mohamed, A.R. (2005). Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochemical Engineering Journal*. 27: 110-119.
- Yu, H.; Zhu, Z.; Hu, W.; Zhang, H. (2002) Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12): 1359-1365.

- Zabranska, J.; Stepova, J.; Wachtl, R.; Jenicek, P.; Dohanyos, M. (2000). The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters at different loading rates. *Water Science Technology*, 42(9): 49-56.
- Zeng, Y-F; Liu, Z-L.; Qin, Z-Z (2009) Decolorization of molasses fermentation wastewater by SnO₂-catalyzed ozonation. *Journal of hazardous materials*, 162, 682-687.
- Zhao, G.; Ma, F.; Wei, L.; Chua, H. (2012) Using rice straw fermentation liquor to produce bioflocclulants during an anaerobic dry fermentation process. *Bioresource Technology*, (113): 83-88.
- Zhao, X.; Xing, D.; Zhang, L.; Ren, N. (2010) Characterization and overexpression of a [FeFe]-hydrogenase gene of a novel hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbienenense*. *International Journal of Hydrogen Energy* (35): 9598-9602.
- Zhu, H.; Stadnyk, A.; Béland, M.; Seto, P. (2008) Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 99, 5078-5084.