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

SAMANTHA CHRISTINE SANTOS

Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos 2014

SAMANTHA CHRISTINE SANTOS

Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos 2014

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

Santos, Samantha Christine S237p Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato organico / Samantha Christine Santos; orientador Prof. Edson Luiz Silva. São Carlos, 2014. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014. 1. Água residuária real. 2. Co-substrato. 3. Compostos inibitórios. 4. Thermoanaerobacterium. I. Título. .

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel SAMANTHA CHRISTINE SANTOS.

Título da tese: "Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fuidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico".

Data da defesa: 18/03/2014

Comissão Julgadora:

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

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

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

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

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento: Profa. Associada Maria Bernadete A. Varesche Silva

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

Resultado:

Aprovada.

APPOVAD

approvada

provada

DEDICATÓRIA

A Deus:

"...enraizados e edificados Nele, firmados na fé, transbordando de gratidão."

Colossenses 2:7

Ao meu pai Marcos e minha irmã Aline:

Por me ensinarem, mais uma vez, os reais valores da vida. "Haja o que houver, distribua confiança e bom ânimo, porque a alegria é talvez a única dádiva que você é capaz de ofertar sem possuir." André Luiz por Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por mais esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional e por colocar pessoas tão queridas e especiais para guiar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva pelo aceite de orientação, pelo incentivo, comprometimento, experiência e auxílio em todas as etapas até que este projeto se tornasse realidade. Agradeço-o pela dedicação, paciência e competência com que orientou este trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amâncio Varesche pela recepção, conselhos, encorajamento e oportunidade de co-orientação deste projeto. Agradeço as valiosas contribuições durante estes três anos de convívio, o aprendizado diário durante o Programa de Aperfeiçoamento Estudantil e as fundamentais considerações no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat, assim como aos meus orientadores, Professores Dr. Edson e Dr^a. Maria Bernadete, pela oportunidade de ter participado como bolsista vinculada ao Projeto Temático "Produção de Bioenergia no Tratamento de Águas Residuárias e Adequação Ambiental dos Efluentes e Resíduos Gerados", financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2009/15.984-0)".

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Doutorado (Processo 2010/20.332-0).

A indústria produtora de açúcar e álcool, Usina São Martinho por disponibilizar as coletas de vinhaça, pela constante atenção e auxílio ao longo de dois anos.

A Prof^a. Dr^a. Mônica Lopes Aguiar, Professora Associada do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos pela gentileza em seus comentários e observações no Exame de Qualificação.

Aos membros da comissão julgadora, agradeço pelo exemplo de postura, pessoal e profissional no trato com a Ciência, e pelas considerações incorporadas neste tese.

Aos docentes e pesquisadores do Programa de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento que me proporcionaram amplo conhecimento na área acadêmico-científica, colaborando para o meu aprimoramento e progresso na carreira.

As laboratoristas do Laboratório de Processos Biológicos, Msc. Maria Angela Adorno, Dr^a Inês e Dr^a Eloisa Pozzi pelo auxílio, solicitude e paciência durante as análises. À querida Dr^a. Isabel Sakamoto, pelo árduo trabalho em me ensinar a fazer as análises de Biologia Molecular, pela história de vida e por toda a ajuda, tranquilidade e torcida durante nossas conversas informais. A Juliana Custódio, pela amizade, conselhos e ensinamentos passados durante o Programa de Aperfeiçoamento Estudantil. Aos queridos e solícitos Júlio Cesar Trofino e Paulo Fragiácomo (Laboratório de Saneamento) pela incansável e insubstituível ajuda durante as análises. Aos funcionários e laboratoristas do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de São Carlos por proporcionarem condições para a realização da etapa experimental deste projeto. Em especial ao Oscar da Silva, por ter feito dos meus dias mais alegres e divertidos, por ser um exemplo de profissional e de ser humano, pelas conversas sérias e rotineiras, pela sua amizade, dedicação à construção e manutenção dos bioreatores e paciência, muita paciência!

Aos grandes amigos e funcionários do Serviço de Transportes da EESC, pelas risadas, companheirismo e torcida para que tudo ocorresse bem durante as coletas de vinhaça em Pradópolis.

A delicadeza, gentileza e amizade das queridas amigas e funcionárias da Secretaria do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Sá, Rose e Pavi, que desde o primeiro dia de meu ingresso no Doutorado, deram-me o suporte necessário em todo e qualquer assunto.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer nesta trajetória durante as análises no Laboratório de Processos Biológicos (Adis, Adriana, Bruna C., Bruna M., Dagoberto, Daniel, Djalma, Eduardo, Fabrício, Filipe, Guilherme, Gustavo, Juliana, Lorena, Moacir, Pilar, Rafael, Regiane C., Regiane R. e Tiago). Em especial, à Mara Rúbia e Lívia pelas histórias de vida e superação compartilhadas. Priscila e Tiago Palladino, foram muitas as ajudas de vocês dois. Tiago, meu amigo de toda a vida, aprendi muito com você. À vocês dois, meus amores, muito obrigada por me compartilharem os momentos felizes e de agonia durante estes anos.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Controle Ambiental II, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de São Carlos (Aruana, Carolina, Cristiane, Everton, Janaína, Helbert, Lívia, Mariana, Morgana e Paula) que, compartilhando suas experiências, me permitiram pegar alguns atalhos. Por me proporcionarem, além do conhecimento, palavras e atitudes de companheirismo, honestidade e bem-estar. Em especial, às amigas que me receberam no Doutorado, Paula, Cristiane e Mariana, por termos superado juntas os obstáculos, pela perseverança e terapias conjuntas, resiliência e principalmente pela paciência descomunal que tiveram comigo. Ao enorme coração da Paula, pessoa essa que nos momentos mais delicados, me acolheu mesmo com todos os meus desatinos e humores, por ter me dado suporte e conselhos, pessoais e profissionais em todas as etapas deste projeto.

Aos meus anjos da guarda de São Carlos que jamais esquecerei: minha amiga Marcela, por todo seu companheirismo, palavras de superação e orações. A minha psicóloga Ana, pelos valores passados a mim, o autoconhecimento, por me emprestar todo seu carinho, atenção, doçura e postura por meio de seu profissionalismo humanitário, e principalmente, por reconhecer meus sentimentos e por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Aos queridos, eternos e especiais amigos de Poços de Caldas (Cissa, Roberta e Juliana), Alfenas (Aline e Letícia) e de Jaboticabal (Carol Miranda, Cíntia, Estevão, Max e Natani), que torceram muito para que esse dia chegasse. Em especial, minha amiga e doce Carol Palamin, por ter me fortificado durante os últimos meses de Doutorado.

A minha amiga e irmã de coração Thaísa pelos quase 10 anos de amizade, pelas infinitas conversas, pelo esforço imensurável em me ouvir e aconselhar, que compartilhou grande parte do seu tempo torcendo para que essa etapa fosse concluída com sucesso.

Ao Guilherme, por ter tido o enorme prazer de conhecê-lo em São Carlos, pelo surpreendente encontro, pelos conselhos, convívio sincero e amoroso e pela oportunidade de dividir momentos leves, serenos e alegres durante esses anos, me mostrando que a vida não precisa ser tão séria, mas que cada escolha traz uma consequência.

Aos meus familiares, pelo constante e incansável incentivo dispensado a mim, por acreditarem nessa conquista, pela compreensão e socorro nas horas em que mais precisei. Ao meu pai, por ser o maior idealizador desse Título, por me proporcionar proteção, estudo e educação, além do incentivo na luta pelos meus sonhos: serei eternamente grata a você. Pelas demonstrações de atenção e afeto da Luciana, que tem se tornado cada vez mais presente em nossa família. À minha irmã Aline e meu cunhado Diego, sempre dispostos a me ajudar e a me animar, pela elevada paciência, pelos exemplos de vida, conselhos e ensinamentos, pelo carinho verdadeiro e sincero. À minha linda e doce avó Gessy e tia Maria Helena por sempre me incentivarem, me ampararem e por me ajudarem a chegar onde cheguei. À minha mãezinha Tere, pelas orações, conforto emocional e pelo presente de tê-la em minha vida.

A todos aqueles que, mesmo não citados aqui, fizeram ou fazem parte desta etapa da minha vida e torcem ou contribuem para o meu progresso pessoal e profissional.

Meus sinceros agradecimentos.

"Vês este pórtico? Tem duas faces. Reúnem-se aqui dois caminhos e ninguém ainda os percorreu até o fim. Esta longa rua que desce, é uma rua que se prolonga durante uma eternidade e esta longa rua que sobe - é outra eternidade. Estes caminhos contradizem-se, chocam um com o outro. E é aqui, neste pórtico que eles se encontram. O nome do pórtico está inscrito na sua fachada, chama-se "instante"."

•

RESUMO

SANTOS, S.C. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico. 2014. 163 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade de produção contínua de hidrogênio, sob condições termofílicas (55°C), a partir de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-acúcar em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) utilizando argila expandida como material suporte para adesão microbiana. Foram utilizados cinco reatores de idêntica configuração, denominados R5, R10, R15, R20 e R30, com variação na concentração afluente de 5000, 10.000, 15.000, 20.000 e de 30.000 mg DQO L^{-1} , respectivamente (com cargas orgânicas volumétricas – TCO entre 15 e 720 kg DQO m⁻³ d⁻¹). O tempo de detenção hidráulica (TDH) reduziu de 8, 6, 4, 2 e 1 h. Na estratégia de operação de um deles, (R₅) investigou-se os efeitos da co-fermentação de porcentagens de glicose e de vinhaça no substrato de alimentação. Os outros quatro reatores foram operados mediante a adição de glicose como co-substrato ao afluente, apenas durante o período de partida operacional. Em todos os reatores, foi observado comportamento de elevação na produção volumétrica de H₂ (PVH) a partir da diminuição do TDH A máxima PVH obtida foi de de 1,96 L h⁻¹ L⁻¹ (R₁₀; TDH de 1h; TCO de 240 kg DQO m⁻³ d^{-1}). No entanto, verificou-se diminuição do rendimento de H₂ (HY) e no conteúdo de H₂ no biogás, com a aplicação dos TDH reduzidos, em todos os reatores, alcançando valor máximo de 4,62 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹ no TDH de 8 h (R_5) e 57.51% de H_2 no TDH de 6 h (R_{20}). O reator operado com a maior concentração de vinhaça (R₃₀) apresentou menores valores de produção de H₂, atribuídos aos compostos inibitórios (elevada concentração de ácidos voláteis no afluente butírico e acético). As análises de clonagem e sequenciamento dos consórcios bacterianos termofílicos revelaram semelhanças (99%) com cepas produtoras de H_2 , como Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, Clostridium cellulosi, Lactobacillus fermentum e Megasphaera elsdenii. A capacidade de produzir H₂, a distribuição dos ácidos e a estrutura da comunidade bacteriana foram fatores influenciados pelo aumento da concentração de vinhaça e das TCO aplicadas.

Palavras-chave: água residuária real, co-substrato,compostos inibitórios, *Thermoanaerobacterium*.

ABSTRACT

SANTOS, S.C. Hydrogen production in thermophilic anaerobic fluidized bed reactor treating stillage as organic substrate. 2014. 161 p. Thesis (Doctoral) – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2014.

The present study aimed to evaluate the ability of continuous hydrogen production under thermophilic conditions (55 °C), from different sugar cane vinasse concentrations in anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) using expanded clay as support material for microbial adhesion. Five reactors of identical configuration were used, denominated R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ and R₃₀, followed by influent variation concentration of 5000; 10,000; 15,000; 20,000 and 30,000 mg COD L⁻¹, respectively (with organic loading rate – OLR varying from 15 to 720 kg COD m⁻³ d⁻¹). The hydraulic retention time (HRT) decreases from 8, 6, 4, 2 and 1 h. The strategy applied to one of those (R_5) , investigated the co-fermentations effects across the application of different percentages of glucose and stillage in the fed substrate. The other four reactors were operated by adding glucose as co-substrate to the influent just during the start-up period. In all reactors, it was observed a volumetric H₂ production (HPR) increase behavior from the HRT decrease. The maximum HPR obtained was 1.96 L h⁻¹ L⁻¹ (R_{10} ; HRT of 1h; OLR of 240 kg COD m⁻³ d⁻¹). However, there was a decrease in H₂ yield (HY) and H₂ content in biogas, with the application of reduced HRT for all reactors, reaching maximum value of 4.62 mmol g COD_{added}⁻¹ at HRT of 8 h (R_5) and 57.51% of H₂ at HRT of 6 h (R_{20}) . The reactor operated with the highest concentration of stillage (R₃₀) showed lower values for H₂ production, attributed to inhibitory compounds (high concentration of volatile acids in the affluent - butyric and acetic).. The cloning and sequencing analyzes of the thermophilic bacterial consortium showed similarity (99%) with H₂ producing strains, such as Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, Clostridium cellulosi, Lactobacillus fermentum e Megasphaera elsdenii. The ability to produce H₂, the distribution of organic acids and the bacterial community structure analyzed in all reactors were factors influenced by the increasing stillage concentration and OLR applied

Keywords: real wastewater, co-substrate, inhibitory compounds, Thermoanaerobacterium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Participações, em porcentagens, de fontes de energia na oferta total de energia primária global em 2008. Fonte: Kumar <i>et al.</i> (2010); IPCC (2012)	7
Figura 3.2: Resumo das principais fontes de biomassa, processos de conversão, e produtos finais associados às biorrefinaria. Fonte: Srirangan <i>et al.</i> (2012)	8
Figura 3.3: Ascensão dos rendimentos e a redução nos custos de produção para produtos brasileiros da agroindústria canavieira entre 1975-2008. Fonte: Lago <i>et al.</i> (2012)	10
Figura 3.4: Fluxograma do processo de fabricação do açúcar e álcool a partir do melaço da cana-de-açúcar. Fonte: Adaptado de Paiva e Morabito (2007); Dias <i>et al.</i> (2012)	14
Figura 3.5: Sítio de interações direcionadas à biodegradação progressiva de moléculas orgânicas complexas a ácidos orgânicos, CH ₄ , CO ₂ , H ₂ e H ₂ S em biorreatores (A: bactérias hidrolíticas/fermentativas; B: bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio; C: bactérias homoacetogênicas; D1: metanogênicas acetoclásticas; D2: metanogênicas hidrogenotróficas). Adaptado de O'Flaherty (2006), Guo <i>et al.</i> (2010) e Wilkinson (2011)	19
Figura 3.7: Esquema comparativo dos três principais tipos tecnológicos de bioprodução de hidrogênio Fonte: Adaptado de Sinha e Pandey (2011)	21
Figura 3.6: Classificação da produção biológica de H ₂ . Fonte: Kim e Kim (2011)	22
Figura 3.8: Transferência líquido-gás na produção fermentativa de hidrogênio. Fonte: Bastidas-Oyanedel <i>et al.</i> (2012)	30
Figura 4.1: Vista superior do reator UASB termofílico utilizado no tratamento de vinhaça na Usina São Martinho, Pradópolis, SP	50
Figura 4.2: Partículas de argila expandida tratadas para utilização como suporte para aderência das populações microbianas	52
Figura 4.3: Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico	54
Figura 4.4: (a) Reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico; (b) partículas de argila expandida no leito; (c) parte superior do reator: coleta de biogás e efluente	54
Figura 5.1: Taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada e rendimento de H_2 nos reatores RALF termofílicos com diferentes concentrações de vinhaça de cana- de-açúcar ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica: (a) reator R_5 ; (b) reatores R_{10} e R_{15} ; (c) reatores R_{20} e R_{30}	66

Figura 5.2: Produção volumétrica de H₂ nos reatores RALF termofílicos com diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar ao longo do aumento da taxa de carregamento orgânico: (a) reator R₅; (b) reatores R₁₀ e R₁₅; (c) reatores R₂₀ e R₃₀..... 69 Figura 5.3: Conteúdo de H₂ (%) nos reatores RALF termofílicos com diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica: (a) reator R_5 ; (b) reatores $R_{10} e R_{15}$; (c) reatores $R_{20} e R_{30}$ 74 Figura 5.4: Ácidos orgânicos e álcoois (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R5 ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: 79 ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)..... Figura 5.5: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₁₅ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-81 butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)..... Figura 5.6: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₂₀ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-82 butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)..... Figura 5.7: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₁₀ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HISBu: ácido iso-86 butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)..... Figura 5.8: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₃₀ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HISBu: ácido iso-87 butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)..... Figura 5.9: Concentrações de sólidos suspensos fixos e voláteis e respectivas porcentagens verificadas nas amostras efluentes dos reatores anaeróbios termofílicos..... 93 Figura 5.10: Coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) e o método cluster UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do inóculo e estabelecidas durante as fases operacionais do reator R5 termofílico (In) inóculo após prétratamento térmico; (Gli + Vin; 2 h): referente à Fase 5, com 33% de glicose e 67% de vinhaça, no TDH de 2h; (Gli + Vin; 1 h): referente à Fase 6, com 33% de glicose e 67% de vinhaça, no TDH de 1h; (Vin; 2h): referente à Fase 7, com 100% de 96 vinhaça, no TDH de 2 h; (Vin; 1h): referente à Fase 8, com 100% de vinhaça, no TDH de 1 h.....

Figura 5.11: Coeficiente de similaridade (correlação de *Pearson*) e o método cluster UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a partir

do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do inóculo e 97 estabelecidas durante as fases operacionais dos reatores R_{15} e R_{20} termofílicos......

Figura 5.12: Coeficiente de similaridade (correlação de *Pearson*) e o método cluster UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas da vinhaça de cana-de-açúcar e estabelecidas durante as fases operacionais dos reatores R_{10} e R_{30} termofílicos.

Figura 5.13: Árvore filogenética a partir das UTO verificadas na biomassa aderida ao material suporte do reator R_5 produtor de hidrogênio, construída a partir de distâncias evolutivas inferidas utilizando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada próxima aos ramos e foi calculada baseada no teste de *bootstrap* com 1000 réplicas (Intervalo de confiança: 95% de substituições na sequência nucleotídica; Uncultured *Chloroflexus sp.:* Outgroup)....

98

103

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição e produção de vinhaça proveniente de diferentes matérias-primas
Tabela 3.2: Alguns dos diversos reatores anaeróbios utilizados para o tratamento de águas residuárias (produção de CH ₄) provenientes de vinhaça de destilarias de álcool
Tabela 3.3: Valores caloríficos de diversos combustíveis
Tabela 3.4: Utilização de diferentes fontes orgânicas para a produção de H ₂ utilizando diversas configurações de reatores anaeróbios
Tabela 3.5: Temperatura termofílica na produção fermentativa de H_2 a partir de diferentes fontes de inóculos e de substratos
Tabela 4.1: Valores máximos e mínimos de parâmetros físico-químicos para a caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar ao longo do experimento
Tabela 4.2: Características físicas da argila expandida segundo Ortega <i>et al.</i> (2001)
Tabela 4.3: Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação para as partículas de argila expandida
Tabela 4.4: Condições operacionais impostas ao RALF termofílico: R ₅
Tabela 4.5: Condições operacionais impostas aos RALF termofílicos: R_{10} , R_{15} , R_{20} e R_{30}
Tabela 4.6: Reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos específicos na técnica de PCR
Tabela 4.7: Análises físico-químicas e biomoleculares realizadas em amostras coletadas nos reatores termofílicos R_5 , R_{10} , R_{15} , R_{20} e R_{30}
Tabela 5.1: Valores médios de rendimento de H ₂ para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo da utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar
Tabela 5.2: Valores médios de produção volumétrica de H_2 para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo da utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar
Tabela 5.3: Produção mesofílica e termofílica de H_2 a partir de diferentes fontes de substratos, em comparação com os resultados obtidos no presente estudo

Tabela 5.4: Valores médios de conteúdo de H_2 para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo da utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar	76
Tabela 5.5: Valores médios de ácidos orgânicos verificados (mg L^{-1} e porcentagem) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados nos reatores termofílicos R_5 , R_{15} e R_{20}	78
Tabela 5.6: Valores médios (iniciais e finais) de ácidos orgânicos verificados (mg L^{-1} e porcentagem) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados nos reatores termofílicos R_{10} e R_{30}	85
Tabela 5.7: Valores médios de pH afluente e efluente frente à utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar nos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH	89
Tabela 5.8: Valores médios de eficiência de remoção de carboidratos totais e de DQO (%) frente à utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de- açúcar nos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH	90
Tabela 5.9: Desempenho de produção volumétrica de hidrogênio e as concentrações (mg L ⁻¹) de sólidos suspensos voláteis, Nitrogênio Total Kjedahl, fósforo total (como PO_4^{-3}) e sulfato nos efluentes dos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH.	94
Tabela 5.10: Resultados comparativos do sequênciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria obtidos no R ₅	101
Tabela 5.11: Resultados comparativos do sequênciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria obtidos no R ₂₀	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AnSBBR anaerobic sequencing batch biofilm reactor
- CNTP condição normal de pressão e temperatura
- CSTR continuous stirred-tank reactor
- DGGE denaturing gradient gel electrophoresis
- DQO demanda química de oxigênio
- E.R. Eficiência de remoção
- EGSB expanded granular sludge bed reactor
- EtOH etanol
- F forward
- HAc ácido acético
- HBu ácido butírico
- HIsBu ácido iso-butírico
- HLa ácido láctico
- HPr ácido propiônico
- PVH produção volumétrica de hidrogênio
- HSu ácido succínico
- HY hydrogen yield
- NTK Nitrogênio total Kjedahl
- pb pares de bases
- PCR polymerase chain reaction
- R -reverse

 R_5 - reator alimentado com a concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar

 R_{10} - reator alimentado com a concentração de 10.000 mg DQO L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar R_{15} - reator alimentado com a concentração de 15.000 mg DQO L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar R_{20} - reator alimentado com a concentração de 20.000 mg DQO L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar R_{30} - reator alimentado com a concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar RALF - reator anaeróbio de leito fluidificado

- RNAr ácido ribonucléico ribosomal
- SSF sólidos suspensos fixos
- SST sólidos suspensos totais
- SSV sólidos suspensos voláteis
- TCO taxa de carregamento orgânica
- TDH tempo de detenção hidráulica
- UASB upflow anaerobic sludge blanket reactor
- UTO unidade taxonômica operacional

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO					
2.	OBJETIVOS DO TRABALHO					
3.	REVISÃO DA LITERATURA	6				
	3.1. Bioenergia	7				
	3.2. A indústria sucroenergética Brasileira	9				
	3.2.1. Vinhaça de cana-de-açúcar: potencial poluidor e possibilidade					
	de destinação inseridas ao conceito de biorrefinarias (CH ₄)	12				
	3.3. Bioprocessos para a produção de hidrogênio: fermentação	19				
	3.4. Fontes e misturas de substratos para a produção fermentativa de H_{2}	23				
	3.5. Produção biológica de H_2 a partir de vinhaça proveniente de diferentes					
	matérias-primas					
	3.6. Princípios e fundamentos fermentativos sob temperatura termofílica	29				
	3.6.1. Inóculo	31				
	3.6.2. Taxa de carregamento orgânico: tempo de detenção hidráulica e					
	concentração do substrato	32				
	3.6.3. Nutrientes	34				
	3.6.4. Características e aplicações dos microrganismos termofílicos na					
	produção de H ₂	34				
	3.7. Produção fermentativa de hidrogênio em reator anaeróbio de leito					
	fluidificado	43				
	3.8. Considerações finais	47				
4.	MATERIAL E MÉTODOS	50				
	4.1. Obtenção de inóculo produtor de hidrogênio: pré-tratamento térmico 5					
	4.2. Água residuária: vinhaça de cana-de-açúcar5					
	4.3. Reator aneróbio de leito fluidificado termofílico: R_5 , R_{10} , R_{15} , R_{20} e R_{30}					
	4.4. Procedimento de partida e condições operacionais dos reatores para a					
	produção de H ₂					
	4.5. Análises físico-químicas 5					
	4.5.1. Determinação de carboidratos totais solúveis					

	4.5.2. Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois
	4.5.3. Determinação da demanda química de oxigênio
	4.5.4. Determinação de micro e macronutrientes
	4.5.5. Determinação de sólidos suspensos
	4.5.6. Determinação do hidrogênio e da composição do biogás
4	.6. Avaliação da comunidade microbiana por Biologia molecular
	4.6.1. Extração de DNA e amplificação pela reação em cadeia de
	polimerase (PCR)
	4.6.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)
	4.6.3. Clonagem e sequenciamento
4.	7. Frequência das análises químicas e de Biologia Molecular
4.	8. Cálculo dos principais parâmetros
5. R	RESULTADOS E DISCUSSÃO
5	.1. Produção termofílica de hidrogênio: efeito da TCO e do TDH utilizando
	diferentes concentrações de vinhaça: R ₅ , R ₁₀ , R ₁₅ , R ₂₀ e R ₃₀
	5.1.1. Rendimento de hidrogênio (HY)
	5.1.2. Produção volumétrica de hidrogênio (PVH)
	5.1.3. Conteúdo de hidrogênio no biogás
	5.1.4. Análise comparativa dos reatores termofílicos
5	5.2. Ácidos orgânicos observados nos efluentes dos reatores R_5 , R_{15} e R_{20}
5	3.3. Ácidos orgânicos observados nos afluentes e efluentes dos reatores R_{10}
	e R ₃₀
5	5.4. pH, remoções de substrato e de carboidratos totais: R_5 , R_{10} , R_{15} , R_{20} e
	R ₃₀
5	5.5. Sólidos suspensos e relações DQO:N:P e DQO:SO ₄ ⁻² : R_5 , R_{10} , R_{15} , R_{20} e
	R ₃₀
5	6.6. Caracterização molecular da diversidade microbiana
	5.6.1. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante: R ₅ , R ₁₀ , R ₁₅ ,
	R ₂₀ e R ₃₀
	5.6.2. Caracterização filogenética do consórcio microbiano termofílico:
	R ₅

5.6.3. Caracterização filogenética do consórcio microbiano termofílico:	
R ₂₀	104
6. CONCLUSÕES	109
7. SUGESTÕES	111
REFERÊNCIAS	112
APÊNDICES – Produção bibliográfica	139

ii

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, associado ao desenvolvimento da atividade econômica e de renda, demanda necessidade de elevação da produção de energia (POTTMAIER *et al.*, 2013). Atualmente a produção energética é o principal fator contribuinte na emissão de gases de efeito estufa (GEE), em particular o CO₂, por meio da queima de combustíveis fósseis como variável determinante. Dessa maneira, as projeções e as alternativas de como o sistema global de energia se desenvolverá, representam pilares fundamentais a serem abordados, principalmente por meio de implicações políticas e investigações científicas para um crescimento econômico sustentável (HÖÖK e TANG, 2013; LEAL *et al.*, 2013; PAO e FU, 2013).

Tecnologias de energias renováveis oferecem uma excelente oportunidade para atenuar a emissão de GEE e reduzir o aquecimento global por meio da substituição de fontes convencionais de energia (PANWAR *et al.*, 2011). Fica evidente que a utilização deste tipo de energia é considerada um ponto chave na minimização do uso de combustíveis fósseis em associação ao desenvolvimento sustentável. No entanto, em aplicações industriais integradas, ainda há muito que ser pesquisado em razão de ampliar o potencial deste recurso energético (TAIBI *et al.*, 2012), e no contexto de biorrefinarias (SRIRANGAN *et al.*, 2012).

É nesse sentido que, de acordo com Souza *et al.* (2011), a utilização do etanol tem atraído intensa atenção em países que estão interessados em reduzir estes efeitos. A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes em países tropicais, como Brasil e Índia, especialmente para a produção de etanol como combustível (MONCADA *et al.*, 2013). O Brasil é o segundo maior produtor mundial deste biocombustível, com 25.780.404 m³ gerados em 2010/2011 (MAPA, 2013).

No entanto, a produção de etanol também produz emissões de GEE durante a fase agrícola devido à disposição de seus resíduos e da vinhaça de cana-de-açúcar, principalmente durante o seu armazenamento, transporte e aplicação no solo como a forma mais comum de destinação deste efluente: a fertirrigação (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A necessidade de melhorias sustentáveis na produção de etanol tem intensificado a busca pela otimização de processos energéticos juntamente com o processo de adequação ambiental dos co-produtos e resíduos gerados (MORAES *et al.*, 2014). Além do processo convencional de digestão anaeróbia visando a produção de metano como biogás combustível realizado por bactérias metanogênicas, atualmente

a vinhaça de cana de açúcar, um efluente lançado a temperaturas elevadas, tem recebido atenção especial, frente às novas alternativas tecnológicas a serem desenvolvidas com o objetivo de dispor adequadamente esta água residuária (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013).

Entre estas tecnologias, o processo de produção de hidrogênio na ausência de luz realizado por bactérias acidogênicas, as quais podem utilizar biomassa e águas residuárias reais de diversas origens como fonte de substrato, tem se tornado atrativo devido à produção de energia renovável, pelo potencial e capacidade de utilizar resíduos orgânicos agroindustriais e industriais, já que produz, além do biogás (H₂), substâncias de valor agregado, como os ácidos acético, láctico, succínico e butírico (SHOW *et al.*, 2011). Se transformada em um processo estável e economicamente viável, a bioprodução de H₂ a partir de resíduos e efluentes com elevada carga orgânica por meio da fermentação poderá produzir quantidades consideráveis de hidrogênio a partir de materiais renováveis (HARVEY e DIXON, 2010; OH *et al.*, 2011).

Embora seja um processo espontâneo e apresente maiores rendimentos entre os processos de bioprodução de H₂, a fermentação ainda é sensível a diversos fatores operacionais, e assim o principal objetivo da maioria dos estudos de pesquisa relaciona-se a possibilidade de aumento no rendimento (PERERA *et al.*, 2012). A questão seria focada em como atingir condições ideais de produção de hidrogênio, a partir de reduzidos custos de operação, considerando a configuração do reator, temperatura, concentração de substrato e taxa de carregamento orgânico aplicada orgânica aplicada (WANG e WAN, 2009; GRAUSE *et al.*, 2012; GIOANNIS *et al.*, 2013). Inevitavelmente, o desempenho e operação de um reator para produção biológica de hidrogênio são determinados por esses e outros fatores associados com condições físicas e microbiológicas como a pressão parcial do hidrogênio e a cultura microbiana (SHOW *et al.*, 2011).

Uma variedade de pesquisas foi realizada a respeito dos parâmetros do processo fermentativo e correspondentes comunidades microbianas. No entanto, ainda há muito a ser elucidado na degradação do substrato. A fim de melhorar a tratabilidade e biodisponibilidade da matéria resistente, a adição de um co-substrato, ou seja, a mistura de compostos, pode ser uma ótima estratégia de melhoria de degradação microbiana (XIA *et al.*, 2012). A glicose é facilmente biodegradada pelos microrganismos durante a produção de hidrogênio por fermentação (FANG e LIU, 2002). Por outro lado, águas residuárias complexas podem conter compostos recalcitrantes que dificultariam a produção de H₂. Cepas microbianas que podem efetivamente degradar a glicose juntamente com outros compostos presentes em uma mistura de substratos são de

considerável interesse acadêmico e prático (SAINT-AMANS *et al.*, 2001; PRAKASHAM *et al.*, 2009; ZEIDAN e VAN NIEL, 2009; XU *et al.*, 2010; DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2011; HNIMAN *et al.*, 2011; CHAGANTI *et al.*, 2012; ROSALES-COLUNGA *et al.*, 2012; MASSET *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2012; YE *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014).

Um outro fator a ser considerado é que, apesar do controle e manipulação das condições que influenciam a bioprodução de hidrogênio, o acúmulo de gases pode causar efeito negativo na produção do biogás (ZHANG *et al.*, 2011; SONNLEITNER *et al.*, 2012). A pressão parcial de hidrogênio (PH₂) na fase gasosa é crucial. Quando a concentração de hidrogênio no *headspace* aumenta, a síntese de H₂ torna-se termodinamicamente desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de produtos finais reduzidos (LEVIN *et al.*, 2004). Apenas em baixos valores de PH₂ poderá ocorrer a oxidação da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida - NADH para a oxidada - NAD⁺) por meio da síntese de H₂ (CIRANNA *et al.*, 2011).

A transferência líquido-gás do H_2 tem se mostrado como um critério primordial, no qual o hidrogênio deve ser direcionado a partir do líquido para a fase gasosa o mais rápido possível mantendo um elevado fluxo contínuo de produção de biogás pelas células. Por um lado, a explicação baseia-se nas propriedades termodinâmicas, mas por outro, há possivelmente a supersaturação de hidrogênio na fase líquida (PEINTNER *et al.*, 2010). Em temperaturas elevadas, o hidrogênio será transferido a partir do líquido para a fase gasosa promovendo uma alta produção de H_2 . Um rendimento quase estequiométrico exige condições de equilíbrio à baixa pressão parcial de H_2 (SONNLEITNER *et al.*, 2012).

Nesse sentido, a produção de hidrogênio a altas temperaturas poderá aumentar a produção de H₂, bem como selecionar produtores eficientes de hidrogênio (FANGKIM e REUNGSANG, 2011). Processos termofílicos exibem baixa solubilidade de H₂ na fase aquosa, e melhores condições de transferência líquido-gás do hidrogênio (AKUTSU *et al.*, 2009a). Além disso, o funcionamento a temperaturas elevadas pode melhorar o desempenho da fermentação, promovendo a hidrólise dos compostos orgânicos e simplificando a comunidade microbiana favorável para a produção de H₂ (KIM *et al.*, 2011).

A temperatura ideal varia de acordo com a natureza do biocatalisador, como por exemplo, as enzimas dos microrganismos e com as características da água residuária (MOHAN *et al.*, 2012). Condições termofílicas para a produção de hidrogênio podem apresentar vantagens no tratamento de águas residuárias lançadas em temperaturas elevadas, como as provenientes de óleo

de oliva, destilarias e do processamento de alimentos (PRASERTSAN *et al.*, 2009; ROY et al., 2012).

Pelas razões expostas acima, o presente estudo centrou-se na investigação do processo de produção fermentativa contínua de H₂ utilizando uma cultura termofílica mista produtora deste biogás, obtida por meio da inibição de bactérias metanogênicas pelo método de pré-tratamento térmico da cultura. Em seguida, parâmetros como concentração de substrato (vinhaça de cana-de-açúcar), de co-substrato (glicose), o efeito o tempo de detenção hidráulica e da taxa de carregamento orgânico foram avaliados em função da capacidade de produção de hidrogênio (volumétrica, rendimento e conteúdo de H₂) e relacionados à distribuição dos ácidos orgânicos solúveis verificados nos cinco reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílicos (RALF - R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀, com variação na concentração afluente de 5000, 10.000, 15.000, 20.000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹, respectivamente). A comunidade microbiana aderida ao material suporte (argila expandida) foi avaliada utilizando a técnica de Biologia Molecular de reação em cadeia de polimerase seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Os consórcios termofílicos foram caracterizados por meio de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S visando conhecer a diversidade dos microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF), sob temperatura termofílica (55 °C), preenchido com argila expandida como material suporte para a adesão microbiana, utilizando vinhaça de cana-deaçúcar como fonte de carbono, com diferentes concentrações de substrato.

Para atingir esse objetivo principal, uma melhor compreensão da operação dos reatores foi obtida a partir dos seguintes objetivos específicos:

 obter consórcio de bactérias anaeróbias produtoras de gás hidrogênio a partir de inóculo fermentativo-metanogênico, originado de reator UASB termofílico, utilizado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, por meio de pré-tratamento térmico da cultura;

• investigar a produção de H_2 durante a estratégia de co-fermentação, em reator anaeróbio RALF termofílico, a 55 °C, com 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da aplicação de diferentes proporções da mistura de vinhaça e glicose como fontes de carbono, até que a vinhaça fosse então o único substrato disponível para a fermentação;

• avaliar a influência da concentração de substrato (vinhaça de cana-de-açúcar) na capacidade de produção de hidrogênio (produção volumétrica, rendimento e conteúdo de H₂ no biogás), assim como a distribuição dos ácidos orgânicos, em reatores RALF termofílicos com concentrações crescentes de 10.000, 15.000, 20.000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹;

 avaliar o efeito da concentração de substrato e de co-substrato na comunidade microbiana estabelecida ao longo da operação dos reatores termofílicos e caracterizar filogeneticamente para o Domínio *Bacteria* dois consórcios microbianos termofílicos (co-fermentação e fermentação).

3. REVISÃO DE LITERATURA

As mudanças climáticas representam um dos grandes desafios do século 21. Seus impactos mais graves podem ser evitados por meio da concentração de esforços na modificação dos sistemas de energia atuais (IPCC, 2012). Nesse cenário, fontes de energia renováveis apresentam um grande potencial para deslocar as emissões de gases de efeito estufa a partir da queima de combustíveis fósseis. No cenário mundial atual, situações como o aumento nos preços dos combustíveis fósseis, o esgotamento da disponibilidade de fontes não renováveis e a poluição (TIWARI e PANDEY, 2012), tornam necessária a mudança de paradigma frente às preocupações ambientais e socioeconômicas (SRIRANGAN *et al.*, 2012).

Opiniões públicas e privadas passaram a considerar a transição de fontes de energia a partir de combustíveis fósseis para o desenvolvimento de energias sustentáveis e limpas, denominadas energias renováveis (CACCIATORE *et al.*, 2012). Além disso, como resultado da ampliação das atividades agrícolas, industriais e urbanas a demanda por energia aumentou consideravelmente, especialmente em países emergentes (BANOS *et al.*, 2011), como o Brasil.

O Brasil possui fontes naturais de energia renovável abundantes, como a energia eólica e solar, a energia hidráulica, o etanol e o biodiesel. Essas fontes fornecem 47,2% da oferta interna de energia primária no país, promovendo a sua consolidação e expansão através de políticas públicas específicas (PEREIRA *et al.*, 2012).

Uma decisão importante para os governos, indústrias e empresas é definir se é ou não possível estabelecer sistemas de energia renováveis em determinadas regiões, e ainda qual das fontes ou a combinação das mesmas seria a melhor escolha (BANOS *et al.*, 2011).

Desta maneira, a revisão bibliográfica desta tese será composta por itens relacionados ao breve entendimento contextual das fontes de bioenergia disponíveis, o que inclui o etanol brasileiro, com enfoque nas possibilidades de destinação da vinhaça de cana-de-açúcar, o principal efluente produzido na indústria sucroenergética. Entre as destinações desta, e de outras águas residuárias, serão abordados os bioprocessos para a produção de H₂ (fermentação na ausência de luz) como fonte alternativa de produção energética, assim como particularidades que possam melhorar esta bioprodução, como, por exemplo, a constatação eficaz do uso de misturas de substratos para a produção fermentativa, a utilização de temperatura termofílica a partir de diversas águas residuárias e as características e aplicações dos microrganismos termofílicos na

produção de H_2 . Por último, serão demostrados os estudos já realizados envolvendo a utilização do reator RALF na produção de H_2 , e também a partir de vinhaça proveniente de diferentes matérias-primas.

3.1. Bioenergia

Dentre as possibilidades de fontes alternativas energéticas, a bioenergia é uma das mais promissoras (Figura 3.1), representando 10,2 dos cerca de 12,6% de fontes de energia na oferta total de energia primária global.





A bioenergia está disponível a partir de materiais derivados de fontes biológicas. Dessa forma, a biomassa, ou seja, a matéria-prima para este tipo de energia renovável provém de material biológico, ou mesmo de resíduos biológicos. A biomassa poderá ser convertida a gases como metano ou hidrogênio, e a biocombustíveis como o etanol ou biodiesel (BANOS *et al.*, 2011). Neste sentido, a biomassa tem o potencial de proporcionar uma considerável porção da demanda energética mundial (WATKINSON *et al.*, 2012).

Os biocombustíveis são considerados uma opção extremamente válida para reduzir os danos das emissões de gases de efeito estufa, aumentando a diversidade e a segurança de abastecimento de energia, bem como oportunidades para a geração de emprego e do desenvolvimento agroindustrial. A redução de gases de efeito estufa devido à produção de

biocombustíveis por meio da retirada de carbono durante o crescimento da planta é uma das principais razões para a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis (SCARLAT e DALLEMAND, 2011). A biomassa poderá ser diretamente utilizada para a obtenção de energia, ou servir como matéria-prima a ser convertida a vários combustíveis líquidos ou gasosos para aplicações práticas, conforme apresentado na Figura 3.2.



Figura 3.2: Resumo das principais fontes de biomassa, processos de conversão, e produtos finais associados às biorrefinaria. Fonte: Srirangan *et al.* (2012).

Segundo Pereira *et al.* (2012), no contexto mundial de bioenergia, o setor sucroalcooleiro no Brasil é um dos mais competitivos do mundo, com os melhores índices de produtividade e rendimento industrial, bem como baixos custos de produção. Com o petróleo custando mais de U\$ 30,00 por barril, o etanol brasileiro é um substituto altamente competitivo. Também é importante ter em mente que toda a gasolina vendida no Brasil, por lei, deve conter 25% de álcool anidro. Ao longo de anos de incentivos políticos, a estratégia brasileira em cultivar e consolidar

seu mercado interno, em especial nos setores de produção de etanol e em hidroelétricas tem produzido resultados significativos.

A integração sinérgica de várias tecnologias bioquímicas e de bioprocessamento auxilia e poderá colaborar ainda mais para o desenvolvimento de programas de energia a partir de biomassa (SRIRANGAN *et al.*, 2012). No cenário brasileiro, onde parte da matéria-prima (bagaço de cana-de-açúcar) para a produção de etanol de segunda geração já está disponível em instalações de produção convencional de primeira geração, a integração da produção de 1° e 2° gerações parece ser a opção mais clara e vantajosa (DIAS *et al.*, 2012).

3.2. A indústria sucroenergética Brasileira

Segundo Lago *et al.* (2012) existem três razões principais pelas quais os biocombustíveis têm sido adotados, como a redução das emissões em relação aos combustíveis fósseis, o desenvolvimento de uma atividade nova e atrativa para o setor agrícola, e a redução da dependência de combustíveis fósseis. Além disso, a utilização de combustíveis a partir de biomassa poderá atenuar questões atuais de segurança energética e da balança comercial, promovendo desenvolvimento socioeconômico para áreas agrícolas de países em desenvolvimento (SRIRANGAN *et al.*, 2012).

No Brasil, a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar foi estimulada entre 1975 e 1999, por meio da implantação política do Programa Nacional do Álcool (Pro-álcool). Devido aos avanços tecnológicos na produção, ao longo do período do programa nacional, a produção de etanol aumentou de 500.000 m³ ano⁻¹ para 15 milhões m³ ano⁻¹ (VAN DEN WALL BAKE *et al.*, 2009). Atualmente, a cana-de-açúcar ocupa cerca de 7 milhões de hectares, cerca de 2%, de toda a terra arável do país, que é o maior produtor mundial, seguido por Índia, Tailândia e Austrália (ÚNICA, 2012). O Brasil é o segundo maior produtor mundial deste biocombustível, com 25.780.404 m³ gerados em 2010/2011 (MAPA, 2013).

O setor sucroenergético Brasileiro, que engloba tanto a produção de álcool quanto a produção de açúcar e eletricidade, é um dos setores que mais cresce e se desenvolve no país, sendo responsável por 3,5% do PIB nacional (LAIME *et al.*, 2011).

A importância dos esforços em termos de pesquisa, desenvolvimento e inovação em toda a cadeia produtiva da cana-de-açúcar é apresentada na Figura 3.3.



Figura 3.3: Ascensão dos rendimentos e a redução nos custos de produção para produtos brasileiros da agroindústria canavieira entre 1975-2008. Fonte: Lago *et al.* (2012).

Entre 1975 e 2008, por conta dos maiores rendimentos da produção de cana-de-açúcar e da produção de etanol por tonelada de cana processada, foi possível aumentar em 125% a produção de etanol por área de cana cultivada. Considerando todo o volume de etanol produzido nesse período, a "economia" gerada em relação à redução do custo de produção do etanol chega a US\$ 249 bilhões, representando uma economia de US\$ 7,3 bilhões por ano (LIMA e CUNHA, 2010).

O Brasil possui características econômicas, edafoclimáticas, tecnológicas e sociais que o potencializam como grande produtor de cana-de-açúcar. Foram produzidos na safra 2008/2009 27,5 bilhões de litros de álcool no país, sendo a região Centro-Sul responsável por 25,1 bilhões de litros. Somente o Estado de São Paulo produziu cerca de 16,7 bilhões de litros (ÚNICA, 2012), demonstrando sua importância no cenário sucroalcooleiro. Além disso, as projeções de demanda de etanol e açúcar, elaborados pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apontam uma crescente necessidade de processamento de cana-de-açúcar.

Por mais de 30 anos o Brasil delineou uma longa estrada que exigiu não só a constante posição de investimentos por parte dos produtores e do Governo, mas também o engajamento de instituições de pesquisa a fim de fornecer a melhor solução tecnológica possível, tanto industrial e agrícola, para aumentar o rendimento e a eficiência no setor (Lago *et al.*, 2012).

No entanto, de acordo com Goldemberg *et al.* (2008) a expansão da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil, a fim de suprir um mercado em expansão bem como as exportações para diversos países, faz aumentar a discussão a respeito da sustentabilidade da produção.

Segundo Scarlat e Dallemand (2011), os objetivos da utilização de biocombustíveis globais são susceptíveis a apresentarem forte impacto sobre a utilização da área plantada e ao mercado agrícola. Embora a produção de biocombustíveis ofereça novas opções para a utilização de culturas agrícolas, há preocupações ambientais, sociais e econômicos associados com a produção de biocombustíveis. Os autores ainda afirmam que a diversidade de matéria-prima, o grande número de rotas de biocombustíveis e sua complexidade direcionam a uma elevada incerteza sobre as performances de GEE, em termos de reduções de emissões em comparação com os combustíveis fósseis, especialmente se a mudança do uso da área plantada está envolvida. Incertezas adicionais podem ocorrer se os efeitos indiretos são considerados, tais como as mudanças de uso indireto do solo, o impacto sobre alimentos e o fornecimento de energia local.

No Brasil, apesar da contribuição para o crescimento sócio-econômico, o setor sucroalcooleiro também se destaca pela potencialidade de danos ao ambiente. Além dos impactos decorrentes da monocultura da cana-de-açúcar, poluição do ar (por meio de queimadas) e empobrecimento do solo, a indústria sucroalcooleira gera grande quantidade de resíduos em seus processos, que se mal gerenciados, poderão acarretar em uma série de conseqüências negativas ao meio ambiente (MACHADO e FREIRE, 2009).

A industrialização da cana resulta na geração de grande quantidade de resíduos como bagaço, cinzas, resíduos líquidos e emissões gasosas (VACCARI *et al.*, 2003). O principal efluente gerado da produção de etanol é proveniente da vinhaça e de águas residuárias utilizadas para a limpeza de talos da cana-de-açúcar. A disposição da vinhaça representa elevado impacto e alto custo, devido à quantidade produzida, entre 0,011 a 0,014 m³ m³etanol⁻¹, às altas cargas orgânicas e ao pH de 4 a 5 (WILKIE *et al.*, 2000; RODRIGUES e ORTIZ, 2006).

Assim como relatado por Scarlat e Dallemand (2011), Oliveira *et al.* (2013) afirmam que a produção de etanol também produz emissões de GEE durante a fase agrícola devido à disposição de seus resíduos e da vinhaça de cana-de-açúcar, principalmente durante o seu armazenamento, transporte e aplicação no solo como a forma mais comum de destinação deste efluente: a fertirrigação.

A necessidade de melhorias sustentáveis na produção de etanol tem intensificado a busca pela otimização de processos energéticos juntamente com o processo de adequação ambiental dos co-produtos e resíduos gerados (MORAES *et al.*, 2014). Além do processo convencional de digestão anaeróbia visando a produção de metano como biogás combustível, realizado por bactérias metanogênicas, atualmente a vinhaça de cana-de-açúcar, um efluente lançado a temperaturas elevadas, tem recebido atenção especial, frente às novas alternativas tecnológicas a serem desenvolvidas com o objetivo de dispor adequadamente esta água residuária (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). Neste contexto, a crescente demanda pelo álcool faz com que as atenções se voltem também para o aumento da produção de resíduos, principalmente a vinhaça.

3.2.1.Vinhaça de cana-de-açúcar: potencial poluidor e possibilidades de destinação inseridas ao conceito de biorrefinarias (CH₄)

A vinhaça proveniente do processamento da cana-de-açúcar em destilarias de álcool representa uma das mais poluentes águas residuárias, com características de alta recalcitrância e elevado volume gerado (SATYAWALI e BALAKRISHNAN, 2008). O etanol pode ser produzido a partir de quatro principais matérias-primas: carboidratos fermentáveis, amido, celulose e inulina. Os diferentes processos aplicados às diferentes matérias-primas nos processos de fermentação e destilação produzem vinhaças que diferem na sua composição físico-química, a qual depende das espécies de plantas: vinhaças da cana-de-açúcar, do açúcar da beterraba, da uva, do sorgo, da *Agave tequilana* para a produção de tequila, do milho, do sorgo, do trigo e da celulose (ESPANA-GAMBOA *et al.*, 2011).

A produção e as características da vinhaça são altamente variáveis e dependem da natureza, composição da matéria-prima utilizada e do processo de produção de etanol, considerando-se a água utilizada para limpeza dos fermentadores, sistema utilizado no preparo do mosto, método e modo de condução de fermentação alcoólica, linhagem de levedura, tipo de destilador, destilação, e a água utilizada no resfriamento e na fervura pode ser descartada junto com a vinhaça, contribuindo para sua variabilidade (WILKIE *et al.*, 2000).

Sendo assim, várias pesquisas têm sido realizadas com vinhaças de diferentes origens de acordo com o país em que a pesquisa se desenvolve. A Tabela 3.1 apresenta alguns dos principais

parâmetros que definem a composição química de vinhaças provenientes de diferentes matériasprimas.

	Matéria-prima					
Parâmetros	Caldo de cana	Melaço de cana	Uva (vinho)	<i>Agave</i> (tequila)	Sorgo	Beterraba
$DBO_{(g,L^{-1})}$	16,7	39,5	15,5-16,3	20,6	46,0	27,5-44,9
$DQO_{(g, L)}^{-1}$	30,4	84,9-95	26-50,2	55,2-66,3	79,9	55,5-91,1
$N_{T (mg. L^{-1})}$	102-628	153-1230	104,9-650	na	800	1800-4750
$P_{T (mg. L^{-1})}$	71-130	1-190	65-118	41	1990	160-163
$K_{(mg. L^{-1})}$	1733-1952	4893-11000	118-800	240-345	na	10000
$S_{T (mg. L^{-1})}$	1356	1500-3480	120	780-880	na	3500-3720
pН	4,0-4,6	4,4-4,8	3,0-4,2	3,4	4,5	4,3-5,3
$Cu_{(mg. L^{-1})}$	4,00	0,27-1,71	0,20-3,26	0,36-4,00	37,00	2,1-5*
$Cd_{(mg. L^{-1})}$	na	0,04-1,36	0,05-0,08	0,01-0,2	na	<1*
$Pb_{(mg. L)}^{-1}$	na	0,02-0,48	0,55-1,34	0,06-0,50	na	<5*
$\operatorname{Fe}_{\mathrm{mg. L}}^{-1}$	16	12-157	0,001-0,077	35-45	317	203-226*
Fenóis (mg. L ⁻¹)	na	34	29-474	44-81	na	450*
Vinhaça	13	12-20	11	10-12	14-16	9-15
(IL. etanol) Referência	Cail e Barford (1985 ^a); Baez-Smith (2006); Wilkie <i>et</i> <i>al.</i> (2000); Salomon e Lora (2009)	Pathak <i>et al.</i> (1999); Hutnan <i>et al.</i> (2003); Baez-Smith (2006); Wilkie <i>et al.</i> (2000); Kannan e Upreti (2008); Chindankumar <i>et al.</i> (2009)	Wilkie <i>et al.</i> (2000); Bustamante <i>et</i> <i>al.</i> (2005); Vlyssides <i>et</i> <i>al.</i> (2005)	Ilangovan <i>et</i> <i>al.</i> (1997); Orendain (2006); Mendez- Acosta <i>et al.</i> (2010); Buitrón e Carvajal (2010); López <i>et al.</i> (2010).	Cail e Barford (1985 ^b); Wilkie <i>et</i> <i>al.</i> (2000); Gnansoun ou <i>et al.</i> (2005)	Wilkie <i>et al.</i> (2000); Madejón <i>et</i> <i>al.</i> (2001); Decloux <i>et</i> <i>al.</i> (2002); Hutnan <i>et</i> <i>al.</i> (2003); Jiménez <i>et</i> <i>al.</i> (2006); Tejada e Gonzalez (2006)

Tabela 3.1: Composição e produção de vinhaça proveniente de diferentes matérias-primas

(* mg kg⁻¹); na: não detectado. Fonte: Espana-Gamboa *et al.* (2011).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar anidro em uma refinaria destilaria é composta por etapas principais, apresentadas na Figura 3.4. A vinhaça, um resíduo da produção de etanol e açúcar, representa um problema de disposição e tratamento, devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (entre 25 e 60 g L^{-1}) e sais dissolvidos contendo potássio, cálcio e íons sulfato (BUITRÓN e CARVAJAL, 2010).



Figura 3.4: Diagrama do processo de fabricação do açúcar e álcool a partir do melaço da cana-deaçúcar. Fonte: Adaptado de Paiva e Morabito (2007); Dias *et al.* (2012).

Segundo Barros *et al.* (2010), durante o processo de produção do etanol, a vinhaça é gerada em elevada quantidade e sua produção varia em função dos diferentes processos, como fermentação do mosto e destilação do vinho. A vinhaça pode ser formada a partir de três mostos diferentes (líquidos susceptíveis a sofrer fermentação), o que lhe confere níveis variáveis para cada elemento mineral. O mosto de melaço é o mais rico e apresenta em média níveis de NPK em torno de 0,57; 0,10; 3,95 kg.m-³ de vinhaça, respectivamente. O mosto misto, que é produzido em usinas como destilarias, apresenta níveis em torno de 0,48 de N, 0,09 de P, 3,34 de K e o mosto de caldo, produzido em destilarias isoladas, apresenta os níveis de NPK em kg m⁻³ de vinhaça, de 0,28; 0,09; 1,29 respectivamente.

Até o final da década de 70, toda a vinhaça produzida era lançada nos rios, córregos e outros reservatórios de água (GLORIA e ORLANDO-FILHO, 1984). A partir de 1978, normas e legislações específicas no âmbito federal e estadual, elaboradas principalmente pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (Cetesb) do Estado de São Paulo, obrigaram os produtores a providenciar um destino ambiental correto e comercialmente interessante à vinhaça (OLIVEIRA, 2011). De acordo com Zhang *et al.* (2012b), o melaço proveniente de usinas é uma

das formas mais vulneráveis de indústrias poluidoras, as quais geram grande volume de vinhaça. Ações de reaplicação ou reúso são limitadas devido ao elevado conteúdo de potássio na vinhaça, muitas vezes desconhecido. Segundo Laime *et al.* (2011), com a perspectiva de aumento substancial da produção de vinhaça e, tendo em vista o aumento do controle sobre a disposição do resíduo, surgiram diversas iniciativas de busca de tecnologias para solucionar o problema.

Uma forma de reaproveitamento da vinhaça que é submetida ao processo de biodegradação é a sua utilização no reúso da água para os processos de lavagem da cana e outras atividades intrínsecas ao processo industrial, bem como para a produção de metabólitos de interesse comercial. Reduz-se a contaminação de solos e corpos hídricos principalmente em regiões que apresentem lençol freático próximo a superfície (FREIRE e CORTEZ, 2000).

No ano de 2005, no estado de São Paulo, foi homologada a Norma Técnica CETESB P4.231 intitulada "Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola", a qual estabelece os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça, gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana-de-açúcar.

No entanto, a prática mais comum e a mais utilizada no setor agrícola de cana-de-açúcar é realizada por meio do procedimento de utilização de vinhaça na adubação da própria plantação de cana, conhecida como fertirrigação. A vinhaça é aspergida por meio de tubulações de irrigação, ou levada em caminhões para aplicação direta na lavoura. É um cenário sólido na indústria sucroalcooleira, mas o volume do resíduo cresce de forma descomunal (OLIVEIRA, 2011).

Embora a vinhaça apresente valor para uso como fertilizante, sua disposição final pode ser considerada problemática devido a sua composição. O efluente apresenta elevada carga orgânica, com proteínas, ácido lático, glicerol, aminoácidos e açúcares reduzidos, compostos recalcitrantes, melanoidinas, forte odor e coloração amarronzada (WILKIE et al., 2000; SATYAWALI e BALAKRISHNAN, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; YALCIN *et al.*, 2010). Contêm ainda variadas concentrações de nutrientes na forma de nitrogênio, fósforo e potássio (SCHULTZ *et al.*, 2010). De acordo com Machado e Freire (2009), estudos da viabilidade técnica, operacional e econômica de tecnologias de tratamento disponíveis para a vinhaça são de grande importância, dado o volume de vinhaça produzido. Os autores afirmam que ao sair da usina a vinhaça apresenta elevada carga orgânica, (entre 25 e 65 g L⁻¹ em termos de DQO), valor reduzido de pH (próximo de 4,0), além de temperaturas do efluente na faixa de 80°C a 90°C, condições extremamente prejudiciais aos solos e aos corpos de água.
A prática de aplicação da vinhaça nas áreas agrícolas de cana-de-açúcar, associadas ao manejo da plantação, poderão impactar consideravelmente a comunidade microbiana do solo devido às mudanças abruptas e transitórias na disponibilidade de nutrientes (SANT´ANNA *et al.*, 2009). Deve-se levar em conta possíveis impactos ambientais adversos, como o enriquecimento de sais no solo e também a lixiviação do nitrato (PARNAUDEAU *et al.*, 2008).

Dessa maneira, a vinhaça possui um grande impacto ambiental quando disposta sem o devido tratamento e em locais inapropriados. Algumas pesquisas têm enfatizado diversos métodos para o tratamento, utilização e disposição de águas residuárias provenientes de indústrias fermentativas do etanol. Tais métodos incluem técnicas físico-químicas e biológicas, como sistemas aeróbios e reatores anaeróbios, filtros percoladores, lagoas de estabilização, e evaporação/condensação na presença ou ausência de combustão (MOHANA *et al.*, 2009; SILES *et al.*, 2011; CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013).

Entre as possibilidades de sistemas biológicos, a alta carga orgânica presente na vinhaça faz com que o tratamento anaeróbio se torne mais atrativo em comparação com o aeróbio (PANT e ADHOLEYA, 2007), diminuindo a concentração de matéria orgânica e gerando biogás que pode ser utilizado para a geração de energia, como por exemplo, os processos convencionais de conversão do substrato orgânico a metano (CH₄) realizado por bactérias metanogênicas.

Diversos estudos foram realizados com diferentes configurações de reatores para avaliar o desempenho da degradação da vinhaça em condições anaeróbias para a obtenção de CH₄, como por exemplo, a utilização de reatores UASB em condições mesofílica (SÁNCHEZ RIERA *et al.*, 1985; SHARMA e SING, 2001; MACHADO e FREIRE, 2009) e termofílica (WIEGANT *et al.*, 1986; SOUZA *et al.*, 1992; VLISSIDIS e ZOUBOULIS, 1993; DRIESSEN *et al.*, 1994; HARADA *et al.*, 1996; SYUTSUBO *et al.*, 1997; VAZOLLER, 1997; VIANA, 2006); reatores de leito fixo (BORIES *et al.*, 1988; LALOV *et al.*, 2001; TELH, 2001; SETH *et al.*, 1995; GOYAL et al., 1996); reatores de leito fluidificado (BALAGUER et al., 1992; FERNANDÉZ *et al.*, 2001; DAMIANO, 2005; FERNANDÉZ *et al.*, 2007; SIQUEIRA, 2008; CABELLO *et al.*, 2009; ANDALIB *et al.*, 2012) e combinação de reator UASB e filtro anaeróbio (KUMAR *et al.*, 2007), entre outros. Frente a necessidade do tratamento da vinhaça e a busca por configurações de digestão anaeróbia, a Tabela 3.2 resume o desempenho de alguns dos diversos reatores anaeróbios utilizados em escalas laboratoriais e piloto para o tratamento de águas residuárias provenientes de destilarias de álcool, para a produção de CH₄.

Reator	Vinhaça	TCO	Produtividade de	E.R.	Referência
	-	$(\text{kg DQO m-}^{3}\text{d}^{-1})$	CH_4	DQO	
UASB	Cana-de-açúcar	24	$9 L L^{-1} d^{-1}$	75	Sánchez-Riera <i>et al</i> (1985)
UASB	Destilarias de whisky	15	12 L d ⁻¹	90	Goodwin e Stuart (1994)
UASB	Destilarias de raki	6 a 11	$376 \text{ ml g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$	90	Akarsubasi <i>et al.</i> (2006)
UASB	Cana-de-açúcar	2 a 16	490 L d ⁻¹	84 a 98	Turkdogan-Aydinol e Yetilmezsoy (2010)
EGSB	Destilarias de cervejaria - trigo	0,012	833 L d ⁻¹	80	Kato et al. (1999)
UASB	Cana-de-açúcar	>86	$26 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	60	Wiegant <i>et al.</i> (1986)
UASB	Cana-de-açúcar	>28	$0,06 \text{ kg DQO}^{-1} \text{ kg}$ SSV $^{-1} \text{ d}^{-1}$	39 a 67	Harada <i>et al</i> . (1996)
UASB	Cana-de-açúcar	>30	-	87	Syutsubo <i>et al.</i> (2001)
Reator anaeróbio de	Cana-de-açúcar	14 a 20	$8,4 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	85 a 97	Bories <i>et al</i> (1988)
Reator anaeróbio de leito fixo	Cana-de-açúcar	22	0,45 m ³ kg DQO removida	72	Seth et al. (1995)
Reator anaeróbio de	Cana-de-açúcar	23	7,2 m ³ m ⁻³ d ⁻¹	60	Acharya <i>et al.</i> (2008)
RALF	Destilarias de vinho	9 a 36	12,3 $\text{m}^3 \text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$	80	Balaguer <i>et al.</i> (1997)
RALF	Cana-de-açúcar	10	2 L d ⁻¹	70	Fernández <i>et al.</i> (2001)
RALF	Cana-de-açúcar	19	46 mL d^{-1}	57	Cabello et al.(2009)
RALF	Milho	29	$40 L L vinhaça^{-1} d^{-1}$	88	Andalib et al. (2012)
UASB e filtro	Cana-de-açúcar	8,7	$0,34 \text{ m}^3 \text{ kg DQO}^{-1}$	79	Kumar et al. (2007)
CSTR	Destilarias de tequila - Agave	0,001 a 0,006	14 L d ⁻¹	95	Méndez-Acosta et al. (2010)
AnSBBR	Cana-de-açúcar	0,8 a 5,7	-	43 a 78	Doll e Foresti (2010)

Tabela 3.2: Alguns dos diversos reatores anaeróbios utilizados para o tratamento de águas residuárias (produção de CH₄) provenientes de vinhaça de destilarias de álcool

TCO: taxa de carregamento orgânica; E.R.: Eficiência de remoção (%); UASB: reator anaeróbio de manta de lodo com fluxo ascendente; EGSB: reator anaeróbio com leito granular expandido; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado; CSTR: reator contínuo de tanque agitado; AnSBBR: reator anaeróbio batelada sequencial com biomassa imobilizada.

poluidora somente poderão ser lançados direta ou indiretamente, nos corpos de água, desde que obedeçam as condições e padrões previstos no artigo 34 que estabelece, dentre outros parâmetros, que o pH de efluentes deve estar entre 5 a 9 e temperatura inferior a 40 °C. No caso da disposição

em solo, a Norma Técnica da CETESB P4.231 de 2005 também exige a correção do pH da vinhaça para valores em torno de 6,0 e estabeleceu um prazo de 5 anos a contar da data de publicação da norma para que as usinas se adequem às exigências estabelecidas. Com relação ao pH da vinhaça, observa-se que os valores ficam entre 3,0 e 5,3, fazendo assim necessário a busca por tratamentos prévios de correção ou alternativas de tratamento.

A respeito da biodegradabilidade da água residuária, pode-se observar a relação DBO/DQO das diferentes fontes de vinhaças (apresentadas na Tabela 3.1), com valores de 0,54; 0,47; 0,3 a 0,6; 0,3 a 0,4; 0,57 e 0,5, encontrados para as vinhaças provenientes de caldo da cana, melaço da cana, uva, tequila, sorgo e beterraba, respectivamente. Os valores indicam que os processos biológicos de tratamento são aplicáveis.

Os métodos de tratamento de resíduos objetivam a remoção de compostos indesejáveis na água residuária para que possa ocorrer o lançamento e disposição segura no meio ambiente. Consequentemente, a importância dos sistemas de tratamentos biológicos atraiu a atenção de pesquisas pelo mundo todo e tem auxiliado no desenvolvimento de tecnologias cada vez mais eficientes e de baixo custo (FERREIRA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a digestão anaeróbia aplicada ao tratamento da vinhaça representa uma eficiente alternativa, tanto em aspectos ambientais como em energéticos, ao permitir a redução de sua carga poluidora e possibilitar a produção de energia do biogás gerado. Segundo Ribas (2007) os efeitos poluidores da atividade podem ser minimizados com tratamento prévio visando posterior descarte no ambiente.

Dependendo do processo empregado, o processo biológico de digestão anaeróbia da vinhaça poderá resultar no aproveitamento da elevada carga orgânica contida nessa água residuária agroindustrial para a geração de energia na forma de biogás (Figura 3.5), por meio de processos de conversão do substrato orgânico a metano, realizado por arqueias metanogênicas, e também a H₂, realizado por bactérias acidogênicas, principalmente no que diz respeito à possibilidade de utilização deste biogás como fonte de energia alternativa à utilização do CH₄.



Figura 3.5: Sítio de interações direcionadas à biodegradação progressiva de moléculas orgânicas complexas a ácidos orgânicos, CH₄, CO₂, H₂ e H₂S em biorreatores (A: bactérias hidrolíticas/fermentativas; B: bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio; C: bactérias homoacetogênicas; D1: metanogênicas acetoclásticas; D2: metanogênicas hidrogênicas). Adaptado de O'Flaherty (2006), Guo *et al.* (2010) e Wilkinson (2011).

Diante às diversas configurações e possibilidades de reatores utilizados para o tratamento de águas residuárias, a digestão anaeróbia parece ser o processo mais promissor para o tratamento efetivo dos resíduos. Vários fatores devem ser ajustados antes que o sistema de tratamento seja considerado uma solução econômica e tecnicamente viável. Considerando o crescimento de todo setor sucroalcooleiro brasileiro, torna-se relevante apontar as possibilidades tecnológicas e buscar inovações para a destinação da vinhaça.

3.3. Bioprocessos para a produção de hidrogênio: fermentação

Águas residuárias com concentrações elevadas de poluentes orgânicos (Castro-Villalobos *et al.*, 2012) estão sendo cada vez mais sendo produzidas no mundo. Conforme abordado no tópico anterior, a digestão anaeróbia destes compostos é uma alternativa atraente, porque, a energia renovável obtida a partir de biomassa e compostos orgânicos, pode proporcionar produção contínua de fonte energética, na forma de biogás. Nesse sentido, em razão do seu potencial inesgotável, do baixo custo, e por ser considerada uma fonte renovável de energia limpa, a utilização do biohidrogênio tem atraído atenção global (Show *et al.*, 2012). A bioprodução de H_2 a partir de águas residuárias representa uma alternativa sustentável para uma economia baseada em combustíveis fósseis, um vez que este biogás é portador de energia com elevado rendimento (Mohan *et al.*, 2013).

De acordo com Lam e Lee (2011) o hidrogênio apresenta elevado poder calorífico (142 MJ kg⁻¹), podendo assim fornecer mais energia por unidade, para a combustão, fazendo do H₂ um forte candidato para o sistema futuro de energia (Tabela 3.3).

Combustível	H_2	CH_4	Gás	Gasolina	Diesel	Etanol	Metanol	Carvão	Madeira	
			natural							
Poder										
calorífico	142	56	54	47	45	30	23	27	15	
$(MJ kg^{-1})$										

Tabela 3.3: Valores caloríficos de diversos combustíveis

Dessa forma, conforme observado nas Figuras 3.6 e 3.7 a produção biológica de hidrogênio pode ser dividida em: biofotólise de água por meio da utilização de algas (direta) e cianobactérias (indireta), fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas, produção fermentativa de hidrogênio a partir de compostos orgânicos. Podem ocorrer também sistemas híbridos com bactérias fotossintéticas e fermentativas. Cada um dos tipos de produção apresenta aspectos positivos e negativos, além de barreiras tecnológicas que precisam ser superadas antes de serem inseridas em escalas plenas e práticas (SINHA e PANDEY, 2011).

Os recentes desenvolvimentos no seqüenciamento genômico, na análise de expressão, e na tecnologia molecular e genética têm aumentado intensivamente a capacidade de ampliar as habilidades metabólicas microbiológicas, sugerindo que posteriores e possíveis modificações poderão resultar em comunidades microbianas capazes de produzir H_2 a elevados rendimentos (ABO-HASHESH *et al.*, 2011).

Entre os bioprocessos apresentados para a produção de hidrogênio, a fermentação na ausência de luz, uma forma modificada do processo de digestão anaeróbia, tem sido sugerida como grande detentora de potencial de produção, com altos rendimentos e a habilidade de utilizar resíduos orgânicos particulados como matéria-prima (PEREIRA *et al.*, 2012).

Kothari *et al.* (2012) afirmaram que a partir da fermentação ocorre a conversão de cerca de 40% da energia química da água residuária em energia na forma de hidrogênio. Neste sentido, embora a viabilidade da produção fermentativa de hidrogênio a partir de águas residuárias tenha sido demonstrada por diversos autores, a tecnologia ainda está no seu início.



Figura 3.6: Classificação da produção biológica de H₂. Fonte: Kim e Kim (2011)



Figura 3.7: Esquema comparativo dos três principais tipos tecnológicos de bioprodução de hidrogênio Fonte: Adaptado de Sinha e Pandey (2011).

De acordo com Sinha e Pandey (2011), em comparação aos processos fotossintéticos de produção de hidrogênio, os processos fermentativos possuem a vantagem de rápida produção de hidrogênio e a simplicidade de operação. A produção de hidrogênio a partir da fermentação na ausência de luz, utilizando biomassa e águas residuárias reais como substrato tem se tornado amplamente atrativa devido à produção de energia renovável, ao potencial e capacidade de lidar com resíduos orgânicos agrícolas e industriais, ao passo que produz H₂ no biogás (BAO *et al.*, 2013).

A questão é como atingir condições ideais de produção de hidrogênio, mantendo reduzidos os custos de tratamento, considerando os parâmetros operacionais: fonte de inóculo, substrato, configuração do reator, temperatura, concentração de substrato e taxa de carregamento

orgânico aplicada orgânica aplicada (WANG e WAN, 2009; GRAUSE *et al.*, 2012; GIOANNIS *et al.*, 2013).

Dessa maneira, os estudos realizados com diferentes fontes e a partir de misturas de substratos orgânicos para a melhoria do processo de degradação em reatores biológicos, e a aplicação do processo fermentativo produtor de H_2 no tratamento de diversas águas residuárias, abrangendo os processos envolvidos na geração de energia a partir da fermentação termofílica na ausência de luz, assim como alguns dos parâmetros associados à esta produção, serão abordados a seguir.

3.4. Fontes e misturas de substratos para a produção fermentativa de H₂

A produção fermentativa de hidrogênio representa uma estratégia aplicável para gerar energia a partir de uma variedade de substratos (Ye *et al.*, 2012). Segundo Akutsu *et al.* (2009a e b) a determinação da aplicabilidade da utilização da biomassa para a produção de H₂, tornando possível a investigação específica de cada fonte de inóculo, bem como as características dos substratos e águas residuárias reais compostas com constituintes complexos, será de extrema importância para os estudos na área de produção biológica de hidrogênio.

Recentemente foram desenvolvidas pesquisas utilizando como fonte de substrato a glicose (LI *et al.*, 2008b; YOKOYAMA *et al.*, 2009; KARADAG, 2011; BARROS e SILVA, 2012), a sacarose (GUO *et al.*, 2010; PERERA e NIRMALAKHANDAN, 2011), a xilose (LONG *et al.*, 2010; MAINTINGUER *et al.*, 2011; MÄKINEN *et al.*, 2012), o amido (CHEN *et al.*, 2009; CAKIR *et al.*, 2010; SEN e SUTTAR, 2012), resíduos sólidos (LEE *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2012), óleo de oliva (O-THONG *et al.*, 2008; KOUTROULI *et al.*, 2009; PRASERTSAN *et al.*, 2009; O-THONG *et al.*, 2009; ISMAIL *et al.*, 2010; BADIEI *et al.*, 2012), águas residuárias de soro de queijo (AZBAR *et al.*, 2009a; AZBAR *et al.*, 2009b; KESKIN *et al.*, 2011; KARGI *et al.*, 2012; ROSA et al., 2009; BUITRÓN e CARVAJAL, 2010), destilarias de tequila (ESPINOZA-ESCALANTE *et al.*, 2009; BUITRÓN e CARVAJAL, 2010), destilarias de etanol utilizando a mandioca (INTANOO et al., 2012; ROY et al., 2012; WANG et al., 2013^b), melaço de açúcar (LAY *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2010; HAN et al., 2012; WANG et al., 2013^a); vinhaça de açúcar de beterraba (ACEVES-LARA *et al.*, 2010) e caldo de cana (PATTRA *et al.*, 2011).

Desta maneira, a Tabela 3.4 apresenta a utilização de diferentes fontes de substratos em diferenciadas configurações de reatores, tornando-se essencial para a investigação dos mesmos para a obtenção de melhores produções de hidrogênio (REN *et al.*, 2011).

Reator	Substrato	Produção de H ₂	Crescimento biológico	Inóculo	Referência
CSTR	Melaço	249 mmol L ⁻¹ d ⁻¹	Suspenso	Lodo: esgoto municipal	Ren et al. (2006)
CSTR	Amido	2,8 mol mol glicose ⁻¹	Suspenso	Lodo digerido	Akutsu et al. (2009 ^a)
CSTR	Lactose	2,8 mol mol lactose ⁻¹	Suspenso	Lodo: UASB	Davila-Vazquez <i>et al.</i> (2009)
CSTR	Sacarose	3,74 mol mol glicose ⁻¹	Suspenso	Clostridium pasteurianum	Yuan et al. (2009)
CSTR	Resíduos de tofu e lodo anaeróbio digerido	2,3 mol mol glicose ⁻¹	Suspenso	Lodo: CSTR	Kim e Lee (2010)
CSTR	Melaço	390 mmol L ⁻¹ d ⁻¹	Suspenso	Lodo: esgoto municipal	Lay et al. (2010)
CSTR	Glicose peptona Amido	1247 mmol $L^{-1} d^{-1}$ 412 mmol $L^{-1} d^{-1}$	Suspenso	Lodo anaeróbio	Li et al. (2010)
CSTR	peptona Melaço	9,72 L d ⁻¹ L ⁻¹	Aderido	Lodo: esgoto	Ren et al. (2010)
		6,65 L d L	Suspenso	Lodo: CSTR e	
UASB	Amido	1,7 mol mol glicose ⁻¹	Granular	UASB	Akutsu <i>et al.</i> (2009°)
UASB	Água residuária: café	1,29 mol mol hexose ⁻¹	Granular	Lodo digerido: anaerobiose	Jung et al. (2010)
EGSB	Glicose L-arabinose	2,7 L $L^{-1}d^{-1}$	Granular	Lodo: CSTR e UASB	Abreu et al. (2010)
RALF	Glicose	2,49 mol mol glicose ⁻¹	Aderido	Lodo: UASB	Amorim et al. (2009)
RALF	Glicose	2,29 mol mol glicose ⁻¹	Aderido	Lodo: UASB	Shida et al. (2009)
RALF	Glicose	2,55 mol mol glicose ⁻¹	Aderido	Lodo: UASB	Reis e Silva (2011)
RALF	Glicose	2,11mol mol glicose ⁻¹	Aderido	Lodo: UASB	Barros e Silva (2012)
RALF	Soro de queijo	1,90 mmol g DQO ⁻¹	Aderido	Lodo: UASB	Rosa et al. (2014)

Tabela 3.4: Utilização de diferentes fontes orgânicas para a produção de H₂ utilizando diversas configurações de reatores anaeróbios

CSTR: reator de agitação contínua; UASB: Reator anaeróbio de manta de lodo com fluxo ascendente; EGSB: reator anaeróbio com leito granular expandido; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado. Fonte: Adaptado de Ren *et al.* (2011).

A fim de melhorar a tratabilidade e biodisponibilidade de substratos complexos, a adição de um co-substrato, ou seja, a mistura de compostos, pode ser uma ótima estratégia de melhoria

de degradação microbiana (XIA *et al.*, 2012). A glicose é facilmente biodegradada pelos microrganismos durante a produção de hidrogênio por fermentação (FANG e LIU, 2002). Por outro lado, águas residuárias complexas podem conter compostos recalcitrantes que dificultariam a produção de H₂. Cepas microbianas que podem efetivamente degradar a glicose juntamente com outros compostos presentes em uma mistura de substratos são de considerável interesse acadêmico e prático (SAINT-AMANS *et al.*, 2001; REN *et al.*, 2008; PRAKASHAM *et al.*, 2009; ZEIDAN e VAN NIEL, 2009; XU *et al.*, 2010; DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2011; HNIMAN *et al.*, 2011; CHAGANTI *et al.*, 2012; ROSALES-COLUNGA *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2014). Esta combinação poderá atingir rendimentos de H₂ mais elevados pela completa utilização da energia armazenada nos substratos.

Na produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça de tequila, Buitrón e Carvajal (2010) alcançaram valores máximos de 50,5 mL $H_2 L^{-1} h^{-1}$, a partir de glicose como afluente inicial de adaptação, permitindo que a biomassa obtivesse a condição mais favorável possível, anteriormente à introdução de vinhaça ao reator em batelada.

A partir da obtenção de cepa recombinante de bactéria termoacidofílica produtora de H_2 e utilizando como fontes de substratos a glicose, a xilose e a mistura de glicose/xilose em reatores em batelada sob condições termofílicas, Li *et al.* (2010), alcançaram valores de 2,71; 1,45 e 2,28 mol mol açúcar⁻¹, respectivamente, demonstrando assim a possibilidade da fermentação de mistura de substratos para a produção eficiente de hidrogênio.

Rosales-Colunga *et al.* (2012) demonstraram que as cinéticas da produção de hidrogênio e de metabólitos, assim como o rendimento de H_2 , são influenciados pelo tipo de açúcar utilizado como fonte de substrato, refletindo nos desvios das rotas metabólicas para a produção de hidrogênio. Por meio da utilização de galactose como fonte de energia os autores obtiveram 1,12 mol.mol galactose⁻¹. A fermentação da lactose ou da mistura de glicose/galactose apresentou rendimento similar, de 1,02 mol.mol hexose⁻¹, tornando possível a aplicação ou estudos mais aprofundados da utilização de carboidratos como substratos individuais ou como mistura para a produção de hidrogênio.

Efetiva produção contínua de H₂, de 1,37 e 1,90 mmol g DQO⁻¹ foi obtida por Rosa *et al.* (2014), a partir da fermentação individual de glicose e de soro de queijo, respectivamente, em reator anaeróbio de leito fluidificado. A utilização da mistura destes dois substratos, durante a co-fermentação, favoreceu a produção concomitante de etanol (3,45 mol EtOH g⁻¹) e de hidrogênio

(1,70 mmol g DQO⁻¹), demonstrando que a mistura de substratos melhorou a produção de bioetanol.

Uma vez que as bactérias produtoras de H_2 são sensíveis às alterações ambientais, uma investigação sobre a resposta do reator em função das mudanças de substrato poderá auxiliar na operação do sistema de produção de hidrogênio.

3.5. Produção biológica de H₂ a partir de vinhaça proveniente de diferentes matériasprimas

Conforme exposto nos tópicos anteriores, a viabilidade da produção de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos tem sido amplamente demonstrada. A utilização destes resíduos para a produção de biohidrogênio como fonte de energia é considerada uma abordagem de pesquisa aplicada adequada, uma vez que a produção de energia e a estabilização do resíduo seriam realizadas simultaneamente (PERERA *et al.*, 2012).

Neste sentido, ao longo da última década tem sido demonstrada a viabilidade da geração de hidrogênio a partir de águas residuárias orgânicas similares à composição da vinhaça de canade-açúcar, como as provenientes de destilarias de álcool (INTANOO *et al.*, 2012; ROY *et al.*, 2012), e de melaço (LAY *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2010; KONGJAN *et al.*, 2011). A produção e as características da vinhaça são altamente variáveis, e dependem da matéria-prima e de diversos aspectos relacionados ao processo operacional da produção de etanol. O potencial destes resíduos a partir de diferentes matérias-primas, tem sido demonstrado sob condições mesofílicas em reatores em batelada (HSIAO *et al.*, 2009; BUITRÓN e CARVAJAL, 2010; NASR *et al.*, 2011; SEARMSIRIMONGKOL *et al.*, 2011) assim como em reatores contínuos (PATTRA *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013^a; WU *et al.*, 2013).

Buitrón e Carvajal (2010) demonstraram a viabilidade de produzir biohidrogênio a partir da vinhaça de tequila. Os autores observaram que a quantidade de biogás e a produção de hidrogênio foram afetadas pela concentração inicial afluente, e que a intensidade deste fator foi dependente do TDH e da temperatura utilizada (25 e 35 °C).

Especificamente para o tratamento de águas residuárias provenientes de melaço (refinaria de açúcar), Ren *et al.* (2010) investigaram a produção fermentativa de hidrogênio, sob condições mesofílicas, em reator anaeróbio de agitação contínua (CSTR), com crescimento da biomassa suspenso e aderido, em carvão ativado, com cargas e TDH aplicados de 8 a 40 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e de

6 h, respectivamente. Os sistemas se mantiveram com valores médios de pH entre 4,5 a 4,8 e 3,8 a 4,4, para o crescimento suspenso e aderido, respectivamente. As produções de hidrogênio foram superiores no reator com crescimento aderido, com cerca de 9,72 L d⁻¹ L⁻¹, enquanto a produção específica de hidrogênio obtida de 5,13 L g⁻¹ SSV d⁻¹ foi maior para o reator com crescimento suspenso. Os autores afirmam que o reator com biomassa aderida mostrou-se mais estável na produção de hidrogênio, pH, eficiência de utilização do substrato e produção de metabólitos (ácidos graxos voláteis e etanol) durante todo o experimento.

A investigação da produção de hidrogênio em reator CSTR para o tratamento de águas residuárias provenientes de melaço (fermentado condensado solúvel), com TDH aplicado de 3 a 24, Lay *et al.* (2010) obtiveram 390 mmol $H_2 L^{-1} d^{-1}$ com carga aplicada de 320 g DQO $L^{-1} d^{-1}$ e TDH de 3 h. Os autores alcançaram maior produção de hidrogênio com carga orgânica e TDH aplicados de 80 g DQO $L^{-1} d^{-1}$ e 12 h, respectivamente. Por meio de análises de PCR em tempo real, com TDH de 8 h, os autores detectaram *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium pasteurianum*. A utilização do melaço como fonte para a produção de hidrogênio mostrou-se um processo viável, porém com menor produção de hidrogênio quando comparado à utilização de sacarose.

O estudo da otimização da produção de hidrogênio, controlando principalmente a concentração afluente, em reatores anaeróbios em batelada utilizando como substrato vinhaça de açúcar de beterraba foi realizado por Aceves-Lara *et al.* (2010). Os autores obtiveram aumento de 75% na produção de hidrogênio, 8,27 mL H₂ L⁻¹ min⁻¹ por meio da aplicação da vazão afluente como a principal variável controlada, atingindo remoções de 95% de glicose.

Mohan *et al.* (2011) utilizaram reator em batelada sequencial a fim de desenvolver e analisar a comunidade microbiana produtora de H₂ a partir de águas residuárias de destilarias de álcool. O desempenho ideal do sistema ocorreu com 40 dias de operação, 0,72 kg m⁻³ d⁻¹, atingindo 0,32 mol H₂ m⁻³ d⁻¹. Espécies dominantes, como *Delftia* sp., uma bactéria oxidante de hidrogênio, foram substituídas por *Anaerofilum* sp., uma Firmicute anaeróbia e hidrogenase Fedependente.

Pattra *et al.* (2011) avaliaram o desempenho de um reator contínuo de tanque agitado nãoestéril (CSTR) enriquecido com *Clostridium butyricum* na produção de hidrogênio a partir de caldo de cana como substrato. Os autores observaram que a espécie produtora de H₂ enriquecida

28

no reator, *C. butyricum*, mostrou-se eficaz na competição com outros microrganismos durante o processo não-estéril, mantendo a produção de hidrogênio e o consumo do substrato.

A operação de forma contínua em reator CSTR e em reator em batelada para a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias de destilarias de álcool utilizando o milho como matéria-prima foi realizada por Qiu *et al.* (2011). Os autores enriqueceram biomassa mista produtora de hidrogênio a partir de composto de esterco bovino digerido, alcançando a maior produção de 196 mL g SV adicionado⁻¹, a 70 °C, pH 7,0. No CSTR, obtiveram 172 mL H₂ g SV adicionado⁻¹, no TDH de 4 dias. Os microrganismos envolvidos nos ensaios em batelada e no CSTR foram similares, relacionando a produção de hidrogênio à presença de bactérias hipertermofílicas como *Thermotoga, Coprothermobacter, Caldanaerobacter, Thermobrachium* e *Caldicellulosiruptor*.

Searmsirimongkol *et al.* (2011) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando como fonte de substrato águas residuárias provenientes do processamento de etanol produzido a partir de cana-de-açúcar em reator em batelada sequencial (ASBR). Por meio da concentração de 40 g L⁻¹, TCO de 60 kg m⁻³ d⁻¹, TDH de 16 h, pH de 5,5, a 37 °, alcançaram 3320 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e 172 mL H₂ g DQO removida⁻¹. As concentrações elevadas de potássio e de sulfato observadas na vinhaça bruta (com DQO de 150 g L⁻¹), de 8,8 e 7,0 g L⁻¹, respectivamente demonstraram a necessidade de diluir o afluente a fim de evitar efeito tóxico às bactérias produtoras de hidrogênio. Em concentrações superiores a 40 g DQO L⁻¹ houve decréscimo do desempenho do sistema em termos de produção de hidrogênio em função das maiores concentrações de PO₄⁻³ e SO₄⁻².

A partir do exposto a respeito das pesquisas realizadas no tratamento anaeróbio de vinhaça e considerando a tendência de crescimento da produção de etanol e da consequente geração de vinhaça de diversas fontes, torna-se necessário o aperfeiçoamento dos métodos de tratamento existentes, partindo-se do conhecimento das vantagens e desvantagens reais associadas a cada um deles, sendo a produção biológica de hidrogênio a partir desta água residuária uma alternativa viável.

Outro fator a ser considerado na melhoria da conversão microbiana de resíduos complexos a H_2 é a temperatura. De acordo Prasertsan *et al.* (2009), condições termofílicas para a produção de hidrogênio podem apresentar vantagens no tratamento de águas residuárias lançadas em temperaturas elevadas, como as provenientes de óleo de palma, destilarias, e do processamento de alimentos, conforme será abordado no item a seguir.

3.6. Princípios e fundamentos fermentativos sob temperatura termofílica

Os microrganismos são capazes de produzir hidrogênio num intervalo de temperatura de 15 a 85 °C (KANAI *et al.*, 2005). Reações fermentativas podem ser operadas a temperaturas mesofílicas, entre 25 e 40 °C, termofílicas entre 40 e 65 °C e em condições hipertermofílicas, com temperaturas acima de 80 °C (SINHA e PANDEY, 2011).

Uma diversidade de substratos sintéticos e reais tem sido viabilizada para a produção de hidrogênio por meio de processos fermentativos termofílicos, e em sua maioria, a partir de reatores em batelada, utilizando a xilose (ZHAO *et al.*, 2010; KHAMTIB e REUNGSANG, 2012), o óleo de palma (O-THONG *et al.*, 2009; YOSSAN *et al.*, 2012), o soro de queijo (KARGI *et al.*, 2012), a mandioca (LUO *et al.*, 2010a; LUO *et al.*, 2010b; O-THONG *et al.*, 2011), a celulose (CARVER et al., 2012; XIA et al., 2012), a palha de arroz (CHEN *et al.*, 2012), o glicerol (SITTIJUNDA e REUNGSANG, 2012), a co-fermentação da glicose com materiais lignocelulósicos (SIGURBJORNSDOTTIR e ORLYGSSON, 2012), e águas residuárias provenientes de destilarias de álcool (INTANOO *et al.*, 2012 e ROY *et al.*, 2012). A efetividade da produção de hidrogênio também pôde ser verificada em reatores contínuos, a partir de sacarose (OBAZU *et al.*, 2012), de soro de queijo (AZBAR *et al.*, 2009a; AZBAR *et al.*, 2009b), de celulose (GADOW *et al.*, 2012) e de destilarias de álcool (WANG *et al.*, 2011).

Sistemas termofílicos operados normalmente sob temperaturas de 55 a 60 °C apresentam alta produção e rendimento de hidrogênio, e direcionam a rota do acetato em maior extensão quando comparados aos sistemas mesófilos (HAWKES *et al.*, 2007). Esses fatores são principalmente atribuídos ao maior favorecimento termodinâmico, aumentando as reações químicas e biológicas, à dominância da via metabólica do acetato contrariamente a do etanol e do lactato e à maior tolerância a pressão parcial do hidrogênio (VAN GROENESTIJN *et al.*, 2002; KOTSOPOULOS *et al.*, 2006; O-THONG *et al.*, 2009).

O hidrogênio apresenta baixa solubilidade em fase aquosa: 0,017 cm³ de hidrogênio por 1 cm³ de água a 1 bar e 37°C (GUWY *et al.*, 1997). Levando-se em consideração a Lei de Henry, temperaturas mais elevadas acabam reduzindo a solubilidade do gás na fase aquosa e, conseqüentemente, a interação do gás com os microrganismos presentes no processo. Isso desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo e aumenta a eficiência de remoção do biogás.

A pressão parcial de hidrogênio (PH₂) na fase gasosa é crucial. Quando a concentração de hidrogênio no headspace aumenta, a síntese de H₂ torna-se termodinamicamente desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de produtos finais reduzidos (LEVIN *et al.*, 2004). Apenas a baixos valores de PH₂, poderá ocorrer a oxidação do NADH para NAD+ por meio da síntese de H₂ (CIRANNA *et al.*, 2011).

A Figura 3.8 ilustra as vias metabólicas que poderão ocorrer a partir da degradação do composto orgânico para a produção biológica de H₂. A fim de superar as limitações termodinâmicas das reações de produção de hidrogênio dependentes de NAD, o aumento da concentração de H+ e/ou a diminuição da pressão de H₂ serão determinantes. Neste contexto, as bactérias termofílicas ou a reconstituição das reações de produção de H₂ dependentes de NAD no periplasma bacteriano, onde a concentração de H+ é mantida, podem ser caminhos a serem estudados e pesquisados (OH *et al.*, 2011).



Figura 3.8. Diagrama das vias metabólicas envolvidas na fermentação de H_2 (AC: acetato; ACK: acetate quinase; ALD: alcool desidrogenase; ETH: etanol; Fdox: ferridoxina oxidada; Fdrd: ferridozina reduzida; FHL: formato hidrogênio liase; FOR: formate; G3P: gliceraldeído-3-fosfato; G6P: glicose-6-fosfato; HydA: hidrogenase ferridoxina dependente; LDH: lactato desidrogenase; Via PP: via das pentose fosfato; NFOR: NAD(P)H ferridoxina oxidoredutase; PDH: pituvato desidrogenase; PFL: piruvato formato liase; PFOR: piruvato ferridoxina oxidoredutase (OH *et al.*, 2011).

Os mecanismos que explicam aumentos nos rendimentos de hidrogênio estão relacionados à termodinâmica de três reações metabólicas: lactato hidrogenase, NADH hidrogenase e homoacetogênese, que são afetadas pelas baixas pressões parciais de H₂ (BASTIDAS-OYANEDEL et al., 2012). A ausência de produção de lactato (Equação 1) poderá elevar a disponibilização de carbono e de elétrons a partir do piruvato, e consequentemente o rendimento de hidrogênio poderá ser aumentado. A reação que envolve a síntese de hidrogênio a partir da oxidação de NADH para NAD⁺ (Equação 2) tem sido considerada termodinamicamente favorável em biossistemas com PH₂ reduzidas, como observadas em temperaturas termofílicas. A formação de ácido acético por meio da rota metabólica da homoacetogênese (conversões de H₂/CO₂ a acetato) poderá ocorrer devido ao consumo de hidrogênio e de gás carbônico, diminuindo assim o rendimento de produção biológica de H₂ (Equação 3). No entanto, reatores termofílicos têm apresentado menor ocorrência de homoacetogênese e de suas consequências deletérias ao rendimento de H₂ (Akutsu *et al.*, 2009a e Luo *et al.* 2010a).

 $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH + H^+$ (Eq. 1) (Wu *et al.*, 2008) NADH + H⁺ → H₂ + NAD⁺ (Eq. 2) (Bastidas-Oyanedel *et al.* (2012) 4H₂ + 2CO₂ → CH₃COOH + 2H₂O (Eq. 3) (Conrad and Wetter, 1990)

As rotas metabólicas em uma cultura acidogênica mista são controladas pela composição de gases no *headspace*, influenciando as propriedades físico-químicas, hidrodinâmicas e a própria composição do *headspace* (Figura 3.9).



Figura 3.9: Transferência líquido-gás na produção fermentativa de hidrogênio. Fonte: Bastidas-Oyanedel *et al.* (2012).

A transferência líquido-gás do hidrogênio tem se mostrado como um critério primordial, no qual o hidrogênio deve ser direcionado a partir do líquido para a fase gasosa o mais rápido possível mantendo assim um elevado fluxo de produção de hidrogênio pelas células. Por um lado, a explicação baseia-se nas propriedades termodinâmicas, mas por outro, há possivelmente a supersaturação de hidrogênio na fase líquida (PEINTNER *et al.*, 2010). Em temperaturas elevadas, o hidrogênio será transferido a partir do líquido para a fase gasosa promovendo uma alta produção de H₂. Um rendimento quase estequiométrico exige condições de equilíbrio à baixa pressão parcial de H₂ (SONNLEITNER et al., 2012).

Além disso, processos fermentativos operando sob condições termofílicas, em torno de 50 °C, resultam em elevada degradação da matéria orgânica, acelerando a estabilização do processo e favorecendo a aplicação de menores TDH com maiores cargas orgânicas volumétricas aplicada. Esses sistemas também produzem biogás de forma mais eficaz (KESKIN *et al.*, 2011; KARGI *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2010a e b; HASYIM *et al.*, 2011).

Ao comparar o processo de estabilidade e a eficiência da digestão anaeróbia em temperaturas de 50°C a 60°C, Kim *et al.* (2002) apontam vantagens do processo termofílico, como por exemplo o aumento da metabolização de sólidos orgânicos e aumento da separação líquido-sólido. O crescimento microbiano e a hidrólise de partículas sólidas podem ser aumentadas, e a solubilidade do H₂ diminuída, aliviando o efeito inibitório causado pela alta pressão parcial do H₂ (WEILAND, 2010).

Ao apresentarem um protocolo rápido e simples para a avaliação do potencial de produção de biohidrogênio a partir de águas residuárias, Mohan *et al.* (2012) afirmaram que a temperatura ideal para a produção de hidrogênio depende da natureza do biocatalisador e do tipo de água residuária a ser utilizada como substrato.

A seguir serão apresentados os principais parâmetros que influenciam a produção biológica de hidrogênio, como a fonte de inóculo, as aplicações de taxas de carregamento orgânico em razão da diminuição do tempo de detenção hidráulica e das diferentes concentrações do substrato e a presença de nutrientes para o crescimento bacteriano. Essas variáveis também são de fundamental importância para estudos realizados sob temperatura mesofílica, no entanto, esta revisão de literatura apresentará os efeitos destes fatores sob temperatura termofílica, assim como as características e aplicações dos microrganismos termofílicos na produção de H₂.

3.6.1. Inóculo

Na etapa de dimensionamento da produção fermentativa de hidrogênio, um dos desafios é a obtenção de inóculo microbiano ativo e estável a partir de fontes naturais. O inóculo deve ser pré-tratado a fim de eliminar as bactérias consumidoras de hidrogênio e enriquecer as produtoras de H₂ (NING *et al.*, 2012).

Microrganismos capazes de produzir hidrogênio estão amplamente distribuídos nos habitats naturais, como solo, águas residuárias, e também lodo de biodigestores, reatores e compostos orgânicos. Dessa maneira diversos materiais podem ser utilizados como fonte de inóculo, os quais poderão ser utilizados como culturas puras ou um consórcio de microrganismos (SINHA e PANDEY, 2011).

O-Thong *et al.* (2009) avaliaram cinco métodos de pré-tratamento para produção biológica de hidrogênio sob condições termofílicas, 60 °C, a partir de águas residuárias de óleo de palma, entre eles o tratamento controle, básico, ácido, ácido 2-bromoetanosulfônico, choque de carga e tratamento térmico. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que, seguido do tratamento térmico, o choque de carga atingiu as melhores produções de hidrogênio, com consequente enriquecimento da biomassa, atingindo 1,96 mol H₂ mol⁻¹ hexose e 11,2 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹, com predominância de ácidos acético e butírico e predominância de bactéria termofílica produtora de H₂, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

Em um reator termofílico CSTR utilizado para a digestão anaeróbia de lodo de suinocultura e resíduos sólidos, Merlino *et al.* (2013) relacionaram a produção biológica de hidrogênio, de $0.06 \text{ L L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, à presença de microrganismos similares a *Clostridium cellulosi*.

3.6.2. Taxa de carregamento orgânico: tempo de detenção hidráulica e concentração do substrato

A produção de hidrogênio a partir de águas residuárias reais, entre outros fatores, é fortemente influenciada pela taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada nos reatores. A TCO depende do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da concentração de matéria orgânica no substrato de alimentação (PEIXOTO *et al.*, 2011; AGUILAR *et al.*, 2013). Portanto, é essencial definir um intervalo de TCO, no qual será possível atingir eficiência constante no reator biológico, ou uma TCO ótima para o máximo rendimento de hidrogênio (HAFEZ *et al.*, 2010).

Como consequência, as rotas fermentativas e os produtos metabólitos finais poderão ser modificados em razão das TCO utilizadas, assim como a eficiência de conversão do substrato e a comunidade microbiana estabelecida no sistema (GIOANNIS *et al.*, 2013).

Por meio do aumento do tempo de detenção hidráulica, uma quantidade maior de substrato é disponibilizada no afluente, e a bioprodução poderá ser aumentada (THANWISED *et al.*, 2012). Resultados experimentais do tratamento de águas residuárias de soro de queijo para a produção de hidrogênio sob condições termofílicas realizados por Azbar *et al.* (2009b) demonstraram que o efeito do TDH influenciou a produção de hidrogênio, concluindo que baixos TDH aplicados ocasionaram em aumento na produção de H₂.

Entretanto, sob temperatura termofílica, Kongjan *et al.* (2009) relataram efetiva produção de H₂ a partir de xilose, em reator CSTR operado em TDH elevado de 72 h, atingindo 1,36 mol H₂ mol xilose_{consumida}⁻¹ e produtividade de 2 mL H₂ d⁻¹ L⁻¹. Apesar disso, elevado conteúdo de hidrogênio no biogás pode ser atingido por meio de aplicação de maiores taxas orgânicas aplicadas em menores tempos de detenção hidráulicas promovendo condições favoráveis para os microrganismos produtores de hidrogênio (BADIEI *et al.*, 2012).

Zahedi *et al.* (2013) avaliaram a produção termofílica de hidrogênio a partir de resíduos sólidos municipais (fração orgânica) com variação de TDH entre 240 a 6 horas. Os autores obtiveram máximo conteúdo de H₂ no biogás (57%) no TDH de 12 h, afirmando que o aumento da taxa de carregamento orgânico, causada pelo diminuição do TDH, esteve correlacionado diretamente com a produção de hidrogênio e à atividade microbiana.

O efeito da concentração do substrato na estabilidade e no rendimento de produção biológica de H₂ ainda não está totalmente esclarecido (Amorim *et al.*, 2012). De acordo com Won *et al.* (2013), a produtividade de hidrogênio é dependente do conteúdo de carboidratos e de matéria orgânica, principalmente quando a fermentação ocorrer mediante a aplicação de TDH reduzidos e TCO elevadas. Antonopoulou *et al.* (2011) também relatou que a concentração de carboidratos influencia na distribuição dos produtos metabólitos. Concentrações afluentes elevadas poderão aumentar a produção de H₂ (WANG e WAN, 2009), porém, por outro lado, concentrações muito elevadas de substrato poderão diminuir esta capacidade (SARIPAN e REUNGSANG, 2013).

Sob temperatura termofílica, Kargi *et al.* (2012) avaliaram a produção de H₂ a partir de diferentes concentrações afluentes de soro de queijo (5,2 a 28,5 g L^{-1}) e observaram que a

utilização da concentração de 9,5 g L^{-1} apresentou o melhor rendimento de H₂, de 1,03 mol mol glicose⁻¹. Os autores afirmaram que a fermentação do substrato com concentrações superiores a 20 g L^{-1} foi prejudicada pela ação inibitória dos ácidos orgânicos voláteis.

3.6.3. Nutrientes

No processo fermentativo de produção de hidrogênio, nitrogênio, fósforo e diversos minerais inorgânicos são necessariamente suplementados às matérias-primas ricas em carboidratos utilizadas como fontes de substratos aos microrganismos a fim de obter condições ótimas para o cultivo de células microbianas e melhores produções de H₂ (SHOW *et al.*, 2011).

Razões apropriadas entre carbono e nitrogênio, carbono e fósforo e entre carbono e sulfato aumentam a bioprodução de hidrogênio por meio da modificação de rotas metabólicas associadas ao requerimento nutricional dos microrganismos (INTANOO *et al.*, 2012). Ao realizarem a melhoria da produção termofílica de hidrogênio utilizando uma nova cepa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* IIT BT-ST1, Roy et al. (2013) afirmaram que uma adequada fonte de nitrogênio é necessária para o funcionamento do metabolismo microbiano durante a fermentação. Além disso, os autores ressaltaram a função do Fe⁺², como cofator da enzima hidrogenase, assim como o papel transportador da ferredoxina (proteína Fe–S) que oxida piruvato a acetil-CoA e Co₂, juntamente com a redução do próton para H₂ molecular. O ferro também pode induzir alterações metabólicas de proteínas Fe–S e não Fe–S associadas com a enzima hidrogenase.

Cheong e Hansen (2007) utilizaram relação DQO:N:P de 100:3.3:0.6 em reator termofílico em batelada alimentado com água residuária sintética, com 25000 mg DQO L^{-1} com glicose como substrato orgânico. Os autores observaram 64% de H₂ no biogás.

Sob temperatura termofílica, Kim e Kim (2012) investigaram a produção de H_2 a partir de diferentes fontes de substratos (xilose, glicose, galactose, sacarose, celobiose e amido), e alcançaram máximo rendimento de H_2 de 3,17 mol mol hexose⁻¹, no teste com sacarose, por meio da relação DQO:N:P:Fe igual a 100:5:1:0,33.

3.6.4. Características e aplicações dos microrganismos termofílicos na produção de H2

A temperatura é um dos parâmetros físicos mais importantes no processo evolutivo. Define propriedades fundamentais das espécies e desempenha papel fundamental em diversos mecanismos fisiológicos complexos (CHEN e SHAKHNOVICH, 2010). Para Carver *et al.* (2011) os microrganismos termofílicos apresentam um enorme potencial para bioprocessos de tratamento de águas residuárias e produção de energia. Segundo Dong *et al.* (2011), sob condição termofílica ocorre uma simplificação da estrutura da comunidade microbiana, maior do que nos sistemas mesofílicas.

Mudanças sutis na temperatura podem impactar amplamente as células biológicas. Dessa maneira, as células termofílicas evoluíram a maquinaria genética de forma substancial a fim evitar a desnaturação térmica do proteoma (GHOSH e DILL, 2010).

A temperatura ideal para a atividade catalítica das enzimas termofílicas é elevada, ente 50 a 80 °C, geralmente superior a temperatura de desnaturação em células mesofílicas. A questãochave é esclarecer a forma pela qual as enzimas termofílicas são capazes de manter suas características estruturais a temperaturas tão altas para a atividade catalítica. Uma comparação entre as seqüências e estruturas dos termofílicos e as dos mesofílicos sugere que a conformação essencial dos elementos é retida e que a sequência no sítio ativo é em grande parte preservada por diversos mecanismos (incluindo pré-arranjo de resíduos catalíticos, aumento no conteúdo de resíduos polares, pontes estáveis de sais, maior rigidez e poucos movimentos de desdobramento) (VEMPARALA *et al.*, 2011).

No caso dos ácidos nucléicos de microrganismos termofílicos, a modificação química estrutural, como por exemplo, a metilação de RNA e a presença de componentes extrínsecos, promotores da estabilidade dos ácidos, como sais e histonas, são essenciais para manter a replicação, transcrição e tradução a altas temperaturas, próximas à de desnaturação de DNA e RNA (JAENICKE e STERNER, 2006).

A termoestabilidade das proteínas presentes nas células termofílicas são de extrema relevância (LIN e CHEN, 2011). Gromiha e Suresh (2008) afirmaram que a distinção entre proteínas mesofílicas e termofílicas é uma questão em desafio e poderá auxiliar no desenvolvimento de proteínas estáveis. Os autores encontraram que a Lys, Arg e Glu, assim como resíduos hidrofóbicos, como a Val e a Ile apresentam maior ocorrência em termófílos quando comparados às sequências mesófilas. A maioria das proteínas se desnatura em altas temperaturas, mas a composição de aminoácidos em proteínas termoestáveis dos microrganismos termófilos identifica as propriedades destas proteínas.

Madigan *et al.* (2004) esclarecem vários fatores que garantem a termoestabilidade de biomoléculas como as proteínas e o DNA em organismos termófilos. As enzimas de termófilos

frequentemente contêm as mesmas características estruturais principais que as correspondentes termolábeis de bactérias mesófilas. No entanto, as proteínas termoestáveis tendem a apresentar núcleos altamente hidrofóbicos, o que provavelmente diminui sua tendência de se desdobrar, além de geralmente apresentarem maior interação iônica em suas superfícies. Outra característica é que o citoplasma de organismos termófilos contém grandes quantidades de 2,3 difosfoglicetato cíclico de potássio, impedindo danos químicos, como a desnaturação do DNA.

Muitos são os fatores que capacitam os termófílos a cresceram em temperatura elevada tais como: os ribossomos, as membranas e as várias enzimas dos microrganismos termofílicos. A perda da função da membrana citoplasmática em baixas temperaturas pode ser o que determina a temperatura de crescimento mínimo dos termófílos (PELCZAR *et al.*, 1996).

A baixa densidade celular encontrada e o requerimento de energia para o aquecimento do sistema são os principais inconvenientes da produção fermentativa sob condições termofílicas. Sistemas de reatores com biomassa imobilizada e efluentes industriais lançados à temperaturas elevadas são sugeridos e aplicáveis para o efetivo e compensatório processo termofílico operacional (KONGJAN e ANGELIDAKI., 2010).

Valdez-Vazquez *et al.* (2005) relataram a produção volumétrica de hidrogênio foi 60% maior em condições termofílicas do que mesofílicas, por meio da utilização de resíduos orgânicos sólidos como fonte de substrato, sugerindo que este comportamento pode ser explicado pela temperatura ideal da enzima hidrogenase das espécies termofílicas selecionadas.

Diversas águas residuárias foram investigadas para a obtenção de melhores produções fermentativas de hidrogênio sob condições termofílicas. Neste contexto, Koutrouli *et al.* (2009) avaliaram a produção a partir de óleo de oliva, com diluição de 1:4, e TDH aplicado entre 7,5 e 30 h. Os resultados obtidos demonstram que a produção termofílica, de 320 mol H₂ tonelada⁻¹ de óleo, foi 1,5 vez maior quando comparada às condições mesofílicas.

A partir de águas residuária do processamento de mandioca, Luo *et al.* (2010) investigaram os efeitos do inóculo, alcalinidade e TDH no processo fermentativo de produção de hidrogênio sob condições termofílicas. Por meio de testes com 5 diferentes fontes de inóculo (lodo de UASB mesofílico utilizado no tratamento de águas residuárias de mandioca; de ASBR termofílico utilizado no tratamento de águas residuárias de mandioca; de esterco bovino digerido em CSTR; de resíduos de granja de aves digerido em CSTR e lodo proveniente do tratamento de esgoto municipal) sem qualquer método de pré-tratamento, os autores observaram que em

sistemas contínuos houve grande similaridade entre as fontes de inóculos, com média de 82,9 a 93,3 mL H₂ g SV⁻¹. A ausência de diferença significativa foi atribuída ao estabelecimento de *Thermoanaerobacteri aceaebacterium*, indicando que todos os inóculos testados foram fontes eficazes para a produção fermentativa de hidrogênio, sob temperatura termofílica, a partir de água residuária de mandioca. A respeito da alcalinidade, concentrações afluentes com 6 g NaHCO₃ L⁻¹ e TDH aplicado de 24 h mostraram-se ideais para a produção de hidrogênio com rendimento de 76 ml H₂ gVS⁻¹ e produção de 3215 ml H₂ L⁻¹ d⁻¹. O butirato representou o metabólito predominante em todos os experimentos, e o aumento da alcalinidade em mais de 6 g L⁻¹ aumentou a concentração de ácidos graxos voláteis/etanol, enquanto a produção de hidrogênio diminuiu devido a maior concentração de acetato e propionato. Os autores observaram ainda que a diminuição do TDH aumentou a produção de hidrogênio, porém apresentou menores valores de rendimento.

Peintner *et al.* (2010) avaliaram dois reatores para a produção fermentativa de hidrogênio em condições termofílicas, um reator de leito percolado e um reator de leito fluidificado, utilizando a glicose como substrato e *Caldicellulosiruptor owensensis* como fonte de inóculo como cultura pura. Os autores obtiveram vantagens para cada uma das configurações de reatores, sendo a maior produção e produtividade, de 3 mol H₂ mol⁻¹ glicose e 0,2 L L⁻¹ h⁻¹ no reator de leito percolado. O reator de leito fluidificado obteve produtividade levemente mais alta, de 0,25 L L⁻¹ h⁻¹, tornando possível a utilização destas configurações para produção de H₂ sob condições termofílicas.

A utilização de vinhaça de açúcar de beterraba, na forma de melaço desaçucarado, como substrato para produção fermentativa de hidrogênio em reatores em batelada e reator UASB sob condições termofílicas, a 55 °C, foi investigada por Kongjan *et al.* (2011). Os autores obtiveram, com concentrações afluentes de açúcar entre 1,5 a 50 g L⁻¹, o rendimento máximo de 237 ml g⁻¹açúcar, com baixas concentrações do substrato, de 2 g L⁻¹. Com a aplicação de maiores concentrações, houve decaimento na produção de hidrogênio. No reator UASB, inoculado com lodo proveniente de indústria do processamento de batata e com inóculo enriquecido em batelada com o melaço, alcançou, com TDH de 24 h e 16,7 g L⁻¹ de açúcar, satisfatória produção de hidrogênio, com rendimento de 269 ml g⁻¹açúcar e volume de 4500 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹. Análises de FISH demonstraram a dominância de *Thermoanaerobacterium spp.*, responsáveis pela produção fermentativa do melaço desaçucarado em condições termofílicas. Espécies como

Thermoanaerobacterium spp. e do filo *Firmecutes (Clotridium, Bacillus e Desulfobacterium)* e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* também foram detectadas nos grânulos do reator UASB.

Por meio do enriquecimento de produtores fermentativos de hidrogênio a partir de fluido de rúmen sob temperaturas termofílicas de 52, 60 e 65 °C, Nissila *et al.* (2011) alcançaram rendimento máximo de H₂ a 60 °C, com 0,44 mol mol hexose⁻¹, sem pré-tratamento do fluido. Os autores encontraram ainda que valores de pH iguais ou menores que 6,0 inibiram a produção de H₂, não sendo detectado o gás; enquanto que, os maiores rendimentos de hidrogênio com simultânea produção de acetato e etanol ocorrerem com pH de 7,3.

Sob condições termofílicas, a produção de hidrogênio em testes em batelada utilizando a palha de arroz sem pré-tratamento como fonte de substrato, realizados por Chen et al. (2012), demonstrou ser dependente do pH, do tamanho e da concentração do substrato, alcançando valores de 24,8 mL H₂ g ST⁻¹, com pH de 6,5, partículas menores que 0,297 mm e concentração de 90 g ST L⁻¹. Análises de PCR-DGGE revelaram a presença de bactérias hidrolíticas e Clostridium fermentativas, como pasteurianum, Clostridium stercorarium e Thermoanaerobacterium saccharolyticum. Sob temperatura termofílica de 55 °C, a fonte de inóculo proveniente de estação de tratamento de águas residuárias municipais se mostrou eficiente na melhoria da produção de H₂, aumentando as perspectivas de produção de hidrogênio a partir de resíduos de lignina sem o pré-tratamento.

Gadow *et al.* (2012) demonstraram que sob temperatura termofílica foi possível obter rendimentos de H₂ superiores quando comparados aos obtidos em condições mesofílicas, para a produção de hidrogênio a partir da celulose. Em reator de agitação contínua (CSTR), com concentração de celulose de 5g L⁻¹ e TDH de 10 dias, sem pré-tratamento da celulose, alcançaram valores de 0,6 mmol g celulose⁻¹ e de 15,2 mmol g celulose⁻¹ a 37 e 55 °C, respectivamente. Não foi detectado metano sob temperatura termofílica, enquanto que na condição mesofílica, o metano representou 26% do conteúdo de biogás. Os resultados demonstram que a temperatura pode ser uma questão-chave para a produção de H₂ a partir da celulose.

A investigação da produção de hidrogênio sob condições termofílicas, com valor controlado de pH a 5,5, utilizando águas residuárias de destilaria de álcool, a partir de raízes de mandioca como matéria-prima, em reator anaeróbio em batelada sequencial (ASBR) foi realizada por Intanoo *et al.* (2012). Por meio da aplicação de 68 kg m³ d⁻¹ foram obtidos valores de

Khamtib e Reungsang (2012) avaliaram a bioprodução de hidrogênio a partir de bactéria termofílica *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19, isolada de sedimento de fonte termal, utilizando como fonte de substrato orgânico a xilose. As condições ideais para a produção de H₂ e para o crescimento celular a partir da xilose ocorrem com valores de pH a 6,5, temperatura de 60 °C, relação C:N de 20:1 e concentração de xilose de 10 g L⁻¹. Os resultados obtidos pelos autores foram de 3020 \pm 210 mL H₂ L⁻¹, 3,95 \pm 0,20 mmol H₂ L h⁻¹ e 2,09 \pm 0,02 mol H₂ mol xilose _{consumida}⁻¹. A cepa demonstrou habilidade para utilizar uma variedade de fontes de carbono (glicose e celulose), porém a xilose e a peptona foram as fontes preferenciais de carbono e de nitrogênio, respectivamente.

A partir de efluente de óleo de palma, Mamimin *et al.* (2012) objetivaram a produção de hidrogênio e a remoção de fenol sob condições termofílicas a partir do enriquecimento da bactéria *Thermoanaerobacterium* obtida de lodo proveniente de reator em batelada sequencial, em escala laboratorial, para o tratamento de óleo de palma a 60 °C. Por meio da realização de testes em batelada, foi possível atingir 4,2 L H₂ L efluente⁻¹ e 65% de eficiência de remoção de fenol. Os efeitos de Fe⁺², NH₄NO₃, óleo de palma nas concentrações de 0,2 g L⁻¹; 0,3 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹, respectivamente, melhoraram a eficiência de remoção do fenol, atingindo 93%. Em reator de agitação contínua, com TDH de 1 e 2 dias, alcançaram valores de 4,0 e 4,2 L H₂ L efluente⁻¹, respectivamente. O enriquecimento do lodo apresentou espécies microbianas como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, Thermoanaerobacterium aciditolerans, Desulfotomaculum* sp., *Bacillus coagulans* e *Clostridium uzonii*, demonstrando elevado potencial para a obtenção de H₂ a partir de águas residuárias contendo fenol.

A bioprodução de hidrogênio a partir da xilose por *Thermotoga neapolitana* foi investigada por Ngo *et al.* (2012), alcançando, em testes em batelada a 75 °C e concentração de 5 g L⁻¹ de xilose e 959 mg L⁻¹ de biomassa, 32,1 mmol H₂ L⁻¹. A fim de desenvolver um sistema em grande escala e superar os problemas dos reatores em batelada, os autores obtiveram em reator anaeróbio de agitação contínua, com valores de pH controlados (em torno de 7,0), 2,8 mol H₂ mol xilose _{consumida}⁻¹, com produção de 2,98 e 0,36 mg L⁻¹ de ácido acético e lático.

A análise de balanço energético realizada por Obazu *et al.* (2012) em reator anaeróbio de leito fluidificado demonstrou que por meio da recirculação termofílica o sistema alcançou

produção volumétrica de energia líquida positiva, com eficiência energética de 49,3%. Houve a ocorrência simultânea de produtividades volumétricas elevadas, de 231,3 mmol $H_2 L^{-1} h^{-1}$ e elevado rendimento, de 3,55 mol mol glicose⁻¹, por meio da elevação de temperatura para 70 °C e pela redução do volume do reator para 5,74 L, aumentando a taxa de recirculação do efluente para 3,2 L min⁻¹. Os autores afirmaram que por meio destes procedimentos a taxa de remoção física de H_2 retido na fase líquida ao redor dos grânulos do leito fluidificado reduziram as limitações termodinâmicas.

Um consórcio bacteriano termofílico foi enriquecido por Roy *et al.* (2012) utilizando lodo proveniente de digestor anaeróbio para o tratamento de águas residuárias de destilaria de álcool a partir de arroz. Os autores afirmaram que a fermentação na ausência de luz apresentou elevado potencial no tratamento de águas residuárias com elevada carga orgânica, como no caso do afluente proveniente de destilarias de álcool, com DQO entre 30 e 60 g L⁻¹. Embora com rendimentos e produções inferiores quando comparados a outros açúcares, a otimização operacional a 60 °C, pH de 6,5 e concentração de substrato de 10 g L⁻¹ permitiu a obtenção de 3985 mL H₂ L⁻¹ e 2,7 mol H₂ mol glicose⁻¹. As concentrações de ácido acético e butírico revelaram que a fermentação de águas residuárias de destilarias de álcool a partir de arroz, foram do tipo fermentação acetato-butirato. Os autores atribuíram os baixos valores à presença de compostos tóxicos que poderiam inibir o processo fermentativo e o crescimento bacteriano.

Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012) realizaram a produção de H₂ e etanol a partir de monoaçúcares, carboidratos poliméricos e hidrolisados a partir de vários materiais lignocelulósicos pela cepa *Thermoanaerobacterium* AK54, isolada de fonte termal, uma bactéria sacarolítica, etanol termofílica e produtora de hidrogênio. A concentração de glicose aplicada variou de 5 a 400 mM, com suplementação de vários substratos filtrados e esterilizados (glicose, frutose, manose, galactose, xilose, ribose, arabiose, sacarose, lactose, lactato, formiato, succinato, malato, piruvato, oxalato, glicerol, aspartano, alanina, sorbitol, glicina, glutamato, serina, treonina, histidina, cistina, (20 mM), amido, celulose, xilan, pectina, peptona, extrato de carne e triptona (2 g.L⁻¹). As condições ótimas encontradas foram a 65 °C com pH entre 5,0 e 6,0. A determinação do RNAr 16S relacionou a cepa AK54 à espécie *Thermoanaerobacterium aciditolerans* (99%). A habilidade de utilizar diversas fontes de substratos foi testada com crescimento positivo para xilose, glicose, frutose, manose, galactose, sacarose e lactose. Os principais produtos metabólicos em todos os casos foram o etanol, acetato e lactato. Por meio da

diminuição da pressão parcial do hidrogênio durante a degradação da glicose, a formação de produtos finais foi direcionada para o H₂, acetato e etanol. A maior produção de etanol foi obtida por meio do hidrolisado de celulose (24,2 mM). O tratamento químico do hidrolisado da biomassa aumentou substancialmente o rendimento de hidrogênio e de etanol a partir de palha de cevada, de *Cannabis sativa* e *Phleum pratense*, mas não ocorreu o mesmo comportamento para a celulose ou o jornal com tinta. A maior produção de hidrogênio foi produzida a partir da celulose hidrolisada ou 6,7 mol g⁻¹ ST com pré-tratamento alcalino (12,2 mol.g⁻¹glicose), mas para a biomassa lignocelulósica, maiores rendimentos ocorreram em *Phleum pratense* com pré-tratamento básico (4,9 mol. g⁻¹ ST). Os autores afirmaram que a cepa AK54 parece ser um microrganismo produtor de etanol e de H₂, aumentando o interesse na verificação de sistemas futuros de produção de ambos os combustíveis.

As concentrações de resíduos de glicerol e de nutrientes demonstraram alta influência na produção biológica de hidrogênio realizada por Sittijunda e Reungsang (2012) a partir de cultura mista anaeróbia termofílica enriquecida proveniente de sedimento de fonte termal. A composição ótima do meio foi de 20,3 g L⁻¹ de resíduos de glicerol, 0,16 g L⁻¹ de uréia, 3,97 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,20 mL L⁻¹ de meio nutricional, fornecendo máxima produção de 1470 mL L⁻¹. Os produtos metabólitos derivados da fermentação foram 1,3 propanodiol, etanol, ácidos acético, fórmico, lático, butírico e propiônico. Os resultados da análise de PCR-DGGE indicaram que os produtores de hidrogênio presentes na fermentação pertenceram a *Thermoanaerobacterium* sp.

Frente ao exposto, a produção fermentativa de hidrogênio sob condições termofílicas é um processo atrativo para a aplicação dos biocombustíveis. De acordo com Karakashev e Angelidaki (2011), do ponto de vista termodinâmico, temperaturas maiores favoreceriam a produção de hidrogênio. Os principais fatores influenciadores na produção de hidrogênio são a carga orgânica aplicada, pH, tempo de detenção hidráulica, concentrações de hidrogênio e de CO₂ dissolvidos e produtos metabólicos solúveis. Uma ampla variedade de estudos tem sido conduzida a respeito da produção em condições termo e hipertermofílicas a partir de diferentes matérias-primas, como substratos puros, resíduos ou águas residuárias. Atualmente, existem diversos processos tecnológicos, onde o controle de condições operacionais, tipos de fermentação e diferentes configurações de reatores frequentemente são analisados em escalas laboratoriais e piloto para a produção biológica de hidrogênio

A Tabela 3.5 apresenta alguns dos diversos estudos realizados na investigação do efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio a partir de diferentes fontes de inóculos e substratos.

Inóculo	Substrato	T Produção/Rendimento de		Referência
		(°C)	H_2	
Lodo: esgoto municipal	Amido	55	1,44 mol g ⁻¹ amido	Lee et al. (2008a)
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	Sacarose	60	2,53 mol mol ⁻¹ hexose	O-Thong <i>et al.</i> (2008)
Esterco digerido e Lodo: fábrica de batata	Melaço beterraba	55	Batelada 237 ml g ⁻¹ açúcar UASB 269 ml g ⁻¹ acúcar	Kongjan <i>et al.</i> (2011)
Fluido de rúmen	Celulose	60	1,93 mol mol ⁻¹ hexose degradada	Nissila et al. (2011)
Lodo ₁ : ETE municipal Lodo ₂ : ETE fábrica de papel Lodo ₃ : Compostagem	Palha de arroz	55	24,8 mL g ST ⁻¹	Chen et al. (2012)
Lodo: ETE municipal	Celulose	55	15,2 mmol g celulose ⁻¹	Gadow et al. (2012)
Lodo: ETE de destilaria de álcool a partir de mandioca	Águas residuárias de destilaria	55	130 mL g DQO ⁻¹	Intanoo <i>et al.</i> (2012)
Lodo: ETE municipal	Soro de queijo	55	1,03 mol mol ⁻¹ glicose	Kargi <i>et al.</i> (2012)
Sedimento de fonte termal	Xilose	60	2,09 mol mol xilose consumida ⁻¹	Khamtib e Reungsang (2012)
Thermotoga neapolitana DSM 4359	Xilose	75	2,8 mol H_2 mol xilose consumida ⁻¹	Ngo et al. (2012)
Mistura de lodo e esterco de vacas leiteiras	Sacarose	70	3,55 mol mol glicose ⁻¹	Obazu <i>et al</i> . (2012)
Lodo: enriquecido de ETE de destilaria de álcool a partir de arroz.	Águas residuárias de destilaria	60	2,7 mol H ₂ mol glicose ⁻¹	Roy et al. (2012)
<i>Thermoanaerobacterium</i> AK54: fonte termal	Glicose e materiais lignocelulósic	65	12,2 mol g ⁻¹ glicose	Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012)
Sedimento de fonte termal	Glicerol	55	1470 mL L ⁻¹	Sittijunda e Reungsang (2012)

Tabela 3.5: Temperatura termofílica na produção fermentativa de H_2 a partir de diferentes fontes de inóculos e de substratos.

Fonte: Adaptado de Sinha e Pandey (2011).

Para elucidar melhor entendimento e aprimoramento da bioprodução de hidrogênio, a verificação e controle dos fatores que influenciam a produção e rendimento de hidrogênio tornam-se fundamentais para o aprimoramento das configurações de reatores.

3.7. Produção fermentativa de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado

Como foi abordado anteriormente, para melhorar a biodegradação de substratos com elevada carga orgânica, uma ampla variedade de reatores de alta taxa foram desenvolvidos para aumentar a retenção da biomassa no sistema, otimizando a produção de hidrogênio (Li e Yu, 2011).

O reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) apresenta diversos fatores positivos como o acúmulo de grande quantidade de biomassa aderida ao meio suporte, suportando TCO elevadas, possibilidade de aplicação de baixos TDH e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos, além de promover alta velocidade de agitação na fase líquida favorece o desprendimento do hidrogênio nesta fase (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2007). Além desses, outros estudos destacam a potencialidade do RALF na produção fermentativa de hidrogênio (WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2006; KOSKINEN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2009 ; SHIDA *et al.*, 2009 ; AMORIM *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2011; REIS e SILVA, 2011; BARROS e SILVA, 2012; SHIDA *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2014).

Estes reatores possuem várias vantagens em relação aos filtros anaeróbios, pois não favorecem a colmatação do leito. Por meio da utilização de material suporte ocorre uma melhoria na superfície para adesão microbiana, reduzindo o volume do reator. No entanto, a recirculação do efluente deve ocorrer a fim de expandir o leito (RAJESHWARI *et al.*, 2000).

O desenvolvimento e manutenção do biofilme formado nos reatores de leito fluidificado são importantes para garantir alta eficiência no sistema de tratamento. Barros e Silva (2012) ressaltam a importância da utilização de matérias suportes leves, de baixo custo e de fácil acesso, contribuindo na solução de problemas ambientais causados atualmente pela disposição inapropriada de resíduos sólidos.

Zhang *et al.* (2007) operaram um reator anaeróbio de leito fluidificado preenchido com carvão ativado como material suporte para adesão da biomassa para avaliar a redução do TDH de 4 h para 0,5 h em uma concentração de glicose de 10 g L^{-1} . Sob condições ácidas, pH 4, e

temperatura de 37 °C, a conversão da glicose reduziu de 99,47% em TDH de 4 h para 71,44% em TDH de 0,5 h. A composição de hidrogênio reduziu levemente de 61,2% para 57,2% quando o TDH foi reduzido. Foi encontrado um rendimento de produção de hidrogênio de 0,94 mol H_2 .mol⁻¹ glicose, em TDH de 4 h e estabilizou em 1,12 a1,19 mol H_2 mol⁻¹ glicose entre o TDH de 0,5 h e 2 h. Ambas a produção volumétrica e a produção específica de hidrogênio aumentaram significativamente com a redução do TDH, com um valor máximo em TDH de 0,5 h de 2,22 L h⁻¹ L⁻¹ e 4,18 mmol H_2 g⁻¹ SSV⁻¹ h⁻¹, respectivamente. A biomassa aderida foi altamente correlacionada com o TDH, aumentando de 8,1 g SSV L⁻¹ para 21,5 g SSV L⁻¹, com a redução do TDH de 4 h para 0,5 h. Em geral, os metabólitos solúveis foram em ordem decrescente, ácido acético (43% a 46%), ácido butírico (20% a 31%), etanol (14% a 21%), ácido capróico (7% a 10%), seguida por uma pequena quantidade de ácido propiônico (0% a 3%). Os metabólitos reduziram levemente quando o TDH foi reduzido com exceção do ácido butírico que inicialmente aumentou, porém diminuiu com a redução do TDH de 1 h para 0,5 h.

Amorim *et al.* (2009) avaliaram a produção de hidrogênio em reator RALF, alimentado com água residuária sintética a base de glicose. Como material suporte foram utilizadas partículas de argila expandida para imobilização da biomassa. O reator foi operado com tempos de detenção hidráulica de 8 a 1 h. O rendimento de produção de hidrogênio aumentou de 1,41 para 2,49 mol H_2 mol⁻¹ glicose por meio da diminuição do TDH de 8-2 h. No entanto, com TDH de 1 h, houve ligeira diminuição para 2,41 mol H_2 mol⁻¹glicose. O biogás foi composto de H_2 e CO₂, e o conteúdo de H_2 aumentou de 8% para 35% com a diminuição do TDH. Os principais metabólitos solúveis durante a fermentação do H_2 foram ácido acético e ácido butírico.

Em estudo a respeito da imobilização do lodo, Lin *et al.* (2009) demonstraram que a cultura microbiana poderia produzir hidrogênio eficientemente em reator anaeróbio de leito fluidificado de 3 fases, com TDH aplicado de 2 a 6 h, atingindo produtividade de 4,26 mol H_2 mol⁻¹sacarose.

Shida *et al.* (2009) estudaram a estabilidade da produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em RALF com argila expandida como meio suporte, utilizando glicose como substrato O reator foi inoculado com lodo anaeróbio com pré-tratamento térmico e operado com diminuição de tempo de detenção hidráulica de 8 a 1 h, em temperatura controlada de 30 °C e pH de cerca de 3,8. Por meio da diminuição do TDH de 8 para 1 h houve aumento na produção média de hidrogênio, com valor máximo de 1,28 L h⁻¹ L⁻¹ para o TDH de 1 h. O bom desempenho do RALF pode ser atribuído ao tratamento térmico adequado do inóculo, a seleção de um meio suporte adequado para a adesão microbiana, bem como a escolha de condições satisfatórias no sistema.

A investigação do efeito do material suporte e do TDH na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado, alimentado com glicose, foi realizada por Barros *et al.* (2010). Os autores obtiveram as maiores produções de hidrogênio de 0,95 e 1,21 L h⁻¹ L⁻¹, com TDH aplicado de 1 h, em reatores preenchidos com partículas de poliestireno e argila expandida, respectivamente. Os autores ressaltaram que os valores obtidos de rendimento, conteúdo e produtividade de hidrogênio, e de biomassa aderida ao meio suporte, foram superiores para o reator preenchido com argila expandida quando comparados aos resultados obtidos com o reator preenchido com poliestireno.

Posteriormente, Barros *et al.* (2011) avaliaram o desempenho e a caracterização filogénetica de reatores RALF preenchidos com partículas de pneu triturado e de politereftalato de etileno-PET utilizando glicose como substrato para a produção e hidrogênio. Os autores obtiveram melhores resultados para o reator preenchido com pneu triturado, com rendimento máximo de hidrogênio de 2,25 mol H_2 mol⁻¹ glicose, com TDH aplicado de 2 h. O sequenciamento genético do gene rRNA 16S e a análise filogenética indicaram a presença de bactérias produtoras de hidrogênio, como as dos gêneros *Clostridium, Bacillus* e *Enterobacter*.

Em condições termofílicas, a 55 °C, o tratamento de resíduos de cozinha em reator anaeróbio de leito fluidificado foi realizado por Kuo *et al.* (2011) a fim de produzir hidrogênio por meio da aplicação de elevado TDH de 7,3 dias. Ocorreu a formação de microrganismos de crescimento aderido e de crescimento suspenso no RALF, as quais foram utilizadas para a investigação do potencial de bioprodução de H₂ e características cinéticas das duas formas de crescimento em reatores em batelada. Os microrganismos com crescimento suspenso apresentaram produção de hidrogênio após 3,6 h de fase lag, com produção máxima específica de H₂ de 2,65 mmol g SSV h⁻¹, enquanto que as células de crescimento aderido atingiram produção de H₂ após 20 h e máxima produção específica de H₂ de 1,06 mmol.g SSV.h⁻¹.

Reis e Silva (2011) avaliaram a influência da velocidade de fluxo ascendente (V_{asc}) aplicado a dois reatores anaeróbios de leito fluidificado (R_{124} e R_{188}), preenchidos com argila expandida como material suporte e utilizados para a produção de hidrogênio, com velocidades de 1,24 cm s⁻¹ e 1,88 cm s⁻¹, respectivamente, e alimentados com glicose (5 g L⁻¹). O reator R_{124} , que

operou com a velocidade mínima de fluidização apresentou os melhores resultados para a produção de hidrogênio. A máxima de produção de hidrogênio foi de 2,21 L h⁻¹ L⁻¹ para TDH de 1 h, enquanto o melhor rendimento foi de 2,55 mol H₂ mol de glicose⁻¹ para o TDH de 2 h. Os autores encontraram cerca de 40 a 67% de conteúdo de hidrogênio no biogás e afirmaram que uma elevada quantidade de etanol foi produzida, sugerindo um via metabólica preferível.

Objetivando estudar a influência de diferentes materiais suportes na produção de hidrogênio e de etanol, Barros e Silva (2012) utilizaram três reatores anaeróbios de leito fluidificado (R₁: poliestireno; R₂: pneu e R₃: politereftalato de etileno- PET). Os autores afirmam que para a produção de hidrogênio, a melhor performance encontrada ocorreu no R₂, com 2,11 mol H₂ mol glicose⁻¹, com maior conteúdo de biogás, de 60%. Em todos os reatores os metabólitos predominantes solúveis foram o ácido acético, butírico, láctico e etanol, com pequenas quantidades de ácido propiônico. O R₃ apresentou um melhor desempenho para a concentração de etanol, com 1941.78 mg L⁻¹. Por meio dos resultados obtidos, os autores afirmaram ainda que foi possível produzir H₂ e etanol, simultaneamente em todos os três reatores.

O desempenho e a composição da comunidade microbiana em dois reatores anaeróbios de leito fluidificado preenchidos com argila expandida como material suporte, alimentados com glicose, foram avaliados por Shida *et al.* (2012), enfatizando os efeitos da taxa de carregamento orgânico e a alcalinidade. Por meio de TCO aplicadas entre 19 e 140 kg DQO m⁻³ d⁻¹ os autores obtiveram rendimentos máximos de H₂ de 2,45 e de 1,90 mol mol glicose⁻¹ com 84 kg. DQO m⁻³ d⁻¹, no reator sem controle de pH (RALF₁) e no reator com controle de pH (RALF₂). Aplicando 140 kg DQOm⁻³ d⁻¹ foi possível atingir a máxima produção volumétrica de H₂, de 0,95 e 0,76 L h⁻¹ L⁻¹ para o RALF₁ e RALF₂, respectivamente. Os produtos metabólitos principais foram ácido acético e butírico para o RALF₁ e ácido acético e etanol para o RALF₂. Por fim, as condições operacionais favoreceram espécies de *Clostridium* (RALF₁) e de *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Veillonellaceae*, *Chryseobacterium*, *Sporolactobacillus* e *Burkholderiaceae* (RALF₂), evidenciando que o controle de pH e a aplicação de TCO diversas desempenham papel importante na determinação do tipo e rotas de fermentação anaeróbia.

Wu *et al.* (2012) pesquisaram o aumento da eficiência de produção de hidrogênio sob condições anaeróbias a partir de sacarose, 20 g L⁻¹, pela adição de íons cálcio (Ca(OH)₂ e CaCl₂), em concentrações de 50, 100 e 200 ppm, em um reator de leito fluidificado com células imobilizadas por adsorção física em carvão ativado com TDH aplicado de 8, 6, 4 e 2 h. O pico de

produção de H₂ foi obtido na concentração de 100 ppm de Ca^{+2} , no TDH de 2 h, de 1,22 mL h⁻¹ L⁻¹. O maior rendimento, de 3,76 mol mol⁻¹sacarose foi obtido no TDH de 6 h, também com 100 ppm de Ca^{+2} .

Munoz-Páez *et al.* (2013) utilizaram dois reatores anaeróbios de leito fluidificado alimentado com sacarose, para a produção de H₂, com taxas de carregamento orgânico de 5 a 8 g sacarose L⁻¹ d⁻¹, com TDH aplicado de 24 h, e obtiveram 54% de hidrogênio no biogás produzido. Os autores afirmaram que a combinação do choque térmico no inóculo e o baixo pH utilizado nos reatores inibiram a produção de metano.

Rosa *et al.* (2014) avaliaram a viabilidade de produção de H_2 em reator RALF utilizando diferentes fontes de carbono: glicose, soro de queijo e a co-fermentação destes dois substratos, e atingiram máximos rendimentos de hidrogênio de 1,37; 1,90 e 1,70 mmol g DQO⁻¹, respectivamente. Os autores relataram que a co-fermentação de glicose e soro de queijo possibilitou a produção simultânea de dois biocombustíveis, H_2 e etanol (3,45 mmol EtOH g DQO⁻¹).

As pesquisas realizadas sugerem a viabilidade e aplicabilidade do reator anaeróbio de leito fluidificado para a produção fermentativa de hidrogênio, demonstrando que esta pode ser uma possível configuração para a avaliação de processos de bioprodução de hidrogênio sob condições termofílicas.

3.8. Considerações finais

A partir da revisão de literatura foi possível evidenciar que a força motriz por trás da expansão da bioenergia é o potencial que detém o fornecimento de uma fonte acessível e prática no contexto renovável para a minimizar as alterações climáticas, otimizar a segurança energética e desenvolvimento econômico, todos fatores associados ao crescimento populacional.

No Brasil, a cana-de-açúcar tem sido cultivada por quase 500 anos. O país, o maior produtor de cana do mundo, detém eficiente produção de açúcar e etanol, com participação fundamental na matriz energética brasileira.

Entretanto, o potencial poluidor do efluente originado a partir do processo de destilação do álcool e açúcar, a vinhaça, representa atualmente uma das maiores fontes causadoras de poluição ambiental. Diversos estudos foram e estão sendo realizados a respeito do tratamento anaeróbio da vinhaça, tanto em faixas de temperatura mesofílicas e termofílicas, possibilitando a

utilização de reatores com altas velocidades de conversão e tolerantes à aplicação de cargas orgânicas elevadas, garantindo a estabilidade do processo de digestão anaeróbia.

O hidrogênio é um combustível único, com inúmeras propriedades. As limitações nas rotas para o aumento de produções de H_2 precisam ser aprofundadas. Diversos parâmetros que têm influenciado significativamente a produção biológica de hidrogênio, tais como pH, temperatura, taxa de carga orgânica, nutrientes, fonte de inóculo, características do substrato, tempo de retenção de sólidos, tempo de detenção hidráulica, e a presença de compostos tóxicos no efluente a ser utilizado como fonte de substrato.

Uma série de águas residuárias contendo açúcares simples (como a glicose e a sacarose) e o amido tem sido extensivamente estudadas para a produção de hidrogênio. Fundamentalmente, águas residuárias com elevado conteúdo orgânico são economicamente mais atrativas a serem utilizadas como substratos para a produção de H₂. Isto se deve ao fato de que a utilização dessas águas residuárias fornece benefícios mútuos de redução do potencial poluidor do afluente e produção de hidrogênio como fonte de energia renovável.

O processo de fermentação termofílica geralmente tem uma maior produção de H_2 e, portanto, possui elevado interesse para a aplicação industrial, uma vez que muitos efluentes industriais, tais como aqueles a partir de alimentos e do processamento de produtos agroindustriais, como a vinhaça, são lançados sob altas temperaturas. Muitas vezes, é preferível tratar estas águas residuárias sob condições termofílicas, que presumivelmente também são mais eficientes na degradação de compostos orgânicos, exibem comunidades microbianas específicas com adaptações fisiológicas e moleculares para suportar temperaturas altas e são mais resistentes a contaminações. Existe ainda o favorecimento termodinâmico, uma vez que sob temperaturas elevadas, o hidrogênio será eficientemente transferido a partir do líquido para a fase gasosa.

Diversos estudos utilizando efluentes industriais reais têm sido investigados para produção de hidrogênio sob condições termofílicas, como vinhaça, óleo de palma, glicerol, soro de queijo, águas residuárias do processamento da mandioca, do arroz, do queijo e da celulose.

Frente às pesquisas de tratamento de águas residuárias, idealizou-se investigar a aplicação da produção biológica de hidrogênio utilizando a vinhaça como substrato orgânico. A partir da utilização de reatores de alta taxa, como no caso dos reatores anaeróbios de leito fluidificado para o tratamento de águas residuárias sob condições termofílicas provenientes de destilarias de cana-

de-açúcar, tem-se a possibilidade de avaliar um tratamento que viabilize a minimização dos impactos poluidores da vinhaça, assim como a produção de hidrogênio via processo fermentativo.

O desenvolvimento, adaptação e operação dos reatores para a produção fermentativa de hidrogênio sob condições termofílicas, como no caso do RALF, ainda representam desafios e requerem pesquisas futuras. Devido às vantagens operacionais do reator como, por exemplo, melhor contato entre substrato e microrganismos, aceitação de altas taxas de carregamento orgânico e melhor resistência à presença de inibidores, juntamente com os bons resultados obtidos nas pesquisas anteriores, optou-se pelo desafio da aplicação do tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar, com biomassa imobilizada em partículas de cinasita, sob condições termofílicas (a 55 °C) para a produção fermentativa de hidrogênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse capítulo está apresentada a fonte de inóculo para a produção biológica de H_2 , o método adotado de pré-tratamento desta cultura mista, assim como a configuração do sistema utilizado para o desenvolvimento da parte experimental, juntamente com os procedimentos de partida e as condições operacionais dos reatores termofílicos. Está apresentada ainda a caracterização da água residuária bruta (vinhaça de cana-de-açúcar) ao longo do experimento, o detalhamento e a frequência das análises físico-químicas e biomoleculares, e por último os cálculos dos principais parâmetros para avaliar a produção biológica de hidrogênio.

4.1. Obtenção de inóculo produtor de hidrogênio: pré-tratamento térmico

A fonte de inóculo utilizada para a partida operacional dos reatores RALF termofílicos foi proveniente de lodo granulado de reator anaeróbio termofílico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB – lodo fermentativo-metanogênico) localizado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), para o tratamento de vinhaça (Figura 4.1). Foram observados valores de 7,06 e 41,3 g L⁻¹ para o pH e para a concentração de sólidos voláteis totais no inóculo, respectivamente. A fim de se obter culturas produtoras de hidrogênio foi realizado o método de pré-tratamento térmico da biomassa (Kim *et al.*, 2006) promovendo a supressão da metanogênese, por meio da eliminação de células vegetativas metanogênicas e favorecendo a permanência de células acidogênicas por meio da formação de endósporos.



Figura 4.1: Vista superior do reator UASB termofílico utilizado no tratamento de vinhaça na Usina São Martinho, Pradópolis, SP.
4.2. Água residuária: vinhaça de cana-de-açúcar

O substrato orgânico (vinhaça de cana-de-açúcar), utilizado para a alimentação dos reatores RALF termofílicos para a produção de hidrogênio, foi coletado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), produtora de etanol e açúcar, a partir de cana-de-açúcar como matéria-prima. Foram adicionados ao afluente dos reatores termofílicos nutrientes necessários ao crescimento celular NiSO4.6H2O: 1,0 mg L⁻¹; FeSO4.7H2O: 5,0 mg L⁻¹; FeCl3.6H2O: 0,5 mg L⁻¹; CoCl2.2H2O 0,08 mg.L⁻¹; CaCl2.6H2O: 47 mg L⁻¹, SeO2: 0,07 mg L⁻¹, uréia: 125 mg L⁻¹; KH2PO4:21 mg L⁻¹; K2HPO4: 85 mg L⁻¹; Na2HPO.4H2O: 33 mg L⁻¹ (modificado de Del Nery, 1987). Durante todo o período operacional dos reatores não houve adição de ácido clorídrico ou de NaOH como agentes acidificantes e alcalinizantes no afluente dos reatores.

Ao longo do experimento, as características da vinhaça coletada (fresca) foram avaliadas, considerando aspectos físico-químicos, como carboidratos totais, carbono orgânico total (COT), DQO total, nitrogênio amoniacal, fósforo total (como PO_4^{-3}), enxofre total (como SO_4^{-2}), zinco, manganês, cobre, cálcio, magnésio, potássio, e a composição e distribuição de ácidos orgânicos (Tabela 4.1). O pH obtido da vinhaça de cana-de-açúcar foi de 4,29 ± 0,3.

Componente	Conteúdo		Componente	Conteúdo	
	$(mg L^{-1})$			$(mg L^{-1})$	
	Min	Max		Min	Max
Carboidratos totais	10.618	16.289	Cobre	0,87	1,13
Carbono orgânico total (ppm)	2342	5235	Sólidos suspensos voláteis	1683	2095
DQO _{total}	30.406	33.857	N-amoniacal	67	101
P _{total} como PO ₄ ⁻³	147	240	Etanol	N.D.	N.D.
Potássio	3600	4800	Butirato	269	4219
Cálcio	532	757	Acetato	348	4917
Magnésio	367	580	Lactato	3421	5248
Zinco	0,97	2,45	Succinato	967	3523
Sulfato	1400	2900	Propionato	314	4680

Tabela 4.1: Valores máximos e mínimos de parâmetros físico-químicos para a caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar ao longo do experimento

N.D.: não detectável

Devido à necessidade de uso de grandes volumes de vinhaça para a realização dos ensaios e a dificuldade em sua obtenção no período de entressafra, foi realizado o armazenamento da vinhaça em freezer (- 5 °C).

4.3. Reator aneróbio de leito fluidificado termofílico: R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀

Os reatores utilizados foram construídos em acrílico transparente de 5 mm de espessura, com 120 cm de altura, diâmetro interno de 5,3 cm e 2646 cm³ de capacidade total cada (volume total).

O material suporte usado para imobilização e adesão da biomassa foi argila expandida, com diâmetro entre 2,8 a 3,5 mm, densidade real de 1,5 g cm⁻³, e porosidade de 23%. Foram utilizadas aproximadamente 800 g de argila expandida (Figura 4.2), proporcionando altura inicial de 40 cm de leito fixo em cada reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico. As características físicas da argila expandida são apresentadas na Tabela 4.2 e estão de acordo com Ortega *et al.* (2001).

Tabela 4.2: Características físicas da argila expandida segundo Ortega et al. (2001)

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



Figura 4.2: Partículas de argila expandida tratadas para utilização como suporte para aderência das populações microbianas

As condições fluidodinâmicas do reator, tais como velocidade de mínima fluidificação e vazão de recirculação para a argila expandida, foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga descritas por Amorim (2009). Características como dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação são apresentadas na Tabela 4.3. A

vazão de recirculação nos biorreatores termofílicos foi mantida em 133 L h^{-1} (expansão de ¹/₄ 30%), e velocidade superficial 1,30 vez maior que a velocidade mínima de fluidização.

Tabela 4.3: Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação para as partículas de argila expandida

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

Inicialmente foram realizados ajustes para verificar as condições fluidodinâmicas do reator. Para isto, foram utilizados os dados experimentais de velocidade de mínima fluidificação, para partículas de argila expandida. Com estes dados foi possível calcular a vazão de recirculação necessária para que o reator atingisse as condições de fluidificação, ou seja, correspondente a 1,3 vezes maior que a V_{mf} . O valor da velocidade de mínima fluidificação para a partícula de argila expandida foi de 1,24 cm s⁻¹ e com o uso de um medidor de vazão acoplado no reator, a bomba foi regulada. A próxima etapa foi o acionamento da bomba, deixando o sistema permanecer em recirculação como se estivesse em batelada com uma vazão de recirculação de 133 L h⁻¹.

A inserção de uma serpentina no reator, a fim de manter a temperatura termofílica do reator de forma uniforme em 55 \pm 1 °C no interior da qual circula água proveniente de um banho ultratermostatizado a 65 °C, foi realizada mediante investigação da efetiva manutenção constante da temperatura. Testes a respeito de configurações para o aquecimento da água residuária foram realizados, os quais envolveram a verificação do aumento da temperatura no interior do reator mediante recirculação do banho ultratermostatizado por meio de encamisamento do reator. Os resultados desta adaptação demonstraram que, devido às perdas de calor em função da parede de acrílico da camisa e do reator, o banho ultratermostatizado deveria ser operado a temperaturas elevadas (acima de 70 °C) a fim de manter o afluente aquecido no reator em torno de 55 °C. Desta forma, optou-se pela configuração da resistência em formato de "U" no interior do reator anaeróbio de leito fluidificado, e também o uso da camisa de termostatização, no interior das quais circula água proveniente de um banho ultratermostatizado, agindo isoladamente e/ou simultaneamente, manteve a temperatura termofílica uniforme em 55 ± 1 °C nos reatores termofílicos.

O esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico (configuração idêntica para todos os cinco reatores) utilizado para a produção contínua de hidrogênio está ilustrado na Figura 4.3.



Figura 4.3: Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico

A Figura 4.4 apresenta fotografias do reator anaeróbio de leito fluidificado utilizado para a produção contínua de hidrogênio utilizado neste estudo.



Figura 4.4: (a) Reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico; (b) partículas de argila expandida no leito; (c) parte superior do reator: coleta de biogás e efluente

4.4. Procedimento de partida e condições operacionais dos reatores para a produção de H₂

Foram utilizados cinco reatores denominados R_5 , R_{10} , R_{15} , R_{20} e R_{30} de idêntica configuração, com variação na concentração afluente de 5000, 10.000, 15.000, 20.000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹, respectivamente. O elevado conteúdo orgânico contido nesta água residuária, de cerca de 30.000 mg DQO L⁻¹, foi diluído para as respectivas concentrações utilizadas neste estudo. Ao longo da operação dos reatores, as menores e as maiores relações DQO:N:P obtidas a partir da água residuária de alimentação, considerando os cinco reatores, estiveram entre 100:1.7:0.5 e 100:4.5:0.8. A razão DQO:SO₄⁻² em todos os reatores esteve entre 13:1 a 20:1.

A operação de um dos reatores (R_5) ocorreu frente a aplicação de diferentes porcentagens de glicose (decrescentes: 67, 33 e 0%) e de vinhaça (crescentes: 33, 67 e 100%) no substrato de alimentação. Este reator foi operado por 308 dias no modo contínuo, ao longo de 8 fases experimentais. A estratégia realizada neste procedimento refere-se à estabilização da produção de H_2 na faixa de TDH aplicado entre 8 e 1 hora, durante as fases experimentais denominadas de 1 a 6, por meio da aplicação de diferentes porcentagens de glicose e de vinhaça no substrato de alimentação (co-fermentação). Em seguida, para avaliar a capacidade de produção de hidrogênio a partir de vinhaça, a glicose foi totalmente retirada da mistura do substrato afluente, introduzindo o substrato complexo (vinhaça) como única fonte de carbono para a produção termofílica de hidrogênio, durante as fases 7 e 8, conforme observado na Tabela 4.4.

Reator	Concentração do substrato	Fases	Duração da fase	TDH (b)	Mistu	ra de	TCO (kg DOO m ⁻³ d ⁻¹)
	$(mg DQO L^{-1})$		(dias)	(11)	Glicose	Vinhaça	
		1	65	8	67	33	15
		2	25	8	33	67	15
		3	60	6	33	67	20
		4	21	4	33	67	30
R_5	5000	5	31	2	33	67	60
		6	14	1	33	67	120
			Vinhaça o	le cana-de	e-açúcar con	no única fo	nte orgânica
		7	53	2	-	100	60
		8	11	1	-	100	120

Tabela 4.4: Condições operacionais impostas ao RALF termofílico: R₅

Os outros quatro reatores (R_{10} , R_{15} , R_{20} e R_{30}) foram operados mediante a adição de 33% de glicose como co-substrato ao afluente, apenas durante o período de partida operacional, conforme apresentado na Tabela 4.5. Dessa maneira, ao longo do período de *start-up* dos reatores (por 13 dias nos reatores R_{15} e R_{20} ; e por 30 dias nos reatores R_{10} e R_{30}), a glicose foi adicionada ao substrato afluente. Esta estratégia de adição de um co-substrato fermentativo auxilia a biodegradabilidade de outros compostos de águas residuárias complexas, como no caso da vinhaça, conforme foi abordado na Revisão de Literatura (item 3.4) desta tese. Os reatores R_{15} e R_{20} foram operados por 120 dias e os reatores R_{10} e R_{30} por 150 dias. Os reatores foram operados no modo contínuo ao longo das fases experimentais descritas na Tabela 4.5.

Reator	Concentração do	Fases	Duração	TDH	TCO
	substrato		da fase	(h)	$(\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1})$
	$(mg DQO L^{-1})$		(dias)		
		1	30	6	40
D	10.000	2	42	4	60
\mathbf{K}_{10}	10.000	3	31	2	120
		4	14	1	240
		1	21	6	60
D	15 000	2	28	4	90
R ₁₅	15.000	3	46	2	180
		4	12	1	360
		1	23	6	80
D	20.000	2	31	4	120
R_{20}	20.000	3	34	2	240
		4	16	1	480
		1	33	8	90
R ₃₀		2	27	6	120
	30.000	3	19	4	180
		4	13	2	360
		5	6	1	720

Tabela 4.5: Condições operacionais impostas aos RALF termofílicos: R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀

TDH: tempo de detenção hidráulica; TCO: taxa de carregamento orgânico

Inicialmente, todos os reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico foram operados no modo batelada (recirculação) por 2 dias, promovendo a aderência da biomassa ao meio suporte. O pH inicial quando ocorreu a partida dos sistemas termofílicos foi de 5,6. Este valor foi alcançado mediante a adição de ácido clorídrico (30%), sendo adicionados 1,0 mL L⁻¹, além da

adição de 2,0 mL L⁻¹ de ácido acético (puro), e de 0,17 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio a fim de controlar e evitar mudanças bruscas no pH do meio, evitando o possível crescimento de bactérias metanogênicas, as quais consumiriam o H₂. Após o período de recirculação de 2 dias, os reatores foram operados em modo contínuo. A aplicação do tempo de detenção hidráulica decresceu de 6, 4, 2 a 1 h nos reatores R_{10} , R_{15} e R_{20} e de 8, 6, 4, 2 a 1 h no reator R_{30} . As taxas de carregamento orgânico (TCO) estiveram entre 60 e 90 para o reator R_{10} ; entre 60 e 360 para o reator R_{15} , entre 80 e 480 para o reator R_{20} e entre 90 e 720 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para o reator R_{30} .

4.5. Análises físico-químicas

Foram realizadas análises físico-químicas periódicas nas amostras coletadas do afluente e efluente, assim como no biogás formado, de todos os reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico. Para fins de monitoramento, foram realizadas constantemente medidas de vazão, pH afluente e efluente, temperatura e altura do leito. As determinações nos afluentes e efluentes compreenderam análises de carboidratos totais solúveis (Dubois *et al.*, 1956), de ácidos orgânicos e álcoois por meio de cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC, Shimadzu[®]), de demanda química de oxigênio, de macro e micronutrientes e de sólidos suspensos (APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2012). A caracterização da vinhaça seguiu estes procedimentos de análises, além da determinação de carbono orgânico total – TOC (Shimadzu Total Organic Carbon Analyzer TOC 5000[®], Gronroos *et al.*, 2005). No biogás formado nos biorreatores termofílicos foram avaliados os rendimentos, as produções volumétricas de H₂ (medidor de gás tipo TG-1, Ritter[®], Alemanha) e as composições do biogás (cromatografia gasosa, Shimadzu GC -2010[®]).

4.5.1. Determinação de carboidratos totais solúveis

A concentração de carboidratos totais de amostras provenientes das fases experimentais de produção biológica de hidrogênio, nos reatores termofílicos, com vinhaça como substrato orgânico foi determinada em triplicata por meio do método colorimétrico descrito por Dubois *et al.* (1956) utilizando glicose como padrão.

4.5.2. Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois

As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, lático, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, e capróico) e álcoois (etanol e metanol) foram determinadas por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC, Shimadzu[®]), aparelho equipado com com bomba (LC-10ADVP), amostrador automático (SIL-20A HT), coluna CTO-20A, a 43 °C, detector de arraste (SDP-M10 AVP) e coluna Aminex HPX-87H (300 mm, 7,8 mm, BioRad). A fase móvel foi representada pelo H_2SO_4 (0.01 N) a 0.5 ml min⁻¹. Os limites de detecção (mg L⁻¹) para cada ácido orgânico e para o etanol foram: ácido succínico: 6,37; ácido láctico: 3,43; ácido acético: 3,36; ácido propiônico: 12,77; ácido butírico: 6,91; ácido iso-butírico: 4,10 e etanol: 19,28.

4.5.3. Determinação da demanda química de oxigênio

As concentrações de matéria orgânica de amostras provenientes das fases experimentais deste estudo foram realizadas, em triplicata, de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), pelo método de digestão e espectrofotometria. Considerando que a vinhaça coletada era armazenada em freezer (- 5 °C) as análises de DQO foram realizadas em cada lote descongelado para posterior utilização no substrato de alimentação destinado aos reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico.

4.5.4. Determinação de micro e macronutrientes

As análises de nitrogênio (Nitrogênio Total Kjedahl, nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico) foram realizadas segundo etapas de digestão (NTK), destilação (NTK e N-amoniacal) e titulação (NTK e N-amoniacal). As determinações de fósforo total (P_{total} como PO₄⁻³) foram feitas mediante digestão e avaliação por método colorimétrico, com metavanadato e molibdato de amônio. As concentrações de sulfato foram determinadas por meio da utilização de kits comerciais (HACH Dr 820 Field Test Kit[®]) e avaliadas por método colorimétrico. As concentrações de potássio, cálcio, magnésio, zinco, cobre foram feitas na caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar, e realizadas por absorção atômica e fotômetro de chama.

As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento da USP, na Escola de Engenharia de São Carlos, em acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

4.5.5. Determinação de sólidos suspensos

A metodologia de filtração (APHA, 2012) foi utilizada para avaliar a concentração de sólidos suspensos totais, voláteis e fixos nas amostras afluentes e efluentes dos reatores RALF termofílicos.

4.5.6. Determinação do hidrogênio e da composição do biogás

A produção volumétrica de todo o biogás formado no reator foi medida por meio de medidor de gás (tipo TG-1, Ritter Inc.[®], Alemanha). Este instrumento esteve acoplado ao reator em operação durante determinado período de tempo, com o objetivo de manter ao máximo a pressão constante. Cada procedimento de medição da vazão volumétrica de biogás consistiu em utilizar o volume de biogás quantificado pelo medidor ao longo do período definido. O medidor forneceu a vazão total de biogás, sendo este valor multiplicado pela concentração de H₂ para se obter a produção volumétrica de H₂.

A determinação do gás hidrogênio foi feita por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010), sendo o aparelho equipado com detector de condutividade térmica, utilizando a coluna Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm). Para tanto, foram retiradas amostras triplicatas de 0,1 mL da fase gasosa do *headspace* do reator em operação (seringa *gastigh* com trava). O gás de arraste na cromatografia gasosa foi o argônio, sob o fluxo de 21,9 cm s⁻¹. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram de 30, 200 e 230 °C, respectivamente.

4.6. Avaliação da comunidade microbiana por Biologia Molecular

Foram realizadas análises moleculares para avaliar as comunidades bacterianas presentes no reator operado mediante a co-fermentação de glicose e vinhaça (R_5), ao longo das fases operacionais com TDH aplicado de 2 e 1 h, assim como a análise da comunidade de microrganismos, nestes mesmos TDH, por meio da utilização de apenas vinhaça como fonte de carbono disponibilizada. As amostras de biomassa foram coletadas ao final do período operacional de cada fase. Após a aplicação do TDH de 2 h, a partir de 100% de vinhaça, optou-se por realizar a caracterização filogenética, por meio das técnicas de clonagem e sequenciamento da biomassa aderida ao material suporte (argila expandida) do reator termofílico R_5 . Para os reatores R_{10} e R_{20} também foram realizadas análises moleculares visando compreender as modificações na comunidade microbiana ao longo das fases operacionais, conforme a diminuição do TDH de 4, 2 e 1 h utilizando somente vinhaça como fonte orgânica. O consórcio microbiano aderido ao material suporte do reator termofílico R_{20} foi selecionado para clonagem, sequenciamente e análise filogenética após a fase operacional com TDH aplicado de 4 h.

A comunidade microbiana estabelecida na cultura mista produtora de hidrogênio sob condições termofílicas, nos reatores $R_{10} e R_{30}$, foi investigada somente em termos da estrutura da comunidade a partir de amostras da biomassa aderida à argila expandida no leito dos reatores, durante os TDH aplicados de 6, 4, 2 e 1 h. Nesta etapa, também foi avaliada a comunidade microbiana presente na vinhaça de cana-de-açúcar, sem diluição.

4.6.1. Extração de DNA e amplificação pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

O DNA genômico foi extraído por lise celular com pérolas de vidro (Sigma), fenol, clorofórmio e tampão fosfatado, utilizando procedimento experimental modificado de acordo com Griffths *et al.* (2000), descrito por Maintinguer *et al.* (2008). Em tubos Falcon (15 mL), toda a amostra (biomassa) que foi retirada das partículas de cinasita foi agitada em vórtex com 5 mL de solução tampão PBS (1 x) e centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado ao pellet pérolas de vidro; 1 mL de PBS (1 x); 1 mL de fenol tamponado equilibrado com Tris; 1 mL de clorofórmio, seguido de homogeneização em vórtex por 60 segundos e centrifugação a 6000 rpm (10 min, 4 °C).

Após a centrifugação foram transferidos 500 μ L do sobrenadante para um tubo eppendord (1,0 mL) e adicionada a mesma quantidade de fenol. O tubo foi submetido à agitação em vórtex até a formação de uma emulsão e centrifugado (condições citadas acima). O procedimento de transferência do sobrenadante foi repetido com volumes menores para reduzir os contaminantes das amostras. Entretanto, ao invés de acrescentar o fenol, era adicionado o clorofórmio. Aproximadamente 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para outro tubo eppendorf para armazenamento a -20 °C.

Para verificar a integridade e a concentração do DNA extraído foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), utilizando 5 μ L do extrato de ácido nucléico homogeneizado juntamente com 2 μ L de *loading dye*. Após o tempo de corrida da eletroforese (mediante corrente de 75 V por 30 min), o gel foi transferido para câmara de transluminador UV (Stratagene Eagle Eye II), acoplado ao computador com o software Eaglesight (Stratagene versão 3.22) para observação das bandas.

A amplificação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com set primer 968FGC (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e 1401R (5'-AACGGGGCGGTGTGTAC-3') para Domínio *Bacteria* (Nubel *et al.*, 1996) sintetizados pela Invitrogen, com GC *clamp* (5'- CGC CCG CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG-3'). Na reação de amplificação para uma amostra (50 μL) foram utilizadas as soluções apresentadas na Tabela 4.6, representando o mix utilizado na técnica de PCR. Após a preparação do mix, as reações para amplificação do fragmento de ácido nucléico foram direcionadas para o termociclador, ao longo de 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação inicial (94 °C por 5 min), desnaturação (94 °C por 45 segundos), anelamento (94 °C por 45 segundos), extensão (72 °C por 1 minuto), final da extensão (72 °C por 1 minuto) e resfriamento (4 °C).

Reagente	Volume (µL)
Água ultrapurificada	34,0
Tampão PCR 10 X	5,0
Cloreto de magnésio (50mM)	1,5
dNTP (2 mM)	5,0
Primer forward (100 pmol/L)	1,0
Primer reverse (100pmol/L)	1,0
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	0,5
Template (50-100 ng)	2,0

Tabela 4.6: Reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos específicos na técnica de PCR

4.6.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os fragmentos amplificados de DNA foram separados pela técnica de *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) de acordo com Muyzer *et al.* (1993). O gel foi preparado com gradiente desnaturante nas concentrações de 45 e 65%. O sistema utilizado foi o DGGE D CodeTM – Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Inc., California). As condições durante a eletrofores mantiveram a temperatura a 60 °C, com corrente de 75 V por 16 horas. Após esse período, o gel foi então corado com solução TAE 1X contendo 1 g mL⁻¹ de brometo de etídio por 10 min. Para observar o perfil de bandas, o gel foi transferido para câmara de transluminador UV (Stratagene Eagle Eye II), acoplado ao computador com o software Eaglesight (Stratagene

versão 3.22). O dendograma foi elaborado e construído utilizando o software Bionumerics versão 2.5. Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), com coeficiente de Pearson.

4.6.3. Clonagem e sequenciamento

O material genético extraído das amostras de biomassa do reator termofílico R₅, (coletada após a aplicação do TDH de 2 h, utilizando como substrato 100% de vinhaça) e do reator termofílico R₂₀ (coletada após a fase operacional com TDH aplicado de 4 h) foram amplificadas com primers específicos (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R: 5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3') (Lane, 1991), e foram purificados com Ilustra GFX PCR DNA kit and Gel Band Purification (GE Healthcare). O vetor usado foi pGEM® Easy Vector System (Promega) e transformados em células competentes de Escherichia coli para a formação da biblioteca de clones (96 clones). A recuperação do fragmento de interesse foi realizada pela PCR meio dos primers M13F (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3' e M13R (5'por CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Chun, 1995). Os produtos da PCR foram encaminhados a Macrogen Inc® (Seu, Coréia, http://dna.macrogen.com/eng) para a análise das sequências de nucleotídeos (sequenciados em analisador automático de DNA modelo ABI3730XL - Applied Biosystem). As sequências obtidas foram averiguadas, e os vetores retirados, por meio dos softwares DNASTAR Lasergene SeqMan Pro e BioEdit versão 7.2.5.

Após essa etapa, a busca por sequências similares foi realizada utilizando as ferramentas do Ribossomal Database Project (*decipher find chimeras*, alinhamento, *complete linkage clustering*, sequências representativas, *RDP classifier*, *dereplicate - http://rdp.cme.msu.edu/*), a ferramenta básica de alinhamento (Basic Local Alignment Search Tool - BLAST) e pesquisas no National Center for Biotechnology Information sequence database (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/*). Por meio destas ações, foi possível agrupar as sequências obtidas em unidades taxonômicas operacionais (UTO).

As árvores filogenéticas para cada amostra sequenciada foi realizada por meio do software MEGA versão 4.0, utilizando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). Para estimar a confiabilidade das árvores, foi utilizado o teste de *bootstrap* para 1000 repetições (Felsenstein, 1985). O limite de confiança adotado foi de 99% para o nível taxonômico de Espécie e de 88% para o nível taxonômico de Gênero. Foram obtidas 56 sequências para a amostra de biomassa sequenciada do R_5 , agrupadas em 13 UTO, e 51 sequências para a amostra de biomassa sequenciada do R_{20} , agrupadas em 21 UTO. As sequências obtidas neste estudo foram

depositadas no GenBank (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank*) com os números de acesso entre KF684949 e KF684961 (R₅) e entre KF751735 to KF751755 (R₂₀).

4.7. Frequência das análises químicas e de Biologia Molecular

A pesquisa foi dividida em fases operacionais, conforme a diminuição do TDH aplicado aos reatores RALF termofílicos alimentados com diferentes concentrações de vinhaça de cana-deaçúcar, de acordo com as especificações abordadas nos itens anteriores. O TDH foi alterado quando era atingido o estado estacionário no reator, principalmente com referência aos valores estáveis de produção de hidrogênio. Ao longo do procedimento operacional dos reatores termofílicos, foram realizadas análises físico-químicas para o monitoramento dos mesmos. Ao final das fases operacionais, algumas partículas de argila expandida foram retiradas para posterior análise de da comunidade microbiana por meio de técnicas de Biologia Molecular. A Tabela 4.7 apresenta a frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases deste estudo.

Tabela 4.7: Análises físico-químicas e biomoleculares realizadas em amostras coletadas nos reatores termofílicos R_5 , R_{10} , R_{15} , R_{20} e R_{30}

Análises	Frequência
pH, vazão, altura e temperatura do leito	Diária
Carboidratos totais e Demanda Química de Oxigênio	3X semana
Produção, rendimento e conteúdo de H ₂ no biogás	3X semana
Ácidos orgânicos	3X semana
Sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis)	3X semana
Nitrogênio (orgânico, total e amoniacal), sulfato e fosfato	3X semana
Biologia Molecular (PCR, DGGE)	Ao final de cada fase operacional
(clonagem e sequenciamento)	Biomassa selecionada (R ₅ e R ₂₀)

4.8. Cálculo dos principais parâmetros

Nesse item serão apresentados os principais cálculos realizados para a execução desse estudo, os quais abrangem a a taxa de carregamento orgânico aplicada teórica (1), a produção volumétrica (2), o rendimento de hidrogênio (3) e a taxa de carregamento orgânico aplicada real (4).

65



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os dados obtidos e a interpretação dos parâmetros analisados na investigação do desempenho dos reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico utilizados no presente estudo a partir de vinhaça de cana-de-açúcar como fonte orgânica. As informações de rendimento, produção e conteúdo de H₂, concentrações de ácidos orgânicos, remoções de carboidratos totais e de matéria orgânica, concentrações de macro, micronutrientes e de sólidos suspensos serão apresentadas por meio de curvas de variação em representações gráficas, e tabelas com os valores médios correspondentes a cada fase de operação dos reatores termofílicos. Ao final, os dados experimentais serão relacionados à presença de microrganimos produtores de hidrogênio, resultado obtido por meio das técnicas de clonagem e sequenciamento da biomassa aderiada ao material suporte dos reatores, assim como outras análises de Biologia Molecular (PCR-DGGE) para avaliar a estrutura da comunidade microbiana estabelecida ao longo das fases operacionais.

5.1. Produção termofílica de hidrogênio: efeito da TCO e do TDH utilizando diferentes concentrações de vinhaça: R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀

Serão apresentados os resultados médios de rendimento, produção e conteúdo de hidrogênio no biogás obtidos ao longo das fases operacionais dos cinco reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico, em relação ao aumento da taxa de carregamento orgânico e diminuição do tempo de detenção hidráulica.

5.1.1. Rendimento de Hidrogênio (HY)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.1 e na Figura 5.1, os rendimentos de hidrogênio obtidos no reator R_5 estiveram entre 1,57 e 4,62 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹. Para o reator R_{10} , os valores mínimos e máximos foram de 1,92 e 2,86 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹. A concentração de 15.000 mg L⁻¹ de substrato afluente, forneceu valores de rendimento entre 1,03 e 2,23 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹. Menores valores de HY foram verificados nos reatores R_{20} e R_{30} , entre 0,60 e 1,85 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹ e entre 0,19 e 0,79 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹, respectivamente. Os valores de rendimento de H₂ (HY) diminuíram ao longo da utilização de maiores concentrações afluentes, assim como por meio da aplicação de maiores taxas de carregamento orgânico e de menores tempos de detenção hidráulica. Essa tendência foi atribuída às consequências de sobrecarga ao sistema, assim como resultado da maior disponibilidade dos compostos recalcitrantes/tóxicos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar, refletindo negativamente neste parâmetro de avaliação da viabilidade de produção biológica de hidrogênio.

Dessa maneira, a avaliação deste parâmetro na produção biológica de H₂ sob diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar demonstrou que o reator R₅, alimentado com a menor concentração de substrato utilizada neste estudo, de 5000 mg DQO L⁻¹ e operado principalmente frente à co-fermentação de glicose (porcentagens decrescentes) e de vinhaça de cana-de-açúcar (porcentagens crescentes), apresentou os maiores valores médios de rendimento de H₂, entre 1,57 e 4,62 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹. O melhor resultado de rendimento (4,62 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹) foi verificado durante a aplicação do maior TDH (8 h) e a consequente menor TCO utilizada, de 15 kg DQO m⁻³ d⁻¹, com 67% de glicose e 33% de vinhaça no substrato de alimentação.

Tabela 5.1: Valores médios de rendimento de H_2 para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo da utilização de diferentes concentrações de vinhaça de canade-açúcar (±: desvios padrões)

	Rendimento de H_2 (HY)										
$(\text{mmol g DQO}_{\text{adicionada}}^{-1})$											
TDH	8	8	6	4	2	1	2	1			
*											
R ₅	4,62±0.4	4,15±0.3	4,31±0.5	4,14±0.3	3,11±0.3	2,06±0.2	3,32±0.3	1,57±0.1			
TCO	15,00	15,00	20,00	30,00	60,00	120,00	60,00	120,00			
R ₁₀	-	-	2,86±0.2	2,77±0.3	2,45±0.3	$1,92\pm0.2$	-	-			
TCO			40,00	60,00	120,00	240,00					
R ₁₅	-	-	2,23±0.3	1,62±0.1	$1,22\pm0.1$	1,03±0.1	-	-			
TCO			60,00	90,00	180,00	360,00					
R ₂₀	-	-	$1,85\pm0.2$	1,51±0.1	0,86±0.1	0,60±0.04	-	-			
TCO			80,00	120,00	240,00	480,00					
R ₃₀	-	0,62	0,79	0,60	0,37	0,19	-	-			
		±0.15	±0.07	±0.09	±0.03	± 0.02					
TCO		90,00	120,00	180,00	360,00	720,00					

TCO: taxa de carregamento orgânico (kg DQO m⁻³ d⁻¹)

*Condições operacionais:

 R_5 : concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da co-fermentação da glicose com a vinhaça durante a diminuição do TDH de 8 a 1 h, seguida da fermentação da vinhaça nos TDH aplicados de 2 e 1 h;

 R_{10} ; R_{15} e R_{20} : concentrações de 10.000; 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato;

 R_{30} : concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 8 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.



Figura 5.1: Taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada e rendimento de H_2 nos reatores RALF termofílicos com diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica: (a) reator R_5 ; (b) reatores R_{10} e R_{15} ; (c) reatores R_{20} e R_{30} .

Tawfik e Salem (2012) relataram que taxas de carregamento orgânico elevadas aplicadas aos sistemas biológicos produtores de hidrogênio possam vir a diminuir o rendimento (HY), Similarmente ao obtido neste estudo Han *et al.* (2012) utilizaram melaço como substrato para a produção biológica de H₂, nas concentrações de 2000 a 8000 mg DQO L⁻¹. Os autores verificaram que a partir da TCO entre 8 a 32 kg m⁻³ d⁻¹, o rendimento de H₂, em reator CSTR, inicialmente aumentou até o limiar de 24 kg m⁻³ d⁻¹, com consequente tendência de diminuição da produção de hidrogênio na TCO de 32 kg m⁻³ d⁻¹. O limiar de TCO atingido de 40,00 kg DQO m⁻³ d⁻¹ para o reator termofílico de 10.000 mg DQO L⁻¹ (R₁₀) demonstrou que os maiores valores de rendimento de hidrogênio foram alcançados no TDH de 6 h, com valores médios obtidos de 2,86 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹.

Os reatores com concentrações superiores de vinhaça, de 15.000, 20.000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹ apresentaram efetivo rendimento de hidrogênio, porém com valores inferiores quando comparados aos reatores com concentrações de 5000 e de 10.000 mg DQO L⁻¹. Os máximos rendimentos de HY obtidos a partir da utilização destas concentrações de substrato afluente também foram verificados durante a aplicação do tempo de detenção hidráulica de 6 h, com valores máximos de 2,23; 1,85 e 0,79 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹, para os reatores R₁₅, R₂₀ e R₃₀, respectivamente.

Nesse sentido, valores similares de HY foram observados a partir de águas residuárias reais. Yang *et al.* (2007) obtiveram 2,30 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ em TDH superior ao deste estudo, de 24 h, a partir de água residuária do processamento de queijo, sob condições mesofílicas em reator CSTR, porém, com detecção de metano, situação que não ocorreu no presente estudo a partir de vinhaça de cana-de-açúcar diluída sob temperatura termofílica. Lee *et al.* (2010), também verificaram valores de HY próximos aos obtidos neste estudo, em reator CSTR intermitente alimentado com resíduos vegetais de cozinha, a 60 °C. Esses autores observaram até 1,70 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ em TCO aplicada de 28 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Hsiao *et al.* (2009) obtiveram rendimento de 2,00 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ em fermentador anaeróbio contínuo a partir de melaço condensado solúvel, em concentração superior a deste estudo, de 40 g DQO L⁻¹.

Wu *et al.* (2013) realizaram a co-fermentação de melaço de açúcar de beterraba com águas residuárias de suinocultura, com 10.000 mg DQO L⁻¹ afluente, e TDH aplicado entre 30 e 6 h. Os autores verificaram que o máximo rendimento de hidrogênio, de 1,57 mol mol açúcar⁻¹, foi alcançado em TDH ótimo de 15,62 h. Os autores observaram que por meio da aplicação de menor TDH, de 6, foi obtido valor de rendimento de hidrogênio, de 0,34 mol mol açúcar⁻¹, ou seja, 4.5 vezes menor em relação ao máximo HY. Esta tendência é similar ao encontrado neste estudo a

partir de vinhaça como fonte orgânica, com diminuição de até 4 vezes o rendimento de hidrogênio no menor TDH avaliado de 1 h (R_{30} : de 0,79 para 0,19 mmol H_2 g DQO_{adicionada}⁻¹).

5.1.2. Produção volumétrica de hidrogênio

Os valores obtidos neste estudo de produção volumétrica de hidrogênio estão apresentados na Tabela 5.2 e na Figura 5.2. As menores concentrações utilizadas neste estudo, por meio da operação dos reatores $R_5 e R_{10}$ forneceram valores entre 0,19 e 0,78 L h⁻¹ L⁻¹ e entre 0,43 e 1,96 L h⁻¹ L⁻¹, respectivamente. Valores mínimos e máximos de produção volumétrica de H₂ de 1,49 e 0,45 L h⁻¹ L⁻¹ e de 0,54 e 1,20 L h⁻¹ L⁻¹ foram verificados nos reatores $R_{15} e R_{20}$, respectivamente. Para o reator R_{30} os valores estiveram entre 0,32 e 0,81 L h⁻¹ L⁻¹.

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) manteve-se estável e com tendência de elevação ao longo do aumento das taxas de carregamento orgânico aplicadas, em todos os reatores termofílicos. Sob condições mesofílicas, assim como observado por Shida *et al.* (2012), Amorim *et al.* (2012), Barros e Silva (2012) e sob condições termofílicas, por Akutsu *et al.* (2009a e b), Luo *et al.* (2010a e b) e Peintner *et al.* (2010), a produção volumétrica de hidrogênio neste estudo manteve-se crescente mediante o efeito da diminuição do TDH.

Tabela 5	.2:	Valores	médios	de	produção	volumétrie	ca de	H_2	para	as	diferentes	taxas	de
carregame	ento	orgânic	o e TDH	apl	licados ao	longo da u	ıtilizaç	ão d	le dife	eren	tes concent	rações	de
vinhaça d	e ca	na-de-aç	úcar (±: d	esv	ios padrões	s)							

	Produção volumétrica de H ₂ (PVH)										
$(L H_2 h^{-1} L^{-1})$											
TDH*	8	8	6	4	2	1	2	1			
R ₅	$0,19{\pm}0,02$	$0,20\pm0,02$	0,25±0,03	$0,35\pm0,04$	0,53±0,05	0,66±0,05	$0,58\pm0,05$	$0,78\pm0,08$			
TCO	15,00	15,00	20,00	30,00	60,00	120,00	60,00	120,00			
R ₁₀	-	-	$0,43\pm0,04$	$0,66\pm0,07$	$1,24\pm0,1$	$1,96\pm0,2$	-	-			
TCO			40,00	60,00	120,00	240,00					
R ₁₅	-	-	$0,45\pm0,05$	$0,55{\pm}0,05$	$0,85{\pm}0,09$	$1,49\pm0,1$	-	-			
TCO			60,00	90,00	180,00	360,00					
R ₂₀	-	-	$0,54{\pm}0,05$	0,71±0,06	0,81±0,08	$1,20\pm0,1$	-	-			
TCO			80,00	120,00	240,00	480,00					
R ₃₀	-	0,32±0,03	0,55±0,04	0,63±0,07	$0,81{\pm}0,1$	$0,80\pm0,07$	-	-			
TCO		90,00	120,00	180,00	360,00	720,00					

TCO: taxa de carregamento orgânico (kg DQO m⁻³ d⁻¹)

*Condições operacionais:

 R_5 : concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da co-fermentação da glicose com a vinhaça durante a diminuição do TDH de 8 a 1 h, seguida da fermentação da vinhaça nos TDH aplicados de 2 e 1 h;

R₃₀: concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 8 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.

 R_{10} ; R_{15} e R_{20} : concentrações de 10.000; 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato;



Figura 5.2: Produção volumétrica de H_2 nos reatores RALF termofílicos com diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar ao longo do aumento da taxa de carregamento orgânico: (a) reator R_5 ; (b) reatores $R_{10} e R_{15}$; (c) reatores $R_{20} e R_{30}$.

Dessa maneira, foi verificado o comportamento crescente da produção de H₂ mediante o aumento da TCO, e consequente diminuição do TDH de 8 para 1 h nos reatores R_5 e R_{30} e de 6 para 1 h nos reatores R_{10} , R_{15} e R_{20} . A partir de melaço, Ren *et al.* (2010) alcançaram 0,40 L h⁻¹ L⁻¹ de produção volumétrica de hidrogênio, no TDH de 6 h. As maiores produções volumétricas de H_2 foram observadas no reator termofílico alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar na concentração de 10.000 mg DQO L⁻¹, com valores entre 0,43 a 1,96 L H_2 h⁻¹ L⁻¹, no menor TDH aplicado, de 1 h.

O aumento da produção de hidrogênio a partir da diminuição do TDH também foi observado por Wang *et al.* (2013) em um reator CSTR alimentado com melaço proveniente de uma refinaria de açúcar, na concentração de 8.000 mg DQO L⁻¹. Os autores reportaram que a utilização de TDH menores favoreceu a produtividade de biohidrogênio, aumentando em cerca de 4 vezes a produção biológica de hidrogênio (de 3,18 para 12,27 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹) por meio da diminuição do TDH de 10 para 5 h. No presente estudo, foi possível aumentar a PVH em cerca de 4 vezes no reator R₁₀ (15,40 para 70,18 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹). Os reatores R₁₅ e R₂₀ também apresentaram bons resultados em termos de produção volumétrica de hidrogênio, com valores entre 0,45 a 1,49 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ e entre 0,54 a 1,20 L H₂ h⁻¹ L⁻¹.

Os valores de produção biológica de hidrogênio verificados nesse estudo podem ser atribuídos as vantagens operacionais da temperatura termofílica. Sob condições termofílicas, Akutsu *et al.* (2009a) relataram que a produção de H₂ pode ser aumentada em razão do favorecimento de transferência líquido-gás do H₂, resultando em valores elevados de produtividade, assim como observado neste estudo, no qual foi possível atingir até 1,96 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ no reator R₁₀, com 10.000 mg DQO L⁻¹, no TDH de 1 h, com TCO de 240,00 kg m⁻³ d⁻¹. Assim como relatado por Weiland (2010), o crescimento microbiano e a hidrólise de partículas sólidas podem ser aumentadas em reatores termofílicos, a solubilidade do H₂ diminuída, aliviando o efeito inibitório causado pela alta pressão parcial do H₂ (OH *et al.*, 2011; BASTIDAS-OYANEDEL *et al.*, 2012). Dong *et al.* (2011) demonstraram que, por meio da aplicação da concentração afluente de sacarose, de 5000 para 10.000 mg DQO L⁻¹, o reator termofílico UASB apresentou maiores produção e rendimento de hidrogênio, associadas a pressão parcial de H₂, implicando que estes sistemas a altas temperaturas podem oferecer ambientes mais favoráveis para a produção biológica de hidrogênio quando comparados aos mesofilicos, demonstrando uma alta estabilidade operacional.

As vantagens inerentes ao reator anaeróbio de leito fluidifcado também ficaram evidentes no presente estudo por meio da efetiva produção volumétrica de H₂. Diversos fatores positivos são atribuidos a este tipo de configuração, como a possibilidade de aplicação de baixos TDH e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos (WU *et al.*, 2003). Peintner *et al.* (2010) avaliaram dois reatores para a produção fermentativa de hidrogênio em condições termofílicas, um reator de leito percolado e um reator de leito fluidificado, utilizando a glicose como substrato. Os autores obtiveram vantagens para cada uma das configurações de reatores, porém o reator de leito fluidificado obteve produtividade levemente mais alta, de 0,25 L L⁻¹ h⁻¹, tornando possível a utilização destas configurações para produção de H₂ sob condições termofílicas.

De acordo com Won et al. (2013), a produtividade de hidrogênio é dependente do conteúdo de carboidratos e de matéria orgânica, principalmente quando a fermentação ocorrer mediante a aplicação de TDH reduzidos e TCO elevadas. Concentrações afluentes elevadas poderão aumentar a produção de H₂ (WANG e WAN, 2009), porém, por outro lado, concentrações muito elevadas de substrato poderão diminuir esta capacidade (SARIPAN e REUNGSANG, 2013). A operação dos reatores termofílicos a partir das concentrações mínima e máxima utilizadas como substrato neste estudo, de 5000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹, respectivamente (R₅ e R₃₀) permitiu a verificação de valores estáveis de produção de biohidrogênio, porém inferiores quando comparados aos reatores com concentrações intermediárias de vinhaça de cana-de-acúcar, (10.000, 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹). Para o reator R_5 , foi constatada produção volumétrica entre 0,19 a 0,78 L H_2 h⁻¹ L⁻¹ e para o reator R_{30} , entre 0,32 e 0,81 L H₂ h⁻¹ L⁻¹. Estes resultados indicam que, em todos os reatores, a PVH foi influenciada por concentrações de substrato reduzidas ou muito elevadas. No R5, a variação da TCO de 15,00 a 120,00 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e no reator R₃₀, com aplicação de taxas de carregamento orgânico elevadas, de 90,00 a 720,00 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foram constatadas menores produções volumétricas. Valores similares foram obtidos sob condições termofílicas a partir de águas residuárias reais. Kim et al. (2011) utilizaram um reator CSTR para a produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias do processamento de tofu, com concentração elevada, de 26,5 g DQO L⁻¹, e obtiveram 0,34 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ no TDH aplicado de 8 h. Azbar et al. (2009b) relataram PVH de 0,33 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ também em um reator CSTR termofílico para a produção de biohidrogênio com água residuária do processamento de queijo (40 g DQO L^{-1}).

Foi constatada neste estudo tendência de aumento da PVH e de diminuição de HY perante o aumento da TCO aplicada em todos os reatores termofílicos. Akutsu *et al.* (2009a) sob condições termofílicas, também verificaram esse comportamento, utilizando amido como substrato orgânico, em reator UASB. Os autores relataram aumento da produção volumétrica de hidrogênio de 0,04 para 0,16 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, mediante o elevação da TCO de 8 até 127 kg DQO m⁻³ d⁻¹. No entanto, para o rendimento de H₂, os autores observaram o decréscimo deste parâmetro de 1,68 para 0,20 mol H₂ mol glicose⁻¹. Luo *et al.* (2010a) investigaram os efeitos do inóculo, alcalinidade e TDH no processo fermentativo de produção de hidrogênio sob condições termofílicas, e observaram que a diminuição do TDH aumentou a produção de hidrogênio, porém apresentou menores valores de rendimento, assim como observado neste estudo. Ao longo das fases operacionais deste estudo, também foi observado este comportamento (Figuras 5.1 e 5.2). Por exemplo para o reator R₅, o rendimento máximo de hidrogênio de 4,62 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ obtido no TDH de 8h, foi reduzido para 1,57 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ na maior TCO aplicada (TDH de 1 h), de 120,00 kg DQO m⁻³ d⁻¹. No entanto, a produção volumétrica durante a utilização desta taxa de carregamento orgânica, de 120 kg DQO m⁻³ d⁻¹, foi a máxima para este reator, de 0,78 L H₂ h⁻¹ L⁻¹.

5.1.3. Conteúdo de hidrogênio no biogás

As porcentagens de hidrogênio obtidas no biogás dos reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico mantiveram-se constantes e elevadas, com valores médios entre 31,4 a 57,5% durante as fases operacionais, de acordo com exposto na Tabela 5.4 e na Figura 5.3. Foram observados valores entre 31,4 e 52,0% de H₂ no biogás do reator R₅. Para o reator R10, foram observados valores entre 51,7 e 57,1%, enquanto que para os reatores R15 e R20, os valores estiveram entre 43,3 e 48,9% e entre 42,3 e 57,5%, respectivamente. O reator alimentado com a maior concentração de vinhaça utilizada neste estudo, apresentou valores entre 30,2 e 52,1% de hidrogênio no biogás produzido.

As maiores porcentagens, em torno de 57% de H₂, foram obtidas nos reatores $R_{10} e R_{20}$, durante a aplicação dos TDH de 4 e de 6 h, respectivamente. De forma similar ao observado neste estudo, Kongjan *et al.* (2011), a 55 °C, tanto em modo batelada, quando em reator UASB, não detectaram metano no biogás formado a partir do tratamento de águas residuárias de vinhaça de açúcar de beterraba, atingindo até 61,2% de H₂ no biogás. Sob tais condições as arqueas metanogênicas foram completamente reprimidas pelas condições operacionais e ao baixo pH estabelecido no reator, semelhante ao deste estudo, em torno de 5,0.

Conteudo de 112 no biogas										
(%)										
TDH*	8	8	6	4	2	1	2	1		
R ₅	49,0±3,7	52,0±4,8	50,9±3,1	58,8±6,7	42,8±3,9	45,9±5,4	41,6±4,8	31,4±2,9		
TCO	15,0	15,0	20,0	30,0	60,0	120,0	60,0	120,0		
R ₁₀	-	-	51,7±4,6	57,1±5,2	53,4±2,4	52,6±7,1	-	-		
TCO			40,0	60,0	120,0	240,0				
R ₁₅	-	-	48,9±4,2	43,5±3,4	46,0±5,5	43,3±2,8	-	-		
TCO			60,0	90,0	180,0	360,0				
R ₂₀	-	-	57,5±4,1	48,3±3,	43,6±3,7	42,3±5,4	-	-		
TCO			80,0	120,0	240,0	480,0				
R ₃₀	-	49,7±3,2	52,1±4,8	47,6±4,9	37,3±5,6	30,2±2,0	-	-		
TCO		90,0	120,0	180,0	360,0	720,0				

Tabela 5.4: Valores médios de conteúdo de H₂ para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo da utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar

TCO: taxa de carregamento orgânico (kg DQO m⁻³ d⁻¹)

*Condições operacionais:

 R_5 : concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da co-fermentação da glicose com a vinhaça durante a diminuição do TDH de 8 a 1 h, seguida da fermentação da vinhaça nos TDH aplicados de 2 e 1 h;

 R_{10} ; R_{15} e R_{20} : concentrações de 10.000; 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato;

 R_{30} : concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 8 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.

Sob condições termofílicas, Intanoo *et al.* (2012) obtiveram 43% de H₂ no biogás em reator em batelada. Azbar *et al.* (2009b), a 55 °C, obtiveram em reator CSTR, a partir do soro de queijo, valor médio de 45%. Zahedi *et al.* (2013) avaliaram a produção termofílica de hidrogênio a partir de resíduos sólidos municipais (fração orgânica) com variação de TDH entre 240 a 6 horas. Os autores obtiveram máximo conteúdo de H₂ no biogás (57%) no TDH de 12 h. Tais resultados foram similares ao obtido neste estudo, com até 57,5% a partir de água residuária complexa (R₁₀, TDH de 4 h; TCO de 60,00 kg DQO m⁻³ d⁻¹).

Ao utilizaram glicose como fonte de substrato, Barros e Silva (2012) sob condições mesofílicas em reator RALF, obtiveram conteúdo de H_2 entre 46 e 60%, relatando que maiores porcentagens são alcançadas por meio da aplicação de TDH menores, entre 8 a 2 h. Neste estudo, com aplicação de TDH de 4 h no reator R_5 , foi possível alcançar valores similares em termos de conteúdo de hidrogênio, de 50,8%, a partir da mistura de glicose e de vinhaça, nas proporções de 33 e de 67%, respectivamente.



Figura 5.3: Conteúdo de H₂ (%) nos reatores RALF termofílicos com diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica: (a) reator R_5 ; (b) reatores $R_{10} e R_{15}$; (c) reatores $R_{20} e R_{30}$.

Apesar da estabilidade verificada no conteúdo de H_2 ao longo da diminuição do TDH nos reatores com concentrações de vinhaça superiores, as maiores porcentagens de hidrogênio foram obtidas a partir das menores TCO estudadas em cada reator termofílico: 60,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R₁₅); 80,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R₂₀) e 120,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R₃₀), todas no TDH aplicado de 6h. Os

resultados obtidos de porcentagem de hidrogênio no biogás são similares aos obtidos por Tawfik e Salem (2012), de 40 a 56%, alcançado a partir da produção biológica de H₂ a partir de águas residuárias do processamento de arroz em reator anaeróbio de fluxo ascendente, com variação de TCO entre 7,1 a 26,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

5.1.4. Análise comparativa dos reatores termofílicos

Na análise comparativa entre os cinco reatores verificou-se apenas para o R_{15} (15.000 mg DQO L⁻¹) correlação entre a produção volumétrica de H₂ (y) e a TCO (x), sendo expressa como y= 0,0035x + 0,2363 (R² = 0,9997). A maior produção volumétrica obtida nesse reator foi de 1,49 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, no TDH de 1 h.

No entanto, a maior produção volumétrica deste estudo foi obtida por meio da aplicação da concentração afluente de 10.000 mg DQO L^{-1} , também no TDH de 1 h, produzindo 1,96 L H₂ $h^{-1} L^{-1}$.

Em todos os reatores o parâmetro de rendimento de H_2 apresentou decréscimo ao longo do aumento da TCO devido a diminuição do TDH, com o valor máximo de 4,62 mmol H_2 g $DQO_{adicionada}^{-1}$ verificado durante a utilização da menor concentração de vinhaça de cana-de-açúcar, no reator R_5 (5000 mg DQO L⁻¹), e no maior TDH aplicado, de 8 h.

O máximo conteúdo de hidrogênio no biogás foi de 57,1% (TDH de 4 h) e de 57,5% (TDH de 6 h), porcentagens observadas no $R_{10} e R_{20}$, respectivamente.

Apesar das menores produções e rendimentos de H_2 obtidas durante a operação do reator com vinhaça de cana-de-açúcar na concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹, os resultados ainda assim demonstram a viabilidade de produzir este biogás frente às taxas de carregamento orgânico elevadas impostas no reator termofílico, principalmente quando comparados aos estudos encontrados na literatura considerando a produção termofílica de H_2 .

A conversão microbiana de águas residuárias reais a biohidrogênio por meio de processos fermentativos na ausência de luz observados em estudos anteriores, assim como as diversas cargas orgânicas aplicadas, ao longo da modificação da TCO e do TDH, e as variações de temperatura, para a obtenção de efetivas produção e rendimento de H_2 estão apresentadas em comparação com os resultados encontrados no presente estudo, na Tabela 5.3.

Água residuária/Reator	Concentração do substrato (g DQO.L ⁻¹)	TDH (h)	Temperatura (°C)	PVH (L h ⁻¹ L ⁻¹)	HY (mmol.g DQO _{adicionada})	Referência
Processamento de maçãs	9	_	23	0,09	4,08	Van Ginkel <i>et al.</i> (2005)
^(Batelada) Processamento de oliva	68	-	35	0,002	0,54	(2005) Eroglu <i>et</i> <i>al.</i> (2006)
^(Batelada) Processamento de queijo	7	24	38	0,04	3,21	Yang <i>et al.</i> (2007)
(CSTR) Melaço	10	6 a 1	35	0,71	-	Guo <i>et al.</i> (2008)
Óleo de palma	100	-	37	0,34	1,30	Chong et al. (2009)
Resíduos de indústria de açúcar	30	-	35	-	0,74	Ozkan <i>et</i> <i>al.</i> (2010)
(Batelada) Melaço desaçucarado	50	24	55	0,18	-	Kongjan <i>et</i>
^(UASB) Destilaria de álcool (mandioca)	60	18	55	0,08	-	Intanoo <i>et</i> <i>al.</i> (2012)
(Batelada) Processamento de tofu	36	-	55	0,24	2,62	Lay <i>et al.</i> (2013)
(CSTR) Vinhaça de cana- de-açúcar (RALF)	5 10 15 20 30	8 a 1 6 a 1 6 a 1 6 a 1 8 a 1	55	0,19 a 0,78 0,43 a 1,96 0,45 a 1,49 0,54 a 1,20 0,32 a 0,81	1,57 a 4,62 1,92 a 2,86 1,03 a 2,23 0,60 a 1,85 0,19 a 0,79	O presente estudo

Tabela 5.3: Produção mesofílica e termofílica de H_2 a partir de diferentes fontes de substratos, em comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

CSTR: continuous stirred-tank reactor; EGSB: expanded granular sludge bed reactor; UASB: upflow anaerobic sludge blanket reactor; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado; PVH: produção volumétrica de hidrogênio; HY: rendimento de hidrogênio

5.2. Ácidos orgânicos verificados nos efluentes dos reatores R5, R15 e R20

Os carboidratos presentes em águas residuárias provenientes do setor sucroalcooleiro a partir da cana-de-açúcar, são primariamente degradados a glicose, e então, a piruvato (Wang *et al.*, 2013). Por ser um substrato orgânico complexo, a composição da vinhaça é passível de

mudanças sazonais e de procedimentos operacionais do processamento do açúcar e do etanol. Como consequência, as rotas fermentativas e os ácidos orgânicos poderão ser alterados em razão destas modificações. As concentrações (mg L⁻¹) e a porcentagem dos principais ácidos orgânicos totais observados nos efluentes dos reatores R_5 , R_{15} e R_{20} estão apresentados na Tabela 5.5 e indicam que houve fermentação do tipo mista (Ren *et al.*, 2007).

Dentre os principais ácidos orgânicos encontrados nas análises do efluente do reator R_5 foram observados os ácidos succínico, lático e butírico, com porcentagens entre 3,4 a 44,3%, 7,0 a 30,9 e 10,3 a 28,9%, respectivamente, conforme apresentado na Figura 5.4. Foram obtidos ainda concentrações de ácido acético, iso-butírico e propiônico, entre 2,1 a 28,9%, 4,3 a 24,8% e 2,4 a 19,8%, respectivamente. O etanol foi observado somente nas nos TDH aplicados de 8 e 1 h, com porcentagens de 10,2 e 6,7%, respectivamente.

Presente em todas as fases operacionais do reator R_5 , com exceção da última (a partir de 100% de vinhaça, no TDH de 1 h), observou-se 4,6% e 44,3% de ácido succínico no TDH aplicado de 2 h (100% de vinhaça) e no TDH de 8 h (67% de vinhaça e 33% de glicose), respectivamente. Sob tais condições foi possível obter rendimentos de H₂ de 3,32 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ e de 4,15 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹, respectivamente. Uma vez que o ácido succínico é um produto intermediário no ciclo de Krebs e um produto final do processo fermentativo, os microrganismos podem direcionar a produção para este produto de alto valor agregado (BEAUPREZ *et al.*, 2010). Dessa maneira, o desempenho deste reator termofílico não foi influenciado pelas concentrações elevadas e/ou baixas deste produto metabólito solúvel.

No reator R_5 , foram observadas concentrações entre 217,1 e 1357,7 mg L⁻¹ de ácido láctico. Kuo *et al.* (2011), em reator RALF termofílico, utilizaram resíduos alimentares como substrato orgânico, e também demonstraram que a presença de ácido láctico, com concentrações observadas de 6000 mg L⁻¹, desempenhou fenômeno especial na produção fermentativa de hidrogênio. Assim como alcançado neste estudo, o reator RALF termofílico utilizado pelos autores apresentou efetivo rendimento de H₂, de até 2,5 mmol g DQO⁻¹, com porcentagens similares de hidrogênio no biogás, de até 47%.

Reator	TCO	TDH	Ácidos orgânicos e álcoois verificados													
		(h)*	$(mg L^{-1})$ (%) **													
			HSuc	%	HLa	%	HBu	%	HAc	%	HIsBu	%	EtOH	%	HPr	%
R ₅																
	15,0	8	1367,5	26,6	965,7	24,7	531,5	13,9	85,7	3,3	297,1	7,8	204,6	10,2	111,3	3,5
	15,0	8	5667,5	44,3	1357,7	13,9	980,7	10,3	135,4	2,1	412,2	4,3	nd	nd	301,6	3,8
	20,0	6	3608,4	38,9	1264,6	17,9	907,1	13,1	139,6	3,0	468,2	6,8	nd	nd	139,7	2,4
	30,0	4	963,9	19,7	1153,4	30,9	698,4	19,1	127,7	5,1	270,9	7,4	nd	nd	286,8	9,3
	60,0	2	1298,2	18,4	1241,9	23,2	637,4	12,2	1033,8	28,9	453,6	8,7	nd	nd	142,4	3,2
	120,0	1	5150,2	32,3	861,4	7,1	2705,8	22,8	554,6	6,8	1759,7	14,8	417,4	6,4	477,1	4,8
	60,0	2	187,7	4,6	368,2	11,8	596,2	19,6	214,1	10,3	753,4	24,8	nd	nd	499,2	19,5
	120,0	1	99,5	nd	217,1	9,8	623,9	28,9	294,9	20,0	391,3	18,1	nd	nd	360,1	19,8
R ₁₅																
	60,0	6	7767,1	39,3	1175,7	7,8	2388,2	15,2	400,7	4,0	1965,5	16,2	724,1	7,4	1236,1	10,0
	90,0	4	1447,1	6,8	3510,2	21,8	2178,1	13,8	300,4	2,8	3560,9	13,8	nd	nd	4267,3	32,2
	180,0	2	1267,9	8,0	2683,2	22,2	1529,2	12,9	223,4	2,8	2503,0	12,9	nd	nd	3279,7	33,0
	360,0	1	352,8	1,5	2771,2	15,6	3791,6	21,9	215,1	2,7	4884,8	21,9	nd	nd	4378,1	30,1
R ₂₀					·											
	80,0	6	2626,0	17,2	1025,4	8,8	2613,0	22,9	624,3	8,0	2130,4	18,7	607,3	10,2	1354,1	14,1
	120,0	4	1008,8	6,2	1934,1	15,6	1701,6	14,0	230,3	2,8	2455,1	20,2	nd	nd	3345,9	32,8
	240,0	2	1639,3	7,4	3792,6	22,5	1549,7	9,4	297,0	2,6	3043,9	18,4	nd	nd	3557,6	25,6
	480,0	1	969,6	4,0	3821,9	20,6	4250,9	23,5	376,1	3,0	4919,2	27,2	nd	nd	3292,3	21,6

Tabela 5.5: Valores médios de ácidos orgânicos verificados (mg L^{-1} e porcentagem) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados nos reatores termofílicos R_5 , R_{15} e R_{20}

TCO: taxa de carregamento orgânico (kg DQO $m^{-3} d^{-1}$)

(HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)

nd: não detectado

*Condições operacionais:

 R_5 : concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da co-fermentação da glicose com a vinhaça durante a diminuição do TDH de 8 a 1 h, seguida da fermentação da vinhaça nos TDH aplicados de 2 e 1 h;

 $R_{15} e R_{20}^2$: concentrações de 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.

** As concentrações dos ácidos cítrico, málico e valérico não estão apresentadas na soma dos ácidos totais



Figura 5.4: Ácidos orgânicos e álcoois (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R_5 ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica _{(HSu: ácido} succínico; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)

A partir da mistura de glicose e vinhaça no reator R_5 , durante os TDH de 8 e 4 h, foram obtidos os maiores valores de ácido lático (24,7 e 30,9%, respectivamente) e elevados rendimentos de hidrogênio (4,62 e 4,14 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹, respectivamente), com 49,0 e 50,8% de H₂ no biogás, respectivamente. A importância deste ácido também se confirma para o TDH de 1 h, sendo obtida a menor porcentagem de ácido láctico (7%), com a consequente redução no rendimento (2,06 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹).

Neste mesmo reator (R_5), com a aplicação do TDH de 2 h, foi observado acúmulo de ácido acético, de 127,7 para 1033,8 mg L⁻¹, com diminuições no conteúdo e rendimento de H₂, ou seja, de 50,8 para 42,8% e de 4,14 para 3,11 mmol H₂. g DQO_{adicionada}⁻¹, respectivamente. A formação de ácido acético por meio da via metabólica da homoacetogênse, ou seja, conversão de H₂/CO₂ em acetato, ocorre devido ao consumo de hidrogênio e de gás carbônico (Saady, 2013), situação que pode ter ocorrido devido a queda de rendimento e de conteúdo de H₂ no biogás durante a TCO de 60,0 kg m⁻³ d⁻¹. Outros estudos também observaram a formação de ácido acético com redução da produção de hidrogênio, como Arooj *et al.* (2008), Barros e Silva (2012). Luo *et al.* (2010a), também observaram aumento na concentração de ácido acético em reator CSTR termofílico para a produção de H_2 a partir de águas residuárias de destilarias de álcool. Apesar de constatar a homoacetogênese, os autores observaram produção de H_2 de 69,6 mL gSV⁻¹, enquanto que no reator mesofílico, no qual também foi detectado excesso de ácido acético, de 1600 mg L⁻¹, a produção de H_2 foi inferior, de 14,0 mL gSV⁻¹. Esta constatação, de menores consequências aos reatores operados sob temperaturas elevadas, também foi confirmada por Akutsu *et al.* (2009a), com obtenção de 1,7 mol H_2 mol glicose⁻¹ a partir de amido como substrato orgânico, em reator UASB termofílico, apesar da ocorrência da homoacetogênese.

Houve favorecimento da produção de ácido butírico, ácido acético, e ainda de iso-butírico e diminuição de ácido succínico no reator R_5 , por meio da utilização de vinhaça como única e exclusiva fonte de substrato orgânico, e consequente retirada da glicose, provocando mudança de rota metabólica. Kim e Kim (2012) relataram que diferentes fontes de carbono podem regular as vias metabólicas, resultando em diferentes quantidades de ácidos orgânicos produzidos, e por consequência, diferentes rendimentos de H₂. A evidente modificação da composição dos ácidos orgânicos ao longo das fases operacionais resultaram em diferentes produções volumétricas e rendimentos de H₂, atingindo valores entre 0,19 e 0,78 H₂ h⁻¹ L⁻¹ e entre 1.57 e 4,62 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹, respectivamente. As maiores porcentagens de ácido propiônico, de 19,5 e 19,8% refletiram nas porcentagens médias de conteúdo de H₂ no biogás, onde foram obtidos os menores valores entre as fases de operação, com 41,6 e 31,4% ao longo do TDH aplicado de 2 e 1 h, respectivamente.

A maior concentração de ácido butírico, de 2705,8 mg L⁻¹ ocorreu com a aplicação da maior taxa de carregamento orgânico, de 120 kg m⁻³ d⁻¹. Sob condições termofílicas, Intanoo *et al.* (2012), também obtiveram aumento na concentração de ácido butírico, de 2000 mg L⁻¹ para 10.000 mg L⁻¹, por meio da elevação da TCO (68 kg m⁻³ d⁻¹ para 79 kg m⁻³ d⁻¹). O-Thong *et al.* (2008), a partir de águas residuárias do processamento de óleo de palma, em reator em batelada sequencial termofílico, obtiveram concentrações elevadas de ácido butírico, entre 2000 e 6200 mg L⁻¹, no tempo de incubação de 12 a 49 horas, com conteúdo de H₂, entre 58 a 60%, similar ao obtido neste estudo.

Considerando os reatores com maiores concentrações de vinhaça como substrato orgânico $(R_{15} e R_{20})$, os principais ácidos orgânicos verificados nos efluentes dos reatores, em todos os TDH aplicados (6 a 1 h) foram os ácidos lático, butírico, iso-butírico e propiônico, com

porcentagens entre 7,8 a 22,5%; entre 9,4 e 23,5%; entre 13,3 e 28,2% e entre 10,0 e 32,8%, respectivamente, conforme apresentado nas Figuras 5.5 e 5.6.



Figura 5.5: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₁₅ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica _(HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)

No R₁₅, foi verificada elevada porcentagem de ácido lático (21,8%) durante a TCO aplicada de 90,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Nesta mesma etapa operacional ocorreu a diminuição de rendimento de H₂ (de 2,23 para 1,62 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹). No entanto, a maior produção volumétrica obtida neste reator, de 1,49 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, foi verificada juntamente com a presença de 15,6% de ácido lático. Em relação ao R₂₀ foi observada produção volumétrica de até 1,20 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ e 20,6% deste ácido orgânico (HLa). Jung *et al.* (2010) também observaram a presença de HLa (com porcentagens entre 27 e 46%) ao verificarem a viabilidade da produção contínua de H₂, em CSTR, a partir de águas residuárias do processamento de café, na concentração de 20.000 mg DQO L⁻¹, em TDH de 12 a 6 h. Os autores também relataram comportamento semelhante ao obtido neste estudo (diminuição do TDH acompanhada do aumento da PVH), de 0,07 a 0,34 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ L⁻¹, assim como neste estudo, com aumento de 0,45 para 1,49 e de 0,54 para 1,20 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, nos reatores R₁₅ e R₂₀, respectivamente.

A fermentação do tipo butírica tem sido considerada a rota metabólica mais comumente verificada para a produção de hidrogênio. As maiores TCO aplicadas, de 360,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R₁₅) e de 480,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R₂₀) foram acompanhadas pelos maiores porcentagens de HBu; ou seja, de 21,9 e de 23,5%, respectivamente. Portanto, verificou-se que a utilização de menores TDH (2 e 1 h) favoreceu a manutenção de populações de bactérias fermentativas na presença deste composto solúvel. O limite de TCO no R₁₅, ou seja, a máxima carga orgânica aplicada sem diminuição do rendimento de H₂, relativa a 60,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, forneceu elevado rendimento, de 2,23 mmol H₂ g DQO_{adicionada}¹, e a produção volumétrica de 0,45 L H₂ h⁻¹L⁻¹ (16,1 mmol H₂ h⁻¹L⁻¹). Esses valores foram encontrados a partir da presença de 16,0% de ácido butírico entre os ácidos orgânicos verificados no efluente, no TDH de 6 h. Similarmente, Wang *et al.* (2013a), também indicaram o ácido butírico como um dos intermediários predominantes, em 17,4 a 24,1%, ao longo de toda a operação de CSTR, com variação de TDH, de 10 a 4 h, a partir de melaço de refinaria de açúcar (8000 mg DQO L⁻¹) como substrato orgânico. Os autores obtiveram no TDH de 5 h, a máxima PVH de 12,2 mmol h⁻¹ L⁻¹.



Figura 5.6: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₂₀ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)

Em relação ao ácido propiônico obtido nos efluentes dos reatores R_{15} e R_{20} verificou-se aumento de 10,0 para 32,2% e de 14,1 para 32,8%, respectivamente, face ao aumento da TCO de 60,0 para 90,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R_{15}) e de 80,0 para 120,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (R_{20}). Embora com a significativa elevação de HPr, a maior disponibilidade das referidas cargas orgânicas aos reatores anaeróbios proporcionou produção volumétrica de 0,55 e 0,71 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ (19,70 e 25,40 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹) nos reatores R_{15} e R_{20} , respectivamente. Resultado similar foi obtido por Han *et al.* (2012), a partir de melaço de refinaria de açúcar em CSTR. Os autores também verificaram aumento substancial da porcentagem de ácido propiônico, de 0,8 até 18%, obtida pelo aumento da TCO aplicada, de 8 para 32 kg DQO m⁻³ d⁻¹, mesmo sem provocar instabilidade de produção de H₂ de 8,67 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹.

Os ácidos succínico e acético foram observados em baixas quantidades nos reatores R_{15} e R_{20} . A diminuição das porcentagens de ácido succínico, de 39,3 para 1,5% e de 17,2 para 4,0%, no R_{15} e no R_{20} , respectivamente, ocorreu por meio do aumento da TCO ao longo do estudo. Em relação ao ácido acético observou-se a mesma tendência, sendo obtidas as maiores porcentagens entre os ácidos; ou seja, de 4,0 (R_{15}) e de 8,0% (R_{20}) ao longo das fases operacionais com as menores TCO aplicadas, de 60,0 e de 80,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente, e com elevado rendimento de H₂ observado, de 2,23 e de 1,85 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹.

Nos reatores R₅, R₁₅ e R₂₀, as porcentagens de ácido iso-butírico foram abundantes, entre 4,3 e 28,2%, ao longo das fases operacionais. A presença deste produto não tem sido amplamente descrita a partir da fermentação de carboidratos. Embora, em porcentagens menores (6%), Dictor *et al.* (2010) também detectaram HIsBu durante a produção de H₂ a partir de resíduos sólidos municipais, sob condições fermentativas e termofílicas, como a do presente estudo.

5.3. Ácidos orgânicos verificados nos afluentes e efluentes dos reatores R₁₀ e R₃₀

Os reatores R_{10} e R_{30} , alimentados com as concentrações de 10.000 e de 30.000 mg DQO L^{-1} foram operados ao longo do mesmo período de tempo (ao final deste projeto de doutorado), e por isso, somente para estes dois reatores, optou-se por investigar a distribuição dos ácidos orgânicos solúveis para as respectivas soluções afluentes e para os efluentes destes reatores, tendo em vista o papel fundamental que os mesmos desempenham no processo fermentativo.

Quimicamente diversas modificações ocorrem na composição da vinhaça de cana-deaçúcar de acordo com as características do solo, a variedade da planta, o método de cultivo e os processos industriais utilizados para a produção de etanol; e estes fatores influenciam no conteúdo de sólidos totais, no pH e na presença de ácidos orgânicos (JOHNSON e SEEBALUCK, 2012). Consequentemente, a DQO utilizada como substrato para o reator R_{30} (30.000 mg DQO L⁻¹) é muito superior quando comparada aos outros reatores (R_5 , R_{10} , R_{15} e R_{20}), e assim, a presença de compostos, incluindo os que apresentam efeitos inibitórios para a produção de hidrogênio, também serão superiores. Como resultado, menores valores de produção biológica de H_2 foram verificadas no reator R_{30} .

As concentrações iniciais e finais dos ácidos orgânicos encontrados nas amostras afluentes e efluentes ao longo das fases operacionais de diminuição do TDH nos reatores termofílicos R_{10} e R_{30} , estão apresentadas na Tabela 5.6 e na Figura 5.7. Os dados estão expressos em termos de concentrações (mg L⁻¹) e em porcentagem dos principais ácidos orgânicos observados.

A diminuição do TDH (6 para 1 h) no reator R_{10} foi acompanhada da predominância dos ácidos láctico (25,4 para 32,7%); acético (6,3 para 22,8%) e butírico (15,3 para 26,4%). A maior produção volumétrica de H₂ deste estudo (1,96 L h⁻¹ L⁻¹) foi verificada na fase operacional com a maior porcentagem de ácido butírico detectada no efluente (26,4%). Altas concentrações de ácido butírico ou acético podem ser indicativas de elevada produção de hidrogênio (HAWKES *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2009), de acordo com as equações (1) e (2).

 $C_{6}H_{12}O_{6} \rightarrow CH_{3}CH_{2}CH_{2}COOH + 2CO_{2} + 2H_{2} (1)$ $C_{6}H_{12}O_{6} + 2H_{2}O \rightarrow 2CH_{3}COOH + 4H_{2} + 2CO_{2} (2)$

As concentrações elevadas e moderadas de ácido butírico e de ácido acético, presentes no reator R_{10} podem ter direcionado a produção via fermentação do tipo butírica a partir da utilização de vinhaça como fonte de substrato. Roy *et al.* (2012) sob condições termofílicas, obtiveram este tipo de fermentação a partir de águas residuárias de destilarias de álcool, atingindo rendimento de hidrogênio de 2,7 mol mol⁻¹glicose. Intanoo *et al.* (2012), também sob condições termofílicas a partir de águas residuárias do processamento de álcool, obtiveram aumento na concentração de ácido butírico por meio da elevação da taxa de carregamento orgânica aplicada.

Reator TCO TDH Ácidos orgânicos e álcoois veri											erificado	S				
			(h)*	$(mg L^{-1})$ (%)												
			-	HSuc	%	HLa	%	HBu	%	HAc	%	HIsBu	%	HPr	%	
I N I C I A I S	R ₁₀															
		40,0	6	716,4	11,7	1819,6	39,1	132,4	2,9	136,7	4,4	728,1	16,0	989,8	25,9	
		60,0	4	349,8	6,5	1288,7	31,6	393,6	9,9	264,6	9,7	697,4	17,5	831,8	24,8	
		120,0	2	971,5	18,8	1203,0	30,5	463,8	12,0	228,1	8,7	302,2	7,8	720,3	22,2	
		240,0	1	480,2	22,0	584,0	35,1	114,7	7,0	48,9	4,4	119,4	7,3	331,3	24,2	
	R ₃₀															
		90,0	8	2296,4	10,9	3522,3	21,9	2505,4	15,9	2768,2	25,8	1938,1	12,3	1766,8	13,3	
		120,0	6	2563,3	13,7	2420,5	17,0	3696,3	26,6	3026,2	31,9	81,0	0,6	1189,0	10,2	
		180,0	4	1195,2	5,2	4763,2	27,3	2135,5	12,5	4778,5	41,0	36,3	0,2	1986,0	13,8	
		360,0	2	1302,0	7,6	3685,5	28,3	1067,5	8,4	1437,3	16,5	712,7	5,6	3597,3	33,6	
		720,0	1	950,2	4,5	4400,3	27,0	3765,8	23,7	1107,7	10,2	1159,5	7,3	3656,0	27,3	
	R ₁₀					-										
F I A - I S		40,0	6	455,0	5,7	1999,9	32,7	912,8	15,3	171,3	6,3	1329,6	22,3	892,8	17,8	
		60,0	4	237,1	5,7	902,1	28,3	581,9	18,6	238,9	11,2	743,2	23,8	325,8	12,4	
		120,0	2	461,1	5,3	1683,3	25,4	1156,9	17,9	629,8	14,3	1163,0	18,0	1042,6	19,2	
		240,0	1	300,0	4,8	1280,1	26,8	1235,0	26,4	727,8	22,8	182,0	3,9	601,8	15,3	
	R ₃₀															
		90,0	8	1176,1	5,3	4029,2	23,9	3313,6	20,1	1894,6	16,8	2522,1	15,3	2591,6	18,7	
		120,0	6	1108,3	6,6	3456,3	27,2	4813,4	38,7	1099,8	13,0	347,1	2,8	1219,8	11,7	
		180,0	4	525,8	2,6	4088,3	26,5	3852,4	25,5	3294,9	32,0	207,6	1,4	1532,2	12,1	
		360,0	2	1171,1	5,6	3292,9	20,8	2399,0	15,5	1241,3	11,8	1176,6	7,6	5026,2	38,6	
		720,0	1	1308,8	5,8	3232,9	18,8	4193,0	24,9	1402,3	12,2	1667,9	9,9	4036,4	28,5	

Tabela 5.6: Valores médios (iniciais e finais) de ácidos orgânicos verificados (mg L⁻¹ e porcentagem) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados nos reatores termofílicos R₁₀ e R₃₀

TCO: taxa de carregamento orgânico (kg DQO m⁻³ d⁻¹)

(HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HIsBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico) *Condições operacionais:

 R_{10} : concentração de 10.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato; R_{30} : concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 8 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.


Figura 5.7: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₁₀ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica _(HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HISBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)

A aplicação do TDH de 6 h forneceu os melhores resultados em termos de rendimento de hidrogênio nos reatores termofílicos. Porém, foram verificadas concentrações elevadas dos ácidos butírico (\cong 3600 mg L⁻¹) e acético (\cong 3000 mg L⁻¹), representando os principais ácidos orgânicos no afluente do reator R₃₀, seguidos pelas concentrações de ácidos succínico (\cong 2500 mg L⁻¹), láctico (\cong 2400 mg L⁻¹) e propiônico (\cong 1200 mg L⁻¹). A produção biológica de hidrogênio em condições fermentativas, está sujeita aos efeitos de instabilidade ou inibição em razão das concentrações de ácidos orgânicos e dos desvios de vias metabólicas (Zhang e Wang, 2013).

Zhang *et al.* (2012a) relataram que, entre as concentrações de ácidos voláteis, a produção biológica de hidrogênio decresceu frente ao aumento de acetato (1200 mg L⁻¹) e de butirato (1800 mg L⁻¹), confirmando o efeito inibitório causado pela fração não dissociada destes compostos solúveis ao permear a membrana celular das bactérias produtoras de hidrogénio que, em seguida, se dissociam na célula, modificando o equilíbrio fisiológico celular (Wang *et al.*, 2008).

Na investigação da utilização de elevada concentração de vinhaça, os reduzidos valores obtidos de rendimento de H₂ no R₃₀ (0,79 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹) podem ser explicados por esta limitação em razão das concentrações elevadas de ácidos acético e butírico, uma vez que estes compostos representaram 31,9 e 26,7% entre os ácidos orgânicos obtidos no afluente,

respectivamente. Conforme apresentado na Figura 5.8, a porcentagem verificada no efluente destes ácidos foi de 38,7 e 13,0%, respectivamente. Por outro lado, no R_{10} , as concentrações iniciais dos ácidos butírico e acético (\cong 200 mg L⁻¹) não apresentaram efeitos negativos no desempenho fermentativo, ocorrendo rendimento superior de hidrogênio (2,86 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹).



Figura 5.8: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico R₃₀ ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica _(HSu: ácido succínico ; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HISBu: ácido iso-butírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico)

Apesar das concentrações e porcentagens elevadas de ácidos orgânicos no R_{30} (butírico e propiônico: 15,5 a 39,0% e 11,7 a 39,0), a utilização da alta carga orgânica contida na água residuária complexa, tratada no reator termofílico, apresentou produção volumétrica de 0,80 L h⁻¹ L⁻¹. Similarmente, sob condições termofílicas, a partir de águas residuárias do processamento de queijo, Azbar *et al.* (2009b) reportaram que os ácidos propiônico e láctico aumentaram frente à diminuição do TDH (de 780 para 1460 mg L⁻¹ e de 1600 para 6400 mg L⁻¹, respectivamente), e a produção de H2 foi de 0,33 L H₂ h⁻¹ L⁻¹. Neste estudo, a maior concentração HPr (1200 mg L⁻¹), no R30, ocorreu juntamente com a PVH similar, de 0,55 L H₂ h⁻¹ L⁻¹.

Ao longo da operação dos reatores R_{10} e R_{30} , as concentrações afluentes de ácido propiônico estiveram, aproximadamente entre 120 e 980 mg L⁻¹ no R_{10} e entre 1500 e 3600 mg L⁻¹ ¹ no R_{30} . Pode-se observar que concentrações elevadas deste ácido foram acompanhadas de reduzidos valores de produção biológica de H₂ (PVH=0,80 L h⁻¹ L⁻¹; HY= 0,19 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹; conteúdo de H₂=30.2%). Este comportamento, de efeito negativo na capacidade de produção de hidrogênio frente à concentrações elevadas de ácido propiônico, também foi reportado por Guo *et al.* (2008). Os autores investigaram a porcentagem de diferentes AVT anteriormente e após a fermentação utilizando solubilizado enzimático termofílico, e verificaram efetiva produção de hidrogênio sob as menores concentrações deste composto.

A respeito do ácido láctico, a presença deste ácido orgânico apresentou efeito positivo na produção de H₂, tanto para a concentração de substrato afluente de 10.000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹. Kim *et al.* (2012) também relataram esse comportamento, no qual foi possível obter 22% mais de hidrogênio, em modo batelada, quando a concentração inicial de ácido láctico aumentou de 0 para 8 g HLa L⁻¹. Durante a operação dos reatores R₁₀ e R30, as concentrações afluente deste produto estiveram entre 0,5 e 4,0 g HLa L⁻¹. Concentrações elevadas de HLa também foram detectadas por Özgür *et al.* (2010) em reator termofílico utilizado para o tratamento de melaço de beterraba, com efetiva produção de H₂ de 4,2 mol mol_{sacarose}⁻¹.

O emprego de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar utilizadas neste estudo em reatores RALF termofílicos resultou em distribuições de ácidos orgânicos diferenciadas, porém, assim como nos reatores R_5 , R_{15} e R_{20} , os reatores R_{10} e R_{30} apresentaram fermentação do tipo mista (Ren *et al.*, 2007). A investigação desta distribuição ao longo da operação para a produção biológica de hidrogênio representa uma ferramenta prática para avaliar e correlacionar as possíveis rotas metabólicas produtoras de H_2 , e pode ser muito útil para explicar os efeitos inibitótios decorrentes destas vias (Won *et al.*, 2013).

5.4. pH, remoções de substrato e de carboidratos totais: R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀

Os valores médios de pH verificados nas amostras afluentes e efluentes dos cinco reatores utilizados neste estudo, ao longo da diminuição dos TDH aplicados estão apresentados na Tabela 5.7. Os valores de pH no afluente e no efluente mantiveram-se similares e constantes durante todo as fases operacionais nos reatores anaeróbio de leito fluidificado termofílico, com valores médios de 4,3 e de 4,1 nos afluentes e efluentes, respectivamente (não foram adicionados agentes

alcalinizantes e acidificantes no afluente). Jo *et al.* (2008) afirmaram que o pH do meio é um dos fatores mais importantes na produção de hidrogênio, influenciando rotas metabólicas e a duração da fase lag do crescimento microbiano. Assim, a manutenção do pH na faixa de 4,0 no reator RALF termofílico demonstrou a boa capacidade tamponante intrínseca do reator anaeróbio, assim como observado por Amorim *et al.* (2012) em RALF mesofílico a partir de glicose como fonte orgânica. Ao longo das fases operacionais, não foram verificadas modificações nos valores de pH, evitando alterações nas inter-relações microbianas, no metabolismo e na competição pelo novo substrato adicionado em total porcentagem. Este mesmo fato também foi observado por outros autores em condições termofílicos que não utilizaram agentes alcalinizantes para o controle do pH (Azbar *et al.*, 2009a e b; Akutsu *et al.*, 2009a e b; Kim e Kim, 2012).

pH afluente e efluente									
TDH*	8	8	6	4	2	1	2	1	
R ₅									
Afluente	4,27	4,29	4,17	4,25	4,10	4,18	4,43	4,55	
Efluente	4,18	4,16	4,10	4,17	4,07	4,08	4,51	4,50	
R ₁₀									
Afluente	-	-	4,50	4,25	4,38	4,45	-	-	
Efluente	-	-	4,36	4,39	4,47	4,33	-	-	
R ₁₅			-			-	-		
Afluente	-	-	4,55	4,55	4,38	4,56	-	-	
Efluente	-	-	4,51	4,60	4,52	4,46	-	-	
R ₂₀									
Afluente	-	-	4,47	4,55	4,37	4,38	-	-	
Efluente	-	-	4,41	4,54	4,38	4,42	-	-	
R ₃₀									
Afluente	-	4,49	4,32	4,49	4,39	4,33	-	-	
Efluente	-	4,45	4,44	4,46	4,26	4,17	-	-	

Tabela 5.7: Valores médios de pH afluente e efluente frente à utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar nos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH

*Condições operacionais:

 R_5 : concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da co-fermentação da glicose com a vinhaça durante a diminuição do TDH de 8 a 1 h, seguida da fermentação da vinhaça nos TDH aplicados de 2 e 1 h;

 R_{10} ; R_{15} e R_{20} : concentrações de 10.000; 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato;

 R_{30} : concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 8 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.

As eficiências de remoção de carboidratos totais e de DQO estão apresentadas na Tabela 5.8. Os carboidratos encontrados na vinhaça de cana-de-açúcar foram convertidos à hidrogênio (incluindo o CO₂), ácidos orgânicos e energia intrínseca para crescimento da biomassa ativa no

reator termofílico. No entanto, em relação às eficiências de remoção de carboidratos totais durante a operação dos reatores RALF verificou-se que, embora constatada a produção de hidrogênio durante todas as fases operacionais, houve consumo incompleto de substrato. Os valores de eficiência de remoção estiveram entre 20,2 a 52,6% ao longo das concentrações estudadas. A estratégia escolhida para o reator R_5 , com aplicação de 5000 mg DQO L⁻¹, por meio da adição de mistura de glicose e vinhaça como substratos para a produção de hidrogênio em concentrações decrescentes e crescentes de glicose e de vinhaça, respectivamente, ao longo da estabilização da produção de H₂, provocaram no sistema eficiência máxima de conversão de carboidratos totais obtida neste estudo, de 52,6%, mediante a TCO aplicada de 60,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹.Os menores valores de remoção foram obtidos por meio da aplicação da TCO de 240,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ no R₂₀. Em concentração superior a utilizada neste estudo (40 g DQO L⁻¹), Lay *et al.* (2010) relataram 40% de carboidratos residuais em um reator CSTR utilizado para a produção de H₂ a partir de melaço condensado, com efetiva porcentagem de 36% de H₂ no biogás formado.

Eficiência de remoção (%)									
TDH*	8	8	6	4	2	1	2	1	
R ₅									
E.R.DQO	10,5	8,3	9,9	7,7	12,8	13,4	8,0	8,3	
E.R.Carboidratos _{totais}	50,1	27,1	38,9	45,7	52,6	41,0	43,1	36,4	
R ₁₀									
E.R.DQO	-	-	8,5	13,6	10,9	8,7	-	-	
E.R.Carboidratos _{totais}	-	-	49,1	49,9	48,8	47,7	-	-	
R ₁₅								-	
E.R.DQO	-	-	13,7	10,2	12,2	10,0	-	-	
E.R.Carboidratos _{totais}	-	-	26,3	35,8	30,3	31,0	-	-	
R ₂₀									
E.R.DQO	-	-	12,7	7,2	9,7	8,4	-	-	
E.R.Carboidratos _{totais}	-	-	23,3	27,2	20,2	27,6	-	-	
R ₃₀									
E.R.DQO	-	11,5	10,0	11,5	10,6	10,3	-	-	
E.R.Carboidratos _{totais}	-	31,4	51,5	52,2	38,6	36,6	-	-	

Tabela 5.8: Valores médios de eficiência de remoção de carboidratos totais e de DQO (%) frente à utilização de diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar nos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH

E.R.: Eficiência de remoção;

*Condições operacionais:

 R_5 : concentração de 5000 mg DQO L⁻¹ obtida a partir da co-fermentação da glicose com a vinhaça durante a diminuição do TDH de 8 a 1 h, seguida da fermentação da vinhaça nos TDH aplicados de 2 e 1 h;

 R_{10} ; R_{15} e R_{20} : concentrações de 10.000; 15.000 e de 20.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 6 a 1 h utilizando vinhaça como substrato;

R₃₀: concentração de 30.000 mg DQO L⁻¹ com diminuição do TDH de 8 a 1 h utilizando vinhaça como substrato.

A verificação e a comprovada viabilidade da produção de hidrogênio, mesmo em situações de eficiências incompletas de conversão de carboidratos totais, também foi observada por Peintner *et al.* (2010). Os autores verificaram que sob temperatura termofílica produção biológica de hidrogênio em reator de leito percolado e reator de leito fluidificado, a partir de glicose foram de 1,9 g L⁻¹ de carboidrato residual, por meio da diminuição do TDH de 10 para 7,5 h. Em TDH de 8 h deste estudo foi observado conteúdo similar de carboidrato residual no R_5 , com 2,5 g L⁻¹ de carboidratos totais residuais.

A remoção de carga orgânica manteve-se constante ao longo das fases de operação termofílica de todos os cinco reatores, atingindo valores médios de eficiência entre 7,7 e 13,6%. As baixas eficiências obtidas podem ser atribuídas à presença de ácidos orgânicos derivados do processo fermentativo. Ao afirmarem o potencial do tratamento anaeróbio para efluentes com elevada quantidade de matéria orgânica, Intanoo *et al.* (2012) observaram que, a utilização de águas residuárias provenientes de destilarias de álcool para a produção de hidrogênio sob temperatura termofílica, em reator em batelada, forneceu eficiência de remoção de 32% com TCO aplicada de 68 kg m⁻³ d⁻¹, sugerindo que maiores taxas ocasionam em aumento de AVT e consequente decréscimo na eficiência de remoção da matéria orgânica. Esta situação pôde ser observada neste estudo, com TCO superior, de até 720 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e 11,5% de remoção média de DQO, no R₃₀.

5.5. Sólidos suspensos e relações DQO:N:P e DQO:SO₄⁻²: R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀

Razões apropriadas entre carbono, nitrogênio, e fósforo e entre carbono e sulfato aumentam a bioprodução de hidrogênio por meio da modificação de rotas metabólicas associadas ao requerimento nutricional dos microrganismos (Intanoo *et al.*, 2012; Zhang e Wang, 2013). A relação DQO:N:P afluente esteve entre 100:1.7:0.5 e 100:4.5:0.8. Cheong e Hansen (2007) também utilizaram relação semelhante, de 100:3.3:0.6 em reator termofílico em batelada alimentado com água residuária sintética, com 25.000 mg DQO.L⁻¹ com glicose como substrato orgânico. Os autores observaram 64% de H₂ no biogás, assim como neste estudo, com conteúdo de até 57,5% de H₂ no biogás obtidos nos reatores R₁₀ (relação DQO:N:P de 100:1.9:0.4) e R₂₀ (relação DQO:N:P de 100:4:0.5). A fim de fornecer aos microrganismos quantidades adequadas de nitrogênio e de fósforo, a partir da produção biológica de hidrogênio em modo batelada utilizando monossacarídeos (glicose, frutose e galactose), Li *et al.* (2008a) mantiveram uma relação DQO:N:P similar a obtida neste estudo, de 100:2:0.4. Os autores relataram que o consórcio microbiano misto foi capaz de produzir conteúdo de hidrogênio no biogás de 58%, assim como observado neste estudo, com reatores anaeróbios de leito fluidifcado termofílico.

Os sulfatos, assim como os compostos oxidados e os aminoácidos com enxofre são de extrema importância em processos fermentativos os quais consideram a produção biológica de hidrogênio a partir de águas industriais (Krishna, 2013). A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer em valores de pH baixos, mesmo com concentrações elevadas de sulfato (de 3000 mg L^{-1}), evitando a produção de H₂S por bactérias redutoras de sulfato, que inibem a produção de H₂ por microrganismos acidogênicos (Hwang *et al.*, 2009a e b). A máxima relação DQO:SO₄⁻² foi de 20:1 no reator R₃₀, e mínima de 13:1, nos reatores R₁₀, R₁₅, R₂₀. Em todos os reatores, as concentrações de sulfato estiveram entre 300 e 1900 mg L⁻¹. Searmsirimongkol et al. (2011) relataram que foi possível produzir 0,14 L H_2 h⁻¹ L⁻¹ durante a TCO de 60,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, com relação de 20:1, em ASBR a partir de água residuária de destilaria de álcool. Por meio da aplicação da mesma TCO, de 60,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foi possível obter no reator R₅ produção volumétrica superior, de 0,55 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, com relação DQO:SO₄⁻² inferior, de 16:1, a partir de vinhaça de cana-de-açúcar com 5000 mg DQO L⁻¹. Lin e Chen (2006) afirmaram que mesmo sob concentrações elevadas de sulfato (3000 mg L^{-1}), o efeito da inibição poderá ser minimizado pela operação com valores baixos de pH (5,5), sendo verificada a produção volumétrica de 0,75 L H₂ $h^{-1} L^{-1}$. Em todos os reatores termofílicos, o pH manteve-se na faixa de 4,2-4,5, sem a adição de agentes alcalinizantes ou acidificantes, sendo possível obter produção volumétrica similar, de $0,80 \text{ L H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ no reator R_{30} , com valores de sulfato entre 1500 e 1900 mg L⁻¹.

No contexto da produção de biohidrogênio, a concentraçao de sólidos suspensos presentes na vinhaça representa um problema, uma vez que será necessário elevado tempo de contato a fim de hidrolisar os carboidratos particulados (Nasr *et al.*, 2011). Isso explica as reduzidas taxas de remoção de carboidratos totais obtidas neste estudo, de até 52%, e de sólidos suspensos, entre 26% (R_{15}) e 58% (R_{10}). Ao longo do aumento da TCO, de até 720 kg m⁻³ d⁻¹ no R_{30} , não foram detectados arraste de sólidos suspensos nos efluentes. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores termofílicos foi representada por sólidos suspensos voláteis, com porcentagens entre 67 e 88% para todos os reatores termofílicos ao londo das fases operacionais, conforme apresentado na Figura 5.9.



Sólidos suspensos verificados no efluente dos reatores termofilicos

Figura 5.9: Concentrações médias de sólidos suspensos fixos e voláteis (efluentes) e respectivas porcentagens verificadas ao longo das fases operacionais dos reatores anaeróbios termofílicos.

Na Tabela 5.9 estão apresentadas as concentrações de sólidos suspensos totais, nitrogênio total, fosfato e sulfato, verificadas nos efluentes dos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH, assim como os valores médios de rendimento de hidrogênio.

Reator	TCO	TDH	Parâmetros (biogás e efluente)				
		(h)*	HY	SSV	NTK	P _{total}	SO_4^{-2}
				$(mg L^{-1})$	$(mg L^{-1})$	$(PO_4^{-3} mg L^{-1})$	$(mg L^{-1})$
R ₅							
	15,0	8	4,62	341	87	26,8	286
	15,0	8	4,15	375	186	26,9	284
	20,0	6	4,31	356	199	26,7	307
	30,0	4	4,14	456	275	26,4	308
	60,0	2	3,11	242	123	26,1	313
	120,0	1	2,06	252	208	26,7	318
	60,0	2	3,32	262	191	25,8	313
	120,0	1	1,57	338	172	26,1	318
R ₁₀							
	40,0	6	2,86	332	244	39,6	805
	60,0	4	2,77	223	202	44,4	747
	120,0	2	2,45	365	222	40,0	760
	240,0	1	1,92	378	205	39,2	740
R ₁₅							
	60,0	6	2,23	1208	513	84,4	1070
	90,0	4	1,62	945	385	76,0	1000
	180,0	2	1,22	963	357	84,5	1056
	360,0	1	1,03	901	370	84,4	1125
R ₂₀							
	80,0	6	1,85	1815	855	96,1	1560
	120,0	4	1,51	1157	773	86,6	1090
	240,0	2	0,86	1333	616	87,1	1373
	480,0	1	0,60	1052	683	86,9	1215
R30							
	90,0	8	0,62	851	1118	155,4	1592
	120,0	6	0,79	1143	987	142,8	1950
	180,0	4	0,60	1302	1100	186,1	1680
	360,0	2	0,37	1254	1320	206,2	1533
	720,0	1	0.19	1485	1266	177,1	1733

Tabela 5.9: Rendimento de hidrogênio e as concentrações (mg L⁻¹) de sólidos suspensos voláteis, Nitrogênio Total Kjedahl, fósforo total (como PO_4^{-3}) e sulfato nos efluentes dos reatores termofílicos ao longo da diminuição do TDH e do aumento da TCO aplicada.

TCO: taxa de carregamento orgânico (kg m⁻³ d⁻¹)

HY: rendimento de hidrogênio

SSV: sólidos suspensos voláteis

NTK: Nitrogênio Total Kjedahl

5.6. Caracterização molecular da diversidade microbiana

Os recentes desenvolvimentos na tecnologia molecular e genética têm aumentado intensivamente a capacidade de investigar comunidades microbiológicas, sugerindo que algumas modificações nas condições operacionais poderão resultar em comunidades microbianas capazes de produzir H₂ a elevados rendimentos (ABO-HASHESH *et al.*, 2011). Nesse sentido, as comunidades microbianas aderidas ao material suporte (argila expandida) dos reatores RALF termofílicos deste estudo, foram avaliadas utilizando a técnica de Biologia Molecular de reação em cadeia de polimerase seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Os consórcios termofílicos foram caracterizados por meio de clonagem e sequenciamento do gene RNAr 16S visando conhecer a diversidade dos microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*.

5.6.1. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante: R₅, R₁₀, R₁₅, R₂₀ e R₃₀

Inicialmente serão apresentados os resultados referente a comunidades bacterianas presentes no reator operado mediante a co-fermentação de glicose e vinhaça (R_5).

Por meio da análise da estrutura da comunidade de bactérias analisada pelo PCR-DGGE foram observadas diferenças nos perfis de bandas do inóculo (proveniente de UASB termofílico usado para o tratamento de vinhaça), em comparação aos perfis de bandas obtidas ao longo das fases operacionais do reator R_5 termofílico (Figura 5.10). As análises foram realizadas especificamente para as fases operacionais ocorridas em TDH de 2 e 1 h com a mistura de vinhaça e glicose, e para as fases operacionais referentes aos TDH de 2 e 1 h com vinhaça, como única fonte de substrato orgânico, etapas nas quais foram obtidos os maiores valores médios de produtividade de H_2 , para este reator, entre 0,58 e 0,78 L h⁻¹ L⁻¹.

Obsevou-se 44% de similaridade (correlação de *Pearson*) entre o perfil de bandas do inóculo e das fases operacionais, evidenciando que ocorreram mudanças significativas na comunidade bacteriana ao longo da operação do reator R_5 termofílico, frente à utilização de glicose e vinhaça como fontes de substrato orgânico para a produção de hidrogênio.



Figura 5.10: Coeficiente de similaridade (correlação de *Pearson*) e o método cluster UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do inóculo e estabelecidas durante as fases operacionais do reator R_5 termofílico

(In) inóculo após pré-tratamento térmico; (Gli + Vin; 2 h): referente à Fase 5, com 33% de glicose e 67% de vinhaça, no TDH de 2h; (Gli + Vin; 1 h): referente à Fase 6, com 33% de glicose e 67% de vinhaça, no TDH de 1h; (Vin; 2h): referente à Fase 7, com 100% de vinhaça, no TDH de 2 h; (Vin; 1h): referente à Fase 8, com 100% de vinhaça, no TDH de 1 h

Em contrapartida, a disponibilização de vinhaça como única e exclusiva fonte de carbono não provocou alterações na estrutura dos microrganismos no reator R_5 . Os coeficientes de similaridade obtidos entre as fases operacionais com a mistura de substratos e as fases operacionais com 100% vinhaça, foram elevados, ou seja, de 91, 92 e 95%. A maior produção de H_2 neste reator, de 0,78 L h⁻¹ L⁻¹, foi obtida em TDH de 1h (Vinhaça no TDH de 1 h), com vinhaça como fonte orgânica. Obteve-se elevado coeficiente de similaridade, de 91%, entre esta fase e as fases referentes à mistura de glicose e vinhaça (Glicose +Vinhaça no TDH de 2h e Glicose + Vinhaça no TDH de 1h), e à fase com 100% de vinhaça no TDH de 2 h (Vinhaça no TDH de 2h). Desse modo, verificou-se reduzida alteração das populações em função das condições impostas.

Os perfis de bandas obtidas ao longo das fases operacionais dos reatores termofílicos R_{15} e R_{20} apresentaram diferenças quando comparadas aos perfis verificados na comunidade microbiana no inóculo pré-tratado termicamente (proveniente de UASB termofílico metanogênico para o tratamento de vinhaça). Essa confirmação também foi obtida por meio da análise da estrutura da comunidade de bactérias analisada pelo PCR-DGGE, visualizada na Figura 5.11.



Figura 5.11: Coeficiente de similaridade (correlação de *Pearson*) e o método cluster UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas do inóculo e estabelecidas durante as fases operacionais dos reatores R_{15} e R_{20} termofílicos

A análise comparativa realizada a partir das bandas obtidas do inóculo foram apenas 52% similares as bandas observadas ao longo da diminuição do TDH de 4 para 1 para os reatores R_{15} e R_{20} . Nesse sentido, ocorreram mudanças significativas na comunidade bacteriana ao longo da operação dos reatores RALF termofílicos, frente à utilização de vinhaça diluída como fonte de substrato orgânico para a produção de hidrogênio.

A aplicação do menor TDH, de 1 h, em ambos os reatores, esteve relacionada a obtenção de reduzidos rendimentos de hidrogênio obtidos (R_{15} =1,03 e R_{20} =0,60 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹). Verificou-se para o perfil de bandas da comunidade microbiana que nesta fase operacional, as populações foram 79% similares aquelas obtidas durante a operação em TDH de 2 e 4 h. Dessa maneira, ocorreu modificação do perfil de bandas, e foram observados rendimentos superiores, de 1,22 e 1,62 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹ e de 0,86 e 1,46 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹, para R₁₅ e R₂₀, respectivamente.

Embora com diferentes cargas orgânicas aplicadas, as porcentagens de similaridade encontradas entre o perfil de bandas obtido nestes dois reatores termofílicos nos TDH aplicados de 4, 2 e 1 h, foram elevadas, de 90, 86 e 84% respectivamente. Por meio da análise da produtividade de H₂ (R_{15} = entre 0,45 e 1,49 e R_{20} =entre 0,54 e 1,20 L H₂ h⁻¹ L⁻¹), provavelmente, populações semelhantes estiveram envolvidas na produção biológica nos dois reatores termofílicos.

A influência da concentração de substrato entre os reatores operados com 10.000 e 30.000 mg DQO L^{-1} , na comunidade microbiana, ao final de cada TDH aplicado, está ilustrada no perfil de bandas do DGGE, na Figura 5.12.



Figura 5.12: Coeficiente de similaridade (correlação de *Pearson*) e o método cluster UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a partir do perfil de bandas do DGGE, referente às comunidades bacterianas da vinhaça de cana-de-açúcar e estabelecidas durante as fases operacionais dos reatores R_{10} e R_{30} termofílicos

Foram obtidas diferenças no perfil de bandas verificadas no reator alimentado com vinhaça na concentração de 10.000 e de 30.000 mg DQO L⁻¹. Obsevou-se 56% de similaridade (correlação de *Pearson*) entre o perfil da comunidade microbiana do R₁₀, no TDH de 6 h, em comparação com todas as outras fases operacionais, tanto do R₁₀, quanto do R₃₀. Neste TDH, foi obtido elevado rendimento de hidrogênio, de 2,86 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹. Pode-se sugerir que a biomassa aderida ao material suporte, durante esta fase operacional no R₁₀, foi significativamente diferente das outras comunidades estabelecidas ao longo da diminuição do TDH. Reduzidos valores de rendimento de H₂ foram obtidos ao longo do aumento da TCO, considerando essa diferença detectada no perfil de bandas. Nesse sentido, as condições operacionais, como a concentração do substrato (10.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹), reduzidos TDH aplicados e TCO elevadas foram responsáveis por selecionar e eliminar microrganismos.

Os menores valores de produção de H_2 obtidos neste estudo no reator R_{30} foram acompanhadas por elevada similaridade entre os perfis das bandas estabelecidas durante a aplicação dos TDH de 6, 4, 2 e 1 h (85% de similaridade entre as fases com TDH de 6 e 4 h; e

95% de similaridade entre as fases com TDH aplicado de 2 e 1 h). Esse comportamento sugere que a operação deste reator ocorreu frente à ausência de mudanças significativas na comunidade microbiana ao longo do aumento da TCO. Os efeitos inibitórios provocados pelas concentrações elevadas de ácidos orgânicos, principalmente acético e butírico, verificados nas amostras afluentes, refletiram negativamente no estabelecimento de microrganismos produtores de H₂ no sistema biológico, fornecendo reduzidos valores de HY (0,19 a 0,79 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹) e de PVH (0,32 a 0,81 L H₂h⁻¹ L⁻¹), quando comparados aos valores obtidos pelo reator R₁₀.

A maior produção volumétrica deste estudo, foi obtida durante a operação do reator R_{10} , no TDH aplicado de 1 h (1,96 L H₂ h⁻¹ L⁻¹). O perfil de bandas observado pela análise de DGGE demonstrou elevada similaridade (80%) entre esta fase operacional e a comunidade microbiana encontrada na água residuária bruta (vinhaça de cana-de-açúcar). Isto indica que apesar da elevada vazão afluente provocada pelo menor TDH aplicado, cepas similares de microrganismos encontrados no substrato de alimentação foram capazes de se estabelecer no sistema, como biomassa aderida ao material suporte (argila expandida) neste biorreator.

5.6.2. Caracterização filogenética do consórcio microbiano termofílico: R5

As sequências filogenéticas da biomassa formada na cinasita (material suporte) do R_5 termofílico, após a fase operacional em TDH de 2 h, a partir de 100% de vinhaça, foram agrupadas em 13 unidades taxonômicas operacionais (UTO), correpondente a apenas ao Filo Firmicutes, totalizando 56 sequências. Dentre essas, obteve-se 99% de similaridade com *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Clostridium cellulosi* e Uncultured bacterium. Similaridades entre 88 e 92% foram relacionadas a *Lactobacillus* sp., *Moorella* sp. e *Caldanaerobius* sp. (Tabela 5.10).

As UTO 3 a 6 foram relacionadas à *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* pertencente a Família Thermoanaerobacterales. Bactérias termofílicas semelhantes a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* apresentam crescimento ótimo na faixa de 60 °C, e têm ampla capacidade de fermentação de diversos substratos (como xilose, sacarose e amido) a H₂ e produtos secundários solúveis (O-Thong *et al.*, 2009). Estes microrganismos são anaeróbios estritos com crescimento na presença de carboidratos, e produção de ácidos acético, butírico, láctico e succínico (Mosolova *et al.*, 1991), assim como observado neste estudo, com

porcentagens de até 28,9, 29,9, 31,0 e 44,3% dos ácidos acético, butírico, láctico e succínico, respectivamente.

Kongjan *et al.* (2013), utilizaram melaço em reator UASB termofílico de dois estágios para a produção biológica de hidrogênio, e também obtiveram similaridade da sequência de nucleotídeos com *Thermoanaerobacterium* sp.. *Os autores* relataram que esta bactéria é moderadamente termoacidofílica, Gram-positiva e endósporo positiva. Em estudo anterior, também sob temperatura termofílica, Kongjan *et al.* (2011) detectaram a dominância de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* nos grânulos de UASB, usado na produção fermentativa de H_2 a partir de melaço desaçucarado. Neste estudo, obteve-se produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Menor porcentagem, com abundância relativa de 7% (UTO 1) foi relacionada a *Clostridium cellulosi*, pertencente à Família Ruminococcacea. *Clostridium cellulosi* é considerada uma bactéria termofílica formadora de endósporos, capaz de degradar a celulose, com produção de H₂, CO₂, butirato, acetato e etanol, com crescimento entre 55 e 60 °C (Wang *et al.*, 2013b). Esta bacteria termofílica sobrevive a 100 °C durante o período de 20 minutos, a germinação é favorecida nesta espécie por meio de choque térmico, apresentam formato de bacilo com flagelo lofotríquio e endósporos esféricos terminais (Yanling *et al.*, 1991). Em reatores biológicos de produção de H₂ também foram identificadas esta espécie, em crescimento a partir de diversas fontes de carbono, como em indústrias de açúcar (Cai *et al.*, 2013b). Em um reator CSTR termofílico utilizado para a digestão de lodo de suinocultura e resíduos sólidos, Merlino *et al.* (2013) correlacionaram a produção biológica de hidrogênio, de 0,06 L h⁻¹ L⁻¹ à presença de microrganismos similares a *C. cellulosi*.

De acordo com Kim e Kim (2011) e Fangkum e Reungsang (2011), reatores termofílicos apresentam simplificação de comunidades microbianas favoráveis para a produção de H_2 , selecionando produtores eficientes de hidrogênio, comportamento que pode ser evidenciado no presente estudo, com somente duas famílias representando a efetiva comunidade microbiana produtora de hidrogênio, com 99% de similaridade conforme as espécies relacionadas e seus respectivos números de acesso (GenBank) na Tabela 5.10.

U	Número de	Afiliação filogenética	Tamanho	Similaridade	Filo	Nº de acesso	Abundância
Т	clones		(pb)	(%)		GenBank	relativa
0							(%)
1	4	Clostridium cellulosi	980	99	Firmicutes	NR044624.1	7
2	1	Thermoanaerobacterium sp. MYST/2012-07	1032	99	Firmicutes	JX442957.1	2
3	1	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	1020	99	Firmicutes	JX984979.1	2
4	24	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	834	99	Firmicutes	JX984974.1	43
5	1	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	1037	99	Firmicutes	HM585225.1	2
6	7	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	1027	99	Firmicutes	AF247003.1	13
7	2	Uncultured bacterium clone VKW- TB-3.3 16S	712	99	Firmicutes	GQ849504.1	4
8	11	Uncultured bacterium clone D8-50C- C4-3	954	99	Firmicutes	HQ266872.1	20
9	1	Lactobacillus sp.	606	88	Firmicutes	AB016864.1	2
10	1	Lactobacillus sp.	660	89	Firmicutes	DQ523489.2	2
11	1	Uncultured bacterium isolate d21112b41	1043	92	Firmicutes	FR687166.1	2
12	1	<i>Moorella</i> sp.	975	89	Firmicutes	AB086398.1	2
13	1	Caldanaerobius sp.	1019	91	Firmicutes	NR044258.1	2

Tabela 5.10: Resultados comparativos do sequênciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria obtidos no R₅

UTO: unidades taxonômicas operacionais

pb: pares de bases

A sequência de microrganismos representada pela UTO 7 foi relacionada à bactérias não identificadas similares às encontradas por Lee *et al.* (2010) (GenBank: n° de acesso GQ849504.1), em reator CSTR intermitente termofílico usado para a produção de hidrogênio a partir de resíduos vegetais de cozinha, com rendimento de hidrogênio de 1,7 mmol g $DQO_{adicionada}^{-1}$, similar ao obtido neste estudo durante o TDH aplicado de 1 h, com valores médio de 1,57 mmol g $DQO_{adicionada}^{-1}$.

A UTO 8 também foi relacionada à bactérias não identificadas (GenBank nº de acesso HQ266872.1), assim como relatado por Liu e Conrad (2011). Os autores consideraram a utilização quimiolitotrófica acetogênica (H₂/CO₂) a partir de solos produtores de arroz, e demonstraram que microrganismos similares a Família Thermoanaerobacteriaceae foram dominantes sob temperatura de 50 °C, similar a deste estudo. *Acetivibrio* (UTO 11) foi relacionado à degradação da celulose e à produção biológica de hidrogênio realizado por Lu *et al.* (2009) por meio de processo anaeróbio fermentativo em três estágios utilizando talos de milho como substrato orgânico (GenBank: nº de acesso FR687166.1).

A árvore filogenética foi construída com as 56 sequências obtidas a partir da análise dos fragmentos do gene 16S rRNA (Figura 5.13), descritas na Tabela 5.10.

Caldanaerobius (UTO 13), representa bactérias termofílicas e quimio-organotróficas inseridas na Família Thermoanaerobacteraceae e na Classe Clostridia (Ludwig *et al.*, 2008), pertencente ao Filo Firmicutes. Nesta Família também foi obtida similaridade a Moorella (UTO 12), relacionada a produção de H₂, etanol e acetato sob condições termofílicas a partir de frutose como fonte orgânica (Sakai *et al.*, 2004). Os produtos fermentativos incluem o etanol, acetato, formiato, lactato, CO₂ e H₂ (Lee *et al.*, 2008b). Peintner *et al.* (2010) avaliaram dois reatores para a produção fermentativa de hidrogênio em condições termofílicas, um reator de leito percolado e um reator de leito fluidificado, utilizando a glicose como substrato e *Caldicellulosiruptor owensensis* como fonte de inóculo como cultura pura. O reator de leito fluidificado obteve produtividade levemente mais alta, de 0,25 L L⁻¹ h⁻¹, tornando possível a utilização destas configurações para produção de H₂ sob condições termofílicas com este microrganismos. Sob temperatura elevada, de 70 ° C, Zhao *et al.* (2009) identificaram espécies dominantes como *Caldanaerobacter* na produção de hidrogênio e etanol a partir de glicose como fonte de substrato, por meio da manipulação das concentrações ideais de nutrientes. A operação de forma contínua em reator CSTR e em reator em batelada para a produção de hidrogênio a partir de águas

residuárias de destilarias de álcool utilizando o milho como matéria-prima foi realizada por Qiu *et al.* (2011). Os microrganismos envolvidos nos ensaios em batelada e no CSTR foram similares, relacionando a produção de hidrogênio à presença de bactérias hipertermofílicas como *Caldanaerobacter* e *Caldicellulosiruptor*.



Figura 5.13: Árvore filogenética a partir das UTO verificadas na biomassa aderida ao material suporte do reator R_5 produtor de hidrogênio, construída a partir de distâncias evolutivas inferidas utilizando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada próxima aos ramos e foi calculada baseada no teste de *bootstrap* com 1000 réplicas (Intervalo de confiança: 95% de substituições na sequência nucleotídica; Uncultured *Chloroflexus sp.:* Outgroup).

O gênero *Lactobacillus* (UTO 9 e UTO 10) compreendem bactérias que produzem ácido láctico como principal produto metabólito a partir de carboidratos durante o processo fermentativo, e tem sido amplamente descritos como indicativo de inibição na produção biológica de hidrogênio por *Clostridium*, em que a produção reduzida de hidrogénio está associada com um aumento simultâneo de lactato (Noike *et al.*, 2002). No entanto, Baghchehsaraee *et al.* (2009) afirmaram que a degradação do lactato poderia ocasionar em maior quantidade residual de NADH para a produção de hidrogênio pela rota do butirato, explicando assim a efetiva produtividade de H₂ no reator R₅ (de até 0,78 L h⁻¹ L⁻¹) na presença de porcentagens elevadas de ácido láctico entre os ácidos orgânicos verificados neste RALF termofílico. Foram encontradas concentrações elevadas de ácido lático (entre 7,0 e 30,9%), favorecendo a presença de microrganismos relacionados o gênero *Lactobacillus*.

5.6.3. Caracterização filogenética do consórcio microbiano termofílico: R₂₀

As sequências filogenética obtidas do biofilme na cinasita (material suporte) do R_{20} , após a fase operacional em TDH de 4 h foram agrupadas em 21 unidades taxonômicas operacionais (UTO), correpondente a apenas ao Filo Firmicutes, totalizando 51 sequências. Sete destas UTO apresentaram afiliação filogenética de 99% de similaridade. Em relação a outras 14 UTO obtevese entre 94 e 98% de similaridade (Tabela 5.11).

Houve predominância da Classe Bacilli, representada pela Família Lactobacillaceae e Gênero *Lactobacillus*. Menor porcentagem, em torno de 14%, foi atribuída a *Megasphera* sp., bactéria fermentativa e produtora de hidrogênio.

A presença de 15% de ácido láctico entre os ácidos orgânicos produzidos no R_{20} no TDH de 4 h, esteve relacionada a pequena diminuição do rendimento de H₂, de 1,85 para 1,51 mmol g DQO_{adicionada}⁻¹. Jung *et al.* (2010), a partir de águas residuárias provenientes do processamento de café, também observaram fenômeno semelhante em todos os TDH aplicados (12, 8 e 6 h). Os autores reportaram que o ácido láctico foi o principal metabólito solúvel produzido no reator CSTR (superior a 40%), com abundante presença de LAB (bactéria produtora de ácido láctico).

UTO	Número de clones	Afiliação filogenética	Tamanho da sequência (pb)	Similaridade (%)	Filo	N° de acesso do GenBank	Abundância relativa (%)
1	1	Lactobacillus casei	1022	99%	Firmicutes	AY699577.1	2
2	10	Lactobacillus mucosae	1061	99%	Firmicutes	EF120376.1	20
3	6	Lactobacillus fermentum	979	99%	Firmicutes	KF149314.1	12
4	9	Lactobacillus fermentum	912	99%	Firmicutes	HM058242.1	18
5	1	Lactobacillus delbrueckii	945	99%	Firmicutes	FR683101.1	2
6	4	Megasphaera elsdenii	1055	99%	Firmicutes	U95029.1	8
7	2	Lactobacillus malefermentans	759	99%	Firmicutes	FN667283.1	4
8	1	<i>Megasphera</i> sp.	1014	97%	Firmicutes	NR102980.1	2
9	2	<i>Megasphera</i> sp.	987	97%	Firmicutes	HM990964.2	4
10	1	Lactobacillus sp.	1032	95%	Firmicutes	FR683101.1	2
11	1	Lactobacillus sp.	1073	95%	Firmicutes	EU600921.1	2
12	1	Lactobacillus sp.	845	95%	Firmicutes	AP012541.1	2
13	1	Lactobacillus sp.	1094	95%	Firmicutes	HE616585.2	2
14	1	Lactobacillus sp.	1029	95%	Firmicutes	KC836532.1	2
15	1	Lactobacillus sp.	1109	95%	Firmicutes	KF149390.1	2
16	1	Uncultured Lactobacillus sp.	987	94%	Firmicutes	JF806678.1	2
17	1	Lactobacillus sp.	815	93%	Firmicutes	FJ915698.1	2
18	3	Lactobacillus sp.	1030	98%	Firmicutes	EU626018.1	6
19	1	Lactobacillus sp.	1001	98%	Firmicutes	NR041457.1	2
20	2	Lactobacillus sp.	1004	98%	Firmicutes	NR075048.1	4
21	1	Lactobacillus sp.	1075	97%	Firmicutes	KF149017.1	2

Tabela 5.11: Resultados comparativos do sequênciamento genético dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bactéria obtidos no R_{20}

UTO: unidades taxonômicas operacionais

pb: pares de bases

Bactérias produtoras de ácido láctico a partir da fermentação do melaço de cana-de-açúcar foram isoladas e relacionadas a cepas semelhantes a *Lactobacillus* sp., as quais apresentaram capacidade de produzir ácido succínico, incluindo a *L. malefermentans* (Kaneuchi *et al.*, 1988). Foram observadas porcentagens entre 4,0 a 17,2% de ácido succínico entre os ácidos orgânicos obtidos no efluente do reator termofílico R₂₀, sugerindo que estas bactérias (UTO 7) possam ter sido provenientes do substrato de alimentação (vinhaça de cana-de-açúcar). Esta espécie heterotrófica (*Lactobacillus malefermentans*) é anaeróbia facultativa, geralmente na forma de células individuais ou aos pares, com formação de endósporos, e é distinguida pelo fato de fermentar glicose, maltose e inulina (Russel, 1953).

Em reator anaeróbio de leito fixo utilizado para o tratamento de soro de queijo, com produção de até 41 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹, Perna *et al.* (2013) também detectaram a presença de sequências semelhantes a *L.casei* (UTO 1). Nesse caso específico, os autores afirmaram que ainda permanece desconhecido o efeito positivo e negativo de *Lactobacillus* sp. na produção biológica de H₂. *L. casei* possui uma adaptação evolutiva a diferentes nichos ecológicos, e as cepas são capazes de fermentar galactose, frutose, manose, manito, N-acetilglicosamina, mas não fermentam glicerol, arabinose e L-xilose (Cai *et al.*, 2007). Os produtos finais da fermentação serão lactato, acetato, etanol, CO₂ e formiato (Vos *et al.*, 2009).

No entanto, em outros estudos, a presença de *Lactobacillus* sp. foi relacionada a positiva produção biológica de hidrogênio por meio do estabelecimento de consórcio microbiano. Carrilo-Reys *et al.* (2012) relacionaram a presença de *L.casei* à produção biológica de H₂ (porém em pequena quantidade) de 5 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹, em UASB alimentado com soro de queijo. Com valores de rendimento similares aos obtidos neste estudo no R₂₀ (0,60 a 1,85 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹), Yang *et al.* (2007) relataram rendimento de 2,3 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹, em reator CSTR mesofílico usado na produção de H₂ alimentado com água residuária do processamento de queijo. Os autores afirmam que mais de 50% das bactérias presentes foram relacionadas a este gênero *Lactobacillus*, e somente 5% semelhantes a *Clostridium* sp.

As sequências relacionadas às espécies produtoras de ácido láctico *Lactobacillus mucosae*, *L. fermentum* e *L. delbrueckii* (UTO 2 a 5) também foram detectadas por Ohnishi *et al.* (2010) a partir de chorume de lixo como substrato orgânico para a produção biológica de H₂ em reator em batelada. Os autores sugerem que o lactato produzido pelas LAB (bactéria produtora de ácido láctico) foi preferencialmente metabolizado por *Megasphera elsdenii*, uma LUB (bactéria utilizadora de ácido láctico), assim como pode ter ocorrido neste estudo (UTO 6, 8 e 9), com produção de hidrogênio, de 0,71 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ em TDH de 4 h (fase operacional com biomassa submetida a identificação filogenética do gene rRNA 16S). As células de *Lactobacillus mucosae* são Gram-positivas, catalase-negativas, não formam endósporos, apresentam crescimento sob temperatura de 45 °C, e são capazes de fermentar glicose, maltose, galactose e lactose. *L. fermentum* é a principal espécie heterofermentativa entre as representantes de *Lactobacillus* e exibe metabólitos como os ácidos láctido, acético e o peróxido de hidrogênio (Zeng *et al.*, 2011).

A árvore filogenética foi construída considerando a população microbiana composta por produtores de hidrogênio (*Megasphera* sp.) e outros microrganismos (*Lactobacillus* sp) (Figura 5.14).



Figura 5.14: Árvore filogenética a partir das UTO verificadas na biomassa aderida ao material suporte do reator R_{20} produtor de hidrogênio, construída a partir de distâncias evolutivas inferidas utilizando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de réplicas da árvore está apresentada próxima aos ramos e foi calculada baseada no teste de *bootstrap* com 1000 réplicas (Intervalo de confiança: 95% de substituições na sequência nucleotídica; Uncultured *Chloroflexus sp.:* Outgroup).

Vos *et al.* (2009) relataram que o propionato, butirato, valerato, CO₂ e H₂ representam os produtos finais a partir da fermentação de glicose, frutose e lactato, por cepas de *M. elsdenii*. Esta cepa Gram-negativa é um importante microrganismo produtor de propionato, e está relacionado ao catabolismo do ácido láctico e na desaminação de aminoácidos que produzem propionato a parir de lactato, mas não a partir de glicose; além disso, *Megasphaera elsdenii* é capaz de fermentar uma fração do lactato a butirato, e não demonstra repressão de catabolismo por carboidratos como a glicose e a maltose (Hino *et al.*, 1994). Nesse contexto, face ao aumento da TCO de 80,0 para 120,0 kg DQO m⁻³d⁻¹ (R₂₀), verificou-se aumento da porcentagem de ácido propiônico entre os ácidos orgânicos observados no efluente (14,1 para 32,8%).

O comportamento da distribuição dos ácidos orgânicos obtidos no reator R_{20} termofílico, a partir de vinhaça de cana-de-açúcar, durante o TDH aplicado de 4 h (TCO de 120,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹) foi correlacionado à análise dos genes rRNA 16S dos microrganismos presentes na biomassa deste reator. Nesse sentido, foi verificado aumento da porcentagem de ácido láctico (de 8,8 para 15,6%) entre os ácidos orgânicos encontrados no efluente, o que pode ser confirmado pela população de microrganismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, produtores deste metabólito. A elevação da porcentagem de ácido propiônico (de 14,1 para 32,8%) pode ter ocorrido devido a presença de *M. elsdenii*, uma bactéria produtora de hidrogênio, e também de ácido propiônico, a partir de ácido láctico.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que a capacidade termofílica de produzir H_2 de modo contínuo, a distribuição dos ácidos e a estrutura da comunidade bacteriana foram fatores influenciados pelo aumento da concentração de vinhaça de cana-de-açúcar, e também pela diminuição do tempo de detenção hidráulica e consequente aumento das taxas de carregamento orgânicos aplicadas.

O lodo granulado fermentativo-metanogênico proveniente de reator UASB termofílico utilizado para a produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar, representou ser uma fonte de inóculo adequada para a obtenção do consórcio termofílico produtor de hidrogênio. A eliminação dos microrganismos consumidores de H_2 (metanogênicos) foi efetiva frente à aplicação do método de pré-tratamento térmico ao lodo granulado.

A vinhaça de cana-de-açúcar pôde ser utilizada de forma efetiva como fonte de carbono para a produção termofílica contínua de H₂ sob as cinco concentrações afluente testadas (5000, 10.000, 15.000, 20.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹) ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica, de até 1 h. As menores concentrações de vinhaça, de 5000 e de 10.000 mg DQO L⁻¹ apresentaram os melhores resultados considerando os parâmetros de rendimento e de produção volumétrica de H₂, respectivamente. Apesar dos menores valores obtidos durante a operação dos reatores com maiores concentrações de vinhaça, em virtude dos efeitos inibitórios causados pela elevada concentração afluente de ácidos orgânicos (como os ácidos acético e butírico), os resultados ainda assim demonstram a viabilidade de produção, sendo possível verificar elevado conteúdo de H₂ no biogás, de até 52 e 57% durante a operação com concentrações de 20.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹, respectivamente.

Ainda que tenham sido verificados resultados diferenciados de produção de H_2 , todos os reatores termofílicos apresentaram comportamento similar. Por meio da investigação do efeito da carga orgânica aplicada na produção de H_2 a partir da vinhaça (seja durante a mistura de fontes de carbono por meio da co-fermentação com a glicose, ou pela adição de 100% de vinhaça ao afluente), foi verificada tendência de descréscimo de rendimento e de conteúdo de H_2 mediante elevação da taxa de carregamento orgânico. Em contrapartida, o parâmetro de produção volumétrica de H_2 , mostrou-se favorável e com elevações significativas conforme o aumento da carga orgânica aplicada.

Durante a co-fermentação, não foram observadas mudanças significativas na diversidade microbiana após a retirada do co-substrato (glicose), sugerindo que a comunidade bacteriana foi capaz de se adaptar a disponibilização de 100% de vinhaça como substrato orgânico para a produção biológica de H₂. Similaridade da biomassa do reator R_5 termofílico foi relacionada com *Thermoanaerobacterium* sp. e *Clostridium* sp., ambas produtoras de hidrogênio em temperaturas elevadas.

Foram encontradas concentrações elevadas de ácido láctico entre ácidos orgânicos verificados nos efluentes dos reatores ao longo do monitoramento do processo fermentativo, e apesar disso, não foi detectada diminuição de produção volumétrica de hidrogênio, nem mesmo no conteúdo de H₂ observado no biogás. Nesse sentido, a análise dos genes rRNA 16S dos microrganismos do reator R_{20} revelou que a produção de H₂ foi atribuída ao consórcio entre os gêneros *Lactobacillus* (produtor de ácido láctico) e *Megasphera* (produtor de H₂ e de ácido propiônico a partir de ácido láctico).

7. SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se para pesquisas posteriores e complementares a esta:

• Comparar a produção contínua de H₂ a partir da vinhaça de cana-de-açúcar utilizando diferentes concentrações afluente sob faixas de temperatura termofílica e hipertermofílica em reatores de alta taxa;

• Realizar o balanço energético (*net energy gain*) de pesquisas científicas envolvendo a produção biológica de H_2 a partir de águas residuárias, como as provenientes dos setores agroindustriais, com o intuito de avaliar especificamente as vantagens desse sistema, possibilitanto futuras implementações no contexto de biorrefinarias;

• Monitorar a pressão parcial de hidrogênio visando melhorar a produção biológica do biogás sob temperaturas elevadas;

• Avaliar em ensaios celulares *in situ* os efeitos inibitórios causados às cepas microbianas produtoras de hidrogênio em razão das concentrações elevadas de ácidos orgânicos contidos na água residuária do presente estudo;

• Analisar as possibilidades de separação, aproveitamento e reúso dos ácidos orgânicos contidos na vinhaça de cana-de-açúcar, como etapa preliminar e integrada à produção biológica de H₂, tendo em vista que a diminuição destes compostos poderá reduzir os efeitos deletérios causados sob elevada concentração, à biomassa produtora de hidrogênio.

8. REFERÊNCIAS

ABO-HASHESH, M.; WANG, R.; HALLENBECK, P.C. Metabolic engineering in dark fermentative hydrogen production; theory and practice. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8414-8422, 2011.

ABREU, A.A.; ALVES, J.I; PEREIRA, M.A.;, KARAKASHEV, D.; ALVES, M.M; ANGELIDAKI, I. Engineered heat treated methanogenic granules: a promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9577-9586, 2010.

ACEVES-LARA, C.; LATRILLE, E.; BERNET, N.; BUFFIÈRE, P.; STEYER, J. A pseudostoichiometric dynamic model of anaerobic hydrogen production from molasses. *Water Research*, v. 42, p. 2539-2550, 2008.

ACHARYA, B.K.; MOHANA, S.; MADAMWAR, D. Anaerobic treatment of distillery spent wash – A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4621-4626, 2008.

AGUILAR, M.A.R.; FDEZ-GUELFO, L.A.; ÁLVAREZ-GALLEGO, C.J.; GARCÍA, L.I.R. Effect of HRT on hydrogen production and organic matter solubilization in acidogenic anaerobic digestion of OFMSW. *Chemical Engineering Journal*, v. 219, p. 443-449, 2013.

AKARSUBASI, A; INCE, O; OZ, N; KIRDAR, B; INCE, B. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 28-35, 2006.

AKUTSU, Y.; LEE, D.Y.; CHI, Y.Z.; LI, Y.Y.; HARADA, H.; YU, H.Q. Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 5061-5071, 2009b.

AKUTSU, Y.; LI, Y.Y.; HARADA, H.; YU, H.Q. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 2558-2566, 2009a.

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

AMORIM, E.L.C. de; BARROS, A.R.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 783-790, 2009.

AMORIM, E.L.C.; SADER, L.T.; SILVA, E.L. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. Applied *Biochemistry Biotechnology*, v. 166, p. 1248-1263, 2012.

ANDALIB, M.; HAFEZ, H.; ELBESHBISHY, E.; NAKHLA, G.; ZHU, J. Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR). *Bioresource Technology*, v. 121, p. 411-418, 2012.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N.; SKUADAS, I.V. LYBERATOS, G. Effect of substrate concentration on hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 4843-4851, 2011.

APHA, AWWA, WEF., 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.

AROOJ, M.F.; HAN, S.K.; KIM, S.H.; KIM, D.H.; SHIN, H.S. Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 6509-6514, 2008.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T..; KESKIN, T. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 34, p. 7441-7, 2009b.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.; KESKIN, T. Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *International Journal Green Energy*, v. 6, p. 192-200, 2009a.

BADIEI, M.; JAHIM, M.J.; ANUAR, N.; ABDULLAH, S.R.S; SU, L.S; KAMARUZZAMAN, M.A. Microbial community analysis of mixed anaerobic microflora in suspended sludge of ASBR producing hydrogen from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 37, p. 3169-3179, 2012.

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

BALAGUER, M.D.; VICENT, M.T, PARIS, J.M. Anaerobic fluidized bed reactor with sepiolite as support for anaerobic treatment of vinasse. *Biotechnology Letters*, v. 14, p. 433-438, 1992.

BANOS, R.; MANZANO-AGUGLIARO, F.; MONTOYA, F.G; GIL, C.; ALCAYDE, A.; GÓMEZ, J. Optimization methods applied to renewable and sustainable energy: *A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 1753-1766, 2011.

BAO, M.D.; SU, H.J.; TAN, T.W. Dark fermentative bio-hydrogen production: Effects of substrate pre-treatment and addition of metal ions or *L*-cysteine. *Fuel*, v. 112, p. 38-44, 2013.

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

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

BARROS, R.P. de; VIÉGAS, P.R.A; SILVA, T.L. da; SOUZA, R.M. de; BARBOSA, L.; et al. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v.40, p. 341-346, 2010.

BASTIDAS-OYANEDEL; J.; MOHD-ZAKI, Z.; ZENG, R.J; BERNET, N.; PRATT, S.; STEYER, J.; BATSTONE, D.J. Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 503-509, 2012.

BEAUPREZ, J.J.; MEY, M.DE; SOETAERT, W.K. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemestry*, v. 45, p. 1103-1114, 2010.

BORIES, A.; RAYNAL, J; BAZILE, F. Anaerobic digestion of high-strength distillery wastewater (cane molasses stillage) in a fixed-film reactor. *Biological Wastes*, v. 23, p. 251-267, 1988.

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9071-9077, 2010.

CABELLO, P.E; SCOGNAMIGLIO, F.P; FRANCISCO J. C. TERÁN, F.J.C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. *Engenharia Ambiental*, v. 6, p. 321-338, 2009.

CACCIATORE, M.; SCHEUFELE, D.A.; SHAW, B.R. Labeling renewable energies: How the language surrounding biofuels can influence its public acceptance. *Energy Policy*, v. 51, p. 673-682, 2012.

CAI, H.; RODRÍGUEZ, B.T.; ZHANG, W.; BROADBENT, J.R.; STEELE, J.L. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, v. 153, p. 2655-2665, 2007.

CAI, J.; WU, Q.; WANG, G.; DENG, C. Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium* sp. 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill. *Renewable Energy*, v. 59, p. 202-209, 2013.

CAKIR, A.; OZMIHCI, S.; KARGI, F. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13214-3218, 2010.

CARRILO-REYES, J.; CELIS, L.B.; ALATRISTE-MONDRAGON, F.; RAZO-FLORES, E.; Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 5591-5601, 2012.

CARVER, M.C.; VUORIRANTAB, P.; TUOVINENA, O.H. A thermophilic microbial fuel cell design. *Journal of Power Sources*, v. 196, p. 3757-3760, 2011.

CASTRO-VILLALOBOS, M.C.; GARCIA-MORALES, J.L.; FERNÁNDEZ, F.J. By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 7077-7083, 2012.

CHAGANTI, S.R.; KIMB, D.; LALMANA, J.A. Impact of oleic acid on the fermentation of glucose and xylose mixtures to hydrogen and other byproducts. *Renewable Energy*, v. 42, p. 60-65, 2012.

CHEN, P.; SHAKHNOVICH, E.I. Thermal Adaptation of Viruses and Bacteria. *Biophysical Journal*, v. 98, p. 1109-1118, 2010.

CHEN, S.; LO, Y.; LEE, K.; HUANG, T.; CHANG, J. Sequencing batch reactor enhances bacterial hydrolysis of starch promoting continuous bio-hydrogen production from starch feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 8549-8557, 2009.

CHEN, X.; JIANG, S.; ZHENG, Z.; PAN, L.; LUO, S. Effects of culture redox potential on succinic acid production by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1250-1255, 2012.

CHENG, H.H; WHANG, L.M.; WU, C.W.; CHUNG, M.C. A two-stage bioprocess for hydrogen and methane production from rice straw bioethanol residues. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 23-29, 2012.

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

CHONG, M.L.; RAHIM, R.A.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M.A. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 764-771, 2009.

CHRISTOFOLETTI C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, v. 33, p. 2752-61, 2013.

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

CIRANNA, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8714-8722, 2011.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A. de; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; RAZO-FLORES, E. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, v.35, p. 3174-3181, 2011.

DEL NERY, V. *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1987.

DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M.P.; JESUS, C.D.F.; ROSSEL, C.E.V.; FILHO, R.M.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, v. 103, p. 152-161, 2012.

Dictor, M., Joulian, C., Touzé, S., Ignatiadis, I., Guyonnet, D., 2010. Electro-stimulated biological production of hydrogen from municipal solid waste. Int. J. Hydrogen Energy 35, 10682-10692.

DOLL, M.R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C . *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.15,p. 275-282, 2010.

DONG, F.; LI, W.; SHENG, G.; TANG, Y.; YU, H. HARADA, H. An online-monitored thermophilic hydrogen production UASB reactor for long-term stable operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 13559-13565, 2011.

DRIESSEN, W.J.B.M., TIELBAARD, M.H., VEREIJKEN, T.L.F.M. Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process. *Water Science and Technology*, v. 30, p. 193-201, 1994.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356, 1956.

EROĞLU, E.; EROĞLU, I.; GÜNDÜZ,U.; TÜRKER, L.; YÜCEL, M. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 1527-1535, 2006.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management Resource*, p. 1-16, 2011.

ESPINOZA-ESCALANTE, F.M.; PELAYO-ORTÍZ, C.; NAVARRO-CORONA, J.; GONZÁLEZ-GARCÍA, Y.; BORIES, A.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of *Agave tequilana* Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 14-20, 2009.

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

FERNÁNDEZ, N.; FDZ-POLANCO, F.; MONTALVO, S. J.; TOLEDANO, D. Use of activated carbon and natural zeolite as support materials, in an anaerobic fluidized bed reactor, for vinasse treatment. *Water Science and Technology*, v. 44, p. 1-6, 2001.

FERNÁNDEZ, N.; MONTALVO, S.; FERNÁNDEZ-POLANCO, F.; GUERRERO, L.; CORTÉS, I.; BORJA, R.; SÁNCHEZ, E.; TRAVIESO, L. Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 721-728, 2007.

FERREIRA, L.F.; AGUIAR, M.; POMPEU, G.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.R. Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal of. Microbiological. Biotechnology*, v.26, p. 1613-1621, 2010.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. *Vinhaça de cana-de-açúcar*. Série Engenharia Agrícola, Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000.

GADOW, S.I.; LI, Y.; LIU, Y. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15465-15474, 2012.

GHOSH, K.; DILL, K. Cellular Proteomes Have Broad Distributions of Protein Stability. *Biophysical Journal*, v. 99, p. 3996-4002, 2010.

GIOANNIS G de, MUNTONI A, POLETTINI A, POMI R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, v.33, p. 1345-1361, 2013.

GLÓRIA, N.A.; ORLANDO FILHO, J. Aplicação de vinhaça: um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado. *Álcool e Açúcar*, v. 4, p. 22-31, 1984.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy*, v. 36, p. 2086-2097, 2008

GOODWIN, J.A.S.; STUART, J.B. Anaerobic digestion of malt whisky distillery pot ale using upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresource Technology*, v. 49, p. 75-81, 1994.

GOYAL, S. K.; SETH, R.; HANDA, B. K. Diphasic fixed-film biomethanation of distillery spentwash. *Bioresource Technology* v.56, p. 239-244, 1996.

GRAUSE, G.; IGARASHI, M.; KAMEDA, T.; YOSHIOKA, T. Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen . production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 16967-16973, 2012.

GRIFFTHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNEL, A.G.; BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA- based microbial community composition. *Applied Environmental Microbiology*, v.66, p.5488-5497, 2000.

GROMIHA, M.M; SURESH, M.X. Discrimination of mesophilic and thermophilic proteins using machine learning algorithms. *Proteins*, v. 70, p. 1274-1279, 2008.

GRONROOS, A.; KYLLONEN, H.; KORPIJARVI, K.; PIRKONEN, P.; PAAVOLA, T.; JOKELA, J.; RINTALA, J. Ultrasound assisted method to increase soluble chemical oxygen demand (SCOD) of sewage sludge for digestion. *Ultrasonics Sonochemestry*, v.12, p. 115-120, 2005.

GUO, W.; REN, N.; CHEN, Z.; LIU, B.; WANG, X.; XIANG, W.; DING, J. Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in an acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for long-term operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 7397-7404, 2008.

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

GUWY A.J.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; ROZZI, A.G. Hydrogen Production In A High Rate Fluidized Bed Anaerobic Digester. *Water Research*, v.31, p. 1291-1298, 1997.

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M.H.E.; ELBESHBISHY, E.; BAGHCHEHSARAEE. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 81-92, 2010.

HAN, E.; CHEN, H.; JIAO, A.; WANG, Z.; LI, Y.; REN, N. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 843-847, 2012.

HARADA, H.; UEMURA, S.; CHEN, A. C.; JAYADEVAN. J. Anaerobic treatment of recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor. *Bioresource Technology*, v. 55, 215-221, 1996.

HARVEY, S.; DIXON, M. Biological hydrogen production: Simultaneous saccharification and fermentation with nitrogen and phosphorus removal from wastewater effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 9611-9617, 2010.

HASYIM, R.; IMAI, T.; O-THONG, S.; SULISTYOWATI, L. Biohydrogen production from sago starch in wastewater using an enriched thermophilic mixed culture from hot spring. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 14162-14171, 2011.

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.32, p. 172-184, 2007.

HINO, T.; SHIMADA, K.; MARUYAMA, T. Substrate Preference in a Strain of *Megasphaera elsdenii*, a Ruminal Bacterium, and Its Implications in Propionate Production and Growth Competition. *Applied. Environmental. Microbiology*, v. 60, 1827-1831, 1994.

HNIMAN, A.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Developing a thermophilic hydrogenproducing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8785-8793, 2011.

HÖÖK, M.; TANG, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change – A Review. *Energy Policy*, v.52, p. 797-809, 2013.

HSIAO, L.C.; CHANG, J.J.; WU, J.H.; CHIN, W.C.; WEN, F.S.; et al. *Clostridium* strain cocultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7173-7181, 2009. HWANG, J.; CHA, G.; JEONG, T. et al. Effect of COD/SO_4^{2-} ratio and Fe(II) under the variable hydraulic retention time (HRT) on fermentative hydrogen production. *Water Research*, v. 43, p. 3525-3533, 2009b.

HWANG, J.; CHOI, J.; ABOU-SHANAB, R.A.I. et al. Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 9702-9710, 2009a.

INTANOO, P.; RANGSUNVIGIT, P.; NAMPROHM, W.; THAMPRAJAMCHIT, B.;CHAVADEJ, J.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.11104-11112, 2012.

IPCC - *Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation* (SRREN). Cambridge University Press, 1075 p., 2012.

ISMAIL, I.; HASSAN, M.A.; RAHMAN, N.A.A.; SOON, C.S. Thermophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME) using suspended mixed culture. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, p. 42-47, 2010.

JAENICKE, R.; STERNER, R. *Life at high temperatures*. In Dworkin, M. et al. (eds.), The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, ed. 3., 2006

JO, J.H.; LEE, D.S.; PARK, D.; CHOE, W.; PARK, J.M. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2061-2066, 2008.

JUNG, K.W.; KIM, D.; SHIN, H. Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13370-13378, 2010.

KANAI, T.; IMANAKA, H.; NAKAJIMA, A.; UWAMORI, K.; OMORI, Y.; FUKUI, T.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of. Biotechnology*, v. 116, p. 271-282, 2005.

KANEUCHI, C., SEKI, M., KOMAGATA, K. Production of Succinic Acid from Citric Acid and Related Acids by *Lactobacillus* strains. *Applied Environmental. Microbiology*, v. 54, p. 3053-3056, 1988.

KARADAG, D. Anaerobic H₂ production at elevated temperature (60 °C) by enriched mixed consortia from mesophilic sources. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 36, p. 458-468, 2011.

KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I., *Biofuels*, Chapter 23, Thermophilic Biohydrogen Production p. 525-536, 2011.

KARGI, F.; EREN, N.S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 2260-2266, 2012

KATO, M.T.; REBAC, S.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of low-strength brewery wastewater in expanded granular sludge bed reactor. *Applied Biochemistry*. *Biotechnology*, v. 76, p. 15-32, 1999.

KESKIN, T.; AKSO, E.; AZBAR, Y. N. Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed materials of ceramic ring and pumice stone. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 15160-15167, 2011.

KHAMTIB, S.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from xylose by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19 isolated from hot spring sediment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 12219-12228, 2012.

KIM D.H.; HAN, S.K.; KIM, S.H.; SHIN, H. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p.2158-2169, 2006.

KIM, D.; KIM, M. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, v.102, p.8423-8431, 2011.

KIM, M. S; LEE, D. Y. Fermentative hydrogen production from tofu processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium. *Bioresource Technology*, v.101, p. S48-S52, 2010.

KIM, M.; LEE, D.; KIM, D. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8712-8718, 2011.

KIM, M.; SPEECE, R. E. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion: mesophilic and thermophilic. *Water Research*, v.3 6, p.4369-4385, 2002.

KONGJAN, P.; ANGELIDAKI, I.Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: Effect of reactor configuration. *Bioresource Technology*, v.101, p. 7789-7796, 2010.
KONGJAN, P.; O-THONG, S.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production from desugared molasses (DM) using thermophilic mixed cultures immobilized on heat treated anaerobic sludge granules. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 14261-14269, 2011.

KONGJAN, P.; O-THONG, S.; ANGELIDAKI, I. Hydrogen and methane production from desugared molasses using a two-stage thermophilic anaerobic process. *Engineering in Life Sciences*, v. 13, p. 118-125, 2013.

KOSKINEN, P.E.P.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, L.A. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidizedbed bioreactor. *Biotechnology Bioengineering*, v. 97, p. 742-758, 2007.

KOTHARI, R.; SINGH, D.P.; TYAGI, V.V.; TYAGI, S.K. Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 6, p. 2337-2346, 2012.

KOTSOPOULOS, T.A.; ZENG, I. A.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production in granular upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C). *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, p. 296-302, 2006.

KOUTROULI, E. C.; KALFAS, H.;GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3718-3723, 2009.

KRISHNA, RH. Role of factors influencing on anaerobic process for production of bio hydrogen: Future fuel. *International Journal of Advanced Chemistry*, v. 2:31-38, 2013.

KUMAR, A.; KUMAR, K.; KAUSHIK, N.; SHARMA, S.; MISHRA, S. Renewable energy in India: Current status and future potentials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 2434-2442, 2010.

KUMAR, G.S.; GUPTA, S.K.; SINGH, G. Biodegradation of distillery spent wash in anaerobic hybrid reactor. *Water Research*, v. 41, p. 721-730, 2007.

KUO, S.; CHAO, Y.; TIEN, Y.; CHEN, I.; CHENG, S. Bio-hydrogen behavior of suspended and attached microorganisms in anaerobic fluidized bed. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8800-8808, 2011.

LAGO, A.C. do; BONOMI, A.; Cavalett, O.; CUNHA, M.P. DA; LIMA, M.A.P. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. *Biomass and Bioenergy*, v. 46, p. 5-12, 2012.

LAIME, E.M. O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRE, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 5, p. 17, 2011.

LALOV, I.G.; KRYSTEVA, M.A.; PHELOUZAT, J.L. Improvement of biogas production from vinasse via covalent immobilized methanogens. *Bioresource Technology*, v. 79, p. 83- 85, 2001.

LAM, M.K.; LEE, K.T. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win–win strategies toward better environmental protection. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 124-141, 2011.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA Sequencing in Nucleic Acid Techniques. In Bacterial Systematics, Eds. Stackenbrandt, E. and Goodfellow, M. p 115-148, New York: John Wiley and Sons, Inc, 1991.

LAY, C.H.; WU, J. H.; HSIAO, C. L.; CHANG, J. J.; CHEN, C. C.; LIN, C. Y. Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13445-13451, 2010.

LEE, K.S.; HSU, Y.F.; LO, Y.C.; LIN, P.J.; et al. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1565-1572, 2008a.

LEE, Y.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O.; WIEGEL, J. Description of *Caldanaerobius fijiensis* gen. nov., sp. nov., an inulin-degrading, ethanol-producing, thermophilic bacterium from a Fijian hot spring sediment, and reclassification of *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* and *Thermoanaerobacterium zeae* as *Caldanaerobius polysaccharolyticus* comb. nov. and *Caldanaerobius zeae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 666-670, 2008b.

LEE, Z.; LI, S.; KUO, P.; CHEN, I.; TIEN, Y.; HUANG, Y.; CHUANG, C.; WONG, S.; CHENG, S. Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13458-13466, 2010.

LEVIN, B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p.173-185, 2004.

LI J, REN N, LI B, ZHI Q, HE J. Anaerobic biohydrogen production from monosaccarides by a mixed microbial community culture. *Bioresource Technology*; v. 99, p. 6528-6537, 2008a.

LI, S. L.; WHANG, L. M ; CHAO, Y. C.; WANG, Y.H.; WANG, Y. F; HSIAO, C. J; TSENG, I. C.; BAI, M. D.; CHENG, S. S. Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 61-70, 2010.

LI, W.W.; YU, H.Q. Biohydrogen Production with High-Rate Bioreactors. *Biofuels*, v. 24, p. 537-567, 2011.

LI, Z.; WANG, H.; TANG, Z.; WANG, X.; BAI, J. Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p.7413-7418, 2008b.

LIMA, M.A.P.; CUNHA, M. da. Um salto para o futuro – in: ÚNICA: 2010, União da indústria de cana-de-açúcar. Disponível em < http://www.unica.com.br/>, 2012.

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

LIN, C.; WU, S.; CHANG, J.; CHANG, J. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene–vinyl acetate copolymer. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3298-3301, 2009.

LIN, H.; CHEN, W. Prediction of thermophilic proteins using feature selection technique. *Journal of Microbiological Methods*, v. 84, p. 67-70, 2011.

LIU, F.; CONRAD, R. Chemolithotrophic acetogenic H₂/CO₂ utilization in Italian rice field soil. *International Society for Microbial Ecology*, v. 5, p. 1526-1539, 2011.

LONG, C.; CUI, J.; LIU, Z.; LIU, Y.; LONG, M.; HU, Z. Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 6657-6664, 2010.

LU, Y.; LAI, Q.; ZHANG, C.; ZHAO, H.; MA, K.; ZHAO, X.; CHEN, H.; LIU, D.; XING, X. Characteristics of hydrogen and methane production from cornstalks by an augmented two- or three-stage anaerobic fermentation process. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2889-2895, 2009.

LUDWIG,W.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. Revised roadmap to the phylum Firmicutes. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2008.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q.; SHIM, H. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under

high organic loading rate (OLR). International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 11733-11737, 2010a.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; ZHOU, Q.; WANG, J.Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. *Applied Energy*, v. 87, p. 3710-3717, 2010b.

MACHADO, O. J.; FREIRE, F. B. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). OLAM – *Ciência & Tecnologia*, n. 2, p.170, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ed. São Paulo: Prentice Hall, 608p, 2004

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

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

MÄKINEN, A.E.; NISSILA, M.E.; PUHAKKA, J.A. Dark fermentative hydrogen production from xylose by a hot spring enrichment culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 12234-12240, 2012.

MAMIMIN, C.; THONGDUMYU, P.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, T.; O-THONG, S. Simultaneous thermophilic hydrogen production and phenol removal from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15598-15606, 2012.

MAPA - Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, 2010/2011. Disponível em: /http:// http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas (acessado em: 27Março2013).

MASSET, J.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C. BECKERS, L. et al. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 3371-3378, 2010.

MÉNDEZ-ACOSTA, H.O.; RAÚL, S.C.; ALCARAZ-GONZÁLEZ, V.; GONZÁLEZ-ALGARAZ, V.; PELAYO-ORTIZ, C. Anaerobic treatment of tequila vinasses in a CSTR-type digester. *Biodegradation*, v.21, p. 357-363, 2010.

MERLINO, G.; RIZZI, A.; SCHIEVANO, A.; TENCA, A.; SCAGLIA, B.; OBERTI, R.; ADANI, F.; DAFFONCHIO, D. Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Research*, v. 47, p. 1983-1995, 2013.

MOHAN, S. V.; CHIRANJEEVI, P.; MOHANAKRISHNA, G. A rapid and simple protocol for evaluating biohydrogen production potential (BHP) of wastewater with simultaneous process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 3130-3141, 2012.

MOHAN, S. V.; CHIRANJEEVI, P.; MOHANAKRISHNA, G. A rapid and simple protocol for evaluating biohydrogen production potential (BHP) of wastewater with simultaneous process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 3130-3141, 2012.

MOHAN, S.V.; AGARWAL, L.; MOHANAKRISHNA, G.; SRIKANTH, S.; KAPLEY, A.; PUROHIT, A.J.; SARMA, P.N. Firmicutes with iron dependent hydrogenase drive hydrogen production in anaerobic bioreactor using distillery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8234-8242, 2011.

MOHAN, S.V.; PANDEY, A. *Chapter 1 - Biohydrogen Production*: An Introduction. Biohydrogen, p. 1-24, 2013.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.;MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications, *Journal of. Hazardous Materials*, v. 163, p. 12-25, 2009.

MONCADA, J.; EL-HALWAGI, M.M.; CARDONA, C.A. Techno-economic analysis for a sugarcane biorefinery: Colombian case. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 533-543, 2013.

MORAES, B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, L.G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO, P.E. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, v. 113, p. 825-835, 2014.

MOSOLOVA, T. P., S. V. KALYUZHNYI, N. G. BELOGUROVA, AND S. D. VARFOLOMEEV. Effects of antibiotics, temperature, and pH on the growth and metabolism of *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Microbiology*, v. 60, p. 340-345, 1991.

MUNOZ-PÁEZ, K.M.; RUIZ-ORDÁZ, N.; GARCÍA-MENA, J.; PONCE-NOYOLA, M.T.; et al. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35 °C. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 12570-12579, 2013.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-

amplified genes coding for 16S rRNA. Applied Environmental. Microbiology, v. 59, p. 695-700, 1993.

NASR, N., ELBESHBISHY, E., HAFEZ, H., NAKHLA, G., NAGGAR, M.H.E. Biohydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p.12761-12769, 2011.

NGO, T.A.; NGUYEN, T.H.; BUI, H.T.V. Thermophilic fermentative hydrogen production from xylose by *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. *Renewable Energy*, v. 37, p. 174-179, 2012.

NING, Y.; JIN, D.; SHENG, G.; HARADA, H.; SHI, X. Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. *Renewable Energy*, v. 38, p. 253-257, 2012.

NISSILA, M.E.; TAHTI, H.P.; RINTALA, J.A.; PUHAKKA, J.A. Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.1482-1490, 2011.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1367-1371, 2002.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; RI, A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

O'FLAHERTY, V. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 5, p. 39-55, 2006.

OBAZU, F.O.; NGOMA, L.; GRAY, V.M.; Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H₂, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p.5579-5590, 2012.

OH, Y.; RAJ, S.M.; JUNG, G.Y.; PARK, S. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8357–8367, 2011.

OHNISHI, A., BANDO, Y., FUJIMOTO, N., SUZUKI, M., 2010. Development of a simple biohydrogen system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 8544-8553. OLIVEIRA, B.G.; CARVALHO, J.L.N.; CERRI, C.E.P.; CERRI, C.C.; FEIGL, B.J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. *Geoderma*, v. 200-201, p.77-84, 2013.

ORTEGA, F.S.; ROCHA, K.M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V.C. Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via "gelcasting" em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. *Cerâmica*, v. 47, p. 199-203, 2001.

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 3409-3416, 2011.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELANDD, N. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 909-918, 2009.

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

ÖZGÜR, E.; MARS, A.E.; PEKSEL, B.; LOUWERSEB, Y.; YUCEL, M.; et al. Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p. 511-517, 2010.

OZKAN. L.; ERGUDER, T.H.; DEMIRER, G.N. Investigation of the effect of culture type on biological hydrogen production from sugar industry wastes. *Waste Management*, v. 30, p.792-728, 2010.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2321-2334, 2007.

PANWAR, N.L.; KAUSHIKB, S.C.; KOTHARIA, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p.1513-1524, 2011.

PAO, H.T; FU, H.C. Renewable energy, non-renewable energy and economic growth in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 25, p. 381-392, 2013.

PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1553-1562, 2008.

PATTRA, S.; LAY, C.; LIN, C.; O-THONG, S.; REUNGSANG, A. Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8697-8703, 2011.

PEINTNER, C.; ZEIDAN, A.A.; SCHNITZHOFER, W. Bioreactor systems for thermophilic fermentative hydrogen production: evaluation and comparison of appropriate systems. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, p.S15-S22, 2010.

PEIXOTO, G.; SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8953-8966, 2011.

PELCZAR, M.J.; CHANG, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*, v. II, 2° ed. São Paulo: Markron Books, 1996.

PERERA, K.R. J.; KETHEESAN, B.; ARUDCHELVAM, Y.; NIRMALAKHANDAN, N. Fermentative biohydrogen production II: Net energy gain from organic wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 167-168, 2012.

PERERA, NIRMALAKHANDAN, N. Evaluation of dairy cattle manure as a supplement to improve net energy gain in fermentative hydrogen production from sucrose. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8688-8695, 2011.

PERNA, V., CASTELLÓ, E., WENZEL, J., ZAMPOL, C., LIMA, D.M.F., et al. Hydrogen production in a upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 54-62, 2013.

POTTMAIER, D.; MELO, C.R.; SARTOR, M.N.; KUESTER, S.; AMADIO, T.T.; FERNANDES, C.A.H.; MARINHA, D.; ALARCON, O.E. The Brazilian energy matrix: From a materials science and engineering perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 19, p. 678-691, 2013.

PRAKASHAM, A.S.; BRAHMAIAH, P.; SATHISH, T.; RAO, K.R.S.S. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 9354-9361, 2009.

PRASERTSAN, P.; O-THONG, S.; BIRKELANDD, N. Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7748-7459, 2009.

QIU, C.; WENA, J.; JIA, X. Extreme-thermophilic biohydrogen production from lignocellulosic bioethanol distillery wastewater with community analysis of hydrogen-producing microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8243-8251, 2011.

RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V.V.N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 4, p. 135-156, 2000.

RAMOS, C.; BUITRÓN, G.; MORENO-ANDRADE, I.; CHAMY, R. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 13228-13295, 2012.

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

REN, N. Q.; LI, J. Z.; LI, B. K.; WANG, Y.; LIU, S. R. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 2147-2157, 2006.

REN, N. Q.; TANG, J.; LIU, B. F.; GUO, W. Q. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p.2807-2813, 2010.

REN, N.; GUO, W.; LIU, B.; CAO, G.; DING, J. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p. 365-370, 2011.

REN, N.; ZING, D.; RITTMANN, B.E.; ZHAO, L.; XIE, T.; ZHAO, X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, v. 9, p. 1112-25, 2007.

RODRIGUES, D.; ORTIZ, L.S. Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana de açúcar no Brasil. Brasília: Núcleo Amigos da Terra e Instituto Vitae Civilis. 2006.

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

ROSALES-COLUNGA, L.M.; RAZO-FLORES, E.; RODRÍGUEZ, A. DE L. Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on hydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 180–184, 2012.

ROY, S.; GHOSH, S.; DAS, D. Improvement of hydrogen production with thermophilic mixed culture from rice spent wash of distillery industry. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15867-15874, 2012.

SAINT-AMANS, S.; GIRBAL, L.; ANDRADE, J.; AHRENS, K.; SOUCAILLE, P. *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Regulation of Carbon and Electron Flow in Glucose-Glycerol Mixture. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 1748-1754, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining Method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1993.

SAKAI, S.; NAKASHIMADA, Y.; YOSHIMOTO, H.; WATANABE, S.; OKADA, H.; NISHIO, N. Ethanol production from H2 and CO2 by a newly isolated thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1. *Biotechnology Letters*, v.26, p. 1607-1612, 2004.

SANCHEZ RIERA, F.; CORDOBA, P.; SINERIZ, F. Use of the UASB reactor for the anaerobic treatment of stillage from sugar cane molasses. *Biotechnol. Bioengineering*, v. 27, p. 1710-1716, 1985.

SANT'ANNA, S.A.C.; FERNANDES, M.F.; IVO, W.M.P. M.; COSTA, J.L.S. Evaluation of Soil Quality Indicators in Sugarcane Management in Sandy Loam Soil. *Pedosphere*, v. 19, p. 312-322, 2009.

SARIPAN, A.F.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose and arabinose as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 1-17, 2013.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Manage*, v. 86, p. 481-497, 2008.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Manage*, v. 86, p. 481-497, 2008.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J. Recent developments of biofuels/bioenergy sustainability certification: A global overview. *Energy Policy*, v. 39, p. 1630-1646, 2011.

SCHULTZ, N.; LIMA, E.; PEREIRA, M. G.; ZONTA, E. Residual Effects of Nitrogen, Potassium and Vinasse, Fertilization on Cane Plant and Ratoon Harvested with and without Straw Burning. *Revista Brasileira Ciênc*ia e *Solo*, v.34, p. 811-820, 2010.

SEARMSIRIMONGKOL, P.; RANGSUNVIGIT, P.; LEETHOCHAWALIT, M.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 12810-12821, 2011.

SEN, B.; SUTTAR, R.R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starchprocessing wastewater using enriched mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15588-15597, 2012.

SETH, R.; GOYAL, S. K.; HANDA, B. K. Fixed film biomethanation of distillery spentwash using low cost porous media. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 14, p. 79 - 89, 1995.

SHARMA, J.; SINGH, R. Effect of nutrient supplementation on anaerobic sludge development and activity for treating distillery effluent. *Bioresource Technology*, v. 79, p. 203-206, 2001.

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

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

SHOW, K.; LEE, D.; CHANG, J. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8524–8533, 2011.

SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; TAY, J.H.; LIN, C.Y.; et al. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15616-15631, 2012.

SIGURBJORNSDOTTIR, M.A.; ORLYGSSON, J. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK54, isolated from hot spring. *Applied Energy*, v. 97, p. 785-791, 2012.

SILES, J.A.; BREKELMANS, J.; MARTÍN, M.A.; CHICA, A.F.; MARTÍN, A. Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9040-9048, 2010.

SIQUEIRA, L. M. Influência da taxa de carregamento orgânico na degradação anaeróbia da vinhaça em reator de leito fluidizado. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São. 130 p. 2008.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15473-15482, 2012.

SONNLEITNER, A.; PEINTNER, C.; WUKOVITS, W.; FRIEDL, A.; SCHNITZHOFER, W. Process investigations of extreme thermophilic fermentations for hydrogen production: Effect of bubble induction and reduced pressure. *Bioresource Technology*, v. 118, p. 170-176, 2012.

SOUZA, M. E.; FUZARO, G.; POLEGATO, A. R. Termophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. In: *Proceedings of sisth International Symposium on Anaerobic Digestion*, São Paulo, Brasil, 191-200, 1991.

SOUZA, R.R. de.; SCHAEFFER, R.; MEIRA, I. Can new legislation in importing countries represent new barriers to the development of an international ethanol market? *Energy Policy*, v. 39, p. 3154-3162, 2011.

SRIRANGAN, K; AKAWI, L.; MOON-YOUNG, M.; CHOU, C.P. Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Applied Energy*, v. 100, p. 172-186, 2012.

SYUTSUBO, K., SINTHURAT, N., OHASHI, A., HARADA, H. Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change. *Water Science Technology*, v. 43, p. 59-66, 2001.

TAIBI, E.; GIELEN, D.; BAZILIAN, M. The potencial for renewable energy in industrial applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p.735-744, 2012.

TAWFIK, A.; SALEM, A. The effect of organic loading rate on bio-hydrogen production from pre-treated rice straw waste via mesophilic up-flow anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 186-190, 2012.

TELH, M. Avaliação do uso de reator anaeróbio horizontal de leito fixo no tratamento da vinhaça sob condições termofílicas. São Carlos. 60p. (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), 2001.

THANWISED, P.; WIROJANAGUD, W.; REUNGSANG, A. Effect of hydraulic retention time on hydrogen production and chemical oxygen demand removal from tapioca wastewater using anaerobic mixed cultures in anaerobic baffled reactor (ABR). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15503-15510, 2012.

TIWARI, A.; PANDEY, A. Cyanobacterial hydrogen production - A step towards clean environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 139-150, 2012.

TURKDOGAN-AYDINOL, F. I.; YETILMEZSOY, K. A fuzzy-logic-based model to predict biogas and methane production rates in a pilot-scale mesophilic UASB reactor treating molasses wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 182, p. 460-471, 2010.

ÚNICA: União da indústria de cana-de-açúcar, 2012. Disponível em < http://www.unica.com.br/> (acessado em: 27Março2013).

VACCARI, G.; TAMBURINI, E.; SGUALDINO, G.; URBANIEC, K.; KLEMES, J. Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. *Journal of Cleaner Production*, 2003.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; SPARLING, R.; RISBEY, D.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresource Technology*, v. 96, p.1907-1913, 2005.

VAN DEN WALL BAKE, J.D.; JUNGINGER, M.; FAAIJ, A.; POOT, T.; WALTER, A. Explaining the experience curve: Cost reductions of Brazilian ethanol from sugarcane. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 644-658, 2009.

VAN GINKEL, S.W.; OH, S.E.; LOGAN, B.E. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 1535-1542, 2005.

VAN GROENESTIJN, J.W.; HAZEWINKEL, J.H.O.; NIENOORD, M.; BUSSMANN, P.J.T. Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p.1141-1147, 2002.

VAZOLLER, R. F. Microbial aspects of thermophilic anaerobic biodigestion of vinasse. *Novel Trends in Biological Wastewater*, p. 527-532, 1997.

VEMPARALA, S.; MEHROTRA, S.; BALARAM, H. Role of loop dynamics in thermal stability of mesophilic and thermophilic adenylosuccinate synthetase: A molecular dynamics and normal mode analysis study. *Biochemical et Biophysical Acta*, v. 1814, p. 630-637, 2011.

VIANA, A B. *Tratamento anaeróbio de vinhaça em reator UASB operado em temperatura na faixa termofílica* (55°C) e submetido ao aumento progressivo de carga orgânica. 102 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), 2006.

VLISSIDIS, A.; ZOUBOULIS, A. I. Thermophilic anaerobic digestion of alcohol distillery wastewaters. *Bioresource Technology*, v. 43, p.131-140, 1993.

VOS, P.D., GARRITY, M.G., JONES, D., KRIEG, N.R., LUDWIG, W., et al., 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: The Firmicutes, vol. 3. Springer.

WANG B, WAN W, WANG J. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p. 7013-9, 2008.

WANG, B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 4361-4367, 2013a.

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

WANG, W.; XIE, L.; CHEN, J.; LUO, G.; ZHOU, Q. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3833-3839, 2011.

WANG, W.; XIE, L.; LUO, G.; ZHOU, Q. Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by co-digestion: The effects of different co-substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 6980-6988, 2013b.

WATKINSON, I.I.; BRIDGWATER, A.V.; LUXMORE, C. Advanced education and training in bioenergy in Europe. *Biomass and bioenergy*, v. 38, p. 128-143, 2012.

WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiological Biotechnology*, v.85, p. 849-860, 2010.

WIEGANT, W.M., CLAASSEN, J.A., LETTINGA, G. Thermophilic anaerobic digestion of high strength wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, p. 1374-1381, 1986.

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, v. 19, p. 63-102, 2000.

WILKINSON, K.G. A comparison of the drivers influencing adoption of on-farm anaerobic digestion in Germany and Australia. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 1613-1622, 2011.

WON, S.G.; BALDWIN, S.A.; LAU, A.K.; REZADEHBASHI, M. Optimal operational conditions for hydrogen production from sugar refinery wastewater in an ASBR. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 13895-13906, 2013.

WU, S.; CHU, C.; SHEN, Y. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15496-15502, 2012.

WU, S.Y.; LIN, C.N.; CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN,P.J. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology Progress.*, v. 19, p. 828-832, 2003.

WU, X.; LIN, H.; ZHU, J. Optimization of continuous hydrogen production from co-fermenting molasses with liquid swine manure in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresource*. *Technology*, v. 136, p. 351-359, 2013.

XIA, Y; CAI, L.; ZHANG, T. ; FANG, H.H.P. ; Effects of substrate loading and co-substrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 37, p. 13652-13659, 2012.

XU, J.F.; REN, N.Q.; WANG, A.J.; QIU, J. et al. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p.13467-13474, 2010.

YALCIN, S.; ELTAN, O.; KARSLI, M. A.; YALCIN, S. The nutritive value of modified dried vinasse (Pro Mass) and its effects on growth performance, carcass characteristics and some blood biochemical parameters in steers, *Rev. Med. Vet.*, v. 161, p.245-252, 2010.

YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J.A.; BENEMANN, J.R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 32, p. 4761-4771, 2007.

YANLING, H.E.; YOUFANG, D.; YANQUAN, L. Two Cellulolytic Clostridium Species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 41, p. 306-309, 1991.

YE, X.; ZHANG, X.; MORGENROTH, E.; FINNERAN, K.T. Anthrahydroquinone-2,6disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose, xylose, and cellobiose. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 37, p. 11701-11709, 2012. YOKOYAMA, H.; OHMORI, H.; WAKI, M.; OGINO, A.; TANAKA, Y. Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineeng*, v. 107, p. 64-6, 2009.

YOSSAN, S.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 13806-13814, 2012.

YUAN, Z.; YANG, H.; ZHI, X.; SHEN, J. Increased performance of continuous stirred tank reactor with calcium supplementation. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 35, p. 2622-2626, 2009.

ZAHEDIA, S. Hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic thermophilic acidogenesis: Influence of organic loading rate and microbial content of the solid waste. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 85-91, 2013.

ZEIDAN, A.A.; VAN NIEL, E.W.J. Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 34, p. 4524-4528, 2009.

ZENG, X.Q.; PAN, D.D.; ZHOU, P.D. Functional Characteristics of *Lactobacillus fermentum* F1. *Current. Microbiology*, v. 62, p. 27-31, 2011.

ZHANG J, WANG Q. Buffering and nutrient effects of with mud from ammonia-soda process on thermophilic hydrogen fermentation from food waste. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 38, p. 13564-71, 2013.

ZHANG S, KIM TH, LEE Y, HWANG SJ. Effects of VFAs Concentration on Bio-hydrogen Production with *Clostridium Bifermentans* 3AT-ma. *Energy Procedia*, v. 14, p. 518-523, 2012a.

ZHANG, K.; REN, N.; CAO, G.; WANG, A. Biohydrogen production behavior of moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 under different gas-phase conditions. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 36, p. 14041-14048, 2011.

ZHANG, P.; ZHAO, Z.; YU, S.; GUAN, Y.; HE, X. Using strong acid–cation exchange resin to reduce potassium level in molasses vinasses. *Desalination*, v. 286, p. 210-216, 2012b.

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

ZHAO, C.; KARAKASHEV, D.; LU, W.; WANG, H.; ANGELIDAKI, I. Xylose fermentation to biofuels (hydrogen and ethanol) by extreme thermophilic (70 °C) mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 3415-3422, 2010.

9. APÊNDICES - Produção bibliográfica

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

Artigos completos publicados em periódicos:

- ROSA, P.R.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen production and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 1288-1296, 2014.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 55-63, 2014.
- ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Hydrogen Production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. *Bioresource Technology*, v.161, p.10-19, 2014.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.241

Artigo completo aceito em periódico:

1. SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A; SILVA, E.L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*.

Artigo completo submetido para publicação em periódico:

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

Artigos completos publicados em anais de congressos:

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