UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

EDUARDO DELLOSSO PENTEADO

Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios

Orientador: Prof. Marcelo Zaiat

São Carlos, SP

- 2012 -

- VERSÃO CORRIGIDA -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

EDUARDO DELLOSSO PENTEADO

Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências (Engenharia Hidráulica e Saneamento).

Orientador: Prof. Marcelo Zaiat

São Carlos, SP

- 2012 -

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

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

Penteado, Eduardo Dellosso P419i Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios / Eduardo Dellosso Penteado; orientador Marcelo Zaiat. -- São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Digestão anaeróbia. 2. Hidrogênio. 3. Bioenergia. 4. Inóculo. 5. Técnicas de pré-tratamento. 6. Ácidos orgânicos. 7. CLAE. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro EDUARDO DELLOSSO PENTEADO.

Título da dissertação: "Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios".

Data da defesa: 30/03/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Prof. Associado **José Alberto Domingues Rodrígues** (Instituto Mauá de Tecnologia/IMT)

Prof^a. Dr^a. **Magali Christe Cammarota** (Universidade Federal do Río de Janeiro/UFRJ)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento: Prof. Titular Edson Cezar Wendland

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

eprice

DEDICATÓRIA

A minha família, que com carinho, amor, gratidão e incansável apoio me ajudaram durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, a Deus e a Nossa Senhora de Fátima.

À minha família, por ter me dado apoio, carinho e amor para que obtivesse êxito e sucesso, especialmente minhas avós trigêmias: Noélia, Alice e Tia Tita (*in memorian*).

Ao meu orientador Marcelo Zaiat pela oportunidade, pelo apoio e pela orientação durante a realização deste trabalho. Por ter sido mais do que um orientador, por ter sido um amigo e principalmente um exemplo a ser seguido. As coisas ficam mais simples quando você tem alguém como ele para se espelhar.

Aos professores Edson Luiz Silva e Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic pelas sugestões no exame de qualificação e aos professores Maria Bernadete Varesch, Eugenio Foresti e Wiclef Dymurgo Marra Junior pelas contribuições e ensinamentos na hora do café.

À técnica de laboratório Dr^a Isabel Kimiko Sakamoto pela ajuda na execução das análises de biologia molecular realizadas neste trabalho.

À técnica de laboratório Dr^a Eloisa Pozzi Gianotti pela ajuda na execução das análises de microscopia realizadas neste trabalho.

À técnica de laboratório Maria Angela Tallarico Adorno pelo apoio e auxílio no desenvolvimento da metodologia em cromatografia realizado neste trabalho.

À amiga e companheira de câmara Pilar, por toda a ajuda em tudo desde que entrei no laboratório até a finalização do meu trabalho.

Aos amigos de orientador, Adriana, Djalma e Priscila, pela presença nos momentos de risos e em outros nem tão felizes nos quais o apoio de vocês era fundamental para finalizar o dia corrido de análises. Valeram as risadas nas caronas às quintas-feiras para a reunião!! Muito obrigado por toda ajuda, sem vocês teria sido muito mais complicado.

Ao pessoal da Amb3turma, Amanda, André, Andréia, Caio, Cláudia, Dante, Heider, Marcus Vinicius, Leandro, Mariana, Nataska, Natalia Fischer, Patrick, Priscila Marconi, Renata Amaral, Thiago e Thays. Vamos dominar o mundo!!

Ao pessoal da Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos, Davi Gasparini, Guilherme (Ituverava), Gabriel Sacchi, Juliana Resende, Lucas Simão, Henrique Altero (Muringa) pelas alegrias de assistir um futebol as quartas-feiras. Vocês são irmãos para sempre!

Aos meus amigos que ingressaram comigo no mestrado e se tornaram pessoas importantes para toda a vida: Dea Carolina, Felipe, Lívia, Lenin, Lorena, Mara e Priscila. Sem vocês, as aulas não teriam tanta graça.

A todo o pessoal do LPB: Ariovaldo, Betão, Bruna, Carolina, Dagoberto, Daniel, Davi, Débora, Fabrício, Flávia, Gabriel, Guilherme, Gustavo, Jorge, Juliana, Moacir, Rafael, Regiane Correa, Regiane Ratti, Sandra, Theo, Tiago Martins, Tiago Paladino e Vivian. Trabalhar neste laboratório foi a melhor experiência da minha vida.

À Sá, Pavi, Flávia, Rose, que mesmo no campus 1 ajudaram na "papelada" necessária para a realização deste projeto.

À Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento por permitir a execução deste projeto.

Ao CNPq e à FAPESP (nº 2010/03927-0) pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

E a todos que por acaso eu tenha me esquecido de mencionar. Não é uma simples menção em um papel que irá tirar a importância de toda ajuda que recebi durante esse caminho percorrido.

Resumo

Penteado, E. D. Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios. 2012. 143p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Esse trabalho investigou a influência de diferentes origens e pré-tratamentos do inóculo na produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente. Aparas de polietileno de baixa densidade foram usadas como material suporte para fixação da biomassa e os reatores foram operados com 2 h de tempo de detenção hidráulica (TDH) e a 25°C, alimentados com efluente sintético a base de sacarose. Duas fontes de inóculo foram estudadas: lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de água residuária de abatedouro de aves (D) e lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de água residuária de suinocultura (S); além da autofermentação (A), quando não há nenhum inóculo no reator. Além disso, dois tipos de pré-tratamento - térmico (T) e ácido (A) - foram avaliados. Os rendimentos de hidrogênio foram de 2,1, 2,0, 2,0,1,0, 1,0, 0,7, 0,7 mol H₂ mol⁻¹ sacarose quando os reatores foram inoculados com A, DT, DA, D, SA, ST e S, respectivamente. Nessa nomenclatura, a primeira letra se refere à origem do inóculo e a segunda, ao pré-tratamento. Embora hidrogênio (20-78%) e dióxido de carbono (21-55%) tenham sido os principais produtos no biogás, metano foi detectado nos reatores inoculados com D, DA, S, ST e SA no início e no final da operação. A produção volumétrica máxima de hidrogênio(61,6 mL H₂ h⁻¹.L⁻¹) foi obtida quando DA foi usado com inóculo. Porém, o menor valor (15,1 mL H₂ h⁻¹.L⁻¹) foi observado usando o inóculo S. Quando o reator não foi inoculado (A), a produção volumétrica de hidrogênio foi 47,3 mL H₂ h⁻¹.L⁻¹. Etanol, ácido butírico e acético foram os principais produtos metabólicos detectados na fase líquida. Em resumo, os resultados demonstraram que há influência da origem e do pré-tratamento do inóculo em todos os parâmetros analisados. Inóculos sem pré-tratamento resultaram em menor rendimento de hidrogênio do que os observados nos experimentos com inóculos prétratados devido a seleção das bactérias produtoras de hidrogênio (BPH). Ademais, embora o pré-tratamento térmico tenha gerado os maiores valores de rendimento, o pré-tratamento ácido resultou em uma operação mais estável com os maiores valores médios. A autofermentação teve desempenho semelhante aos DT e DA e pode ser uma alternativa para a produção biológica de hidrogênio, pois seleciona as BPH naturalmente.

Palavras-chaves: digestão anaeróbia, hidrogênio, bioenergia, inóculo, técnicas de prétratamento, ácidos orgânicos e CLAE

Abstract

Penteado, E. D. Influence of source and pre-treatments method of seed sludge on the hydrogen production from wastewater in anaerobic bioreactor. 2012. 143p. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

This paper investigated the influence of different inoculums and pretreatment of seed sludge on the biohydrogen production in up-flow anaerobic fixed-bed reactors. Particles of lowdensity polyethylene were used as support for biomass attachment and the reactor was operated with hydraulic retention time (HRT) of 2 h at 25°C, fed with a sucrose-based synthetic wastewater. Two sources of inoculums were studied: anaerobic sludge from an UASB (up-flow anaerobic sludge blanket) reactor applied to treat poultry slaughterhouse wastewater (Sl) and anaerobic sludge from an UASB reactor treating swine wastewater (Sw), besides the autofermentation (A), with no inoculation of the reactor. In addition, two kinds of pretreatment - heat (He) and acid (Ac) shock - were evaluated. Hydrogen yields were 2.1, 2.0, 2.0, 1.0, 1.0, 0.7, 0.7, mol H₂ mol⁻¹ sucrose when the reactors were inoculated with A, SlHe, SlAc, SwAc, Sl, Sw, and SwHe, respectively. In this nomenclature, the first two letters refer to source and the others refer to pretreatment. Although hydrogen (20-78%) and carbon dioxide (21-55%) have been the main gaseous products in the biogas, methane was detected in Sl, SlAc, Sw, SwHe and SwAc at the beginning and in the last days of the operation. Optimal H₂ production rate (61.6 mL H₂ h^{-1} L⁻¹) was obtained when SlAc was used as seed sludge. On the other hand, the smallest value (15.1 mL H₂ $h^{-1} L^{-1}$) were observed using Sw inoculums. When the reactor was not inoculated (A), H_2 production rate was 47.3 mL H_2 h⁻¹ L^{-1} . Ethanol, butyric acid and acetic acid were the main soluble products detected in the liquid phase. In summary, the results have demonstrated that there are influences of the source and the pretreatment of the seed sludge in all parameters analyzed. Inoculums without pretreatment resulted in hydrogen productivity lower than those observed for experiments with pretreated inoculums due the selection of hydrogen producing bacteria (HPB). Furthermore, although the heat shock has generated the highest values of hydrogen yield, the acid-shock provided more stable operation with the highest average values. Besides, the autofermentation had almost the same performance than SIAc and SIHe and could be an alternative for biological hydrogen production due to natural selection of HPB.

Keywords: anaerobic digestion, hydrogen, biopower, seed sludge, pre-treatment method,

organic acids, HPLC

Lista de Ilustrações

Figura 4.1: Fotografia do sistema cromatográfico utilizado no desenvolvimento da
metodologia para determinação e quantificação de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos. 25
Figura 4.2: Desenho do reator anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente, as unidades estão
em mm
Figura 4.3: Aparato experimental para a produção de hidrogênio e a foto do reator anaeróbio
de leito fixo e fluxo ascendente sem material suporte
Figura 4.4: Fotografia do material suporte de polietileno de baixa densidade utilizado no leito
do reator anaeróbio de leito fixo fluxo ascendente para produção biológica de hidrogênio34
Figura 4.5: Esquema geral dos experimentos realizados
Figura 5.1: Cromatograma típico da determinação de ácidos CLAE com detector de UV e
arranjo de diodo;com temperatura do forno de 43°C e fluxo 0,5mL.min ⁻¹ com coluna
Aminex [®] HPX-87H50
Figura 5.2: Cromatograma típico da determinação de carboidratos e álcoois por CLAE com
detector de índice de refração; com temperatura do forno de 43°C e fluxo 0,5mL.min ⁻¹ , com
coluna Aminex [®] HPX-87H
Figura 5.3: Variação temporal da produção do biogás com os diferentes inóculos: A (), D (
←), DT(→), DA (→), S (→),ST(→) e SA (→)
Figura 5.4: Boxplot da produção do biogás com os diferentes inóculos57
Figura 5.5: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para a vazão de biogás produzido. Os valores ns significam que a diferença
não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito
significativos60
Figura 5.6: Variação temporal da porcentagem de hidrogênio no biogás com os diferentes
inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→),ST(→) e SA (→)61
Figura 5.7: Boxplot da porcentagem de hidrogênio (H2) no biogás produzido com os
diferentes inóculos
Figura 5.8: Variação temporal da porcentagem de gás carbônico no biogás com os diferentes
inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→)62
Figura 5.9: Boxplot da porcentagem de gás carbônico (CO ₂) no biogás produzido com os
diferentes inóculos63

Figura 5.10: Variação temporal da porcentagem de metano no biogás com os diferentes
inóculos: D (→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→)
Figura 5.11: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para a porcentagem de hidrogênio na composição do biogás. Os valores ns
significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são
significativos ou muito significativos
Figura 5.12: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para a porcentagem de gás carbônico na composição do biogás. Os valores ns
significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são
significativos ou muito significativos
Figura 5.13: Variação temporal da vazão molar de H_2 com os diferentes inóculos: A (), D (
→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→)
Figura 5.14: Box-plot da vazão molar de hidrogênio com os diferentes inóculos 69
Figura 5.15: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para a vazão molar de hidrogênio. Os valores ns significam que a diferença
não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito
significativos71
Figura 5.16: Variação temporal da produção volumétrica de hidrogênio com os diferentes
inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→)72
Figura 5.17: Box-plot da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) com os diferentes
inóculos72
Figura 5.18: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para a produção volumétrica de hidrogênio (HPR). Os valores ns significam
que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou
muito significativos74
Figura 5.19: Variação temporal da eficiência da conversão da sacarose com os diferentes
inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→)75
Figura 5.20: Box-plot da conversão de sacarose com os diferentes inóculos estudados 76
Figura 5.21: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para a conversão de sacarose. Os valores ns significam que a diferença não é
significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.78
Figura 5.22: Variação temporal do rendimento de hidrogênio (YH2) com os diferentes
inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→)

Figura 5.23: Box-plot do rendimento de hidrogênio com os diferentes inóculos estudados80
Figura 5.24: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para o rendimento de hidrogênio. Os valores ns significam que a diferença
não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito
significativos
Figura 5.25: Variação temporal da concentração de SSV no efluente dos diferentes inóculos:
A (\rightarrow), D (\rightarrow), DT(\rightarrow), DA (\rightarrow), S (\rightarrow), ST(\rightarrow) e SA (\rightarrow)84
Figura 5.26: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de
Kruskall-Walis para sólidos suspensos voláteis (SSV). Os valores ns significam que a
diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito
significativos
Figura 5.27: Concentração de produtos intermediários para o inóculo A ao longo do período
de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (
) e etanol ()
Figura 5.28: Concentração de produtos intermediários para o inóculo D ao longo do período
de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (
) e etanol ()
Figura 5.29: Concentração de produtos intermediários para o inóculo DT ao longo do período
de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (
) e etanol ()
Figura 5.30: Concentração de produtos intermediários para o inóculo DA ao longo do período
de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (
) e etanol ()
Figura 5.31: Concentração de produtos intermediários para o inóculo S ao longo do período
de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (
) e etanol ()
Figura 5.32: Concentração de produtos intermediários para o inóculo ST ao longo do período
de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (
) e etanol ()
Figura 5.33: Concentração de produtos intermediários para o inóculo SA ao longo do período
Figura 5.33: Concentração de produtos intermediários para o inóculo SA ao longo do período de operação: Ácido acético (), ácido butírico (), ácido lático (), ácido propiônico (

Figura 5.34: Concentração média dos produtos intermediários gerados na fermentação da sacarose para a produção de hidrogênio para os diferentes inóculos testados: A (■), D (■), Figura 5.35: Distribuição percentual média dos produtos intermediários para os diferentes inóculos testados: Ácido cítrico (■), ácido málico (■),ácido succínico (■),ácido lático (■), ácido fórmico (■),ácido acético (■),ácido propiônico (■), ácido iso-butírico (■),ácido butírico (■), ácido iso-valérico (■), ácido valérico (■), ácido capróico (■) e etanol (■)......92 Figura 5.36: Variação temporal da eficiência de remoção de DQO dos diferentes inóculos: A (Figura 5.37: Box-plot da conversão de sacarose com os diferentes inóculos estudados. 95 Figura 5.38: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo A no início da operação: Figura 5.39: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo do processo da autofermentação no fim da operação: endósporos e bacilos (a) e filamento (b). Aumento de Figura 5.40: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo D: predominância de Figura 5.41: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo D no final da operação: predominância de filamentosas e endósporos (a) e de bacilos (b). Aumento de 1000 vezes. . 99 Figura 5.42: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo DT no início da operação: predominância de filamentos com bainha e endósporos (a) e cocos (b). Aumento de 1000 Figura 5.43 Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo DA no início da operação: predominância de bacilos e endósporos (a) e de bacilos delgados (b). Aumento de 1000 vezes. Figura 5.44: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo DA no final da operação: predominância de navetes, filamentosas e endósporos (a) e de filamentosas e bacilos delgados Figura 5.45 Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo S no início da operação: predominância de endósporos, bacilos (a) e bacilos (b). Aumento de 1000 vezes...... 101 Figura 5.46: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo S no final da operação: predominância de bacilos e navetes (a) e de endósporos, cocos e navetes (b). Aumento de

Figura 5.47: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo ST no início da operação: predominância de endósporos, bacilos (a) e bacilos e células ovaladas (b). Aumento de 1000 Figura 5.48: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo ST no final da operação: predominância de navetes e de endósporos(a), bacilos e alguns cocos (b). Aumento de 1000 Figura 5.49: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo SA no início da operação: predominância de bacilos, cocos, células ovaladas com bainha e de endósporos(a), bacilos, cocos e filamentosas (b). Aumento de 1000 vezes......103 Figura 5.50: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo SA no final da operação: predominância de bacilos, cocos, células ovaladas com bainha e de endósporo (a), bacilos, cocos e endósporos(b). Aumento de 1000 vezes......103 Figura 5.51: Dendograma do gel de DGGE para o domínio Bacteria avaliando a diversidade entre a origem do inóculo no início (0), no meio (30) e no fim da operação (60) para os reatores inoculados com A, D e S.....105 Figura 5.52: Dendograma do gel de DGGE para o domínio Bacteria avaliando a diversidade entre os inóculos com e sem pré-tratamento do lodo anaeróbio de abatedouro de aves (D) no iníco (0), no meio (30) e no fim da operação (60) para os reatores inoculados com D, DT e Figura 5.53: Dendograma do gel de DGGE para o domínio Bacteria avaliando a diversidade entre os inóculos com e sem pré-tratamento do lodo anaeróbio de suinocultura (S) no iníco (0), no meio (30) e no fim da operação (60) para os reatores inoculados com S, ST e SA....109 Figura 5.54: Dendograma do gel de DGGE para o domínio Bacteria avaliando a diversidade entre os inóculos A, D, DT, DA, S, ST e SA no término da operação dos reatores.....111 Figura 5.55: Variação temporal do pH no efluente dos diferentes inóculos: A (-+), D (-+), DT(-), DA(-), S(-), ST(-) e SA(-). Figura 5.56: Variação temporal da vazão molar de hidrogênio (--) e do gás carbônico (--) para os inóculos testados: A(a), D (b), DT (c), DA (d), S(e), ST (f) e SA (g).115 Figura 5.57: Variação temporal do rendimento (----) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc, ---) no Figura 5.58: Variação temporal do rendimento (----) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAcHomoacetogenese/HAc): no

período que não há produção de metano (), a relação máxima () e mínima () quando
há a produção de metano no reator inoculado com D 119
Figura 5.59: Variação temporal do rendimento () e da relação do ácido acético gerado pela
homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAcHomoacetogenese/HAc,) no
reator inoculado com DT 120
Figura 5.60: Variação temporal do rendimento () e da relação do ácido acético gerado pela
homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc _{Homoacetogenese} /HAc): no
período que não há produção de metano (), a relação máxima () e mínima () quando
há a produção de metano no reator inoculado com DA 120
Figura 5.61: Variação temporal do rendimento () e da relação do ácido acético gerado pela
homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAcHomoacetogenese/HAc): no
período que não há produção de metano (), a relação máxima () e mínima () quando
há a produção de metano no reator inoculado com S 121
Figura 5.62: Variação temporal do rendimento () e da relação do ácido acético gerado pela
homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAcHomoacetogenese/HAc): no
período que não há produção de metano (), a relação máxima () e mínima () quando
há a produção de metano no reator inoculado com ST 121
Figura 5.63: Variação temporal do rendimento () e da relação do ácido acético gerado pela
homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAcHomoacetogenese/HAc): no
período que não há produção de metano (), a relação máxima () e mínima () quando
há a produção de metano no reator inoculado com SA 122
Figura 5.64: Identificação dos pontos de coleta para a realização do perfil espacial nos
reatores
Figura 5.65: Perfil espacial de pH com diferentes inóculos: A (), D (), DT (), DA
(→), S(→), ST (→) e SA (→)125
Figura 5.66: Perfil espacial da eficiência de conversão da sacarose com diferentes inóculos: A
(→), D (→), DT (→), DA (→), S (→), ST (→) e SA (→)
Figura 5.67: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com A: ácido acético(),
ácido propiônico (), ácido butírico (), etanol () e ácido lático ()
Figura 5.68: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com D: ácido acético(),
ácido propiônico (), ácido butírico (), etanol () e ácido lático () 127
Figura 5.69: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado DT: ácido acético(), ácido
propiônico (), ácido butírico (), etanol () e ácido lático ()

Figura 5.70: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com DA: ácido acético(),
ácido propiônico (), ácido butírico (), etanol () e ácido lático ()
Figura 5.71: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com S: ácido acético(),
ácido propiônico (→), ácido butírico (→), etanol (→) e ácido lático (→)129
Figura 5.72: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado ST: ácido acético(), ácido
propiônico (), ácido butírico (), etanol () e ácido lático ()
Figura 5.73: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com SA: ácido acético(),
ácido propiônico (), ácido butírico (), etanol () e ácido lático ()
Figura 5.74: Curva de distribuição do Tempo de Detenção Hidráulica nos reatores com e sem
biomassa131

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Levantamento dos diferentes configurações de reatores e TDHs utilizados na
produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias
Tabela 3.2: Levantamento de trabalhos já realizados com pré-tratamento de inóculo16
Tabela 4.1: Volume da solução mãe utilizada na diluição para cada um dos pontos da curva de
calibração
Tabela 4.2: Médias quadráticas e grau de liberdade utilizados na análise da variância (Teste
F)
Tabela 4.3: Teste de linearidade e da eficiência de regressão. 29
Tabela 4.4: Caracterização do efluente sintético a ser utilizado
Tabela 4.5: Concentração de sólidos totais e voláteis iniciaos de cada um dos inóculos de lodo
anaeróbio estudados
Tabela 4.6: Variáveis operacionais analisadas
Tabela 4.7: Solução para amplificação dos fragmentos específicos do ácido nucleico 41
Tabela 4.8: Programação do termociclador para amplificação dos fragmentos de ácidos
nucléicos pela reação em cadeia de polimerase (PCR) 41
Tabela 4.9: Composição para o preparo de 100 mL do gel desnaturante
Tabela 5.1: Curva de regressão e teste de eficiência de regressão para as diferentes substâncias
analisadas
Tabela 5.2: Ajuste ao modelo linear e validade da regressão para as diferentes substâncias
analisadas
Tabela 5.3: Avaliação da precisão do método e da precisão instrumental para as diferentes
substâncias analisadas
Tabela 5.4: Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para as diferentes substâncias
analisadas
Tabela 5.5: Valores médios, mínimos e máximos do biogás produzido com os diferentes
inóculos
Tabela 5.6: Valores médios, mínimos e máximos da porcentagem de H ₂ no biogás produzido.

Tabela 5.7: Valores médios, mínimos e máximos da porcentagem de CO2 no biogás
produzido61
Tabela 5.8: Valores médios e máximos da vazão molar de hidrogênio 69
Tabela 5.9: Valores médios e máximos da produção volumétrica de hidrogênio (HPR)73
Tabela 5.10: Valores médios, mínimos e máximos da conversão de sacarose para cada inóculo
estudado76
Tabela 5.11: Valores médios, mínimos e máximos de Y _{H2} para os inóculos testados79
Tabela 5.12: Relação entre os rendimentos médio e máximo obtidos e o rendimento máximo
teórico caso haja somente ácido acético na produção de hidrogênio
Tabela 5.13: Valores médios de SSV e de SV no líquido drenado e aderida no material
suporte após o término do período de operação para os inóculos testados
Tabela 5.14: Fator de conversão de substrato a célula ($Y_{X/S}$) calculado para os diferentes
inóculos85
Tabela 5.15: Concentração média dos produtos intermediários gerados na fermentação da
sacarose para a produção de hidrogênio para os diferentes inóculos testados
Tabela 5.16: Valores médios, mínimos e máximos da eficiência de remoção de DQO para os
inóculos testados94
Tabela 5.17: Reações usadas para o cálculo da DQO teórica de cada metabólito e o fator que
relaciona a massa desta substância com o equivalente em DQO96
Tabela 5.18: DQO efluente média empírica e a teórica e a sua concordância nos inóculos
estudados96
Tabela 5.19: Caracterização morfológica dos diferentes inóculos usados na produção
biológica de hidrogênio no início da operação104
Tabela 5.20: Caracterização morfológica dos diferentes inóculos usados na produção
biológica de hidrogênio ao fina do período de operação104
Tabela 5.21: Valores médios, mínimos e máximos do pH efluente para cada inóculo estudado
Tabela 5.22: Identificação dos pontos de coleta para a realização do perfil espacial nos
reatores
Tabela 5.23: Dados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos e concentração da biomassa
intersticial para os reatores sem biomassa e para os inóculos estudados

Lista de Abreviaturas

- A Inóculo obtido do processo de autofermentação
- BHP Bactérias produtoras de hidrogênio
- CG Cromatografia Gasosa
- CIGSB carrier-induced granular sludge bed
- CSTR continuos stirred tank reactor
- CLAE Cromatografia Líquida de alta eficiência
- D Inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves sem pré-tratamento
- DA Inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves com pré-tratamento ácido
- DGGE Eletroforese de gel de gradiente desnaturante
- DT Inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves com pré-tratamento térmico
- DQO Demanda Química de Oxigênio
- EESC Escola de Engenharia de São Carlos
- HPR Produção volumétrica de hidrogênio
- LPB Laboratório de Processos Biológicos
- PCR Reação de cadeia de polimerase
- pH potencial hidrogeniônico
- Q vazão de alimentação do reator
- S Inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de rejeitos de suinocultura sem pré-tratamento
- SA Inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de rejeitos de suinocultura com pré-tratamento ácido
- SSV Sólidos Suspensos Voláteis
- ST Inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB aplicado ao tratamento de rejeitos de suinocultura com pré-tratamento térmico
- TDH Tempo de detenção hidráulica médio real
- UASB Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*)

Sumário

1	Intr	ntrodução1				
2	Objetivos4					
2.1 Objetivo geral				4		
	2.2	Obj	jetivos específicos	4		
3	Rev	visão	Bibliográfica	5		
3.1 Produção biológica fermentativa de hidrogênio						
3.2 Fatores de influência na pro			ores de influência na produção de hidrogênio em reatores anaeróbios	6		
	3.2.	1	Influência do Tempo de Detenção Hidráulica (TDH)	6		
	3.2.	2	Influência da Temperatura	8		
	3.2.	3	Influência do substrato	10		
	3.2.	4	Influência do pH	12		
3.2.		5	Influência dos microrganismos	14		
	3.3	Ava	anços do grupo de pesquisa	19		
	3.4	Cor	nsiderações finais	22		
4	Mat	terial	l e métodos	23		
4.1 Desenvolvimento de método para determinação de ácidos orgânicos, ál carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)						
	4.1.	1	Instrumentação e condição analítica	24		
	4.1.	2	Padrões cromatográficos	25		
	4.1.	3	Preparo das amostras	26		
	4.1.4		Elaboração das curvas de calibração	27		
	4.1.5		Validação do método	28		
	4.2	Pro	dução biológica de hidrogênio	30		
	4.2.	1	Efluente sintético	30		

	4.2.2	Reator de leito fixo	31
	4.2.3	Meio suporte	33
	4.2.4	Inóculos dos reatores	35
	4.2.5	Operação dos reatores	35
	4.2.6	Monitoramento das variáveis físico-químicas	37
	4.2.7	Avaliação microbiana	39
	4.2.8	Ensaios hidrodinâmicos	43
	4.2.9	Cálculos	44
	4.2.10	Geração de biomassa e conversão de substrato em biomassa $(Y_{X/S})$	46
	4.2.11	Tratamento dos dados e análise estatística	48
5	Resulta	dos e Discussão	50
	5.1 Desenvolvimento de método para determinação de ácidos orgânic carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)		lcoois e 50
	5.1.1	Validação do método	51
	5.2 Pro	odução biológica de hidrogênio	56
	5.2.1	Geração de produtos intermediários	86
	5.2.2	Balanço de DQO nos reatores	94
	5.2.3	Análise dos microrganismos por microscopia ótica	97
	5.2.4	Avaliação da comunidade microbiana	104
	5.2.5	Instabilidade na produção de hidrogênio	113
	5.2.6	Perfil espacial dos parâmetros monitorados	123
	5.2.7	Comportamento hidrodinâmico dos reatores	130
6	Conclus	sões	133
7	Sugestõ	jes	136
8	Referências bibliográficas 13		

1 Introdução

As principais fontes de energia mundial são os combustíveis fósseis com destaque ao carvão, ao petróleo e ao gás natural, que juntos suprem, aproximadamente, 80% da demanda global (DAS & VEZIROGLU, 2001). O uso destas fontes tem causado diversos problemas ambientais, tais como a emissão de poluentes atmosféricos e o aquecimento global.

Dessa forma, diversas fontes renováveis e mais limpas de energia estão sendo estudadas e empregadas na matriz energética de vários países para redução da emissão de gases causadores do aquecimento global na atmosfera, minimizando os problemas ambientais.

Dentre as alternativas, o hidrogênio destaca-se por apresentar, na sua combustão, liberação de calor 2,75 vezes maior do que a energia obtida pelo uso de hidrocarbonetos, gerando como principal produto da sua queima o vapor de água. Assim, o hidrogênio, quando obtido de matérias primas renováveis, torna-se uma alternativa energética promissora (LAY *et al.*, 1999).

De acordo com Lay *et al.* (1999), o gás hidrogênio pode ser obtido por quatro processos, a partir de fontes primárias de energia, que são: a eletrólise da água, processos termoquímicos, processos radiolíticos e processos biológicos. Entretanto, a produção biológica pode ser uma alternativa promissora, por usar menos energia e ser realizada em temperatura e pressão ambiente, ou seja, um modo seguro de produção de hidrogênio (WANG & WAN, 2009).

O hidrogênio biológico pode ser gerado por meio de processos fototróficos ou fermentativos, sendo este último o mais vantajoso por ser o processo mais simples, o qual apresenta as maiores velocidades de produção de hidrogênio e o menor custo de implementação (LAY *et al.*, 1999 e MATHEWS & WANG, 2009).

A produção de gás hidrogênio por meio de processo anaeróbio tem se apresentado como uma alternativa energética de menor impacto ambiental, pois utiliza matérias-primas renováveis, podendo ser realizado de forma independente da disponibilidade de combustíveis fósseis, sendo assim, uma maneira mais amigável ao ambiente de produzir hidrogênio.

O uso de reatores anaeróbios é recente para a produção de hidrogênio, sendo o Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP) um dos pioneiros no Brasil. Contudo, nos trabalhos realizados por esse laboratório com reatores de leito fixo, é possível verificar uma queda na produção de hidrogênio após se atingir um ponto de máxima produção de hidrogênio chegando, em alguns casos, a cessar completamente a produção no reator com cerca de 60 dias de operação (FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010 e LIMA, 2011). Este fato pode ser explicado pela possível presença de microrganismos que consomem o hidrogênio produzido. A presença ou não desses microrganismos é influenciada pela forma de inoculação, pelo tipo de pré-tratamento do inóculo e pela operação do reator anaeróbio de fluxo ascendente.

Visando otimizar a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em um sistema de consórcio microbiano, se faz necessário o pré-tratamento do inóculo reduzindo a quantidade e a atividade das bactérias consumidoras de hidrogênio, selecionando as bactérias produtoras de hidrogênio (WANG & WAN, 2008a). Atualmente, os principais métodos de pré-tratamento para selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio reportados na literatura são: choque térmico, aplicação de ácido ou base, aeração, congelamento e descongelamento, aplicação de clorofórmio, 2-bromoetanosulfonato de sódio e iodopropano (CHEONG & HASSEN, 2006; ZHU & BLÉNAND, 2006; HU & CHEN, 2007; MOHAM *et al.*, 2007; MU *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008; WANG & WAN, 2008a e LUO *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho pretende avaliar a influência da origem e do prétratamento do inóculo na produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente a partir do tratamento de águas residuárias, avaliando o efeito destes parâmetros em reatores contínuos já que, na maioria dos trabalhos científicos, os analisam em reatores em batelada. Além disso, esta pesquisa buscou a estabilidade na produção de hidrogênio em reatores de leito fixo e fluxo ascendente.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência da inoculação do reator anaeróbio de leito fixo sobre a produção biológica de hidrogênio a partir de efluente sintético a base de sacarose.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

• Desenvolver e validar método cromatográfico para determinação e quantificação de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

• Avaliar a influência da origem do inóculo na produção de biogás, a vazão molar de hidrogênio e o rendimento de hidrogênio no reator anaeróbio de leito fixo.

• Avaliar a produção de biogás, a vazão molar de hidrogênio e o rendimento de hidrogênio dos lodos anaeróbios com pré-tratamento térmico e ácido no reator anaeróbio de leito fixo.

• Avaliar a influência da origem do inóculo e do pré-tratamento na composição do biogás produzido, na distribuição dos produtos intermediários e na eficiência de remoção de matéria orgânica.

• Comparar, por meio de ferramentas de biologia molecular, as comunidades microbianas dos diferentes inóculos testados ao longo do tempo de operação do reator.

4

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Produção biológica fermentativa de hidrogênio

O processo de digestão anaeróbia pode ser dividido em duas etapas, em acidogênese e metanogênese. A produção de hidrogênio só é possível se o processo for interrompido na primeira etapa, pois, nesta etapa, o hidrogênio é produzido, e na segunda é consumido para a geração de metano.

A acidogênese é a etapa fermentativa da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos e é o processo no qual o hidrogênio é produzido. Nesta etapa, os microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica em hidrogênio, gás carbônico e ácidos graxos voláteis de cadeia curta. Assim, estratégias de controle operacional devem ser aplicadas aos reatores utilizados com o objetivo de se produzir hidrogênio (LEITE *et al.*, 2008).

Desta forma, a produção biológica de hidrogênio a partir da fermentação apresenta algumas vantagens em relação à fototrófica, tais como: maior velocidade de produção de hidrogênio pelas bactérias fermentativas; a dispensabilidade de intensidade luminosa e, em alguns casos, os microrganismos já se encontram condicionados para a geração de hidrogênio (LAY *et al.*, 1999).

Em condições anaeróbias, a matéria orgânica é oxidada e o excesso de elétrons é usado para produzir o gás hidrogênio, processo facilitado pela enzima hidrogenase. Outro mecanismo para a produção de hidrogênio ocorre quando a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotído (NADH) é formada através da glicólise (conversão da glicose a piruvato). O NADH é, então, oxidado, conforme a Reação 3.1, produzindo o hidrogênio.

 $NADH + H^{+} \rightarrow H_2 + NAD^{+}$ (Reação 3.1)

O processo de produção do gás hidrogênio via fermentação apresenta como principal desvantagem em relação ao processo fototrófico que o hidrogênio produzido encontra-se misturado com gás carbônico (CO₂) e, eventualmente, com o metano (CH₄), necessitando assim de separação posterior para ser utilizado como combustível (PEIXOTO, 2008).

3.2 Fatores de influência na produção de hidrogênio em reatores anaeróbios

3.2.1 Influência do Tempo de Detenção Hidráulica (TDH)

A influência do TDH sobre a produção de hidrogênio e dos ácidos orgânicos foi estudada em diversos reatores de crescimento imobilizado (GAVALA *et al.*, 2006), reatores de leito fixo (CHANG *et al.*, 2002) e de crescimento suspenso (AKUTSU *et al.*, 2009a). Os estudos demonstram que o TDH exerce influência na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.

Chen *et al.* (2001) apresentaram como método de inibição da fase metanogênica da digestão anaeróbica a operação em TDH de entre 2 e 4 horas, o que contribui no arraste das arqueias metanogênicas dos reatores. O arraste desses microrganismos pode ser explicado pela velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) das arqueias metanogênicas suspensas, da ordem de 0,0167 h⁻¹, ser inferior a das bactérias acidogênicas, que é de aproximadamente 0,083 h⁻¹. Dessa forma, as arqueias metanogênicas são incapazes de manter uma população estável e acabam sendo eliminadas do sistema (CHEN *et al.*, 2001).

Akutsu *et al.* (2009a) operaram reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*, anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente) com diversos tempos de detenção hidráulica (entre 3 e 48 horas). O inóculo foi retirado de dois reatores: um reator de bancada agitado que produzia hidrogênio por fermentação do amido com concentração média de 15 g L^{-1} a 55°C, e de um reator UASB que tratava efluente sintético, no qual se

retirou os grânulos mesófilos que foram submetidos a tratamento térmico prévio (a 100°C, por 2 h) para tentar eliminar as arqueias metanogênicas. Em todos os ensaios realizados em condições termofílicas (55°C), não se observou a presença de metano no biogás, sendo este somente constituído por hidrogênio e pelo gás carbônico. A produção volumétrica de hidrogênio foi aumentada com a redução do tempo de detenção hidráulica (TDH) de 48 para 6 horas de 2,0 L H₂ L⁻¹ dia⁻¹ para 4,0 L H₂ L⁻¹ dia⁻¹. Porém, o rendimento de hidrogênio diminui de 1,68 mol H₂ mol⁻¹ glicose para aproximadamente 0,25 mol H₂ mol⁻¹ glicose, devido ao aumento da carga orgânica que antes era 8 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (TDH de 48 horas) e passou para 127 kg DQO m⁻³ dia⁻¹ (TDH de 6 horas).

Azbar *et al.* (2009) estudaram a variação do TDH utilizando água residuária de indústria de processamento de queijo com DQO constante em 47 g L⁻¹ em um reator de mistura completa (CSTR). O TDH variou entre 1 e 3,5 dias. Estes autores perceberam que quando o TDH foi reduzido de 3,5 dias para 2 dias a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) sofreu decréscimo, de 1,5 L H₂ L⁻¹ dia⁻¹para 0,5 L H₂ L⁻¹ dia⁻¹; porém, quando o parâmetro em estudo foi novamente diminuído de 2 dias para 1 dia, houve um aumento para 1,0 L H₂ L⁻¹ dia⁻¹. A composição do biogás não se alterou com a mudança do TDH, apresentando percentual médio de 42% de hidrogênio. Neste trabalho, o rendimento de hidrogênio diminui de 22 mmol H₂ g⁻¹ DQO para 5 mmol H₂ g⁻¹ DQO quando o TDH mudou de 3,5 dias para 1 dia.

Na Tabela 3.1, é apresentado um resumo dos diversos trabalhos que avaliam o TDH em diferentes configurações de reatores.

Reator	Substrato	Faixa de TDH estudado	Rendimento máximo de hidrogênio (mol $H_2 mol^{-1}$ substrato)	TDH ótimo	Referência
UASB	Amido (15 g amido L ⁻¹) Água residuária	6 a 48 horas	1,68	48 horas	Akutsu <i>et al.</i> (2009a)
CSTR	de processamento de queijo (47 g DQO L ⁻¹)	1 a 3,5 dia	$\begin{array}{c} 22 \text{ mmol } H_2 \text{ g}^{\text{-1}} \\ \text{DQO} \end{array}$	3,5 dia	Azbar <i>et al.</i> (2009)
CSTR	Glicose (10 g glicose L ⁻¹)	2 a 12 horas	2,2 (mesofílico, 35°C) 2,1 (termofílico, 55°C)	4 (mesofílico, 35°C) 6 (termofílico, 55°C)	Gavala <i>et al.</i> (2006)
Reator anaeróbio fluidificado	Glicose (4 g glicose L ⁻¹)	1 a 8 horas	1,90 (poliestireno) 2,52 (argila expandida)	2 horas	Barros <i>et al.</i> (2010)
Reator anaeróbio fluidificado	Glicose (4 g glicose L^{-1})	1 a 8 horas	2,15 (pneu triturado) 1,87 (PET)	2 horas	Barros <i>et al.</i> (2011)
Reator anaeróbio fluidificado	Glicose (2 g glicose L ⁻¹)	1 a 8 horas	2,29 (argila expandida) 0.12 (argila	2 horas	Shida <i>et al.</i> (2009)
Reator anaeróbio de leito fixo	Sacarose (17,8 g sacarose L ⁻¹)	0,5 a 5 horas	$\begin{array}{c} \text{(alglia)} \\ \text{(b)} \\ \text{(b)}$	1 hora (argila expandida) 2 horas (carvão ativado)	Chang <i>et al.</i> (2002)
Reator anaeróbio de leito fixo	Sacarose $(0,89 \text{ g sacarose} \text{ L}^{-1})$	0,5 e 2 horas	4,44 (argila expandida), 4,52 (carvão vegetal) e 4,38(polirtileno)	0,5 hora (todos os materiais suportes testados)	Fernandes (2008)
Reator anaeróbio de leito fixo	Sacarose (10,0g sacarose L ⁻¹)	1,5 a 24 horas	6,00 (anéis de cerâmica) e 5,80 (pedra pomes)	1,5 hora (anéis de cerâmica) 3horas (pedra pumes)	Keskin <i>et al.</i> (2011)

Tabela 3.1: Levantamento dos diferentes configurações de reatores e TDHs utilizados na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias.

3.2.2 Influência da Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes, pois influencia as atividades dos microrganismos, inclusive das bactérias produtoras de hidrogênio. Diversos trabalhos têm sido realizados e têm demonstrado que há uma determinada faixa de temperatura entre 25°C e 60°C em que se nota alta capacidade das bactérias produtoras de hidrogênio em produzir este gás por meio da fermentação. No entanto, quando as temperaturas são elevadas pode ocorrer um decréscimo na produção (WANG & WAN, 2009).

Wang e Wan (2008b) estudaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio em reatores em batelada inoculados com lodo de decantador primário de uma estação de tratamento de esgoto sanitário de Pequim (China) e relataram que, quando a temperatura aumentou de 20°C para 40°C, houve aumento na eficiência da degradação de substrato e da vazão de hidrogênio. Neste estudo, os valores máximos destes parâmetros foram obtidos a 40°C e foram, respectivamente, 98,1% e 31,9 mL H₂ h⁻¹. Porém, quando a temperatura foi novamente aumentada de 40°C para 55°C, verificou-se uma queda observando-se os seguintes valores a 55°C: 40% na degradação de substrato e 5 mL H₂ h⁻¹ na vazão de hidrogênio.

Lee *et al.* (2006) investigaram os efeitos da temperatura e do tempo de detenção hidráulica (TDH) e concluíram que, em geral, a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e o rendimento de hidrogênio tendem a aumentar quando há um aumento da temperatura de operação de 30°C para 40°C e eles tendem a diminuir quando a temperatura varia de 40 para 45°C. Neste trabalho, a 30°C e TDH de 1 hora, os valores da porcentagem de hidrogênio no biogás, a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e o rendimento foram, respectivamente, de 38%, 3,34 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ e 2,91 mol H₂ mol⁻¹ sacarose; para 40°C de 41%, 4,75 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ e 3,88 mol H₂ mol⁻¹ sacarose; e para 45°C de 35%, 3,61 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ e 2,99 mol H₂ mol⁻¹ sacarose.

Zhang e Shen (2006) observaram que na faixa de temperatura entre 25°C e 40°C ocorrem às melhores eficiências do processo, principalmente devido à condição próxima da ideal (35°C) do funcionamento dos catalisadores bioquímicos. Nesse trabalho, a máxima porcentagem obtida de hidrogênio no biogás foi de 42,9%, obtida a 40°C em um reator em batelada de 120 mL de volume útil.

Gavala *et al.* (2006) estudaram dois reatores contínuo de mistura completa, um a 35°C e outro a 55°C e observaram que o rendimento da produção de hidrogênio e a produção volumétrica de hidrogênio especifica foram maiores em condições termofilicas do que em condições mesofilicas. Os pesquisadores obtiveram a produção volumétrica de hidrogênio

especifica de cerca de 100 mmol H_2 h⁻¹ L⁻¹ g⁻¹ SSV a 55°C e de 15 mmol H_2 h⁻¹ L⁻¹ g⁻¹ SSV a 35°C, devido a baixa produção de biomassa em condições termofilicas para o TDH de 6 horas. O rendimento para o mesmo TDH foi de 2,1 mol H_2 mol⁻¹ glicose e 1,5 mol H_2 mol⁻¹ glicose para a condição termofílica e mesofilica, respectivamente.

O hidrogênio é um gás que apresenta baixa solubilidade em ambiente aquoso. Segundo Guwy *et al.* (1997), a solubilidade do hidrogênio é 0,017 mL H₂ mL⁻¹ de água a 1 bar e 37°C. Considerando a Lei de Henry, no qual a solubilidade é proporcional a pressão parcial do líquido, quando maior for a temperatura, menor será a solubilidade do hidrogênio. Consequentemente, menor será a interação dos microrganismos presentes no reator, desfavorecendo as rotas que consomem o hidrogênio produzido, como a metanogênica hidrtogenotrófica e a homoacteogênese (HAWKES *et al.*, 2002).

3.2.3 Influência do substrato

A maioria dos trabalhos tem utilizado como afluente dos reatores acidogênicos, substratos sintéticos que contêm sacarose ou glicose como fonte de carbono orgânico e meio inorgânico constituído por macro e micronutrientes (WANG & WAN, 2009).

Diferentes águas residuárias estão sendo utilizadas como substrato para a produção biológica de hidrogênio, como, efluentes da industria alimentícia e da produção de biocombustíveis (PEIXOTO *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2010).

van Ginkel *et al.* (2005), ao estudar a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias domésticas e de processamento de alimentos, realizaram análises preliminares para determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal (NH₃-N) e fósforo ($PO_4^{3^-}$). Os resultados indicaram que esses nutrientes seriam limitantes na maior parte das águas residuárias para a atividade dos microrganismos em sistemas de tratamento. Os autores

avaliaram, também, o potencial para a produção de hidrogênio de cada água residuária com e sem a adição de nutrientes (N, P e elementos traço). Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a água residuária de indústria de balas, cuja DQO era de 20 g L^{-1} , apresentou aumento do rendimento de hidrogênio de 0,02 para 0,10 L H₂ g⁻¹ de DQO com a adição de nutrientes. Entretanto, essa mesma água residuária com DQO de 0,6 g L^{-1} , não apresentou diferença na produção de hidrogênio mesmo com a adição de nutrientes.

Deve-se observar que não é só importante a presença de nutrientes, mas a proporção na qual estão disponíveis. De acordo com Lin e Lay (2004), a razão entre carbono e nitrogênio pode influir significativamente na composição do biogás e na velocidade de produção do hidrogênio.

No trabalho desenvolvido pelos referidos autores, no qual a fonte de carbono era sacarose, foram testadas diferentes relações C/N iguais a, 40, 47, 98 e 130. Lin e Lay (2004) encontraram a razão C/N igual a 47 como sendo ótima para a máxima produção de hidrogênio obtendo o pico de rendimento de 4,8 mol H_2 mol⁻¹ sacarose e de produção volumétrica de hidrogênio (HPR) de 270 mmol H_2 L⁻¹ d⁻¹. Quando se comparou essa relação C/N com o controle, percebeu-se que houve um aumento de 500% e 80%, respectivamente, no rendimento de hidrogênio e na produção volumétrica de hidrogênio (HPR). Comparando com as outras relações C/N de 40 e 98, os pesquisadores observaram redução de 55% no rendimento e que a HPR não foi afetada para relação C/N igual a 98; porém, quando operado com C/N igual a 40, a HPR diminuiu em 80%.

Anzola-Rojas (2010) estudou a relação entre carbono e nitrogênio de 40, 90, 140 e 190 para a produção de hidrogênio em reatores de leito fixo e fluxo ascendente. Por ajuste de uma função, encontrou uma relação ótima para a produção de hidrogênio igual a 137, que resultaria em um rendimento de 3,5 mol H_2 mol⁻¹ sacarose. Além disso, percebeu-se que sob

excesso de nitrogênio o crescimento da biomassa ocorre com uma maior velocidade apresentando efeitos negativos sobre a produção de hidrogênio, enquanto a carência de nitrogênio permite o controle do crescimento da biomassa e um maior rendimento de hidrogênio.

3.2.4 Influência do pH

O potencial hidrogeniônico (pH) é outro importante fator que influencia a síntese de hidrogênio nos sistemas biológicos, pois o pH pode afetar tanto a atividade da hidrogenase quanto as rotas metabólicas. Estudos têm demonstrado que há uma faixa apropriada de pH entre 4,0 e 7,0 para a obtenção de hidrogênio. Quando se eleva o pH de 2,0 para próximo de 7,0 pode se notar aumento da capacidade das bactérias produtoras de hidrogênio. No entanto, valores elevados de pH entre 10 e 14 podem diminuir a produção (WANG; WAN, 2009).

Mu *et al.* (2006) operaram um reator UASB em diferentes faixas de pH usando sacarose como única fonte de carbono, variando de 3,4 a 6,3, e observaram que a pressão parcial do hidrogênio, a velocidade de produção de hidrogênio, o rendimento de hidrogênio e a distribuição dos metabólitos do processo fermentativo de produção de hidrogênio são dependentes do valor do pH. Em pH igual a 3,4, foi encontrado o maior valor da pressão parcial de hidrogênio, que foi de 5,2 10⁴ Pa, e com o aumento do pH para 6,3, houve uma redução na pressão parcial para 2,8 10^4 Pa. A produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 61 para 145 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹, quando o pH passou de 3,4 para 4,2; no entanto, este parâmetro diminuiu para 89 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹, quando o pH foi aumentado para 6,3. O rendimento de hidrogênio teve um comportamento similar ao observado para a produção volumétrica de hidrogênio. Quando o pH foi incrementado de 3,4 para 4,2, o rendimento aumentou de 0,68 mol H₂ mol⁻¹ glicose para 1,61 mol H₂ mol glicose⁻¹ e depois diminuiu para 1,00 mol H₂ mol⁻¹ glicose quando o pH atingiu o valor de 6,3. Zhao e Yu (2008) avaliaram o efeito do pH na produção anaeróbia de hidrogênio em reator UASB tratando água residuária sintética a base de sacarose com concentração de 10 g L⁻¹ e chegaram às mesmas conclusões de Mu *et al* (2006), porém com valores de pH diferentes. A máxima pressão parcial de hidrogênio no biogás foi de 0,52 atm (5,2 10⁴ Pa) obtida quando o pH era mantido em 7,5 e a menor foi de 0,22 atm (2,2 10⁴ Pa) quando o pH era de 8,0. A produção volumétrica de hidrogênio (HPR) aumentou de 106 para 144 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹ quando o pH foi aumentado de 6,1 para 7,0, porém diminuiu para 89 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹ quando o pH foi de 8,0. Quando o pH subiu para 9,0, HPR voltou novamente a subir para 137 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹ e desceu novamente para 65 mL L⁻¹ h⁻¹ quando acrescentou-se 0,5 no pH, atingindo o valor de 9,5. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de algumas bactérias produtoras de hidrogênio que preferem ambiente alcalino, pH maior que 8,0, para o seu desenvolvimento, como *Eubacterium multiforme* e *Penibacillus polymyxa*, que são capazes de crescer bem em uma faixa de pH entre 9,0 e 9,5, mas estão inativas em pH inferior a 6,0 (Cai *et al.*, 2004).

Lee *et al.* (2008) estudou o efeito do pH usando água residuária de uma cozinha vegetariana com concentração de DQO de aproximadamente de 30 g L⁻¹ para a produção de hidrogênio em condições termofílicas, a 55°C, e observaram que quando o pH do afluente foi mantido em 5,5 não houve produção de hidrogênio, mas quando o pH foi controlado em 6,0, 6,5 e 7,0 foi observado o predomínio da fermentação através da formação do ácido butírico. A maior produção volumética especifica de hidrogênio foi de 0,48 mmol H₂ g⁻¹ SSV h⁻¹ quando o pH foi mantido em 6,0, e o maior rendimento foi de 0,57 mmol H₂ g⁻¹ DQO em pH 7,0.

Fang e Liu (2002) constataram que a velocidade de produção de hidrogênio e a ação dos microrganismos hidrogenotróficos são afetadas pelo pH. O trabalho desenvolvido pelos autores consistiu na operação de um reator anaeróbio em batelada aplicado à degradação de glicose com concentração inicial de 7,0 g L^{-1} sob pH igual a 5,5. Durante o período experimental não houve consumo de hidrogênio por arqueias metanogênicas para a produção de metano.

Hwang *et al.* (2009) estudaram a influência da concentração do sulfato e do pH na produção de hidrogênio usando, como substrato glicose com concentração de 15 g L⁻¹ em termos de DQO e obtiveram a melhor vazão de hidrogênio no mesmo valor de pH encontrado por Fang e Liu (2002), de 5,5, sendo o melhor valor de 5,4 L H₂ dia⁻¹. Quando o pH passou de 5,5 para 6,2, observou-se a diminuição na vazão de hidrogênio de 5,4 para 4,5 L H₂ dia⁻¹.

van Ginkel *et al.* (2001) estudaram a variação da concentração inicial de substrato e do pH em reatores em batelada para a produção de hidrogênio. A sacarose foi utilizada como substrato e a concentração variou entre 0,5 e 44,8 g L⁻¹ em termos de DQO. A maior produção volumétrica de hidrogênio foi 74 mL L⁻¹ h⁻¹ em pH 5,5 e concentração de substrato de 7,5 g DQO L⁻¹ com eficiência de conversão de 38,9%. O maior rendimento de hidrogênio foi de 4,9 mol H_2 mol⁻¹ sacarose em pH 5,5.

A literatura apresenta que o pH ótimo para produção de hidrogênio está na faixa entre 5,0 e 6,5 (FANG *et al.*, 2002; LIN & CHANG, 2004), porém há trabalhos que fixam o valor de 5,5 como o único ótimo (FANG & LIU, 2002; MU *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2007). Entretanto, segundo Lay *et al.* (1999), vale ressaltar que valores de pH inferiores a 4,5 são desfavoráveis à produção de hidrogênio, pois pode ocorrer a inibição da atividade da hidrogenase e de outras enzimas importantes e a consequente alteração das rotas metabólicas envolvidas no processo de produção de hidrogênio.

3.2.5 Influência dos microrganismos

As bactérias produtoras de hidrogênio podem ser encontradas amplamente em ambientes naturais, como no solo e em lodos de estações de tratamento de águas residuárias que utilizam a tecnologia anaeróbia. Desta forma, estes podem ser usados como os principais inóculos dos reatores anaeróbios que visam à produção de hidrogênio (WANG & WAN, 2009).
Os processos fermentativos que utilizam consórcios microbianos apresentam vantagens quando comparados com os que operam com culturas puras, pois a operação dos primeiros é mais simples, o controle do processo é mais fácil e pode-se utilizar ampla fonte de substrato, ao contrário das culturas puras, que apresentam uma faixa restrita de substrato. Porém, em um processo fermentativo com consócio microbiano, o hidrogênio produzido pelos microrganismos pode ser consumido pelas bactérias consumidoras de hidrogênio, podendo reduzir as velocidades de obtenção de hidrogênio (HUNG *et al.*, 2011).

Para reduzir a influência das bactérias consumidoras de hidrogênio, os inóculos de cultura mista podem sofrer um pré-tratamento por certos métodos, com o objetivo de selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio. Entre os métodos de pré-tratamento do inóculo pode-se citar o choque térmico, a aeração, o congelamento e descongelamento, a adição de ácido ou de base e a adição de clorofórmio (WANG & WAN, 2009).

Entretanto, como está apresentado na Tabela 3.2, existe divergência sobre o método de pré-tratamento ideal para a seleção das bactérias produtoras de hidrogênio a partir de consórcio microbiano. A possível justificativa para essa discordância é a diferença entre esses estudos em termos do inóculo, do método de pré-tratamento estudado, das condições específicas de cada método de pré-tratamento e do tipo de substrato.

O pré-tratamento térmico do inóculo seleciona os microrganismos formadores de endósporos, pois sob elevadas temperaturas somente esses sobrevivem, enquanto, os microrganismos não formadores de endósporos, como as arqueias metanogênicas, serão eliminados ou inibidos. Desta forma, o pré-tratamento térmico do inóculo favorece as bactérias produtoras de hidrogênio já que elimina ou inibe as bactérias consumidoras de hidrogênio e as arqueias metanogênicas.

Inóculo	Método de pré- tratamento estudado	Substrato	Tipo de reator	Rendimento máximo de hidrogênio (mol H_2 mol ⁻¹ de substrato)	Pré-tratamento ótimo	Referência
Lodo estabilizado	Ácido, básico, choque térmico, aeração e clorofórmio	Glicose	Batelada	1,8	Choque térmico	Wang; Wan (2008a)
Esterco bovino	Congelamento e descongelamento, ácido, choque térmico e 2- bromoetanosulfona to de sódio	Glicose	Batelada	1,0	Ácido	Cheong; Hassen (2006)
Granulo metanogênico	Ácido, choque- térmico e clorofórmio	Glicose	Batelada	1,2	Clorofórmio	Hu; Chen (2007)
Lodo de digestor	Básico, ácido 2- bromoetano sulfônico e iodopropano	Sacarose	Batelada	6,12	Base	Zhu; Béland (2006)
Lodo anaeróbio	2-bromoetano sulfonato de sódio, ácido, choque- térmico e quatro combinações	Água residuária	Batelada	0,0317 mmol $H_2 g^{-1}$ DQO	2- bromoetanosulfo nato de sódio	Mohan <i>et</i> <i>al.</i> (2008)
Lodo de decantador secundário	Choque térmico, reaeração, ácido e básico	Glicose	Batelada	1,96	Reaeração	Ren <i>et al.</i> (2008)
Lodo granular anaeróbio de UASB	Choque térmico, clorofórmio, ácido, básico e choque físico	Vinhaça da produção de etanol a partir de mandioca	Batelada	$^{65,3}_{mL H_2 g^{-1} SSV}$	Nenhum	Luo <i>et al.</i> (2010)
Lodo granular anaeróbio de UASB	Choque térmico, clorofórmio, ácido, básico e choque físico	Vinhaça da produção de etanol a partir de mandioca	Mistura Completa (CSTR)	52,9 mL H ₂ g ⁻¹ SSV	Nenhum	Luo <i>et al.</i> (2010)
Lodo anaeróbio de UASB	Choque térmico, ácido e básico	Sacarose	Batelada	2,00	Térmico	Mu <i>et al.</i> (2007)

Tabela 3.2: Levantamento de trabalhos já realizados com pré-tratamento de inóculo.

Assim como o pré-tratamento térmico, o pré-tratamento ácido do inóculo seleciona os microrganismos produtores de hidrogênio por meio da formação de endósporos em condições ambientais adversas. Assim, as bactérias produtoras de hidrogênio que formam endósporos são favorecidas enquanto as bactérias consumidoras de hidrogênio e as arqueias metanogênicas são inibidas ou eliminadas, pois são microrganismos não formadores de endósporos.

Fernandes (2008), que utilizou o processo da autofermentação para inoculação do reator para a produção de hidrogênio, observou que as principais bactérias produtoras de hidrogênio são pertencentes aos gêneros *Enterobacter sp.* e *Clostridium sp.* As primeiras são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas e responsáveis pela produção de hidrogênio a partir de carboidratos como fonte de carbono; e as *Clostridium sp.* são bactérias Gram-negativas, formadoras de esporos, estritamente anaeróbias e são os microrganismos dominantes em sistemas de produção de hidrogênio com baixo tempo de detenção hidráulica.

Amorim *et al.* (2009) aplicaram o pré-tratamento térmico, 90°C por 10 min, no lodo de suinocultura para inativar as bactérias consumidoras de hidrogênio e selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio, como *Clostridium sp* e *Baccillus sp*, para a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado, no qual o material suporte era argila expandida. No final da operação, os autores concluíram que o pré-tratamento do inóculo e o baixo valor do pH foram ferramentas eficientes na prevenção do desenvolvimento da população formadora de metano.

Shida *et al.* (2009); Barros *et al.* (2010) e Barros *et al.* (2011) aplicaram o mesmo processo de pré-tratamento térmico no mesmo inóculo que Amorim *et al.* (2009) e observaram que o biogás era composto exclusivamente de hidrogênio e gás carbônico.

Kawagoshi *et al.* (2005) trabalharam com seis tipos de inóculo (lodo de uma estação de tratamento de águas residuárias de lodos ativados, lodo digerido anaerobiamente, solo de plantação de melancia, solo de pomar de kiwi, sedimentos de lago e composto aeróbio) e dois métodos de pré-tratamento do inóculo (choque térmico e choque ácido) para a produção biológica de hidrogênio em reatores em batelada e observaram que os melhores resultados foram obtidos com o inóculo de lodo digerido anaerobiamente pré-tratado com choque térmico obtendo rendimento de hidrogênio de 1,35 mol H₂ mol⁻¹ de glicose.

Além disso, os autores notaram que em alguns casos o condicionamento do inóculo pode afetar negativamente a produção de hidrogênio, como aconteceu com os sedimentos de lago que sofreram pré-tratamento térmico e ácido que apresentaram menor produção de hidrogênio do que o mesmo inóculo sem o pré-tratamento. Os rendimentos de hidrogênio para o inóculo sem o pré-tratamento, para o tratado com choque térmico e para o submetido ao tratamento ácido foram, respectivamente, de 0,9; 0,6 e 0,7 mol H₂ mol⁻¹ de glicose.

Danko *et al.* (2008) estudaram dois inóculos, um lodo suspenso e outro granular, e dois tipos de pré-tratamento (ácido 2-bromoetanosulfônico e autoclave) e observaram que o pré-tratamento com o ácido 2-bromoetanosulfônico apresentou melhores resultados para a produção de hidrogênio, chegando em alguns casos a atingir o triplo da produção volumétrica do que o observado no processo de pré-tratamento térmico. Comparando os dois inóculos, os autores notaram diferenças de metabólitos. Nos reatores inoculados com lodo suspenso, houve a predominância do ácido acético e para os reatores inoculados com lodo granular, o ácido butírico foi o ácido que apresentou a maior porcentagem do total de ácidos orgânicos.

Sá (2011) avaliou os pré-tratamentos ácido, térmico e alcalino em um lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto sanitário do Rio de Janeiro para a produção de biohidrogênio em reatores batelada. O maior rendimento ao longo das 120 horas de duração do experimento foi de 4,62 mol H_2 mol⁻¹ de sacarose obtido no experimento com inóculo com o pré-tratamento térmico. No entanto, após o ápice, o rendimento diminuiu. Este fato também foi observado nos reatores inoculados sem pré-tratamento e com pré-tratamento alcalino. Para o tratamento ácido esse comportamento não foi observado, pois o pré-tratamento ácido foi mais efetivo em inibir os microrganismos consumidores de hidrogênio e não apresentou a queda do rendimento de hidrogênio.

Alguns métodos de análises microbiológicas, como PCR-DGGE, têm sido usados para determinar a estrutura da comunidade microbiana durante a produção de hidrogênio. Estes

podem ser usados para detectar alterações na estrutura da comunidade após o pré-tratamento, como foi observado por Ren *et al* (2008), que relataram alterações da comunidade microbiana e do tipo de processo fermentativo predominante. Nos reatores com inóculos que sofreram o pré-tratamento térmico e alcalino, observou-se a predominância da fermentação do ácido butírico, entretanto os reatores inoculados com lodo que sofreu o pré-tratamento ácido e com o lodo sem pré-tratamento apresentaram um sistema de fermentação mista e para o reator operado com inóculo que sofreu o tratamento de reaeração, houve a predominância da fermentação de etanol.

3.3 Avanços do grupo de pesquisa

As pesquisas que visam à produção biológica de hidrogênio são recentes no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP) são recentes, sendo este laboratório um dos pioneiros no Brasil a abordarem o tema.

Os primeiros trabalhos concluídos neste grupo de pesquisa que tinham o objetivo de produzir hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária foram Fernandes (2008) e Peixoto (2008).

Fernandes (2008) avaliou a produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo avaliando a influência do material suporte e do tempo de detenção hidráulico (TDH). Os resultados obtidos mostraram que o material suporte (argila expandida, carvão vegetal e polietileno) não influencia a produção biológica de hidrogênio visto que os rendimentos de hidrogênio médio foram semelhantes para todos os materiais testados, próximo a 4,4 mol H_2 mol⁻¹ sacarose para 0,5 hora e 3,3 mol H_2 mol⁻¹ sacarose para 2,0 horas.

Desta forma, optou-se por utilizar aparas de polietileno de baixa densidade nos trabalhos subsequentes, por ser um material suporte de baixo custo e ser viável em larga escala.

Com relação ao TDH aplicado, Fernandes (2008) estudou TDH de 0,5 e 2 horas e concluiu que o uso de 0,5 horas aumentou o rendimento de produção de hidrogênio, no entanto diminuiu relação entre a produção volumétrica de hidrogênio obtida e a máxima teórica e a conversão de substrato. Estes parâmetros de monitoramento para o polietileno foram em média 70% e 84% para 2,0 horas e 38% e 59% para 0,5 horas, respectivamente. Portanto, o TDH de 2,0 horas foi escolhido para ser utilizado nos demais trabalhos do grupo.

Peixoto (2008) aplicou o reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente no tratamento de água residuária de indústria de refrigerante para a produção biológica de hidrogênio. Este trabalho comparou dois reatores um no qual houve adição de macro e micronutrientes e outro que foi operado sem a adição destes e concluiu que a adição dos nutrientes apresentou efeito negativo sob a produção biológica de hidrogênio: o rendimento de hidrogênio máximo foi de 4,2 mol H_2 mol⁻¹ carboidratos para o reator sem adição de nutrientes.

Fernandes *et al.* (2010) avaliaram a potencialidade do uso de efluentes reais na produção biológica de hidrogênio usando esgoto doméstico, vinhaça da indústria sucroalcooleira e glicerol que é efluente da produção de biodiesel. A vinhaça foi o substrato que apresentou o melhor potencial para a produção biológica de hidrogênio.

Anzola-Rojas (2010) estudou a influência da relação carbono e nitrogênio (C:N) na produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente utilizando efluente sintético a base de sacarose com 2000 mg L⁻¹ de concentração de DQO (1780 mg L⁻¹ de sacarose). As relações C:N avaliadas foram 40, 90,140 e 190, calculados a partir da quantidade de átomos de carbono e nitrogênio.

A partir dos valores máximos de rendimento de hidrogênio obtidos em cada situação estudada, uma função foi ajustada e encontrou-se a relação ótima igual a 137, para a produção de hidrogênio resultando em um rendimento de 3,5 mol H_2 mol⁻¹ sacarose. Além disso, percebeu-se que quando aplicada baixas relações de carbono e nitrogênio o crescimento microbiano ocorre de maneira mais rápida diminuindo a produção de hidrogênio; enquanto em altas relações há maior controle do crescimento de biomassa e maior rendimento de hidrogênio.

Neste trabalho desenvolvido por Anzolas-Rojas, foi observada uma queda na produção biológica de hidrogênio após se atingir o ápice, em algumas relações testadas, a produção do biogás chegou a cessar completamente durante os 60 dias de operação. Esta instabilidade foi explicada pela presença de bactérias hidrogênio-oxidante e pela dificuldade da transferência de massa entre a fase líquida e o biofilme e a fase líquida e fase gasosa.

Neste contexto, Lima (2011) estudou a influência da razão de recirculação na produção biológica em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente analisando a razão de recirculação de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0. Os reatores anaeróbios foram alimentados com água residuária sintética base de sacarose com 2000 mg L⁻¹ de concentração de DQO (1780 mg L⁻¹ de sacarose) e relação C:N igual a 140.

O reator com o melhor desempenho tanto na conversão do substrato quanto no rendimento de hidrogênio foi o operado com razão de recirculação de 0,5: 79% de eficiência de conversão de carboidratos e 1,43 mol H_2 mol⁻¹ sacarose. A partir dos valores máximos de rendimento de hidrogênio obtidos em cada situação, foi ajustada uma função que encontrou a razão de recirculação ótima igual a 0,6, para a produção de hidrogênio resultando em um rendimento máximo de 4,2 mol H_2 mol⁻¹ sacarose e produção volumétrica de hidrogênio de 128,13 mL H_2 h⁻¹ L⁻¹.

Lima (2011) também verificou instabilidade na produção biológica de hidrogênio e verificou-se que a mesma justificativa apresentada por Anzola-Rojas (2010), da presença de bactérias consumidoras de hidrogênio, explicava essa oscilação.

3.4 Considerações finais

O gás hidrogênio obtido pela fermentação biológica a partir de águas residuárias se apresenta como um carreador de energia vantajoso do ponto de vista ambiental, visto que seu uso em células combustíveis pode gerar energia elétrica tendo como produtos finais calor e vapor de água. Além disso, caso seja utilizada água residuárias para sua geração, apresentará ampla disponibilidade a baixo custo e minimizará o passivo ambiental causado pelos lançamentos de efluentes tornando o processo mais atrativo economicamente e ambientalmente amigável.

Na literatura, a maioria dos trabalhos disponíveis que abordam a origem e o prétratamento do inóculo usam reatores em bateladas típicas, não analisando a produção contínua de hidrogênio. Além disso, não há consenso em relação qual é a melhor técnica de prétratamento aplicado ao inóculo. Assim, seguindo a linha de pesquisa de bioenergia realizada no Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (LPB-EESC-USP), o objetivo deste trabalho foi aplicar diferentes inóculos e diferentes técnicas de pré-tratamento para avaliar qual o mais eficiente na produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo visto que há poucos relatos do uso dessas técnicas em reatores contínuos.

4 Material e métodos

4.1 Desenvolvimento de método para determinação de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A produção biológica de hidrogênio a partir de efluentes ricos em carboidratos é atrativa por ser menos intensiva em energia e ser realizado em temperatura e pressão ambiente, de maneira mais segura (WANG & WAN, 2009). O hidrogênio é produzido através de um processo fermentativo que gera diversos metabólitos, dentre estes se destacam os ácidos orgânicos e os álcoois.

Diversas pesquisas usam métodos separados para análises de álcoois, ácidos e carboidratos. No Laboratório de Processos Biológicos, usa-se o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) para a determinação de carboidratos totais; a metodologia da cromatografia gasosa de *"headspace"* desenvolvida por Maintinguer *et al.*(2008) para a determinação dos álcoois e acetona; e a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de onze ácidos orgânicos de cadeia curta desenvolvida por Lazaro (2009).

Com o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência, é conveniente analisar ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos usando o método de "all-in-one" (do inglês, tudo em um) baseados nas colunas cromatográficas de resinas de troca iônica. (SCARLATA; HYMAN, 2010).

Essas resinas são versáteis, determinando diversos componentes orgânicos. Pecina *et. al.* (1984) publicaram um trabalho no qual avaliavam 63 componentes em 5 temperaturas e dois fluxos em uma coluna de troca iônica (AMINEX[®] HPX-87H, BioRad). Esses pesquisadores identificaram as melhores temperaturas de operação da coluna para a separação de álcoois, formaldeídos, ácidos e carboidratos, que era em torno de 40 a 60°C.

Além disso, outro beneficio destas colunas é que as condições dos métodos são simples e convenientes, consistindo de uma solução diluída de ácido sulfúrico que é o eluente iscocrático e os compostos são detectados através do índice de refração. (SCARLATA; HYMAN, 2010).

Desta forma, visando aperfeiçoar as análises através da inclusão de todos estes componentes em uma única metodologia e de diminuir os resíduos gerados, implementando as ideias de sustentabilidade e de química verde, foi desenvolvida metodologia que consiste em determinar álcoois, ácidos orgânicos e carboidratos em uma única corrida.

4.1.1 Instrumentação e condição analítica

Usou-se um sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) SHIMADZU[®] equipado com bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20A HT, forno CT-20A, dois detectores ligados em série: um detector de ultravioleta (UV) com arranjo de diodos do modelo SDP-M10 AVP, um detector por índice de refração RID-10A; além do controlador SCL-10AVP. A coluna utilizada foi AMINEX[®] HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; BioRad) e o software Class-VP (SHIMADZU[®]) para analisar os resultados. A Figura 4.1 apresenta o sistema cromatográfico utilizado para o desenvolvimento desta metodologia.



Figura 4.1: Fotografia do sistema cromatográfico utilizado no desenvolvimento da metodologia para determinação e quantificação de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos.

Os ácidos foram detectados pelo detector SDP-M10 AVP e os demais compostos (carboidratos e álcoois) pelo detector RID-10A.

Como fase móvel (FM) usou-se solução de ácido sulfúrico 0,005 M baseado na metodologia descrita por Vonach *et al.* (1998), que utilizaram a coluna analítica Inores[®] H (250mm x 7.8mm; Inovex,) para determinação de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos em vinhos.

As variáveis testadas foram temperatura do forno de 30°C a 65°C e fluxo do eluente, de 0,3 a 0,8 ml.min⁻¹.

4.1.2 Padrões cromatográficos

Foram estudados 8 carboidratos, 3 álcoois, acetona e 12 ácidos orgânicos. Os carboidratos utilizados foram: xilose, manose, celobiose, sacarose, galactose, frutose, glicose, L-arabinose. Os álcoois e acetona testados são os principais produtos da fermentação de

carboidratos para a produção de bioenergia: o metanol, etanol, n-butanol e a acetona. Os ácidos são os mesmos detectados pelo método descrito por Lazaro (2009): ácidos cítrico, málico, succiníco, lático, fórmico, acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico, valérico e capróico. Esses foram escolhidos como sendo os principais metabólitos possivelmente encontrados na produção de bionergia a partir de efluente sintético a base de sacarose, da vinhaça da cana de açúcar, do hidrolisado do bagaço da cana de açúcar e de materiais ricos em carboidratos complexos, como, o papel.

Os padrões cromatográficos dos ácidos (cítrico, málico, succiníco, fórmico, acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico e valérico; e capróico) e dos álcoois (etanol, n-butanol, metanol) apresentam 99% de pureza e foram obtidos da Sigma-Aldrich[®]. Os padrões da xilose, manose, galactose, L-arabinose (99% de pureza) foram adquiridos da empresa Vetec Química Fina[®]. Os outros padrões dos carboidratos (celobiose, sacarose, frutose, glicose) têm 99% de pureza e são da Synth[®]. O padrão do ácido lático (75% de pureza) foi obtido da Tecno-Lab[®].

O ácido sulfúrico foi obtido da JT Baker[®] com 99% de pureza e a água foi ultrapurificada em sistema Millipore Mili-Q[®].

4.1.3 Preparo das amostras

Em 2,0 mL da amostra a ser analisada adicionou-se 80 μ L de solução de ácido sulfúrico 1 N (2M) para que o pH da amostra fosse inferior a 2, já que este é a faixa de pH ideal para separação dos analitos na coluna utilizada (PECINA *et al.*, 1984). Em seguida, a solução a ser injetada foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μ m. No injetor automático, o volume injetado foi programado para 100 μ L.

26

4.1.4 Elaboração das curvas de calibração

4.1.4.1 Preparo das soluções estoques

As soluções estoques dos ácidos foram preparadas com concentrações de aproximadamente 20 g L⁻¹, diluídas em água ultra purificada. Os ácidos orgânicos pouco solúveis em água, como acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico, foram diluídos em água utrapurificada com adição de hidróxido de sódio, de acordo com a reação estequiométrica de neutralização de cada ácido. Essas soluções-estoque foram armazenadas em frascos plásticos e a -20°C até o seu uso. As soluções dos carboidratos e álcoois foram preparadas no mesmo dia de uso para evitar que elas se degradassem e/ou volatilizassem.

4.1.4.2 Curva de calibração

Para preparar as soluções dos pontos para a confecção da curva de calibração, preparou-se uma solução-mãe contendo todas as substâncias de interesse de concentração conhecida de aproximadamente 1000 mg L⁻¹, a partir das soluções estoque dos compostos individuais. A partir desta solução, foram retiradas alíquotas para fazer as soluções usadas na curva de calibração, diluídas em água ultrapurificada. Na Tabela 4.1 são mostrados os volumes da solução mãe utilizada para a concentração requerida na curva para um volume final de 5 mL.

3											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentração (mg L ⁻¹)	5,0	10,00	25,00	50,00	100,00	150,00	250,00	400,00	550,00	700,00	900,00
Volume da solução mãe (mL)	0,025	0,050	0,125	0,250	0,5000	0,750	1,250	2,0000	2,750	3,500	4,5000

Tabela 4.1: Volume da solução mãe utilizada na diluição para cada um dos pontos da curva de calibração

4.1.5 Validação do método

O método foi validado pela determinação de sua linearidade, precisão, precisão instrumental e limites de detecção e quantificação de acordo com Damasceno *et al.* (2008), Duarte *et al.* (2006) e Ribani *et al.* (2004).

4.1.5.1 Linearidade

A linearidade dos sinais aferidos e a concentração das substâncias analisadas foram avaliadas por meio da regressão linear. A avaliação da significância estatística da regressão foi feita realizando a Análise de Variância (Tabela 4.2) e pelos testes de ajuste ao modelo linear (ALM), validade de regressão (VR) e eficiência de regressão (ER) (Tabela 4.3) (CHUI *et al.*, 2001).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média quadrática
Total	$SQT = \sum \sum y_{ij}^2$	n	MQT = $^{SQT}/n$
Correção ("b")	$FC = n.y_{00}^2$	1	FC
Total Corrigido	$SQC = \sum \sum (y_{ij} - y_{00})^2$	n-1	MQC = $\frac{SQC}{n-1}$
Devido a regressão ("a")	$SQR = \sum (y_i - y_{00})^2$	1	MQR = SQR
Residual	$SQE = \sum \sum (y_{ij} - y_i)^2$	n-2	$MQE = \frac{MQE}{n-2}$
Erro puro	$SQEP = \sum \sum (y_{ij} - y_{i0})^2$	n- <i>m</i> _i	MQEP = $\frac{SQEP}{n - m_i}$
Falta de ajuste	$SQL = \sum (y_i - y_{i0})^2$	$m_i - 2$	MQL = $\frac{SQL}{m_i - 2}$
			Fonte: CHUI <i>et al.</i> , 2001.

Tabela 4.2: Médias quadráticas e grau de liberdade utilizados na análise da variância (Teste F).

n = número total de medições (33); m_i = numero de níveis com repetição de variável x (11); y_{ij} = valor da variável controlada; y_{00} = média de todos os valores de y; y_i = valor da variável controlada calculada pela equação obtida pela regressão; y_{io} = média das determinações repetidas no nível i; O índice "i" refere-se ao nível da variável independente x, o índice "j" refere-se às repetições feitas em cada nível de x. Nos casos SQR e SQL, os somatórios vão de i=1 até i=n. Nos casos de SQT, SQC, SQE, SQEP os primeiros somatórios vão de i=1 até i=n.

Tabela 4.3: Teste de linearidade e da eficiência de regressão.

Teste	F Crítico	F Obtido	Condição
Ajuste ao modelo linear (AML)	$F_{(mi-2;(n-mi);\frac{\alpha}{2})}$	MQL/MQEP	$F_{Crítico} < F_{Obtido}$
Validade da regressão (VR)	$F_{(1;(n-2);\frac{\alpha}{2})}$	MQR/MQE	$F_{Crítico} >> F_{Obtido}$
	Teste d	e eficiência	
Eficiência (r ²)		SQR/SQC	
Eficiência máxima (r _{max}	2)	(SQC-SQEP)/SQC	

Fonte: CHUI et al., 2001.

4.1.5.2 Precisão

A precisão do sistema foi expressa como o coeficiente de variação (CV %) dos tempos

de retenção de cada padrão nas diferentes concentrações dos pontos da curva de calibração.

4.1.5.3 Precisão Instrumental

A precisão instrumental do sistema foi expressa como o coeficiente de variação (CV %) dos tempos de retenção de nove injeções repetidas de solução padrão com concentração de 400 mg L^{-1} .

4.1.5.4 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção representa a menor quantidade de substância que pode ser detectada pelo método. O limite de quantificação (LOQ) representa a menor quantidade de substância que pode ser medida pelo método.

Há três maneiras diferentes de calcular esses critérios: método visual, método de relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Neste trabalho usou-se os parâmetros da curva analítica e as equações utilizadas são apresentadas a seguir:

$$LOD = 3.3 \times \frac{RMSE}{m}$$
(Equação 4.1)
$$LOQ = 10 \times \frac{RMSE}{m}$$
(Equação 4.2)

Em que:

RMSE: raiz quadrada do erro quadrático médio

m: inclinação da equação de regressão linear

4.2 Produção biológica de hidrogênio

4.2.1 Efluente sintético

Na Tabela 4.4, é apresentada a descrição da composição da água residuária sintética com Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 2000 mg L⁻¹ e relação C/N igual a 140

(calculada pela relação entre átomos de carbono e nitrogênio). Essa relação carbono e nitrogênio foi usada, pois é próxima a ideal para o máximo rendimento em reatores anaeróbios de leito fixo alimentado com água residuária a base de sacarose (ANZOLA-ROJAS, 2010).

Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	1781,24
Uréia (CH ₄ N ₂ O)	11,51
Óxido de selênio (SeO ₂)	0,036
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	5,36
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,3
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	2,76
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .6H ₂ O)	2,06
Sulfato de níquel (NiSO ₄ .6H ₂ O)	0,5
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,5
Cloreto férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,25
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂ .2H ₂ O)	0,04

Tabela 4.4: Caracterização do efluente sintético a ser utilizado.

Fonte: Del Nery (1987) adaptado.

Essa água residuária sintética serviu para alimentar o reator anaeróbio de fluxo ascendente que visava a produção de hidrogênio. Para ajustar o pH da água residuária sintética próximo a 6,5, utilizava-se 0,25 mL de HCl 12 M e 500 mg de bicarbonato de sódio por litro de meio.

4.2.2 Reator de leito fixo

Durante a realização da parte experimental foram operados reatores anaeróbios de leito fixo de fluxo ascendente, cada um com volume total de aproximadamente 3,7 L. Os reatores foram construídos em tubos de acrílico com diâmetro interno de 80 mm, diâmetro externo de 88 mm e 750 mm de comprimento (Figura 4.2).



Figura 4.2: Desenho do reator anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente, as unidades estão em mm.

Cada reator tinha três compartimentos: entrada de afluente, saída de efluente e leito; separados por telas de aço inox de 5 mm de abertura presas nas flanges do reator. Essas dimensões são semelhantes às reportadas nos trabalhos realizado no LPB-EESC-USP (FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010 e LIMA, 2011).

O comprimento do leito do reator era de 50 cm com cinco pontos de amostragem equidistantes para estudo de perfil espacial. A parte superior do leito era vedada para evitar possíveis vazamentos de gases. Além disso, nesta região foi alocado tubo em formato de "L"

com extremidade apontada para o sentido oposto do fluxo liquido gasoso pelo qual saía o efluente do reator.

Na Figura 4.3, o esquema da instalação experimental composta pelo reservatório do afluente, a bomba de alimentação, o reator anaeróbio com os pontos amostrais, o septo de coleta de amostra gasosa, a saída do efluente, o selo hídrico e o medidor de gás são apresentados. Além disso, a foto do reator anaeróbio é apresentada nesta mesma figura.



Figura 4.3: Aparato experimental para a produção de hidrogênio e a foto do reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente sem material suporte.

4.2.3 Meio suporte

Os reatores foram preenchidos com tiras de polietileno de baixa densidade, como aparas de usina de reciclagem de plástico que serviu como material suporte para adesão da biomassa de acordo com os trabalhos de Fernandes (2008); Peixoto (2008); Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011).

Foi realizado o ensaio de granulometria do material suporte no Departamento de Geotecnia da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. A massa da amostra de material suporte foi aferida e depois foram submetidas ao ensaio de peneiramento utilizando peneiras com as seguintes aberturas comerciais; 12,70 mm, 9,52 mm, 7,53mm, 6,35 mm, 5,66 mm, 4,76 mm, 3,36mm e 2,00 mm. O ensaio foi realizado em Agitador Solotest (nº 7, série 0805, Referência 1202230) com duração de 15 minutos e agitação constante. Finalizada essa etapa, a massa retida em cada uma das peneiras foi aferida e construiu-se a curva granulométrica.

O material suporte apresentou comportamento uniforme, com 80% de toda a massa utilizada no ensaio retida na peneira com abertura de 4,76 mm. O restante ficou entre as peneiras de abertura de 5,66 mm e 2,00 mm. A Figura 4.4 apresenta a fotografia do matéria suporte utilizado neste trabalho.



Figura 4.4: Fotografia do material suporte de polietileno de baixa densidade utilizado no leito do reator anaeróbio de leito fixo fluxo ascendente para produção biológica de hidrogênio.

A porosidade do leito foi medida no início de cada operação. O material suporte foi disposto dentro do leito e adicionou-se água. Do volume drenado descontou-se o volume dos compartimentos de entrada e saída e calculou-se a porosidade do leito que foi de aproximadamente 45% para todas as operações.

34

4.2.4 Inóculos dos reatores

Um dos reatores foi inoculado por meio do processo de fermentação natural de acordo com metodologia desenvolvida por Leite *et al.* (2008), sendo o controle do experimento, enquanto o outro foi inoculado com os diferentes lodos de reatores anaeróbios.

Foram utilizados os seguintes tipos de inóculos: lodo oriundo de reator anaeróbio de manta de lodo fluxo ascendente (UASB) aplicado ao tratamento de efluente de abatedouro de aves (Avícola Dacar S.A) sem pré-tratamento (D), com pré-tratamento térmico (DT) e com pré-tratamento ácido (DA) e lodo de um reator UASB aplicado ao tratamento de dejetos de suinocultura (Unesp-Jaboticabal) sem pré-tratamento (S), com pré-tratamento térmico (ST) e com pré-tratamento ácido (SA).

O pré-tratamento térmico do inóculo foi realizado para obtenção de culturas selecionadas de bactérias produtoras de hidrogênio por meio da metodologia do choque térmico, que consiste em levar uma amostra do inóculo para aquecimento a 90°C durante 10 minutos e depois resfriá-lo à temperatura ambiente em cinco minutos (KIM *et al.*, 2006a).

O pré-tratamento com ácido do inóculo foi realizado para obtenção de culturas selecionadas de bactérias produtoras de hidrogênio por meio do controle do pH, adicionando ácido clorídrico (HCl) com concentração de 1,0 mol L⁻¹ até que o pH se estabilizasse em 3,0, mantido nesse valor por 24 horas. Decorrido esse tempo, o pH era elevado a 6,98 com adição de hidróxido de sódio com concentração de 1,0 mol L⁻¹ (WANG & WAN, 2008a).

4.2.5 Operação dos reatores

O método de fermentação natural consistiu em fermentar por três dias a água residuária sintética. Depois, essa solução foi recirculada no reator pelo período de 5 dias para desenvolvimento da biomassa (LEITE *et al.*, 2008). Em seguida, o reator foi operado por um período de 60 dias.

O procedimento de inoculação dos outros reatores anaeróbios foi macerar o lodo anaeróbio, realizar o pré-tratamento como descrito no item 4.2.4. Depois disso, foi preparada uma solução na qual 10% do volume eram do lodo anaeróbio e o restante completado com a água residuária sintética. Essa solução foi recirculada nos reatores pelo período de cinco dias para que os microrganismos aderissem ao material suporte. Em seguida, o reator foi operado por um período de 60 dias. Na Tabela 4.5, os valores dos sólidos totais e sólidos totais voláteis iniciais de cada um dos inóculos de lodo anaeróbio estudados são apresentados.

Tabela 4.5: Concentração de sólidos totais e voláteis iniciaos de cada um dos inóculos de lodo anaeróbio estudados.

Inóculo	Sólidos Totais (g L ⁻¹)	Sólidos Totais Voláteis (g L ⁻¹)
D	50,7	41,1
DT	38,9	32,9
DA	46,7	35,3
S	47,1	35,2
ST	47,1	35,6
SA	42,4	26,7

Durante os sessenta (60) dias de operação, o reator foi operado em modo contínuo com temperatura controlada a 25°C por meio de câmara climatizada. O tempo de detenção hidráulica teórico (TDH) aplicado foi de 2 horas, conforme os trabalhos anteriormente realizados no LPB-EESC-USP (FERNANDES, 2008; PEIXOTO, 2008; ANZOLA-ROJAS, 2010 e LIMA, 2011). A vazão afluente de água residuária foi mantida constante em 21 mL min⁻¹.

No início, no meio e no final de cada fase da operação, isto é, após a recirculação, no 30° e 60° dia de operação, foram coletadas amostras de biomassa para serem analisadas utilizando as ferramentas da biologia molecular. Com as amostras de biomassas do início e do fim do período de operação, foram realizados ensaios de microscopia.

Os ensaios hidrodinâmicos foram realizados nos reatores sem biomassa e no final de cada operação, para analisar a mudança do escoamento. Além disso, após o término de cada

operação foi realizado o perfil espacial de algumas variáveis ao longo do reator para futuramente subsidiar o desenvolvimento de modelo matemático da produção biológica de hidrogênio. Na Figura 4.5, um esquema do procedimento experimental realizado neste trabalho é apresentado.



Figura 4.5: Esquema geral dos experimentos realizados.

4.2.6 Monitoramento das variáveis físico-químicas

Para fins de monitoramento, as análises das variáveis operacionais e a frequência são apresentadas na Tabela 4.6. Além disso, nesta mesma tabela, encontra-se o método utilizado.

Parâmetro	Freqüência	Metodologia
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	4 vezes por semana	Standard Methods (APHA, 2005)
рН	4 vezes por semana	Standard Methods (APHA, 2005)
Temperatura	Diário	Standard Methods (APHA, 2005)
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	2 vezes por semana	Standard Methods (APHA, 2005)
Sacarose	4 vezes por semana	Dubois <i>et al</i> (1956)
Produção de Biogás	4 vezes por semana	Medidor de gás MilliGas- counter da marca Ritter [®]
Composição do Biogás	4 vezes por semana	Cromatografia gasosa
Ácidos Voláteis	4 vezes por semana	Cromatografia Líquida
Álcoois	4 vezes por semana	Cromatografia Líquida

Tabela 4.6: Variáveis operacionais analisadas.

4.2.6.1 Medição volumétrica de biogás

O volume de biogás produzido foi quantificado utilizando-se o medidor de gás milligas-counter, da Ritter[®]. Os medidores estiveram acoplados durante todo o tempo de operação com o objetivo de manter a pressão dos reatores constante. Cada procedimento de medição da vazão volumétrica de biogás consistiu em anotar o volume do biogás quantificado pelo medidor durante um tempo definido.

4.2.6.2 Análise da composição do biogás

A composição do biogás gerada em cada reator foi avaliada por meio da retirada de amostra (200 μ L) do headspace dos reatores. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU[®], equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna CARBOXEN[®] 1010 plot 30 m X 0,53 mm, sendo o argônio o gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 230°C, respectivamente, e na coluna a temperatura foi 130°C com aquecimento de 46°C min⁻¹ até 135°C.

4.2.6.3 Análise de ácidos, álcoois e carboidratos

As análises de ácidos (cítrico, málico, succínico, lático, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), álcoois (metanol, etanol e n-butanol) e carboidratos (glicose e frutose) foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência usando a melhor condição operacional da metodologia desenvolvida no item 4.1, que foi de fluxo de eluente de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 43°C.

4.2.7 Avaliação microbiana

4.2.7.1 Análises microscópicas

As características morfológicas dos microrganismos foram observadas por microscopia de contraste de fase usando o microscópio OLYMPUS[®] modelo BX60-FLA equipado com o software Image Pro-Plus.

4.2.7.2 Avaliação da comunidade microbiana por PCR-DGGE

Várias metodologias são propostas para estudos que envolvem a ecologia microbiana de reatores biológicos. (PURDY *et al.*, 1996; GODON *et al.*, 1997; e GRIFFITHS *et al.* 2000). Para este trabalho, foi utilizado o protocolo de Griffiths *et al.* (2000) que consiste de três etapas:

Etapa 1 - Extração do DNA

Em tubos Falcon (15 mL), 0,5 g de biomassa foi agitada em vórtex com 5 mL de tampão PBS 1 X e centrifugada a 6000 giros (γ) por 10 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e repetido o procedimento por mais 2 vezes.

Após a etapa de lavagem das amostras, foi adicionado ao *pellet* 0,5 g de pérolas de vidro $(150 - 212 \ \mu \text{ m})$; 1 mL de tampão PBS (1X); 1 ml de fenol tamponado equilibrado com Tris; e 1 ml de clorofórmio, seguido de homogeneização, em vórtex, por 60 segundos e centrifugação a 6000 giros (γ) por 10 minutos a temperatura de 4°C.

Após centrifugação, foram transferidos aproximadamente 750 μ L do sobrenadante para um tubo eppendorf (1,5 mL) e adicionada a mesma quantidade de fenol. O tubo foi submetido à agitação em vórtex até a formação de uma emulsão e centrifugado sob as mesmas condições acima mencionadas.

O procedimento de transferência do sobrenadante foi repetido com os volumes de 500 e 300 μ L a fim de reduzir os contaminantes das amostras. Entretanto, ao invés de acrescentar a solução de fenol, foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Por fim, aproximadamente 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para outro tubo eppendorf, armazenado 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 nucleico homogeneizado a 2 μ L de loading dye. As condições de corrida da eletroforese foram 75 V constante por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi transferido para câmara de transiluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II) para observação dos resultados.

Etapa 2 - Amplificação pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

Na reação de amplificação para uma amostra (volume de 50 μ L) foram usadas as soluções apresentadas na Tabela 4.7, que formam o mix utilizado na PCR.

Reagente	Volume (µL)	
Água ultrapurificada	34,0	
Tampão PCR 10 X	5,0	
Cloreto de magnésio (MgCl2) 50 mM	1,5	
dNTP 2 mM	5,0	
Prmer forward (100 pmol/L)	1,0	
Primer reverse (100 pmol/L) 0	1,0	
Taq DNA polymerase (5 U/μL)	0,5	
Template (50 – 100 ng)	2,0	

Tabela 4.7: Solução para amplificação dos fragmentos específicos do ácido nucleico.

Os primers específicos para o domínio Bacteria foram o 968 FGC e 1401 R (NUBEL

et al., 1996).

Após preparação do "mix" as reações para amplificação do fragmento 16 S de DNAr

foram realizadas em termociclador, cuja programação encontra-se descrita na Tabela 4.8.

Tabela	4.8:	Programação	do	termociclador	para	amplificação	dos	fragmentos	de	ácidos
nucléic	os pe	la reação em ca	adei	a de polimerase	e (PCF	R)				

Condição da PCR para Domínio Bacteria					
Número de ciclos	30				
Desnaturação inicial	94°C durante 5 minutos				
Desnaturação	94°C durante 45 segundos				
Anelamento	94°C durante 45 segundos				
Extensão	72°C durante 1 minuto				
Final da extensão	72°C durante 1 minuto				
Resfriamento	4°C				

O produto da PCR foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,4% (m/v), conforme condições utilizadas para verificar a integridade e a concentração do DNA extraído usando a câmara de trans-iluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II).

Etapa 3 - Separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR utilizando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O gradiente do gel de poliacrilamida utilizado foi 40% - 60% para o domínio *Bacteria*. A composição da solução do gel encontra-se na Tabela 4.9.

First of First and First and See and See and See						
Solução	0%	40%	60%			
Bis-acrilamida 40% (mL)	20,0	20,0	20,0			
TAE 50 X (mL)	2,0	2,0	2,0			
Formamida (mL)	0,0	16,0	24,0			
Uréia (g)	0,0	8,4	25,2			

Tabela 4.9: Composição para o preparo de 100 mL do gel desnaturante.

Após preparação da solução do gel, foram montadas as placas de vidro e adicionado 100 μ L de APS e 10 μ L de *temed* a 14 mL da solução de poliacrilamida. Em seguida, as soluções de concentração 40% e 60% foram transferidas simultaneamente para o "sanduíche" por meio do aparelho injetor e, após 10 minutos, adicionada a solução do gel de 0% para formação dos "poços" com auxílio do "pente".

Após polimerização do gel, os "poços" foram lavados com a solução tampão da câmara eletroforética (7 litros de água ultra-purificada acrescida de 140 mL de TAE 50 X) e cada uma foi preenchida com 25 μ L do produto da PCR homogeneizado com 4 μ L de loading dye.

As condições da eletroforese foram 75 V por 16 horas a 65°C. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 15 minutos; lavado com água Milli-Q por 5 minutos; e exposto a 254 nm para foto documentação por meio da câmara de trans-iluminador UV (Stratagene – Eagle Eye II).

4.2.8 Ensaios hidrodinâmicos

Foram realizados estudos hidrodinâmicos, tanto nos reatores sem biomassa no inicio da operação quanto ao final de cada operação, para avaliar as mudanças nas características do padrão de escoamento com o acúmulo de biomassa. O TDH teórico aplicado foi de 2 h (obtido com uma vazão de 1,3 L.h⁻¹) e utilizou-se dextrana azul como traçador, o qual foi aplicado nos reatores na forma de pulso segundo a metodologia de Levenspiel (2000).

Nos ensaios abióticos, o reator foi alimentado com água do sistema público de abastecimento e foi dado um pulso de 50 mL de uma solução do traçador (concentração de 2,0 g L^{-1} de dextrana azul). As amostras foram coletadas na saída do reator de 3 em 3 minutos durante 4 h (2 vezes o TDH teórico) e depois foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm.

Nos ensaios após a operação, o reator foi alimentado com meio sintético e foi dado um pulso de 50 mL de uma solução do traçador (concentração de 2,0 g L⁻¹ de dextrana azul). As amostras foram coletadas na saída do reator de 3 em 3 minutos durante 4 h (2 vezes o TDH teórico), centrifugadas em 6000 giros (γ) por 90 segundos e depois foram lidas em espectrofotômetro.

Desta forma, foram obtidos os dados experimentais de concentração de dextrana azul, por meio de curva padrão de calibração no espectrofotômetro, permitindo a confecção da curva *C* (Concentração x Tempo). O TDH médio real foi determinado de acordo com a Equação 4.3 (Levenspiel, 2000).

$$\theta_h = \frac{\int_0^\infty t.C(t).dt}{\int_0^\infty C(t).dt}$$
(Equação 4.3)

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

A variância (δ^2) das curvas, que indica a dispersão da distribuição, foi calculada coma Equação 4.4 (Levenspiel, 2000).

$$\delta^2 = \frac{\int_0^\infty (t-\theta_h)^2 \mathcal{L}(t) dt}{\int_0^\infty \mathcal{L}(t) dt}$$
(Equação 4.4)

A partir do cálculo da variância adimensional (δ_{θ}^2) (Equação 4.5) utilizou-se o modelo de tanques de mistura completa em série e calculou-se o número de reatores (*N*) com a Equação 4.6 (Levenspiel, 2000).

$$\delta_{\theta}^{2} = \frac{\delta^{2}}{\theta_{h}^{2}}$$
(Equação 4.5)
$$N = \frac{1}{\delta_{\theta}^{2}}$$
(Equação 4.6)

4.2.9 Cálculos

De acordo com os resultados obtidos nas análises previamente descritas, utilizou-se o Microsoft Excel[®] para os cálculos da Equação 4.7 até a 4.16, valores máximos, valores médios e desvio padrão. Cada equação está apresentada com as respectivas unidades de medida.

$$Q[mL min^{-1}] = \frac{V}{\theta}$$
 (Equação 4.7)

Na qual, V o volume útil do reator e θ o tempo de detenção hidráulica teórico aplicado, 2 horas.

• Velocidade de conversão de sacarose (v_S) :

$$v_{S}[\text{mmol }h^{-1}] = \frac{Q \cdot (C_{So} - C_{Sf})}{MM_{S}}$$
(Equação 4.8)

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

• Vazão de biogás (Q_g) :

$$Q_g \ [mL h^{-1}] = \frac{V_m \cdot F_m}{t}$$
(Equação 4.9)

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

Composição do biogás

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

$$\%_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n}$$
(Equação 4.10)
$$\%_{CO_2} = \frac{n_{CO_2}}{n}$$
(Equação 4.11)
$$\%_{CH_4} = \frac{n_{CH_4}}{n}$$
(Equação 4.12)

Na qual, n_{H_2} , n_{CO_2} e n_{CH_4} correspondem à quantidade de cada um dos gases no biogás: hidrogênio, dióxido de carbono e metano, respectivamente. Esse conteúdo foi medido por cromatografia e calculado pelas curvas de calibração do cromatógrafo. O valor de n corresponde ao número de mols totais na amostra de gás injetado, calculado pela soma do numero de mols de cada componente ((Equação 4.13).

- $n = n_{\rm H_2} + n_{\rm CO_2} + n_{\rm CH_4}$ (Equação 4.13)
- Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) :

$$v_{H_2}[mmol \cdot h^{-1}] = \frac{Q_g \cdot n_{H_2}}{V_i}$$
(Equação 4.14)

Na qual, V_i corresponde ao volume da amostra coletado no headspace do reator e injetado no cromatógrafo gasoso.

• Rendimento de hidrogênio (Y_{H2}):

$$Y_{H_2}[molH_2 \cdot mol_{sac}^{-1}] = \frac{v_{H_2}}{v_S}$$
(Equação 4.15)

• Produção volumétrica de hidrogênio (HPR):

$$HPR[mL_{H_2} \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}] = \frac{Q_g \cdot \mathscr{M}_{H_2}}{V}$$
(Equação 4.16)

4.2.10 Geração de biomassa e conversão de substrato em biomassa $(Y_{X/S})$

Com os valores de sólidos suspensos voláteis, foi calculado o arraste de biomassa ao longo do sistema multiplicando a vazão de efluente líquido pela concentração de sólidos suspensos voláteis e o tempo. Durante o intervalo das amostras de sólidos aferidas, foi considera que a concentração que saia do reator era constante. Somando esses valores, obtevese o valor total de biomassa arrastada (BA) durante os sessenta (60) dias de operação do sistema. A Equação 4.17 apresenta o cálculo utilizado.

$$BA = Q \cdot [(t_1) \cdot SSV_1 + (t_2 - t_1) \cdot SSV_2 + (t_3 - t_2) \cdot SSV_3 + \cdots + (t_n - t_{n-1}) \cdot SSV_n]$$
(Equação 4.17)

No qual, BA é a massa de biomassa arrastada do sistema (mg), SSV corresponde a concentração de sólidos suspensos voláteis em determinado tempo segundo metodologia do *Standard Methods* (APHA, 2005) (mg L^{-1}), Q é a vazão afluente ao reator de efluente sintético (L h^{-1}) e t é o tempo (h).

Para o cálculo da biomassa aderida no material suporte foi coletada uma amostra no fim da operação e adicionou-se 100 mL de água destilada. Em seguida, levou-se esta mistura para o aparelho de ultrassom por 20 minutos, para que a biomassa aderida ao material suporte se desprendesse. Depois separou o material suporte da solução de biomassa. A amostra de material suporte foi levado a estufa a 120°C por 20 minutos para secar e depois aferiu-se a sua massa. Para a solução de biomassa, foi feita a análise de sólidos totais segundo metodologia do *Standard Methods* (APHA, 2005). Este procedimento foi realizado em triplicata.

Após a operação, também foi calculada a quantidade de sólidos totais presentes no líquido drenado do reator (APHA, 2005). Este procedimento foi realizado em triplicata.

Com o valor da média de biomassa aderida por massa de material suporte e da massa total do material suporte colocada no leito do reator anaeróbio e do valor médio de sólidos voláteis presente no líquido drenado do reator após a operação, pode-se calcular o valor de biomassa retida (BR) no reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente no final da operação de acordo com a Equação 4.18.

$$BR = Bm \cdot MS + SV_{dren} \cdot V_{dren}$$
 (Equação 4.18)

No qual, BR é a massa de biomassa retida no sistema (mg SV), Bm corresponde a concentração de sólidos voláteis aderido por massa de material suporte (mg SV g⁻¹ de material suporte), MS massa total de material suporte (g de material suporte), SV_{dren} corresponde a concentração de sólidos voláteis no líquido drenado do reator após o término da operação (mg L^{-1}) e V_{dren} é o volume do líquido drenado do reator após o término da operação (L).

Assim, considerando que o arraste dos sólidos fixos e a concentração de sólidos dissolvidos não são significativos, a massa de biomassa gerada no sistema é calculada pela Equação 4.19. A Equação 4.20 apresenta o balanço de biomassa gerado, que inclui a biomassa produzida no sistema menos a biomassa inserida no sistema, quando lodos anaeróbios foram utilizados como inóculos no reator.

$$BG = BR + BA$$
(Equação 4.19)
$$BG = BR + BA - SV_{inicial} \cdot V_{lodo}$$
(Equação 4.20)

No qual, BG é a massa de biomassa gerada no reator anaeróbio de leito fixo (mg SV), BR é a massa de biomassa retida no sistema (mg SV), BA é a massa de biomassa arrasta do sistema (mg SV), SV_{inicial} corresponde a concentração de sólidos voláteis do inóculo utilizado inserido no início da operação (mg L⁻¹) e V_{lodo} é o volume do inóculo utilizado no início da operação (L).

Com valor total de sacarose consumida e de biomassa gerada, determinou-se o coeficiente de conversão de substrato em microrganismos, dividindo o segundo pelo primeiro.

4.2.11 Tratamento dos dados e análise estatística

Primeiramente, as variáveis de monitoramento da produção biológica de hidrogênio (vazão do biogás, porcentagem de hidrogênio e gás carbônico no biogás, vazão molar de hidrogênio, produção volumétrica de hidrogênio, conversão de substrato, rendimento de hidrogênio e sólidos suspensos voláteis) para as setes condições experimentais (A, D, DT, DA, S, ST e SA) foram submetidas ao teste de normalidade D'Agostino utilizando o programa BioEstat[®]. Esse teste tem o objetivo de verificar se os dados obtidos são paramétricos, isto é, seguem uma distribuição normal, ou se eles são não paramétricos, seguem uma distribuição estatística diferente da distribuição normal.

O teste de normalida D'Agostino foi utilizado, pois se destina para pequenas amostras, com quantidade de dados a ser analisada igual ou superior a dez (10) unidades. A hipótese de nulidade, que os dados são paramétricos, deve ser rejeitada quando o valor calculado é menor ou igual ao valor crítico mínimo ou maior ou igual ao valor crítico máximo. Desta forma, adota-se a hipótese alternativa, de que os dados são paramétricos. Caso contrário, adota-se a hipótese de nulidade que os dados são paramétricos.

Determinado se os dados seguem distribuição normal ou não, realizou-se o teste de hipótese para as setes condições experimentais (A, D, DT, DA, S, ST e SA). Esse teste poderia ser a análise da variância pelo teste F (ANOVA) se todos os grupos seguissem a distribuição normal, ou seja, sendo dados paramétricos. No entanto, como pelo menos um dos grupos analisados foi não paramétrico, o teste de hipótese aplicado foi o Kruskal-Walis (K-W) utilizando o programa BioEstat[®]. O teste de Kruskal-Walis tem o objetivo de verificar se os dados provêm de uma mesma população com média e variância iguais, ou seja, são estatisticamente iguais, ou são de populações diferentes, apresentando diferença estatística significativa.

O teste de hipótese de Kruskal-Wallis foi adotado, pois se destina a comparar três ou mais populações independentes de mesmo tamanho ou desiguais. A hipótese de nulidade, que os dados são estatisticamente oriundos de uma mesma população, deve ser rejeitada quando o valor calculado de H é maior que o valor crítico de H ($H_{crítico}$). Para um nível de significância de 0,05 e com grau de liberdade igual a 6 (total de grupos analisados – 1), o valor crítico de H ($H_{crítico}$) é 12,60.

5 Resultados e Discussão

5.1 Desenvolvimento de método para determinação de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Entre as variáveis testadas, temperatura do forno e fluxo do eluente, as melhores condições foram: temperatura da coluna de 43°C e fluxo de 0,5 ml.min⁻¹. Nas Figura 5.1 e 5.2, os cromatogramas obtidos a partir do detector de ultravioleta e índice de refração são apresentados, respectivamente.



Figura 5.1: Cromatograma típico da determinação de ácidos por CLAE com detector de UV e arranjo de diodo;com temperatura do forno de 43°C e fluxo 0,5mL.min⁻¹ com coluna Aminex[®] HPX-87H.


Figura 5.2: Cromatograma típico da determinação de carboidratos e álcoois por CLAE com detector de índice de refração; com temperatura do forno de 43°C e fluxo 0,5mL.min⁻¹, com coluna Aminex[®] HPX-87H.

A celobiose não foi detectada, pois este carboidrato é insolúvel em água. A sacarose foi quebrada em glicose e frutose, pois ocorreu a hidrólise ácida desta substância quando se adicionou a solução de ácido sulfúrico 1 N, motivo pelo qual estas substâncias não aparecem no cromatograma na Figura 5.2.

Diversos compostos apresentaram tempo de retenção próximo como a xilose, manose, galactose, L-arabinose e frutose e o ácido iso-butírico e acetona. Por este motivo foram mantidos nesta metodologia a frutose e o ácido iso-butírico, que são importantes no monitoramento de reatores anaeróbios aplicados à produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária sintética a base de sacarose que é objeto de trabalho desta pesquisa.

5.1.1 Validação do método

5.1.1.1 Linearidade

As curvas de calibração foram lineares na faixa de concentrações investigada entre 5,0 e 900,0 mg L⁻¹. Na Tabela 5.1, os dados das curvas de calibração e do teste de eficiência de regressão de cada um dos analíticos são reumidos. De acordo com esses valores, pode-se

afirmar que os coeficientes de correlação linear (R^2) foram superiores a 0,95, fato que evidencia a ocorrência de linearidade (CHUI *et al.*, 2001).

Analito	Equação	\mathbf{R}^2	\mathbf{R}^2_{max}
Ácido Cítrico	y = 11240x + 50113	0,997	1,000
Ácido Málico	y = 9557, 5x + 43528	0,999	1,000
Ácido Succínico	y = 8332,1x + 29959	0,969	0,978
Ácido Lático	y = 5926,8x + 49125	0,970	0,977
Ácido Fórmico	y = 10596x + 57150	0,971	0,977
Ácido Acético	y = 25366x + 87489	0,999	1,000
Ácido Propiônico	y = 6270, 6x + 54152	0,997	0,999
Ácido Isobutírico	y = 8075,9x + 24505	0,999	1,000
Ácido Butírico	y = 6383,5x + 28468	0,998	0,999
Ácido Isovalérico	y = 6297, 4x + 40204	0,998	0,999
Ácido Valérico	y= 5486,9x + 30559	0,998	0,999
Ácido Capróico	y =4386,2x - 6492,8	0,980	0,993
Glicose	y =1584,4x + 1433,4	0,995	1,000
Frutose	y =2964x + 1319,2	0,999	1,000
Metanol	y =208,75x + 299,83	0,967	0,991
Etanol	y = 583,74x + 27245	0,965	0,991
N-Butanol	y =1045x + 5052,8	0,988	0,998

Tabela 5.1: Curva de regressão e teste de eficiência de regressão para as diferentes substâncias analisadas.

Na Tabela 5.2, os resultados dos testes de linearidade para uma significância de 95% são apresentados.

A	Ajuste do Mo	delo Linear	Validade da	regressão
Апаню	Festatistico	Fobtido	Festatistico	F _{obtido}
Ácido Cítrico		1,511		90577
Ácido Málico		1,782		96394
Ácido Succínico		0,008		1376
Ácido Lático		0,010		1342
Ácido Fórmico		0,005		1370
Ácido Acético		0,982		103584
Ácido Propiônico		0,324		44379
Ácido Isobutírico		0,427		68520
Ácido Butírico	2,763	0,264	7,209	49754
Ácido Isovalérico		0,470		18421
Ácido Valérico		0,618		24137
Ácido Capróico		1,675		2830
Glicose		1,010		4881
Frutose		1,512		156525
Metanol		1,213		1431
Etanol		1,558		3567
N-Butanol		0,576		11630

Tabela 5.2: Ajuste ao modelo linear e validade da regressão para as diferentes substâncias analisadas.

De acordo com a metodologia descrita por Chui *et al.* (2001), se o valor de F obtido no ajuste do modelo linear a partir da ANOVA for inferior ao F estatística ($F_{obtido} < F_{estatística}$), aceita-se a regressão linear. Observando os dados na Tabela 5.2, se aceita a hipótese de nulidade, que a curva de calibração destas substâncias é linear na faixa de concentração testada, pois F obtido no ajuste do modelo linear a partir da ANOVA é inferior ao F estatístico crítico para uma significância de 95%.

O teste de validade da regressão avalia se a inclinação da reta é diferente de zero. Desta forma, quando o valor de F obtido a partir da ANOVA for superior ao F estatística $(F_{obtido} >> F_{estatística})$, a inclinação da reta de calibração é diferente de zero (nulo). Observando os dados na Tabela 5.2, rejeita-se a hipótese de nulidade, que o valor do coeficiente angular é igual a zero, e adota-se a hipótese alternativa, que o valor deste parâmetro é diferente de zero, pois o valor de F obtido a partir da ANOVA é superior ao F estatístico crítico para uma significância de 95%.

5.1.1.2 Precisão do método e precisão instrumental

Na Tabela 5.3 a precisão do método e a precisão instrumental, estimados pelo coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção para o método de determinação de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos em CLAE, são apresentados. O primeiro parâmetro foi calculado a partir do tempo de retenção dos analitos na curva de calibração; a precisão instrumental foi medida a partir de 9 injeções da mesma solução padrão com concentração de 400 mg L^{-1} .

Nas condições empregadas o CV para a precisão do método variou de 0,0139 a 0,0522% e o para a precisão instrumental, de 0,023 a 0,052%. Os valores de CV obtidos nestas análises foram semelhantes aos obtidos por Lazaro (2009), que variou de 0,0352 a 0,3258% para a precisão do método de determinação de ácidos orgânicos e de 0,0632 a 0,1083% para a precisão instrumental; e inferiores aos determinados por Damasceno *et al.* (2008), que variou de 0,8 a 1,56% para o método de determinação de aldicarbe.

	Precisão do Método		Precisão Instrumental			
Analito	Tempo de Retenção Média ± Des. Pad(min)	CV (%)	Tempo de Retenção Média ± Des. Pad(min)	CV (%)		
Ácido Cítrico	$10,061 \pm 0,00173$	0,0172	9,894 $\pm 0,0051$	0,052		
Ácido Málico	11,936 $\pm 0,0023$	0,0193	11,747 $\pm 0,0056$	0,048		
Ácido Succínico	$14,557 \pm 0,0027$	0,0182	$14,351 \ \pm 0,0059$	0,041		
Ácido Lático	$15,649 \pm 0,0031$	0,0195	$15,426 \pm 0,0062$	0,040		
Ácido Fórmico	$16,823 \pm 0,0040$	0,0240	$16,583 \pm 0,0066$	0,040		
Ácido Acético	18,166 $\pm 0,0025$	0,0139	$17,971 \pm 0,0070$	0,039		
Ácido Propiônico	21,464 ± 0,0050	0,0233	21,191 ± 0,0075	0,035		
Ácido Isobutírico	24,238 ± 0,0751	0,310	$23,930 \pm 0,0085$	0,035		
Ácido Butírico	$26,344 \pm 0,0065$	0,0247	$26,053 \pm 0,0085$	0,032		
Ácido Isovalérico	30,341 ± 0,0070	0,0231	$30,053 \pm 0,0083$	0,027		
Ácido Valérico	$36,972 \pm 0,0103$	0,0278	$36,653 \pm 0,0101$	0,030		
Ácido Capróico	$56,085 \pm 0,0146$	0,0261	$55,620 \pm 0,0253$	0,046		
Glicose	$11,383 \pm 0,0031$	0,0268	$11,200 \pm 0,0029$	0,026		
Frutose	$12,296 \pm 0,0031$	0,0248	$12,105 \pm 0,0034$	0,029		
Metanol	23,073 $\pm 0,0085$	0,0369	22,757 $\pm 0,0052$	0,023		
Etanol	$25{,}730\ \pm 0{,}0105$	0,0410	$25,403 \pm 0,0057$	0,023		
N-Butanol	$44,\!093 \ \pm 0,\!0230$	0,0522	43,655 ± 0,0123	0,028		

Tabela 5.3: Avaliação da precisão do método e da precisão instrumental para as diferentes substâncias analisadas.

5.1.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação de cada um dos analitos analisados neste método são apresentados na Tabela 5.4.

Analito	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido Cítrico	6,37	19,35
Ácido Málico	6,58	19,95
Ácido Succínico	4,09	12,39
Ácido Lático	3,43	10,41
Ácido Fórmico	2,39	7,22
Ácido Acético	3,36	10,18
Ácido Propiônico	12,77	38,70
Ácido Isobutírico	4,10	12,43
Ácido Butírico	6,91	20,94
Ácido Isovalérico	5,85	17,73
Ácido Valérico	7,71	23,38
Ácido Capróico	0,16	0,46
Glicose	3,39	10,26
Frutose	3,52	10,66
Metanol	20,91	63,37
Etanol	19,28	58,42
N-Butanol	23,02	69,76

Tabela 5.4: Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para as diferentes substâncias analisadas.

5.2 Produção biológica de hidrogênio

A produção de biogás dos reatores inoculados por autofermentação (A), lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves sem pré-tratamento (D), lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves com prétratamento térmico (DT), lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves com pré-tratamento ácido (DA), lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura sem pré-tratamento (S), lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura com pré-tratamento térmico (ST), lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura com pré-tratamento ácido (SA) ao longo do tempo de operação é apresentado na Figura 5.3. Neste período de operação (60 dias), já está descontado o período de recirculação. Na Figura 5.4, o *box-plot* da produção de biogás é apresentado. Os valores médios, máximos e mínimos da produção de biogás são mostrados na Tabela 5.5.



Figura 5.3: Variação temporal da produção do biogás com os diferentes inóculos: A (↔), D (→), DT(→), DA (→), S (→),ST(→) e SA (→).



Inéculo	$Q_{g} (mL h^{-1})$							
moculo	Média	Mediana	Mediana 1º Quartil 3º Quartil Mínir					
Α	177,6 ± 133,5	142,9	51,6	283,7	0	418,8		
D	$96,6\pm47,7$	81,1	66,3	108,1	28,9	238,4		
DT	$173,9 \pm 185,4$	102,5	32,4	294,2	14,1	631,3		
DA	$245,2 \pm 86,3$	242,1	196,2	278,9	69,1	572,3		
S	$59,8 \pm 65,2$	31,9	27,1	52,3	11,2	244,5		
ST	84,6 ± 83,5	69,2	39,5	83,5	3,7	390,7		
SA	$103,5\pm88,9$	56,7	32,8	156,0	6,9	324,1		

Tabela 5.5: Valores médios, mínimos e máximos do biogás produzido com os diferentes inóculos.

Os outliers, valores discrepantes representados por "*" na Figura 5.4, não foram eliminados, pois, caso fossem retirados, todos os dados iniciais, do primeiro até o 15° dia de operação, do reator inoculado com o lodo S seriam descartados. Outro motivo é a instabilidade da produção de biogás observada em todos os reatores na Figura 5.3.

Analisando as Figura 5.3 e 5.4 e a Tabela 5.5, nota-se que a produção de biogás foi influenciada pela origem e pelo pré-tratamento do inóculo. O maior valor médio da produção de biogás foi do reator inoculado com lodo DA ($245,2 \pm 86,3$ mL h⁻¹), o que pode indicar que os microrganismos presentes neste inóculo estavam mais adaptados para as condições de operação do reator (TDH, substrato e temperatura) do que os demais. Esse inóculo apresentou, também, a maior estabilidade na produção do biogás, que pode ser observada pelo valor do desvio padrão, pelo intervalo entre o 1º e 3º quartis (a altura do *box*) e os "bigodes" do *box-plot* (Figura 5.4).

Observando a Figura 5.3, vale ressaltar que, embora a origem e o pré-tratamento do inóculo tenham influenciado a produção de biogás, todos tiveram o mesmo comportamento de instabilidade, com aumento da produção de biogás até um máximo e depois a queda, se aproximando de zero. Esse comportamento instável foi observado por Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011) e será discutido posteriormente no item 5.2.5.

Esses autores, trabalhando com a mesma configuração de reator e condições operacionais similares, obtiveram valores médios de vazão do biogás entre 131,1 e 423,4 mL h^{-1} para o inóculo da autofermentação (A), na mesma ordem de grandeza do alcançado neste trabalho para o mesmo inóculo (177,6 ± 133,5 mL h^{-1}).

Foi realizado o teste estatístico de normalidade de D'Agostino para determinar se os dados seguem a distribuição normal e se são paramétricos usando o programa BioEstat[®]. Conclui-se que os dados de produção de biogás são paramétricos para os inóculos A e SA; entretando para os demais, eles são não-paramétricos.

Desta forma, o teste hipótese de Kruskall-Walis foi realizado usando o programa BioEstat[®] para analisar se os dados são estatisticamente diferentes.O valor de H obtido foi de 70,15 (p<0,0001) e é altamente significativo, pois para o nível de significância de 0,05 o valor crítico de H (H_{crítico}) é 12,60. Portanto, rejeita-se a hipótese de que a vazão de biogás é independente do inóculo e se aceita a hipótese alternativa de que a vazão de biogás é dependente do inóculo utilizado.

Analisando os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados (Figura 5.5), pode-se observa que a diferença entre a média do lodo DA com A não é significativa, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Para os demais inóculos testados a diferença entre as médias é significativa. Portanto, o inóculo DA apresentou o maior valor médio de produção de biogás.



Figura 5.5: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para a vazão de biogás produzido. Os valores na significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

A composição do biogás foi determinada através de cromatografia gasosa e determinou-se a porcentagem de hidrogênio e gás carbônico, sendo os dados apresentados nas Tabela 5.6 e 5.7 e nas Figura 5.6 a 5.9.

Inéculo			H_2 (%)					
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo		
Α	$60,7\pm7,2$	60,6	56,2	63,9	47,4	78,4		
D	54,6 ±14,0	58,8	53,2	62,3	8,6	69,7		
DT	$61,8\pm5,\!4$	62,2	58,4	65,8	48,6	72,7		
DA	$58,3\pm7,3$	58,0	51,4	63,4	47,2	77,9		
S	$54{,}2\pm10{,}6$	55,6	50,1	62,1	18,4	68,2		
ST	$56{,}8\pm5{,}4$	57,3	53,1	59,3	46,9	76,7		
SA	$59,2 \pm 5,4$	61,0	55,1	62,7	46,6	70,0		

Tabela 5.6: Valores médios, mínimos e máximos da porcentagem de H₂ no biogás produzido.

Inéculo		CO ₂ (%)								
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo				
Α	$39,4\pm7,1$	39,4	36,2	43,5	21,6	52,6				
D	$38,7\pm6,4$	38,6	36,1	41,4	25,5	54,2				
DT	$38,2 \pm 5,4$	37,6	34,0	41,6	0,0	51,4				
DA	$39,6\pm5,5$	40,7	36,6	42,7	22,1	48,6				
S	$42,0\pm7,\!6$	42,8	35,6	47,7	24,9	55,6				
ST	$41,8\pm4,5$	41,3	40,4	45,1	23,3	50,3				
SA	$39,5 \pm 4,0$	38,6	37,1	41,3	30,0	49,2				

Tabela 5.7: Valores médios, mínimos e máximos da porcentagem de CO_2 no biogás produzido



Figura 5.6: Variação temporal da porcentagem de hidrogênio no biogás com os diferentes inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→),ST(→) e SA (→).



Figura 5.7: Boxplot da porcentagem de hidrogênio (H_2) no biogás produzido com os diferentes inóculos.



Figura 5.8: Variação temporal da porcentagem de gás carbônico no biogás com os diferentes inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→).





O metano foi observado nos primeiros dias e/ou no final da operação dos seguintes inóculos: lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves sem pré-tratamento (D), lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves com pré-tratamento ácido (DA), lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura sem pré-tratamento (S), lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura com pré-tratamento térmico (ST) e lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura com pré-tratamento térmico (SA). O gráfico da variação temporal da porcentagem de metano no biogás é apresentado na Figura 5.10.



Figura 5.10: Variação temporal da porcentagem de metano no biogás com os diferentes inóculos: D (→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→).

Conforme apresentado nas Figura 5.6 e 5.8 pode-se notar que as porcentagens de hidrogênio e de gás carbônico na composição do biogás não se alteraram tanto quanto a produção de biogás em toda a operação. A porcentagem de hidrogênio foi levemente decrescente (Figura 5.6) e a porcentagem de gás carbônico foi crescente ao longo do período de operação para todos os inóculos estudados.

Nas Tabela 5.6 e 5.7, as porcentagens médias de hidrogênio e gás carbônico foram similares para todos os inóculos testados. O lodo DT foi o que apresentou a maior porcentagem média de hidrogênio de 61,8% e a menor porcentagem média foi de 54,2% para o lodo S. Para o gás carbônico, a maior porcentagem média foi 42,0% e a menor média foi 38,2% para os inóculos S e DT, respectivamente.

Analisando o desvio padrão das porcentagens de hidrogênio e de gás carbônico na composição do biogás, apresentados nas Tabela 5.6 e Tabela 5.7 e nas Figura 5.7 e 5.9, observa-se que quando há o pré-tratamento do inóculo ocorre maior estabilidade da composição do que quando os reatores foram inoculados com lodos anaeróbios sem pré-

tratamento. As técnicas de pré-tratamento ocasionaram a seleção dos microrganismos permitindo que a composição do biogás não se modificasse significativamente ao longo da operação.

A porcentagem de metano no biogás produzido foi decaindo nos primeiros dias, pois os microrganismos metanogênicos foram carreados do reator, devido a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) das arqueias metanogênicas, da ordem de 0,0167 h⁻¹, ser inferior ao das bactérias acidogênicas, que é de aproximadamente 0,083h⁻¹. Dessa forma, as arqueias metanogênicas foram incapazes de manter uma população e acabaram sendo eliminadas do sistema (CHEN *et al.*, 2001).

Após o 30° dia de operação, a porcentagem de metano na composição do biogás teve um comportamento de crescimento. No reator inoculado com o lodo D, a porcentagem de metano iniciou-se com 1% no 45° dia de operação e atingiu 12% no último dia de operação (60° dia). Esse reaparecimento de metano pode ser explicado pelo desenvolvimento de uma população metanogênica devido a anomalias do escoamento verificada pelo ensaio hidrodinâmico após a operação (apresentado no item 5.2.7), que proporcionaram a retenção e as condições favoráveis para o crescimento destes microrganismos.

Portanto, os microrganismos metanogênicos, que são não-formadores esporos, não foram eliminados do consórcio microbiano, mas foram somente temporariamente inibidos pelas técnicas de pré-tratamento aplicadas aos inóculos.

As porcentagens de hidrogênio e gás carbônico são similares às observadas nos trabalhos de Lima (2011) e Anzola-Rojas (2010), que utilizaram como inóculo o processo de autofermentação (A) em condições operacionais similares ás usadas neste trabalho.

Amorin *et al.* (2009), Barros *et al.* (2011), Barros *et al.* (2010) e Shida *et al.* (2010) utilizaram o lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura com prétratamento térmico (ST) para a produção de hidrogênio em reatores fluidificados com o TDH variando entre 8 e 1 hora e obtiveram entre 40 e 60% em média de hidrogênio no biogás, similares aos deste trabalho. No entanto, esses autores não detectaram metano na composição do biogás.

O teste estatístico de normalidade de D'Agostino foi realizado para as porcentagens de hidrogênio e gás carbônico para os diferentes inóculos testados. Concluiu-se que os dados de porcentagem de hidrogênio são paramétricos para os inóculos A, DT, DA e SA e não paramétricos para os demais. Os dados de gás carbônico são não-paramétricos para DA e ST e paramétricos para os demais.

Foi realizado o teste hipótese de Kruskall-Walis usando o programa BioEstat[®] para analisar se os dados são estatisticamente diferentes. Para a porcentagem de hidrogênio no biogás e para a porcentagem de gás carbônico, o valor de H obtido foi de 20,99 (p<0,0019) e 15,59 (p<0,0161), respectivamente, que são significativos já que o valor de H foi superior ao valor crítico (H_{crítico}) de 12,60 para o nível de significância de 0,05. Portanto, rejeita-se a hipótese de nulidade e se aceita a hipótese alternativa de que as porcentagens de hidrogênio e de gás carbônico são dependentes do inóculo utilizado. Os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados para as porcentagens de hidrogênio e de gás carbônico são apresentados respectivamente nas Figura 5.11 e 5.12.



Figura 5.11: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para a porcentagem de hidrogênio na composição do biogás. Os valores ns significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.



Figura 5.12: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para a porcentagem de gás carbônico na composição do biogás. Os valores ns significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

Analisando os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados para a porcentagem de hidrogênio e de gás carbônico (Figura 5.11 e 5.12, respectivamente), pode-se observa que a diferença entre a média de todos os inóculos é não significativa na maioria das comparações, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Portanto, não se pode

afirmar qual é o inóculo que apresenta o maior valor médio da porcentagem de hidrogênio e o menor valor médio da porcentagem de gás carbônico.

A vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) foi determinada a partir dos valores de produção volumétrica de biogás e a porcentagem de hidrogênio no biogás (Figura 5.13). O *box-plot* da vazão molar de hidrogênio e os valores médios, mínimos e máximos são apresentados na Figura 5.14 e na Tabela 5.8, respectivamente.



Figura 5.13: Variação temporal da vazão molar de H_2 com os diferentes inóculos: A (\rightarrow), D (\rightarrow), DT(\rightarrow), DA (\rightarrow), S (\rightarrow), ST(\rightarrow) e SA (\rightarrow).



Figura 5.14: Box-plot da vazão molar de hidrogênio com os diferentes inóculos.

Ináculo		$v_{H_2} \pmod{\mathbf{h}^{-1}}$								
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo				
Α	$5,6\pm4,5$	4,6	1,4	8,2	0	15,3				
D	$2,3 \pm 1,5$	2,1	1,5	2,7	0,2	7,0				
DT	$6,1 \pm 7,3$	2,7	0,8	11,4	0,3	25,5				
DA	$7,6 \pm 3,3$	7,1	5,0	9,3	2,0	19,6				
S	$1,6 \pm 2,2$	0,6	0,4	1,2	0,2	8,1				
ST	$2,4 \pm 2,7$	1,8	1,0	2,2	0,1	12,8				
SA	$3,0 \pm 3,1$	1,5	0,9	4,5	0,1	10,6				

Tabela 5.8: Valores médios e máximos da vazão molar de hidrogênio

O maior valor médio foi de 7,6 mmol H_2 h⁻¹ quando o reator foi inoculado com o lodo DA e o menor valor médio foi de 1,6 mmol H_2 h⁻¹ para o reator S (Tabela 5.8).

O comportamento da vazão molar de hidrogênio foi instável, chegando a cessar em alguns inóculos (A e S), idêntico ao comportamento observado na produção de biogás, já que essa variável é utilizada no cálculo da vazão molar de hidrogênio. Esse comportamento instável foi observado por Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011) para o inóculo obtido pelo processo de autofermentação (A) e será discutido posteriormente no item 5.2.5.

Analisando a Figura 5.14 e os valores médios (Tabela 5.8), os valores da vazão molar de hidrogênio dos inóculos com pré-tratamento ácido e térmico (DT, DA, ST e SA) foram superiores aos valores observados para os inóculos sem pré-tratamento (D e S). Entre a origem do inóculo nota-se que o processo de autofermentação (A) apresenta valores maiores que as outras duas origens testadas, porém os valores de A são mais discrepantes do que os outros dois. A maior vazão molar média de hidrogênio entre todos os inóculos testados foi observada na condição DA. Além disso, a menor altura do *box* indica uma maior homogeneidade dos dados quando comparada com o lodo A e DT que obtiveram valores médios próximos.

Como os demais parâmetros, foi realizado o teste estatístico de normalidade de D'Agostino para a vazão molar de hidrogênio e concluiu-se que os dados de vazão molar de hidrogênio são paramétricos somente para o inóculo A e não paramétricos para os demais.

Foi realizado o teste de hipótese de Kruskall-Walis e determinou-se que os dados são estatisticamente diferentes, pois o valor de H foi de 71,6 (p<0,0001), maior que o valor de $H_{crítico}$ (12,60) para o nível de significância de 0,05. Os valores da diferença entre as médias da vazão molar de hidrogênio para os inóculos testados obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis são apresentados na Figura 5.15.



Figura 5.15: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para a vazão molar de hidrogênio. Os valores ns significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

Analisando os valores da diferença entre as médias da vazão molar de hidrogênio dos inóculos testados (Figura 5.15), pode-se observar que a diferença entre a média do lodo DA e a média do inóculo A é não significativa, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Entretanto, a diferença entre a média do inóculo DA e os demais é significativa. Portanto, o inóculo DA foi o reator que apresentou o maior valor médio de vazão molar de hidrogânio.

A produção volumétrica de hidrogênio foi obtida pela razão entre a vazão volumétrica de hidrogênio e o volume útil do reator (Figura 5.16). O *box-plot* e os valores médios e máximos são apresentados na Figura 5.17 e na Tabela 5.9, respectivamente. O valor máximo obtido foi de 195,6 mL H_2 h⁻¹ L⁻¹ para o lodo DT e o menor valor foi para o reator inoculado com o lodo A, pois não foi mensurado pelo medidor de gás nenhum volume de biogás produzido pelo reator.



Figura 5.16: Variação temporal da produção volumétrica de hidrogênio com os diferentes inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→).



Figura 5.17: *Box-plot* da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) com os diferentes inóculos.

Ináculo		$HPR (mL H_2 h^{-1} L^{-1})$							
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo			
Α	$47,3\pm36,1$	41,6	13,1	73,7	0	118,4			
D	$23,2 \pm 14,0$	19,1	15,8	27,4	2,1	59,8			
DT	$51,7\pm56,1$	29,3	8,5	96,2	3,5	195,6			
DA	$61,\!6\pm25,\!3$	63,4	44,2	75,3	15,1	161,2			
S	$15,1\pm19,1$	7,3	5,0	11,8	1,3	67,1			
ST	$21,1\pm22,8$	16,9	8,9	19,0	0,9	109,4			
SA	$26,7\pm23,6$	14,6	7,8	40,4	1,9	82,9			

Tabela 5.9: Valores médios e máximos da produção volumétrica de hidrogênio (HPR).

Os valores obtidos no reator inoculado pelo processo de autofermentação foram inferiores aos obtidos por Lima (2011), Anzola-Rojas (2010) e Fernandes (2008). Isso pode ser justificado pela mudança dos tamanhos de partícula do material suporte, que diminui a porosidade do leito e dificultou o desenvolvimento dos microrganismos nos interstícios. O tamanho das aparas de polietileno de baixa densidade utilizadas nos trabalhos anteriores apresentava diâmetro equivalente de 2,0 cm, garantindo uma porosidade do leito de aproximadamente 60%, diferente do utilizado neste trabalho. O diâmetro equivalente das aparas deste trabalho era de 0,4 cm, o que resultou em porosidade do leito da ordem de 45%, diminuindo, assim, os espaços vazios para o crescimento dos microrganismos nos interstícios e consequentemente a produção de hidrogênio.

O teste estatístico de normalidade de D'Agostino foi realizado para a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e concluiu-se que os dados são paramétricos somente para o inóculo A e SA e não paramétricos para os demais.

O teste de hipótese de Kruskall-Walis determinou que os dados são estatisticamente diferentes pois o valor de H de 126,5 (p<0,0001) é maior que o valor de $H_{crítico}$ (12,60) para o nível de significância de 0,05. Os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados para a produção volumétrica de hidrogênio obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis são apresentados na Figura 5.18.



Figura 5.18: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para a produção volumétrica de hidrogênio (HPR). Os valores na significativa que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

Analisando os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados (Figura 5.18), pode-se observar que as diferenças entre a média do lodo DA e o inóculo A e DT são não significativas, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Todavia a diferença entre a média do inóculo DA com os demais é significativa. Portanto, o inóculo DA foi o que apresentou o maior valor médio de produção volumétrica de hidrogênio (HPR).

Todos os inóculos testados apresentaram capacidade de usar a sacarose como substrato, porém a eficiência de conversão de sacarose demonstra instabilidade operacional ao longo do período de operação (Figura 5.19).



Figura 5.19: Variação temporal da eficiência da conversão da sacarose com os diferentes inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→).

O comportamento instável da conversão de sacarose (medida pelo método do Dubois *et al.*, 1956) pode ser explicado por dois motivos. O primeiro é que no início da operação havia uma comunidade microbiana proteolítica, que provavelmente não estava habituada em utilizar a sacarose como substrato, havendo variabilidade na conversão do substrato. Com o passar do tempo os organismos foram se adaptando e aumentando a eficiência de conversão do substrato até atingir um ápice. Após esse pico, houve outra instabilidade na conversão de sacarose provocada pela anomalia do escoamento devido ao aumento do polímero extracelular (dado meramente visual). Assim, esse é o segundo motivo para a explicação do comportamento instável da conversão da sacarose.

Fernandes (2008) observou instabilidades na conversão de sacarose e creditou este fato à produção fermentativa de hidrogênio ser um processo intermediário da degradação anaeróbia, no qual há a conversão incompleta da matéria orgânica havendo um residual de substrato. Na Tabela 5.10, são apresentados os valores médios, máximos e mínimos para cada um dos inóculos testados e, na Figura 5.20, o *box-plot* com todos os reatores operados neste trabalho.

Tabela 5.10: Valores médios, mínimos e máximos da conversão de sacarose para cada inóculo estudado.

Ináculo	Conversão de Sacarose (%)						
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo	
Α	$55,8 \pm 16,8$	58,5	46,9	65,7	12,8	84,6	
D	$42,7\pm17,1$	40,1	30,5	54,0	12,3	75,8	
DT	$50{,}8\pm11{,}9$	51,6	43,5	61,1	17,4	66,8	
DA	$70{,}5\pm11{,}7$	71,5	63,1	77,0	40,2	91,5	
S	$42,\!4\pm9,\!5$	40,7	38,1	47,4	16,7	61,8	
ST	$62,\!6\pm7,\!4$	63,8	56,6	68,1	46,5	75,0	
SA	$56{,}9\pm9{,}8$	57,5	49,3	65,3	36,5	71,4	





A maior média de conversão da sacarose foi de 70,5% no reator inoculado com DA e o menor valor foi de 42,4% observado no inóculo S (Tabela 5.10).

Os resultados da Tabela 5.10 e Figura 5.20 mostram que a conversão da sacarose dos inóculos com pré-tratamento ácido e térmico (DT, DA, ST e SA) foram superiores aos valores

observados para os inóculos sem pré-tratamento (D e S). Este resultado pode estar associado ao fato dos inóculos sem pré-tratamento terem sido impactados pelas condições operacionais do reator (TDH, temperatura e substrato) permitindo que alguns microrganismos presentes nestas comunidades fossem eliminados do reator, diminuindo a eficiência de conversão de sacarose. Nos inóculos pré-tratados, a eficiência de conversão de sacarose foi maior devido a seleção dos microrganismos que possivelmente estavam mais adaptados às condições operacionais.

A maior conversão de sacarose foi observada na condição DA e a baixa altura do *box* na Figura 5.20 indica uma maior homogeneidade dos dados quando comparada com o lodo A e DT que obtiveram valores médios próximos. No entanto, o reator mais estável foi o S que apresentou o menor intervalo interquartis (altura do *box*).

Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011), que trabalharam em condições similares as do presente trabalho e utilizaram o inóculo do processo de autofermentação (A), apresentaram taxas de conversões superiores às obtidas neste trabalho. Anzola-Rojas (2010) alcançou médias de conversão superiores a 80% para todas as relações C:N e Lima (2011) obteve médias superiores a 65% de conversão de substrato para várias razões de recirculação do meio líquido avaliadas. A diferença entre estes trabalhos e o presente está na porosidade do leito. Segundo Lee e colaboradores (2003), quanto menor a porosidade da matriz do material suporte, menor será a conversão de sacarose e a produção volumétrica de hidrogênio (HPR).

Foi realizado o teste estatístico de normalidade de D'Agostino usando o programa BioEstat[®] para a conversão de sacarose e concluiu-se que os dados são não paramétricos para A e D e paramétricos para os demais. Realizou-se o teste de hipótese de Kruskall-Walis usando o programa BioEstat[®] e determinou-se que os dados são estatisticamente diferentes pois o valor de H foi de 97,7 (p<0,0001), maior que o valor de H_{crítico} (12,60) para o nível de significância de 0,05. Os valores da diferença entre as médias pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis são apresentados na Figura 5.21.



Figura 5.21: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para a conversão de sacarose. Os valores na significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

Analisando os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados (Figura 5.21), pode-se observar que a diferença entre a média do lodo DA com os demais é significativa com exceção do inóculo ST que apresentou diferença não significativa entre as médias, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Portanto, o inóculo DA foi o que apresentou o maior valor médio da conversão de sacarose.

Com o consumo de substrato e a vazão molar de hidrogênio, calculou-se o rendimento do sistema, cujo comportamento temporal está apresentado na Figura 5.22 para todos os inóculos testados. Como já foi comentado anteriormente para a vazão de biogás, a vazão molar de hidrogênio e a eficiência de conversão de sacarose, também houve instabilidade no rendimento de hidrogênio e será discutido posteriormente no item 5.2.5. Segundo Show *et al.* (2011), o rendimento de hidrogênio não pode ser mantido constante em reatores de leito fixo por causa do gradiente de distribuição do pH ao longo do reator, o que causa uma distribuição heterogênea da atividade microbiana.



Figura 5.22: Variação temporal do rendimento de hidrogênio (Y_{H_2}) com os diferentes inóculos: A (----), DT(----), DA (----), ST(----) e SA (----).

O maior valor médio foi obtido com o inóculo A com 2,1 mol H_2 mol⁻¹ sacarose (Tabela 5.11), porém os inóculos DT e DA apresentaram médias próximas de 2,0 mol H_2 mol⁻¹ sacarose. A menor média de rendimento ao longo do período foi do inóculo S e ST com 0,7 mol H_2 mol⁻¹ sacarose. Na Figura 5.23, o *box-plot* do rendimento de hidrogênio para todos os inóculos testados é apresentado.

Ináculo	Y_{H_2} (mol H ₂ mol ⁻¹ sacarose)						
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo	
Α	$2,1 \pm 1,8$	1,6	0,4	3,1	-	6,8	
D	$1,0 \pm 0,9$	0,7	0,5	1,1	0,2	4,4	
DT	$2,0 \pm 2,2$	1,0	0,3	3,5	-	6,9	
DA	$2,0 \pm 1,1$	1,9	1,2	2,6	0,4	6,3	
S	$0,7\pm0,9$	0,3	0,2	0,6	-	4,0	
ST	$0,7\pm0,7$	0,5	0,3	0,8	0,0	3,3	
SA	$1,0 \pm 0,9$	0,5	0,3	1,3	0,0	3,1	

Tabela 5.11: Valores médios, mínimos e máximos de Y_{H2} para os inóculos testados.



Os resultados da Tabela 5.11 e Figura 5.23 demonstram que a origem e o prétratamento do inóculo influenciaram no rendimento de hidrogênio. Os valores dos inóculos sem pré-tratamento (D e S) foram inferiores aos valores médios obtidos com os inóculos que sofreram algum tipo de pré-tratamento. No entanto, estes foram mais heterogêneos do que os primeiros. Esse resultado pode ser explicado pelo impacto das condições operacionais do reator na comunidade microbiana dos inóculos *in natura* e pela seleção dos microrganismos com o pré-tratamento do inóculo.

Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011), que utilizaram o inóculo do processo de autofermentação (A) e trabalharam em condições operacionais similares ao do presente trabalho, apresentaram rendimento de hidrogênio próximo ao obtido com este inóculo no presente trabalho. Esses autores alcançaram médias de rendimento de hidrogênio superiores a $1,5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ sacarose em todos os experimentos realizados.

Fernandes (2008) estudou diferentes inóculos em reatores em batelada e obteve rendimento de hidrogênio de 2,54 mol H_2 mol⁻¹ sacarose e 0,22 mol H_2 mol⁻¹ sacarose para o

inóculo oriundo do reator acidogênico de leito fixo preenchido com argila expandida previamente inoculado pelo processo de autofermentação (A) e lodo anaeróbio de abatedouro de aves com pré-tratamento térmico (DT), respectivamente.

Sá (2011) estudou três tipos de pré-tratamento em lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto sanitário do Rio de Janeiro para a produção de biohidrogênio em reatores em batelada (alcalino, térmico e ácido) e observou que no pré-tratamento ácido não ocorreu a queda do rendimento após o ápice. Esse comportamento foi similar ao observado no inóculo DA, pois este pré-tratamento provavelmente foi mais efetivo em inibir os microrganismos consumidores de hidrogênio.

Foi realizado o teste estatístico de normalidade de D'Agostino usando o programa BioEstat[®] para o rendimento de hidrogênio e concluiu-se que os dados são paramétricos somente para o inóculo A e não paramétricos para os demais. O teste de hipótese de Kruskall-Walis foi realizado usando o mesmo programa e determinou-se que os dados são estatisticamente diferentes, pois o valor de H foi de 53,0 (p<0,0001), maior que o valor de H_{crítico} (12,60) para o nível de significância de 0,05. Os valores da diferença entre as médias dos inóculos testados para os rendimentos de hidrogênio obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis são apresentados na Figura 5.24. Pode-se observar que os rendimentos médios de hidrogênio para os inóculos A, DT e DA são estatisticamente semelhantes, não havendo diferenças significativas entre as médias destes três inóculos, mesmo havendo diferença estatística entre os dados. Além disso, analisando a Figura 5.23, os rendimentos médios dos inóculos A, DT e DA são os maiores observados.



Figura 5.24: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para o rendimento de hidrogênio. Os valores na significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

O rendimento máximo teórico para a produção de hidrogênio a partir de sacarose é de 8 mol de hidrogênio mol⁻¹ de sacarose, se houver a formação de ácido acético como único produto (Reação 5.1). Caso haja a produção de ácido butírico como único produto da conversão de sacarose, o rendimento máximo teórico diminuirá para 4 mol de hidrogênio mol⁻¹ de sacarose (Reação 5.2).

$$\begin{split} C_{6}H_{12}O_{6} + 2 & H_{2}O \leftrightarrows 2 & CH_{3}COOH + 4H_{2} + 2 & CO_{2} & \Delta G^{0} = -215,95 & \text{kJ mol}^{-1} & (\text{Reação 5.1}) \\ C_{6}H_{12}O_{6} + 2 & H_{2}O \leftrightarrows CH_{3}CH_{2}CH_{2}COOH + 2H_{2} + 2 & CO_{2} & \Delta G^{0} = -285,05 & \text{kJ mol}^{-1} \end{split}$$

(Reação 5.2)

Os rendimentos de hidrogênio indicaram a predominância de fermentação mista com produção de ácido acético, butírico e outros na produção de hidrogênio em todos os inóculos utilizados. A relação entre o rendimento máximo teórico para a produção de hidrogênio a partir de sacarose quando há produção somente de ácido acético e os rendimentos médio e máximo obtidos são apresentados na Tabela 5.12.

	Inóculo						
	А	D	DT	DA	S	ST	SA
Média (%)	26,3	12,5	25,0	25,0	8,75	8,75	12,5
Máximo (%)	85,0	55,0	86,25	78,75	50	41,25	38,75

Tabela 5.12: Relação entre os rendimentos médio e máximo obtidos e o rendimento máximo teórico caso haja somente ácido acético na produção de hidrogênio para todos os inóculos estudados.

Para todas as variáveis analisadas, o mesmo comportamento foi observado e ficou evidente que há influência da origem e do pré-tratamento dos inóculos sobre a produção de biogás, vazão molar de hidrogênio, produção volumétrica de hidrogênio, eficiência de conversão de sacarose e rendimento de hidrogênio.

Os inóculos *in natura*, sem pré-tratamento, em geral, apresentaram valores inferiores aos observados para os inóculos que foram submetidos a algum tipo de método de enriquecimento das bactérias produtoras de hidrogênio, pois naqueles pode haver microrganismos consumidores de hidrogênio que sintetizam metano (metanogênicos) e ácido acético (homoacetogênicos), afetando os parâmetros de monitoramento da produção de hidrogênio. Nos inóculos submetidos a pré-tratamento, esses microrganismos foram suprimidos ou temporariamente inibidos, aumentando as variáveis analisadas.

Entre os inóculos estudados, os que apresentam os melhores valores em todas as variáveis são o inóculos A, DT e DA. O inóculo A mostrou-se uma alternativa para a produção biológica de hidrogênio, pois este não precisou da aplicação de técnicas de prétratamento para selecionar os microrganismos produtores de hidrogênio, havendo uma seleção natural. No entanto, a instabilidade na produção de biogás, vazão molar de hidrogênio, produção volumétrica de hidrogênio e rendimento de hidrogênio pode ser um ponto negativo deste inóculo. O lodo DA foi o inóculo que apresentou a maior estabilidade operacional quando comparado aos demais inóculos testados. Sendo este o ponto forte para aplicação do pré-tratamento ácido em lodo anaeróbio, além de ser uma técnica viável em larga escala. Outro parâmetro analisado foi a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente do reator, com o objetivo de monitorar o arraste de sólidos do reator (Figura 5.25 e Tabela 5.13).



Figura 5.25: Variação temporal da concentração de SSV no efluente dos diferentes inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→).

Tabela 5.13: Valores médios de SSV e de SV no líquido drenado e aderida no material suporte após o término do período de operação para os inóculos testados.

Inóculo	SSV	$\mathbf{SV}_{\mathbf{Final}}$	Biomassa Aderida (mgSV g ⁻¹ materia suporte)	
	(mgSSV L ⁻¹)	(mgSV L ⁻¹)		
Α	$36,7 \pm 14,0$	10.080,0	12,1	
D	$60,8 \pm 30,2$	23.833,3	21,8	
DT	$44,6 \pm 29,5$	29.933,3	27,7	
DA	$41,4 \pm 22,8$	12.916,7	48,4	
S	$63,0 \pm 22,6$	14.533,3	32,4	
ST	$75,2 \pm 46,3$	11.766,7	43,5	
SA	$69,0 \pm 47,0$	16.733,3	17,0	

Com os valores da Tabela 5.13, calculou-se a massa de biomassa gerada e a massa de biomassa que foi arrastada do sistema de acordo com a metodologia apresentada no item

4.2.10. Relacionando estes valores observou-se que o arraste de biomassa foi representativo, entre 45 e 70% do total de biomassa gerada durante o período de operação. Desta forma, notase que o reator não retém a biomassa como esperado para um reator contendo material suporte para aderência microbiana.

Com os valores de consumo do substrato e de produção de biomassa estimou-se o fator de conversão de substrato a célula ($Y_{X/S}$) (Tabela 5.14). Os valores encontrados são próximos ao observado por Kim *et al.* (2006b): 0,071 mgSS mg⁻¹ sacarose (0,080 mgSSV mg⁻¹ DQO) para lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto doméstico com prétratamento térmico em reatores de mistura completa na produção de hidrogênio.

Tabela 5.14: Fator de conversão de substrato a célula ($Y_{X/S}$)calculado para os diferentes inóculos.

	Inóculo									
_	А	D	DT	DA	S	ST	SA			
_{X/S} (mgSSV mg ⁻¹ Sacarose)	0,064	0,158	0,133	0,096	0,124	0,113	0,105			
_{X/S} (mgSSV mg ⁻¹ Sacarose)	0,064	0,158	0,133	0,096	0,124	0,113				

O $Y_{X/S}$ foi influenciado pela origem e pelo tipo de pré-tratamento utilizado. Os inóculos com maior diversidade microbiana, aqueles que não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento (D e S), apresentaram maior valor do $Y_{X/S}$. Além disso, o tipo de pré-tratamento afeta este parâmetro. Os inóculos com pré-tratamento térmico (DT e ST) apresentaram valores superiores aos inóculos com pré-tratamento ácido (DA e SA), possivelmente indicando que estas técnicas selecionam os microrganismos da mesma maneira, por meio do enriquecimento das bactérias formadoras de endósporos, porém, a cinética de consumo de substrato pode ser diferente.

O teste estatístico de normalidade de D'Agostino foi realizado usando o programa BioEstat[®] para o sólidos suspensos voláteis e concluiu-se que os dados são paramétricos para o inóculo A, D, S e ST e não paramétricos para os demais. Assim, foi realizado o teste de hipótese de Kruskall-Walis usando o programa BioEstat[®] e determinou-se que os dados são estatisticamente diferentespois o valor de H foi de 20,9 (p<0,0019), que é maior que o valor de $H_{crítico}$ (12,60) para o nível de significância de 0,05. Porém, não se observa diferença significativas entre as médias de todos os inóculos (Figura 5.26) mesmo havendo diferença estatística entre os dados, não foi possível inferir em qual condição houve maior ou menor arraste de sólidos.



Figura 5.26: Diferença entre as médias de cada inóculo obtidos pelo teste de hipótese de Kruskall-Walis para sólidos suspensos voláteis (SSV). Os valores na significam que a diferença não é significativa, já p<0,05 entende-se que os valores são significativos ou muito significativos.

5.2.1 Geração de produtos intermediários

Os valores de concentração dos principais produtos intermediários obtidos na produção biológica de hidrogênio a partir da sacarose para cada um dos inóculos são apresentados nas Figura 5.27 a 5.33.

Os principais produtos intermediários foram ácido butirico, ácido acético e etanol. Além desses, outros produtos intermediarios foram gerados, como ácido propiônico, ácido lático, ácido citrico, ácido málico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido iso-butírico, ácido
iso-valérico, ácido valérico e ácido capróico, porém em concentrações inferiores a 20 mg.L⁻¹. Na Tabela 5.15 e na Figura 5.34, são apresentados os valores médios das concentrações de todos os produtos intermediários observados para todos os inóculos testados.



Figura 5.27: Concentração de produtos intermediários para o inóculo A ao longo do período de operação: Ácido acético (→), ácido butírico (→), ácido lático (→), ácido propiônico (→) e etanol (→).



Figura 5.28: Concentração de produtos intermediários para o inóculo D ao longo do período de operação: Ácido acético (→), ácido butírico (→), ácido lático (→), ácido propiônico (→) e etanol (→).



Figura 5.29: Concentração de produtos intermediários para o inóculo DT ao longo do período de operação: Ácido acético (\rightarrow), ácido butírico (\rightarrow), ácido lático (\rightarrow), ácido propiônico (\rightarrow) e etanol (\rightarrow).



Figura 5.30: Concentração de produtos intermediários para o inóculo DA ao longo do período de operação: Ácido acético (→), ácido butírico (→), ácido lático (→), ácido propiônico (→) e etanol (→).



Figura 5.31: Concentração de produtos intermediários para o inóculo S ao longo do período de operação: Ácido acético (\rightarrow), ácido butírico (\rightarrow), ácido lático (\rightarrow), ácido propiônico (\rightarrow) e etanol (\rightarrow).



Figura 5.32: Concentração de produtos intermediários para o inóculo ST ao longo do período de operação: Ácido acético (→), ácido butírico (→), ácido lático (→), ácido propiônico (→) e etanol (→).



Figura 5.33: Concentração de produtos intermediários para o inóculo SA ao longo do período de operação: Ácido acético (----), ácido butírico (----), ácido lático (----), ácido propiônico (-----) e etanol (----).

Produtos	Concentração média (mg L ⁻¹)										
Intermediários	Α	D	DT	DA	S	ST	SA				
Ác. Cítrico	$8,1\pm4,5$	9,7 ± 5,4	$5,8\pm3,0$	$10{,}6\pm8{,}5$	7,5 ± 3,8	11,5 ± 9,2	12,6 ± 11,4				
Ác. Málico	$18,5 \pm 16,6$	35,3 ±20,8	$41,9\pm23,4$	$40,\!2\pm25,\!4$	$39,9 \pm 28,6$	$63,0\pm25,0$	66,3 ± 33,8				
Ác. Succínico	-	$10{,}0\pm7{,}7$	-	$3,4 \pm 2,4$	-	$16,8\pm17,2$	$9{,}0\pm6{,}7$				
Ác. Lático	$25,7\pm25,8$	$20,\!4\pm11,\!4$	$20,6\pm13,4$	$64,7\pm30,3$	$18,7\pm13,7$	$69,3\pm22,7$	$53,9\pm22,1$				
Ác. Fórmico	$11{,}4\pm5{,}0$	$12,0\pm7,1$	$10{,}5\pm7{,}4$	$15{,}5\pm9{,}1$	$9,2\pm6,3$	$17{,}9\pm8{,}9$	$19{,}9\pm6{,}8$				
Ác. Acético	$40,\!3\pm17,\!9$	$36{,}4\pm19{,}8$	$31{,}4\pm8{,}3$	$63{,}4\pm17{,}9$	$27,7\pm8,1$	$59,8 \pm 19,2$	$45{,}2\pm14{,}8$				
Ác. Propiônico	$13,9\pm6,2$	$11,\!4\pm7,\!6$	$13{,}5\pm8{,}7$	$23,7 \pm 12,9$	$10{,}6\pm6{,}2$	$16{,}4\pm7{,}0$	$22,2\pm12,9$				
Ác. Isobutírico	$18,0\pm12,8$	$22,0\pm11,7$	$23,7 \pm 14,7$	$23{,}5\pm13{,}8$	$23{,}4\pm14{,}4$	$33,5\pm37,6$	$12,5 \pm 7,7$				
Ác. Butírico	$64,9\pm31,4$	$49,9 \pm 22,\!4$	119,8 ±55,8	$149,0\pm40,9$	89,6 ± 33,9	$124,1\pm38,7$	$108,\!2\pm29,\!1$				
Ác. Isovalérico	$15{,}2\pm9{,}8$	$16{,}3\pm6{,}6$	$12,\!2\pm10,\!8$	23,4 ± 13,9	$13{,}5\pm7{,}5$	19,1 ± 23,4	$18,9 \pm 12,7$				
Ác. Valérico	$9{,}9\pm 6{,}3$	$19,\!4\pm17,\!7$	$25{,}8\pm34{,}8$	$12,\!2\pm14,\!0$	$10{,}7\pm6{,}6$	$11,\!6\pm7,\!6$	37,8 ± 33,7				
Ác. Capróico	$25,0\pm22,8$	$14,\!6\pm6,\!5$	$30{,}4\pm21{,}2$	$12{,}5\pm7{,}0$	$19{,}3\pm8{,}5$	$12,0\pm4,\!6$	$14,1\pm10,\!4$				
Etanol	$122,7\pm59,0$	$73,\!6\pm41,\!2$	$45{,}9\pm27{,}0$	$112,8\pm50,2$	$44,6\pm34,0$	$102,6\pm32,4$	$97,2\pm58,7$				

Tabela 5.15: Concentração média dos produtos intermediários gerados na fermentação da sacarose para a produção de hidrogênio para os diferentes inóculos testados.



Figura 5.34: Concentração média dos produtos intermediários gerados na fermentação da sacarose para a produção de hidrogênio para os diferentes inóculos testados: A (■), D (■), DT(■), DA (■), S (■), ST(■) e SA (■).

A concentração dos produtos intermediários gerados na fermentação da sacarose para a produção de hidrogênio para os diferentes inóculos testados não apresentou comportamento definido e claro, sendo muito instável: com elevadas concentrações em um dia e baixa em outros. No entanto, ao se analisar o ácido butírico e o ácido acético na Tabela 5.15 e na Figura 5.34 pode-se observar que os valores médios obtidos para os inóculos pré-tratados (DA, ST e SA) foram superiores aos obtidos com os inóculos sem pré-tratamento (D e S). Desta forma, além de influenciar na produção biológica de hidrogênio, a origem e o pré-tratamento do inóculo interferem na produção dos produtos metabólicos no meio líquido.

Analisando a distribuição percentual média dos produtos (Figura 5.35), observa-se que os principais produtos intermediários foram o ácido acético, ácido butírico e o etanol. Os demais produtos intermediários representam no máximo 37% do total de produtos intermediários solúveis.



Figura 5.35: Distribuição percentual média dos produtos intermediários para os diferentes inóculos testados: Ácido cítrico (■), ácido málico (■),ácido succínico (■),ácido lático (■), ácido fórmico (■),ácido acético (■),ácido propiônico (■), ácido iso-butírico (■),ácido butírico (■), ácido iso-valérico (■), ácido valérico (■), ácido capróico (■) e etanol (■).

A formação desses produtos intermediários coincide com diversas pesquisas sobre produção biológica de hidrogênio, mas a quantidade e a distribuição não são similares devido às diferentes configurações de reatores e parâmetros de operação (AKUTSU *et al.*, 2009b;

AMORIM *et al.*, 2009; AZOLA-ROJAS, 2010; FERNANDES, 2008; BARROS *et al.* 2010; BARROS *et al.* 2011; LIMA, 2011; MAINTINGUER *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2011 e SHIDA *et al.*, 2009).

A alta concentração de etanol inesperada pode estar relacionada com o aumento da pressão parcial do hidrogênio no interior do reator ou a presença de microrganismos produtores de hidrogênio e etanol com elevados rendimentos. A produção de hidrogênio a partir de hexoses com produção de ácido acético e ácido butírico (Reações 5.3 e 5.4, respectivamente) propicia a elevada pressão parcial de hidrogênio favorecendo reações que consomem o hidrogênio produzido, como a reação entre ácido acético e hidrogênio, produzindo etanol, que é favorável termodinamicamente (Reação 5.5).

 $\begin{array}{ll} C_{6}H_{12}O_{6}+2\ H_{2}O\leftrightarrows 2\ CH_{3}COOH+4H_{2}+2\ CO_{2} & \Delta G^{0}=-215,95\ kJ\ mol^{-1} & (Reação\ 5.3)\\ C_{6}H_{12}O_{6}+2\ H_{2}O\leftrightarrows CH_{3}CH_{2}CH_{2}COOH+2H_{2}+2\ CO_{2}\ \Delta G^{0}=-285,05\ kJ\ mol^{-1} & (Reação\ 5.4)\\ CH_{3}COOH+H_{2}\leftrightarrows C_{2}H_{5}OH+4H_{2}O & \Delta G^{0}=-49.51\ kJ\ mol^{-1} & (Reação\ 5.5) \end{array}$

Considerando que o reator estava aberto, portanto à pressão atmosférica, pode-se calcular a pressão parcial de hidrogênio multiplicando a pressão atmosférica pela fração molar de hidrogênio no gás, que é igual a porcentagem de hidrogênio apresentado anteriormente. A pressão parcial de hidrogênio variou entre $0.8 \ 10^4$ e $8.0 \ 10^4$ Pa e a média entre $5.4 \ 10^4$ e $6.3 \ 10^4$ Pa. Segundo Li *et al.* (2007), pressão parcial de hidrogênio superior a $4 \ 10^4$ Pa favorece a produção de etanol, tanto pela conversão do carboidrato quanto pela reação entre hidrogênio e ácido acético (Reação 5.5).

Outra razão para a alta produção de etanol observada nesta pesquisa é que alguns microrganismos possivelmente presentes no inóculo, da espécie *Clostridium*, como *Clostridium pasteurianum* podem produzir hidrogênio e etanol com elevados rendimentos (AKUTSU *et al.*, 2009b).

5.2.2 Balanço de DQO nos reatores

Os valores médios, mínimos e máximos da eficiência de remoção de DQO para cada um dos inóculos usados estão apresentados na Tabela 5.16. O perfil temporal da eficiência de remoção de DQO e o *box-plot* estão representados nas Figura 5.36 e 5.37, respectivamente.

Tabela 5.16: Valores médios, mínimos e máximos da eficiência de remoção de DQO para os inóculos testados.

Treéserle	Remoção de DQO (%)									
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo				
Α	$11,9\pm4,5$	12,1	8,4	14,6	2,2	23,4				
D	$9,2 \pm 3,8$	9,5	7,3	11,2	0,2	17,6				
DT	$10,4 \pm 3,5$	10,4	7,9	13,2	2,8	17,0				
DA	14,4 ± 5,8	13,4	11,2	16,8	1,5	35,2				
S	$9{,}9\pm3{,}8$	10,2	6,8	12,5	2,5	16,8				
ST	13,6 ±4,5	12,5	10,8	15,7	4,5	27,0				
SA	$13,\!6\pm5,\!6$	12,2	8,3	17,3	5,4	25,8				



Figura 5.36: Variação temporal da eficiência de remoção de DQO dos diferentes inóculos: A (→), D (→), DT(→), DA (→), S (→), ST(→) e SA (→).



Os valores médios de todos os inóculos ficaram próximos de 10%, como esperado para o processo de produção de hidrogênio por degradação anaeróbia. Essa baixa eficiência de remoção de DQO está relacionada com o fato da produção do hidrogênio ocorrer na etapa inicial da digestão anaeróbia, quando substratos complexos são convertidos a substâncias mais simples que não estão completamente reduzidas, como o ácido acético, proporcionando

reduzidas eficiências de remoção de matéria orgânica (Fernandes, 2008).

O balanço da DQO foi realizado para todas as operações usando o equivalente em DQO do substrato e metabólitos produzidos. As reações usadas para o cálculo da DQO teórica de cada metabólito e o fator que relaciona a massa desta substância com a DQO estão apresentados na Tabela 5.17.

Produtos Intermediários	Reação	Fator (mg DQO mg ⁻¹ substância)
Ác. Cítrico	$C_6H_8O_7$ + 4,5 $O_2 \leftrightarrows 6 CO_2$ + 4 H_2O	0,75
Ác. Málico	$C_4H_6O_5$ + 3 O_2 \leftrightarrows 4 CO_2 + 3 H_2O	0,72
Ác. Succínico	$C_4H_6O_4$ + 3,5 $O_2 \leftrightarrows$ 4 CO_2 + 3 H_2O	0,95
Ác. Lático	$C_3H_6O_3$ + 3 O_2 \leftrightarrows 3 CO_2 + 3 H_2O	1,07
Ác. Fórmico	$CH_2O_2+0.5 O_2 \leftrightarrows CO_2+H_2O$	0,35
Ác. Acético	$C_2H_4O_2$ + 2 O_2 \leftrightarrows 2 CO_2 + 2 H_2O	1,07
Ác. Propiônico	$C_3H_6O_2$ + 3,5 $O_2 \leftrightarrows$ 3 CO_2 + 3 H_2O	1,51
Ác. Isobutírico	$C_4H_8O_2$ + 5 O_2 = 4 CO_2 + 4 H_2O	1,82
Ác. Butírico	$C_4H_8O_2$ + 5 O_2 \leftrightarrows 4 CO_2 + 4 H_2O	1,82
Ác. Isovalérico	$C_5H_{10}O_2$ + 6,5 O_2 \leftrightarrows 5 CO_2 + 5 H_2O	2,04
Ác. Valérico	$C_5H_{10}O_2$ + 6,5 O_2 \leftrightarrows 5 CO_2 + 5 H_2O	2,04
Ác. Capróico	$C_6H_{12}O_2$ + 8 $O_2 \leftrightarrows 6 CO_2$ + 6 H_2O	2,20
Etanol	$C_2H_6O+3,5 O_2 \leftrightarrows 2 CO_2+3 H_2O$	2,43
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$ + 12 $O_2 \leftrightarrows$ 12 CO_2 + 11 H_2O_2	1,12

Tabela 5.17: Reações usadas para o cálculo da DQO teórica de cada metabólito e o fator que relaciona a massa desta substância com o equivalente em DQO.

Somou-se a DQO equivalente de todos os componentes solúveis e comparou-se com a DQO empírica (APHA, 2005) e as relações em média tiveram mais do que 73% de concordância (Tabela 5.18). A concordância deve sempre ser o mais próximo possível de 100%, para fechar o balanço. A diferença observada indica que outros produtos intermediários não foram contabilizados e nem detectados pelos métodos empregados neste trabalho.

Tabela 5.18: DQO efluente média empírica e a teórica e a sua concordância nos inóculos estudados.

	Inóculos						
	Α	D	DT	DA	S	ST	SA
DQO empírica solúvel (mg L ⁻¹)	1768	1833	1752	1775	1753	1801	1802
DQO teórica (mg L ⁻¹)	1325	1414	1330	1289	1387	1367	1400
Concordância	76%	78%	76%	73%	79%	76%	82%

5.2.3 Análise dos microrganismos por microscopia ótica

Análises microbianas dos inóculos foram feitas após a recirculação, no início do período de operação, e no fim da operação, após 60 dias. Para o inóculo A, no início da operação, as imagens de microscopia indicaram o predomínio de bacilos e endósporos conforme apresentado na Figura 5.38. Esses microrganismos foram, provavelmente, responsáveis por diferentes vias da conversão de sacarose em hidrogênio e ácidos orgânicos. Essas morfologias são similares às dos gêneros *Enterobacter, Clostridium* e *Bacillus* que estão associados com a produção biológica de hidrogênio e de ácidos orgânicos (LEITE *et al*, 2008).



Figura 5.38: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo A no início da operação: endósporos (a) e levedura e bacilos (b). Aumento de 1000 vezes.

Após o 60° dia de operação, foi realizada novamente a microscopia da biomassa presente no interior do reator com o inóculo A e as imagens são apresentadas na Figura 5.39. Pode-se observar que não houve variação da morfologia da comunidade microbiana, havendo presença de bacilos e endósporos (Figura 5.39a) e de filamentos, possivelmente de hifas de fungos (Figura 5.39b). As morfologias dos microrganismos foram similares ao relatado por Fernandes (2008), Peixoto (2008) e Lima (2011), que também usaram a autofermentação como estratégia de inoculação dos reatores.



Figura 5.39: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo do processo da autofermentação no fim da operação: endósporos e bacilos (a) e filamento (b). Aumento de 1000 vezes (a) e de 400 vezes (b).

O reator inoculado com D apresentou uma maior variedade na morfologia dos microrganismos no início da operação, com presença de endósporos (Figura 5.40a), de bacilos (Figura 5.40a e Figura 5.40b) e de sarcinas fluorescentes (Figura 5.40b), possivelmente do gênero *Methanosarcina* que são microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos.



Figura 5.40: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo D: predominância de bacilos e endósporos (8a) e de sarcinas (8b). Aumento de 1000 vezes.

Analisando as imagens do final da operação, apresentadas na Figura 5.41, nota-se que a morfologia da comunidade microbiana é similar à comunidade microbiana no início da operação com predominância de filamentos, possivelmente de *Metanosaeta* sp (Figura 5.41a), bacilos e endósporos (Figura 5.41b).



Figura 5.41: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo D no final da operação: predominância de filamentosas e endósporos (a) e de bacilos (b). Aumento de 1000 vezes.

O reator inoculado com DT apresentou uma maior quantidade de endósporos e bacilos quando comparado ao inóculo D (Figura 5.42), devido ao pré-tratamento térmico. Após os 60 dias de operação do reator, a morfologia da comunidade microbiana foi semelhante a do início da operação.



Figura 5.42:Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo DT no início da operação: predominância de filamentos com bainha e endósporos (a) e cocos (b). Aumento de 1000 vezes.

No início da operação do inóculo DA, houve a predominância de bacilos e endósporos

(Figura 5.43). Com o decorrer da operação, houve alteração de parte da morfologia (Figura

5.44), com predominância de filamentosas, navetes e bacilos delgados.



Figura 5.43 Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo DA no início da operação: predominância de bacilos e endósporos (a) e de bacilos delgados (b). Aumento de 1000 vezes.



Figura 5.44: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo DA no final da operação: predominância de navetes, filamentosas e endósporos (a) e de filamentosas e bacilos delgados (b). Aumento de 1000 vezes.

O reator inoculado com S apresentou morfologias semelhantes a cocos, bacilos e filamentos similares aos das *Metanosaeta sp*. A imagem da microscopia de contraste de fase é apresentada na Figura 5.45. Após a operação, a comunidade não apresentou muita variação de morfologias com predominância de formas similares a bacilos, cocos, endósporos e navetes (Figura 5.46).



Figura 5.45 Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo S no início da operação: predominância de endósporos, bacilos (a) e bacilos (b). Aumento de 1000 vezes.



Figura 5.46: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo S no final da operação: predominância de bacilos e navetes (a) e de endósporos, cocos e navetes (b). Aumento de 1000 vezes.

No início da operação do inóculo ST houve a predominância de bacilos, endósporos, navetes e células ovaladas com bainha (Figura 5.47). Essas células ovaladas são semelhantes à morfologia de leveduras. As condições operacionais não proporcionaram alteração da morfologia (Figura 5.48), com predominância de filamentosas, navetes, endósporos e bacilos.



Figura 5.47: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo ST no início da operação: predominância de endósporos, bacilos (a) e bacilos e células ovaladas (b). Aumento de 1000 vezes.



Figura 5.48: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo ST no final da operação: predominância de navetes e de endósporos(a), bacilos e alguns cocos (b). Aumento de 1000 vezes.

O reator inoculado com SA apresentou morfologias semelhantes a cocos, bacilos e endósporos no início da operação (Figura 5.49). Após a operação, a comunidade não apresentou muita variação de morfologias com predominância de formas similares a bacilos, células ovaladas com bainha, cocos, endósporos e navetes. As imagens da microscopia ótica de contraste de fase estão apresentadas na Figura 5.50.



Figura 5.49: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo SA no início da operação: predominância de bacilos, cocos, células ovaladas com bainha e de endósporos(a), bacilos, cocos e filamentosas (b). Aumento de 1000 vezes.



Figura 5.50: Microscopia óptica de contraste de fase com inóculo SA no final da operação: predominância de bacilos, cocos, células ovaladas com bainha e de endósporo (a), bacilos, cocos e endósporos(b). Aumento de 1000 vezes.

Nas Tabela 5.19 e 5.20 encontram-se descritas as freqüências das principais morfologias visualizadas nas amostras de biomassas coletadas, respectivamente, no início e no final do período de operação. Ocorreu pouca variação da diversidade microbiana durante a operação do reator de leito fixo. As morfologias predominantes foram de bacilos e endósporos que são morfologias similares aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, associados à produção biológica de hidrogênio e de ácidos orgânicos (LEITE *et al*, 2008).

Marfalarian	Inóculos							
Worloogias	А	D	DT	DA	S	ST	SA	
Bacilos	++++	++	++++	+++	++	+++	+++	
Cocos	-	+++	+	+	+++	+	+	
Endósporos	++++	+	++++	++++	+	+++	+++	
Filamentos	-	+++	++	++	+++	++	++	
Células ovaladas com bainha	++	+	+	+	++	+++	+++	
Sarcinas	-	+++	+	+	+++	+	+	
Navetes	-	-	-	-	++	++	++	

Tabela 5.19: Caracterização morfológica dos diferentes inóculos usados na produção biológica de hidrogênio no início da operação.

(++++) predominante, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (++) raros e (-) não observado.

Tabela 5.20: Caracterização morfológica dos diferentes inóculos usados na produção biológica de hidrogênio ao fina do período de operação

Morfologias	Inóculos							
Montologias	А	D	DT	DA	S	ST	SA	
Bacilos	++++	+++	++++	++++	+++	++	+++	
Cocos	-	++	+	+	++	+	+	
Endósporos	++++	++	+++	+++	++	++	++	
Filamentos	++	+++	++	++	+++	+++	+++	
Células ovaladas com bainha	+++	+	+	+	++	+++	+++	
Sarcinas	-	+	-	-	+	-	-	
Navetes	-	-	-	++	++++	+++	+++	

(++++) predominante, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (++) raros e (-) não observado.

5.2.4 Avaliação da comunidade microbiana

A avaliação da comunidade microbiana foi feita através da técnica de PCR-DGGE para o domínio *Bacteria* para diferentes condições. O dendograma foi realizado a partir dos padrões de bandas do DGGE e o coeficiente de similaridade usado foi calculado pelo índice de Jacard por meio do software Bionumerics[®] versão 2.5.

O dendograma com avaliação da diversidade bacteriana entre as três origens utilizadas neste trabalho (A, D e S) está apresentado na Figura 5.51. A comparação da comunidade bacteriana do inóculo D coletado no início (D0) e no fim da operação (D60) resultou no coeficiente de similaridade de 61%. As amostras de biomassa do reator inoculado com A foram agrupadas com similaridade de 42%. O inóculo S apresentou similaridade de 38%, indicando maior alteração da comunidade bacteriana (62%) após 60 dias de operação quando comparada com os inóculo D e A. Enquanto, o inóculo D apresentou a menor modificação da comunidade bacteriana (39%).



Figura 5.51: Dendograma do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* avaliando a diversidade entre a origem do inóculo no início (0), no meio (30) e no fim da operação (60) para os reatores inoculados com A, D e S.

A alteração da comunidade bacteriana do início para o final da operação dos inóculos D e S pode ser atribuída à seleção microbiana resultante da mudança do substrato (de água residuária de abatedouro de aves e de rejeitos de suinocultura para sacarose) e a configuração do reator (de reator anaeróbio de manta de lodo – UASB- para reator anaeróbio de leito fixo). Provavelmente, por esta razão, os inóculos D e S apresentaram baixa conversão de sacarose (43%) e baixa produção volumétrica de hidrogênio (23,2 e 15,1 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹, respectivamente para os inóculos D e S).

A modificação da comunidade microbiana de 58% da amostra A provavelmente está relacionado ao crescimento e adesão da biomassa ao material suporte. No início da operação,

a biomassa estava suspensa no caldo fermentado e após a operação a biomassa estava aderida ou nos interstícios do material suporte, mudando as características da comunidade bacteriana.

O coeficiente de similaridade entre as amostras coletadas no meio (30) e no final do período de operação (60) do reator inoculado com A foi de 96%, enquanto para os inóculos D e S foi de 61% e 60%, respectivamente, sugere que no reator inoculado com A ocorreu a manutenção da maioria das populações bacterianas nos últimos 30 dias de operação. Este resultado permite inferir que os inóculos S e D provavelmente ainda estavam em processo de seleção da comunidade microbiana.

Mesmo sem aplicar nenhuma técnica de pré-tratamento do inóculo para selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio, todas as origens do inóculo foram capazes de produzir hidrogênio. No entanto, o inóculo A produziu mais do que os outros (D e S), pois estes eram oriundos de reatores metanogênicos utilizados no tratamento de água residuária complexa.

As bandas marcadas com as setas "*a*" e "*b*" na Figura 5.51 mostram populações microbianas presentes em todas as amostras. A seta "*a*" foi observada nas amostras D0, D30, D60, A0, A30 e A60 e em menor intensidade nas amostras S0, S30 e S60, sugerindo que tal população foi favorecida independente da origem do inóculo utilizado e, provavelmente, esta esteja relacionada com a produção biológica de hidrogênio. Comportamento semelhante foi observado com a seta "b".

O resultado do DGGE que compara a comunidade bacteriana dos reatores inoculados com inóculos D com e sem pré-tratamento é apresentado na Figura 5.52.

106



Figura 5.52: Dendograma do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* avaliando a diversidade entre os inóculos com e sem pré-tratamento do lodo anaeróbio de abatedouro de aves (D) no iníco (0), no meio (30) e no fim da operação (60) para os reatores inoculados com D, DT e DA.

O primeiro grupo foi formado pelo inóculo D sem pré-tratamento coletado no início (D0), no meio (D30) e no fim da operação (D60). O coeficiente de similaridade, neste ramo, foi de 58%. O segundo foi constituído pelos inóculos com pré-tratamento coletado no início (DT0), no meio (DT30 e DA30) e no fim da operação (DT60 e DA60), com coeficiente de similaridade de 59%. O inóculo DA coletado no início da operação (DA0) formou um único ramo com modificação de 62% em relação ás outras comunidades microbianas, indicando que o lodo anaeróbio de reator UASB tratando efluente de abatedouro de aves apresentou a maior alteração nas populações bacterianas quando foi submetido ao pré-tratamento ácido quando comparado ao pré-tratamento térmico.

Analisando os três inóculos apresentados na Figura 5.52, pode-se verificar diferenças relativas à comunidade bacteriana no início da operação devido ao pré-tratamento realizado. O coeficiente de similaridade entre o inóculo D e DT foi de 49%, já entre os três foi de 38%. Estes resultados confirmam a seleção dos microrganismos pelo pré-tratamento térmico e ácido. Além disso, essa mudança da comunidade microbiana pode ter interferido no rendimento de hidrogênio, aumentando de 1,0 mol H_2 mol⁻¹ de sacarose quando o reator foi inoculado com D para 2,0 mol H_2 mol⁻¹ de sacarose para os inóculos DT e DA.

A operação dos reatores também foi importante na seleção e manutenção das comunidades microbianas. A modificação na comunidade microbiana no início e no término da operação foi significativa, maior que 32% para os inóculos D, DT e DA. Essa diferença está relacionada com as condições operacionais do reator anaeróbio de leito fixo, como o TDH aplicado de 2 horas, o substrato e o pH.

Nos últimos 30 dias de operação, comparando as amostras coletadas no meio (D30, DT30 e DA30) e no fim (D60, DT60 e DA60) do período, as alterações das comunidades microbianas nos reatores inoculados com D, DT e DA foram inferiores a 21%, permitindo inferir que houve a presença e a manutenção da maioria das populações bacterianas entre o meio e o final do período de operação.

As bandas marcadas com as setas "a", "b", "c" e "d" na Figura 5.52 mostram populações microbianas presentes em todas as amostras. A seta "a" foi observada em todos os inóculos: nas amostras D0, D30, D60, DA0, DA30 e DA60 e em menor intensidade nas amostras DT0, DT30 e DT60, sugerindo que tal população foi favorecida independente da técnica de pré-tratamento aplicada ao inóculo utilizado e, provavelmente, esta esteja relacionada com a produção biológica de hidrogênio. Comportamento semelhante foi observado na população destacada com a seta "c".

A população marcada com a seta "b" na Figura 5.52 esteve presente em todas as amostras, com exceção da coletada no início da operação com inóculo DA, indicando que este tipo de tratamento desfavoreceu o desenvolvimento destes microrganismos, porém eles foram capazes de estabelecer uma população durante a operação já que o afluente não era estéril.

As técnicas de pré-tratamento são utilizadas para selecionar os microrganismos produtores de hidrogênio. A banda assinalada com a seta "d" na Figura 5.52 é uma população que está presente nos inóculos pré-tratados (DT0, DT30, DT60, DA0, DA30 e DA60) e nas amostras do inóculo sem pré-tratamento (D0, D30 e D60) a intensidade da banda é fraca.

Desta forma, pode-se inferir que os pré-tratamentos favoreceram o desenvolvimento desta população e que, possivelmente, ela esteja relacionada com a produção biológica de hidrogênio.

O dendograma da avaliação da comunidade bacteriana do inóculo S com e sem prétratamento está apresentado na Figura 5.53. Por meio do coeficiente de similaridade, foi possível identificar três grupos. O primeiro deles foi composto pelo inóculo S (S0, S30 e S60), com coeficiente de similaridade de 56%. No segundo ramo, foram agrupadas as amostras de biomassa do reator inoculado com pré-tratamento ácido (SA) com similaridade de 60%. O inóculo com pré-tratamento térmico (ST) formou o terceiro grupo e apresentou similaridade de 52%.



Figura 5.53: Dendograma do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* avaliando a diversidade entre os inóculos com e sem pré-tratamento do lodo anaeróbio de suinocultura (S) no iníco (0), no meio (30) e no fim da operação (60) para os reatores inoculados com S, ST e SA.

Diferenças entre as comunidades bacterianas no início da operação podem ser observadas, pois as modificações entre os três inóculos foram de 51% entre o inóculo sem pré-tratamento e com pré-tratamento ácido e de 54% entre os três. Estes resultados demonstram o enriquecimento do inóculo com aplicação de técnicas de pré-tratamento, que proporcionou aumento da eficiência de conversão de sacarose para hidrogênio e ácidos e álcoois (de 42% para o inóculo S para 63% e 57% para os inóculos ST e SA, respectivamente) e da produção volumétrica de hidrogênio (de 15,1 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ para 21,1 e 26,7 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ para os inóculos ST e SA, respectivamente).

A operação dos reatores favoreceu a seleção das populações bacterianas nas comunidades microbianas. As modificações entre o início e o término da operação foram de 44% para o inóculo S, de 48% para o inóculo ST e de 40% para o inóculo SA. Essas diferenças foram resultado das condições operacionais do reator anaeróbio de leito fixo, como o TDH aplicado de 2 horas, o substrato e o pH.

Após o 30° dia de operação até o fim da operação, a maioria da comunidade microbiana bacteriana se manteve presente nos reatores, pois o coeficiente de similaridade entre o meio (S30, ST30 e SA30) e final (S60, ST60 e SA60) da operação foi maior que 70% para todos os inóculos apresentados na Figura 5.53. O coeficiente de similaridade entre as amostras ST30 e ST60 foi de 85% e entre SA30 e SA60 foi de 87%.

As setas "*a*", "*b*" e "*c*" na Figura 5.53 mostram populações microbianas presentes em todas as amostras. A seta "*a*" foi observada em todos os inóculos: nas amostras SA0, SA30 e SA60 e em menor intensidade nas amostras S0, S30, S60, ST0, ST30 e ST60, sugerindo que tal população foi favorecida pela técnica de pré-tratamento ácido aplicado ao inóculo utilizado e, provavelmente, esta população esteja relacionada com a produção biológica de hidrogênio. Comportamento semelhante foi observado na população destacada com a seta "*b*".

As técnicas de pré-tratamento são utilizadas para selecionar os microrganismos produtores de hidrogênio. A banda assinalada com a seta "*c*" é uma população que está presente nos inóculos pré-tratados (ST30, ST60, SA30 e SA60) com banda intensa e nas amostras do inóculo sem pré-tratamento e no início dos inóculos pré-tratados (S0, S30, S60, ST0 e SA0) a intensidade da banda é fraca. Desta forma, pode-se inferir que os pré-tratamentos e a operação dos reatores favoreceram o desenvolvimento desta população e que, provavelmente, ela esteja relacionada com a produção biológica de hidrogênio.

A avaliação da comunidade bacteriana no final do período para todos os reatores operados (A, D, DT, DA, S, ST e SA) está apresentada no dendograma na Figura 5.54. A partir da Figura 5.54, foi possível identificar dois grupos. O primeiro deles foi composto pelo inóculo A60 e S60, com coeficiente de similaridade de 38%. No segundo ramo foram agrupadas as amostras de biomassa do inóculo D com e sem pré-tratamento (D60, DT60 e DA60) e inóculo com pré-tratamento térmico e ácido do lodo anaeróbio de suinocultura (ST e SA) com similaridade de 62%. Desta forma, pode-se inferir que as populações bacterianas dos inóculos A60 e S60 apresentaram as maiores alterações quando comparadas com os reatores do segundo grupo com pré-tratamento (38%), com exceção do reator inoculado com D60.



Figura 5.54: Dendograma do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* avaliando a diversidade entre os inóculos A, D, DT, DA, S, ST e SA no término da operação dos reatores.

Analisando os inóculos apresentados na Figura 5.54, pode-se verificar diferenças relativas à comunidade bacteriana devido à origem e ao pré-tratamento do inóculo utilizado. O coeficiente de alteração entre A60 e S60 foi de 62% e entre as três origens (A60, S60 e D60) de 67%. Com relação ao pré-tratamento, os inóculos do lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura (S60, ST60 e SA60) apresentaram maior alteração da comunidade bacteriana, com modificações de 67%, quando comparado com os inóculos do lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves (D60, DT60 e DA60), que apresentaram modificações de 27%.

A similaridade para os inóculos pré-tratados entre DT e DA e entre ST e SA foi de 89% e 79%. Essa elevada semelhança entre as comunidades microbianas influenciaram os parâmetros de monitoramento: o rendimento médio de hidrogênio foi idêntico para os inóculos DT e DA, igual a 2,0 mol H_2 mol⁻¹ de sacarose; a produção volumétrica de hidrogênio foi similar para os inóculos ST e SA, de 21,1 e 26,7 mL H_2 h⁻¹ L⁻¹ respectivamente.

As setas "*a*", "*b*" e "*c*" na Figura 5.54 mostram populações microbianas presentes nas amostras. As populações indicadas pelas setas "*a*" *e* "*c*" foram observadas em todos os inóculos sugerindo que estas populações estejam relacionadas com a produção biológica de hidrogênio.

A banda assinalada com a seta "b" é uma população que está presente nos inóculos pré-tratados (D60, DA60, ST30 e SA60) com banda intensa e nas amostras do inóculo sem pré-tratamento (D60 e S60) a intensidade da banda é fraca. No entanto, no inóculo A60 esta banda não está presente. Desta forma, pode-se inferir que os pré-tratamentos dos inóculos favoreceram o desenvolvimento desta população e que, provavelmente, ela esteja relacionada com a produção biológica de hidrogênio.

As comunidades bacterianas presentes nos reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente utilizados para a produção biológica de hidrogênio foram diferentes por três motivos. Primeiro, a origem do inóculo influenciou a comunidade microbiana, como foi observado na Figura 5.51 e Figura 5.54. Segundo, o pré-tratamento do lodo anaeróbio enriqueceu os inóculos por meio da seleção das bactérias formadoras de esporos alterando as comunidades microbianas. As condições operacionais do reator foram outro fator que proporcionaram modificações das populações bacterianas presentes no início e no fim do período de operação.

5.2.5 Instabilidade na produção de hidrogênio

Como apresentado anteriormente, houve instabilidade da produção de biogás, da vazão molar de hidrogênio, da produção volumétrica de hidrogênio e do rendimento da produção de hidrogênio, com aumento até o ápice e subseqüente queda até o 60° dia, em todos os experimentos, independente do inóculo estudado. Esta instabilidade já havia sido observada por Lima (2011), Anzola-Rojas (2010) e Fernandes (2008) em reator e condições similares às aplicadas no presente trabalho.

Além disso, esta instabilidade também foi observada no meio líquido, principalmente na conversão da sacarose e nos produtos intermediários. Como foi justificado anteriormente, a instabilidade no meio liquido possivelmente pode ser explicada, pois a comunidade microbiana não estava adaptada às condições operacionais no início da operação. Com o passar do tempo ela foi se adequando às condições e aumentando a conversão de sacarose até que a quantidade de polímero extracelular provocasse anomalias no escoamento, permitindo a formação de caminhos preferenciais no meio líquido e reduzindo a eficiência de conversão da sacarose.

Nos produtos intermediários, não se observou aumento na produção de intermediários mais reduzidos como ácido propiônico, que está associado à baixa produção de hidrogênio. O pH efluente se manteve estável e próximo de 4,5 em todos os inóculos testados (Figura 5.55 e Tabela 5.21). Segundo Hawkes *et al.* (2007), os reatores anaeróbios com pH próximo a 4,5 produzem hidrogênio em quantidade inferior ao observado quando o pH do reator é mantido em 5,0-6,0, pois a partir de 4,5 a troca da rota metabólica acidogênica para a solvetogênica diminuindo a produção de hidrogênio (Lee *et al.*, 2002). Portanto, a instabilidade da produção de hidrogênio pode ter sido provocada pela queda do pH, porém esse fenômeno não explicar a queda da vazão molar do gás carbônico (Figura 5.56).



Figura 5.55: Variação temporal do pH no efluente dos diferentes inóculos: A (\rightarrow), D (\rightarrow), DT(\rightarrow), DA (\rightarrow), S (\rightarrow), ST(\rightarrow) e SA (\rightarrow).

Ináculo	pH efluente								
moculo	Média	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo			
Α	$4,8 \pm 0,3$	4,7	4,6	4,8	4,4	5,8			
D	$5,0\pm0,4$	4,9	4,8	5,3	4,4	6,0			
DT	$4,8 \pm 0,3$	4,8	4,7	5,0	4,5	5,9			
DA	$4,5\pm0,1$	4,4	4,4	4,5	4,3	4,7			
S	$5,0 \pm 0,3$	5,0	4,8	5,1	4,4	6,0			
ST	$4,5\pm0,1$	4,5	4,4	4,6	4,2	4,9			
SA	$4,7 \pm 0,2$	4,4	4,6	4,8	4,4	5,1			

Tabela 5.21: Valores médios, mínimos e máximos do pH efluente para cada inóculo estudado

Desta forma, a instabilidade está também relacionada com o biogás gerado, como pode ser observada na Figura 5.56 que mostra o comportamento similar da vazão molar de hidrogênio e do gás carbônico para todos os inóculos testados. Este desempenho semelhante indica que os componentes do biogás podem estar sendo consumidos por alguns microrganismos presentes nos inóculos, como as arqueas metanogênicas e as bactérias homoacetogênicas.



Figura 5.56: Variação temporal da vazão molar de hidrogênio (→) e do gás carbônico (→) para os inóculos testados: A (a), D (b), DT (c), DA (d), S(e), ST (f) e SA (g).

Embora todos os inóculos testados tenham tido o mesmo comportamento, observa-se na Figura 5.56d que o inóculo do lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves com pré-tratamento ácido (DA) apresentou o comportamento mais estável, embora em valores baixos. Este comportamento indica que o pré-tratamento ácido foi mais efetivo em reduzir a atividade do consumo de hidrogênio e gás carbônico.

Anzola-Rojas (2010) supôs que o consumo concomitante de gás carbônico e hidrogênio fosse por homoacetogênese, porém essa hipótese foi recusada pela autora por não observar um aumento da concentração do ácido acético.

No entanto, a concentração de ácido acético pode não variar enquanto o processo de homoacetogênese ocorre. Arooj *et al.* (2008) propuseram um modelo para estimar a produção de ácido acético pela homoacetogênese. A produção de ácido acético acompanhada pela produção de hidrogênio (Reação 5.6) é favorável para a produção de biológica de hidrogênio. O ácido acético gerado por esta via será representado por HAc_{H2}.

$$C_{12}H_{22}O_{11}+5H_2O \rightarrow 4CH_3COOH+4CO_2+8H_2$$
 (Reação 5.6)

No entanto, o hidrogênio e dióxido de carbono no reator podem reagir e formar ácido acético (Reação 5.7), que é uma via desfavorável para a produção de biológica de hidrogênio. O ácido acético gerado por esta via será representado por HAc_{Homoacetogênese}.

$$4H_2+2CO_2 \rightarrow CH_3COOH+2H_2O \qquad \Delta G^0 = -55.1 \text{ kJ.mol}^{-1} \qquad (\text{Reação } 5.7)$$

Considerando que a produção de ácido propiônico consome um mol de hidrogênio e que a conversão de um mol de sacarose para ácido bútirico gera 4 mols de hidrogênio têm-se, então:

$[HAc] = [HAc]_{Homoacetogenese} + [HAc]_{H2}$	(Equação 5.8)
$[H2] = 8*[HAc]_{H2} + 4*[But{irico}] - [Propionico] - 4*[HAc]_{Homoacetogenese}$	(Equação 5.9)

Substituindo a Equação 5.8 na Equação 5.9 e isolando HAc_{Homoacetogenese}, obtêm-se a Equação 5.10 que mostra como calcular a parcela de ácido acético devido a homoacetogenese, quando não há produção de metano.

$$HAc_{Homoacetogenese} = \frac{8*[HAc] + 4*[Butírico] - [Propiônico] - [H_2]}{12}$$
(Equação 5.10)

Além disso, o hidrogênio e o ácido acético podem ser consumidos para formação de metano, apresentados nas Reações 5.11 e 5.12, respectivamente. Segundo Luo *et al.* (2011), no processo de digestão anaeróbia, o processo da homoacetogênese não compete com a metanogênese, pois são menos termodinamicamente desfavoráveis e a afinidade das metanogênicas para o hidrogênio está em entre 10 e 100 vezes maior que a afinidade das homoacetogênicas.

$$\begin{array}{ll} 4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2 O \\ CH_3 COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \end{array} \qquad \Delta G^0 = -130,7 \text{ kJ.mol}^{-1} \\ \Delta G^0 = -31 \text{ kJ.mol}^{-1} \end{array} \qquad (\text{Reação 5.11}) \\ (\text{Reação 5.12}) \end{array}$$

Fazendo as mesmas ressalvas, que a produção de ácido propiônico consome um mol de hidrogênio, que a conversão de um mol de sacarose para ácido bútirico gera 4 mols de hidrogênio e um de ácido e que todo o metano gerado seja produzido pela Reação 5.11, têm-se:

$$[HAc] = [HAc]_{Homoacetogenese} + [HAc]_{H2}$$
(Equação 5.13)
$$[H_2] = 8*[HAc]_{H2} + 4*[Butírico]-[Propiônico]-4*[HAc]_{Homoacetogenese} - 4*[CH_4]$$
(Equação 5.14)

Substituindo a Equação 5.13 na Equação 5.14 e isolando HAc_{Homoacetogenese}., obtêm-se a Equação 5.15 que mostra como calcular a parcela de ácido acético devido a homoacetogênese, quando há produção de metano exclusivamente pela Reação 5.11

$$HAc_{Homoacetogenese} = \frac{8*[HAc] + 4*[Butírico] - [Propionico] - [H_2] - 4*[CH_4]}{12}$$
(Equação 5.15)

O ácido acético utilizado na reação de metanogênese acetoclástica (Reação 5.12) será representado como HAc_{CH4}. Considerando que todo metano seja produzido por esta reação (Reação 5.12), o balanço será o seguinte:

$[HAc] = [HAc]_{Homoacetogenese} + [HAc]_{H2} - [HAc]_{CH4}$	(Equação 5.16)
$[HAc]_{CH4} = [CH_4]$	(Equação 5.17)
$[H_2] = 8*[HAc]_{H2} + 4*[But{irico}] - [Propiônico] - 4*[HAc]_{Homoacetogenese}$	(Equação 5.18)

Substituindo as Equações 5.16 e 5.17 na Equação 5.18 e isolando HAc_{Homoacetogenese}., obtêm-se a Equação 5.19 que mostra como calcular a parcela de ácido acético devido a homoacetogênese, quando há a produção de metano exclusivamente pela Reação 5.12.

$$HAc_{Homoacetogenese} = \frac{8*([HAc] + [CH_4]) + 4*[Butírico] - [Propiônico] - [H_2]}{12}$$
(Equação 5.19)

Desta forma, quando houver metano no biogás do reator haverá um valor máximo e outro mínimo do ácido acético oriundo da homoacetogênese. Esses valores serão obtidos pelas reações de metanogênese acetoclástica (Equação 5.19) e de metanogênese hidrogenotrófica (Equação 5.15) respectivamente.

A relação entre o rendimento e a porcentagem de ácido acético oriundo da homoacetogênese sobre o ácido acético total em cada inóculo testado está apresentado nas Figura 5.57 a 5.63. Analisando estas figuras, pode-se observar que à medida que o rendimento de hidrogênio decresce, há o aumento da porcentagem do ácido acético oriundo da homoacetogênese. Assim, o hidrogênio produzido está sendo consumido juntamente com o gás carbônico com síntese do ácido acético, havendo a redução da concentração de ambos no biogás, como demonstrado na Figura 5.56.



Figura 5.57: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc, \rightarrow) no reator inoculado com A.



Figura 5.58: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc): no período que não há produção de metano (\rightarrow), a relação máxima (\rightarrow) e mínima (\rightarrow) quando há a produção de metano no reator inoculado com D.



Figura 5.59: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc, \rightarrow) no reator inoculado com DT.



Figura 5.60: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc): no período que não há produção de metano (\rightarrow), a relação máxima (\rightarrow) e mínima (\rightarrow) quando há a produção de metano no reator inoculado com DA.



Figura 5.61: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc): no período que não há produção de metano (\rightarrow), a relação máxima (\rightarrow) e mínima (\rightarrow) quando há a produção de metano no reator inoculado com S.



Figura 5.62: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc): no período que não há produção de metano (\rightarrow), a relação máxima (\rightarrow) e mínima (\rightarrow) quando há a produção de metano no reator inoculado com ST.



Figura 5.63: Variação temporal do rendimento (\rightarrow) e da relação do ácido acético gerado pela homoacetogênese sobre a concentração de ácido acético total (HAc_{Homoacetogenese}/HAc): no período que não há produção de metano (\rightarrow), a relação máxima (\rightarrow) e mínima (\rightarrow) quando há a produção de metano no reator inoculado com SA.

Arooj *et al.* (2008) estudaram a produção contínua de hidrogênio em um reator de mistura usando amido como substrato, com variação do tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 a 18 horas. A modelagem do consumo de hidrogênio pelas homoacetogênicas foi realizada e observou-se que para baixos TDH, entre 9 e 4 horas, a relação entre a concentração de ácido acético gerado pela homoacteogênese sobre a concentração total foi significativa, em torno de 50%. Para TDH elevados, entre 18 e 12 horas, essa relação não foi tão relevante, próximo dos 30%.

A pressão parcial de hidrogênio na fase líquida é um parâmetro que afeta a produção biológica de hidrogênio. Altas pressões parciais têm efeito negativo diminuindo a atividade da hidrogenase, tornando as reações produtoras de hidrogênio termodinamicamente desfavoráveis e beneficiando reações que consomem o hidrogênio como a homoacetogênese que utilizam o hidrogênio e o gás carbônico e sintetizam ácido acético (DINAMARCA; BAKKE, 2009).

122
Portanto, possivelmente a alta pressão parcial de hidrogênio na fase líquida é responsável pela queda da produção do biogás, do consumo do hidrogênio e do gás carbônico deslocando o equilíbrio das reações que consomem o hidrogênio como a homoacetogênese (Reação 5.7) e a conversão do ácido acético a etanol (Reação 5.5).

5.2.6 Perfil espacial dos parâmetros monitorados

No término do período de operação, no 60° dia de operação, de cada reator foi realizado os perfis espaciais de pH, eficiência de conversão de sacarose e da concentração dos metabólitos intermediários (ácidos e álcoois) com o intuito de se observar o comportamento do processo de produção biológica de hidrogênio ao longo dos reatores e no futuro subsidiar o desenvolvimento de uma modelagem matemática da cinética de produção biológica de hidrogênio. Os pontos de coleta estão destacados na Figura 5.64, no qual o ponto 1 é o afluente do reator, o ponto 2 é na câmara de entrada; os pontos 3, 4, 5, 6 e 7 são pontos de amostragem do leito e o ponto 8 é o efluente. Na Tabela 5.22, há a correlação entre os pontos de coleta e a relação comprimento e diâmetro interno correspondente, pois os gráficos dos perfis utilizam este parâmetro no eixo da abscissa.



Figura 5.64: Identificação dos pontos de coleta para a realização do perfil espacial nos reatores.

Tabela 5.22: Identificação dos pontos de coleta para a realização do perfil espacial nos reatores.

Ponto de coleta	Relação comprimento e diâmetro (L.D ⁻¹)			
1 (Afluente)	0			
2	0,63			
3	2,00			
4	3,19			
5	4,38			
6	5,56			
7	6,75			
8 (Efluente)	8,81			

O perfil espacial do pH para todos os tipos de inóculos testados é apresentado na Figura 5.65. Para todos, logo após a entrada do reator, no primeiro ponto de amostragem do reator, o valor do pH foi inferior a 6, em comparação com o pH do afluente que era de 6,5. Além disso, os comportamentos apresentados pelos inóculos estudados são similares aos demonstrados por Fernandes (2008), Peixoto (2008), Anzola-Rojas (2010) e Lima (2011), nos quais ocorreram queda de valores do pH ao longo do leito.



Figura 5.65: Perfil espacial de pH com diferentes inóculos: A (\rightarrow), D (\rightarrow), DT (\rightarrow), DA (\rightarrow), S(\rightarrow), ST (\rightarrow) e SA (\rightarrow).

O perfil da conversão de sacarose nos reatores inoculados (Figura 5.66) apresenta crescimento ao longo do reator, demonstrando a ocorrência do regime hidrodinâmico pistonado. Além disso, a maior parte da sacarose foi convertida no primeiro terço do reator, principalmente na câmara de entrada e na primeira parte do leito. Nesta região que engloba os dois primeiros pontos de amostragem do reator, o reator inoculado pelo processo de autofermentação (A) apresentou aproximadamente 65% de conversão da sacarose e o reator inoculado com o lodo anaeróbio D teve 50%.



Figura 5.66: Perfil espacial da eficiência de conversão da sacarose com diferentes inóculos: A (↔), D (↔), DT (↔), DA (↔), S (↔), ST (↔) e SA (↔).

Os principais produtos intermediários observados foram o etanol, o ácido butírico, o ácido acético e o ácido lático similar ao observado no efluente dos reatores. O perfil espacial dos principais produtos em cada um dos inóculos estudados é apresentado nas Figura 5.67 a 5.73. No primeiro ponto de amostragem, não foi detectado nenhum produto intermediário da conversão da sacarose em hidrogênio.

No primeiro terço do reator, principalmente na câmara de entrada e na primeira parte do leito, pode-se observar que as concentrações de ácido butírico e etanol equivalem a mais de 50% da concentração do efluente do reator. Nesta região que engloba os dois primeiros pontos de amostragem do reator, o reator inoculado com o lodo anaeróbio DA teve aproximadamente 90% e 50% para o ácido butírico e etanol; respectivamente, e o reator inoculado com o lodo anaeróbio SA apresentou valor superior a 70% para o ácido butírico e 60% para o etanol.



Figura 5.67: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com A: ácido acético(→), ácido propiônico (→), ácido butírico (→), etanol (→) e ácido lático (→).



Figura 5.68: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com D: ácido acético(→), ácido propiônico (→), ácido butírico (→), etanol (→) e ácido lático (→).



Figura 5.69: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado DT: ácido acético(----), ácido propiônico (----), ácido butírico (-----), écido lático (-----).



Figura 5.70: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com DA: ácido acético(\rightarrow), ácido propiônico (\rightarrow), ácido butírico (\rightarrow), etanol (\rightarrow) e ácido lático (\rightarrow).



Figura 5.71: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com S: ácido acético(\rightarrow), ácido propiônico (\rightarrow), ácido butírico (\rightarrow), etanol (\rightarrow) e ácido lático (\rightarrow).



Figura 5.72: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado ST: ácido acético(→), ácido propiônico (→), ácido butírico (→), etanol (→) e ácido lático (→).



Figura 5.73: Perfil espacial dos metábolitos no reator inoculado com SA: ácido acético(\rightarrow), ácido propiônico (\rightarrow), ácido butírico (\rightarrow), etanol (\rightarrow) e ácido lático (\rightarrow).

5.2.7 Comportamento hidrodinâmico dos reatores

Os ensaios hidrodinâmicos foram feitos com os reatores no início, ou seja, sem biomassa e no final de cada uma das operações, isto é, com 60 dias de operação para cada um dos inóculos estudados. Seguindo a metodologia descrita no subitem 4.2.8 do item Material e Métodos, foram traçadas as curvas de distribuição do tempo de residência real em cada fase como pode ser visto na Figura 5.74, que relaciona variação da concentração do traçador pelo tempo. As curvas R1 e R2 são as obtidas pelos dois reatores de leito fixo utilizados neste trabalho, preenchidos com o material suporte e sem biomassa.



Figura 5.74: Curva de distribuição do Tempo de Detenção Hidráulica nos reatores com e sem biomassa.

Analisando a Figura 5.74, verifica-se que mesmo o leito do reator não sendo ordenado, ambos os reatores (R1 e R2) sem biomassa tiveram comportamento similares e o TDH real ficou próximo ao TDH teórico esperado.

A biomassa intersticial do material suporte provavelmente fez com que o comportamento do escoamento se alterasse em relação aos reatores sem biomassa. Para todos os ensaios realizados com biomassa, o pico das curvas ocorreu antes do TDH teórico esperado (2 horas ou 120 minutos). Este comportamento sugere que em todas as condições ocorreram anomalias no escoamento, como zonas mortas ou caminhos preferenciais provocados pela biomassa presente nos interstícios da matriz do material suporte (Levenspiel, 2000). Na Tabela 5.23 são apresentados os valores do TDH real, da variância, do número de tanques em série, do número de dispersão e da quantidade de biomassa intersticial em cada fase de operação.

Inóculo	TDH (min)	Variância (σ)	<u>D</u> и. L	N	Biomassa intersticial (mg STV.g ⁻¹ material suporte)
R1- sem biomassa	120,39	1148,61	0,040	13	-
R2- sem biomassa	117,47	1179,37	0,043	12	-
А	31,79	321,78	0,159	3	12,05
D	20,51	117,08	0,139	4	21,83
DT	12,03	59,21	0,205	4	27,66
DA	29,97	321,25	0,179	3	48,38
S	19,09	121,47	0,167	3	32,41
ST	29,93	335,62	0,187	3	43,51
AS	24,51	248,29	0,207	2	17,00

Tabela 5.23: Dados obtidos nos ensaios hidrodinâmicos e concentração da biomassa intersticial para os reatores sem biomassa e para os inóculos estudados

Os valores de variância (σ) diminuíram no final da operação quando comparado com os resultados obtidos nos reatores sem biomassa indicando aumento do coeficiente de dispersão quando a biomassa estava presente na realização dos ensaios hidrodinâmicos. Este comportamento também foi observado por Fontes (2011) e Anzola-Rojas (2010). No entanto, não foi possível determinar alguma relação entre a quantidade de biomassa nos interstícios do material suporte e o coeficiente de dispersão.

Os valores de biomassa intersticial são inferiores aos valores obtidos por Fontes (2011) e Anzola-Rojas (2010). Essa discrepância pode ter sido causada pela diferença na forma de compactação do leito proveniente do uso de uma matriz de material suporte mais homogêneo e com menor diâmetro equivalente (4,76 mm), que diminuiu o volume intersticial disponível para o desenvolvimento dos microrganismos.

Os perfis espaciais e os dados hidrodinâmicos serão utilizados no futuro para subsidiar o desenvolvimento de uma modelagem matemática da cinética de produção biológica de hidrogênio.

6 Conclusões

Os resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho de pesquisa permitem concluir que há influência da origem e do pré-tratamento do inóculo sobre a produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária sintética. A escolha da origem do inóculo e do pré-tratamento ao qual o mesmo é submetido pode ser decisiva em relação à produção de bioenergia pela influência notada sobre os rendimentos de hidrogênio.

Além disso, a partir dos resultados obtidos e da discussão apresentadas por este trabalho, pode-se concluir que:

• A metodologia para determinação e quantificação de ácidos, álcoois e carboidratos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentou linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação satisfatórios, mostrando se como uma ferramenta útil para o controle do processo de produção de bioenergia;

• A origem e o pré-tratamento do inóculo influenciam a produção do biogás, a vazão molar de hidrogênio, a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento de hidrogênio. A eficiência de conversão da sacarose também foi influenciada por estes dois fatores.

• O inóculo obtido pelo processo de autofermentação (A) resultou no maior rendimento médio de 2,1 mol de H₂ mol⁻¹ de sacarose, similar aos obtidos nos reatores inoculados com lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves com pré-tratamento térmico e ácido (DT e DA) que resultaram em 2,0 mol de H₂ mol⁻¹ de sacarose. O consórcio microbiano obtido pelo processo de fermentação natural (A) mostrase interessante para a produção biológica de hidrogênio, pois não foi necessário a aplicação de técnicas de pré-tratamento para a seleção dos microrganismos. No entanto, a instabilidade da produção biológica de hidrogênio é um ponto negativo deste inóculo;

• O inóculo obtido do lodo anaeróbio de reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves com pré-tratamento ácido (DA) foi o consórcio microbiano que apresentou a maior estabilidade da produção biológica de hidrogênio e os maiores valores de eficiência de conversão de sacarose e produção volumétrica de hidrogênio, 70,5% e 61,6 mL $H_2 h^{-1} L^{-1}$, respectivamente. Sendo, assim, uma técnica de pré-tratamento para enriquecimento das bactérias produtoras de hidrogênio viável em larga escala;

• O biogás produzido foi composto principalmente por H_2 e CO₂. As porcentagens médias de hidrogênio foram superiores a 54,6% para todos os inóculos estudados. Metano foi detectado nos inóculos D, DA, S, ST e SA em dois momentos: no início e no final da operação.

• Para todos os inóculos estudados, os principais metabólitos foram ácido butírico e etanol com distribuição percentual superior a 15% e 19%, respectivamente;

• Os exames de microscopia possibilitaram visualizar a diversidade de morfologias presentes na comunidade microbiana no início e no final da operação, além de observar formas de bactérias semelhantes aos principais gêneros responsáveis pela produção biológica de hidrogênio, como bacilos similares aos dos *Clostridium*;

• Por meio da técnica de PCR-DGGE, foi possível comparar a comunidade bacteriana presente nos inóculos em três momentos da operação: início, meio e fim. Desta forma, observou-se que a origem e o pré-tratamento do inóculo influenciaram no consórcio microbiano. O coeficiente de similaridade entre os inóculos (A, D e S) foi de 38% e entre os inóculos sem e com pré-tratamento foi de 38% para o lodo anaeróbio de reator UASB

134

tratando água residuária de abatedouro de aves (D, DT e DA) e de 46% para o lodo anaeróbio de reator UASB tratando rejeitos de suinocultura (S, ST, SA);

• A queda da produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente está relacionada com a alta pressão parcial do hidrogênio que desloca o equilíbrio para reações que consomem o hidrogênio, como a homoacetogênese, que usa o hidrogênio e o gás carbônico presentes no biogás produzido para sintetizar ácido acético, e a reação entre o hidrogênio e ácido acético que produz etanol. Portanto, houve a queda do hidrogênio e não houve o aumento do ácido acético, mas sim do etanol.

7 Sugestões

Considerando os resultados obtidos e as experiências vivenciadas no presente trabalho, são apresentadas sugestões de temas para futuros trabalhos de produção biológica de hidrogênio:

• Comparar configurações de reatores usando mesmo inóculo, substrato e condições operacionais, com objetivo de estudar a influência do escoamento, da transferência de massa e da retenção de sólidos na produção biológica de hidrogênio;

Analisar a pressão parcial de hidrogênio no meio líquido visando melhorar a produção de hidrogênio;

• Realizar estudo microbiológico mais aprofundado com o intuito de identificar os principais grupos de microrganismos presentes e de genes responsáveis pela produção e consumo do hidrogênio com o objetivo de solucionar a queda na produção do biogás.

• Avaliar a possibilidade de aproveitamento dos ácidos e álcoois por meio de técnicas de separação, tendo em vista as concentrações obtidas, principalmente de etanol.

136

8 Referências bibliográficas

- 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, n. 12, p. 5061-5071, 2009a.
- AKUTSU, Y., LEE, D.-Y., LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 13, p. 5365-5372, 2009b.
- AMORIM, E.L.C., BARROS, A.R., DAMIANOUIC, M.; 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, n. 2, p. 783-790, 2009.
- ANZOLA -ROJAS, M. P. Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- AROOJ, M.F., HAN, S.K., KIM, S.H., KIM, D.H.; SHIN, H.S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 33, n.13, p. 3289-3294, 2008.
- AZBAR, N., DOKGOZ, F.T.C., KESKIN, T., KORKMAZ, K.S.; SYED, H.M. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 34, n. 17, p. 7441-7447, 2009.
- BARROS, A.R., ADORNO, M.A.T., SAKAMOTO, I.K., MAINTINGUER, S.I., VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology* v. 102, n.4, p. 3840-3847, 2011.
- BARROS, A.R., DE AMORIM, E.L.C., REIS, C.M., SHIDA, G.M.; SILVA, E.L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* v.35, n.8, p. 3379-3388, 2010.
- CAI, M.L., LIU, J.X.; WEI, Y.S. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environmental Science & Technology* v. 38, n. 11, p. 3195-3202, 2004.
- CHANG, J.S., LEE, K.S.; LIN, P.J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy* v. 27, n. 11-12, p. 1167-1174, 2002.
- CHEN, C.C., LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 57, n. 1-2, p. 56-64, 2001.

- CHEONG, D.Y.; HANSEN, C.L. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 72, n. 4, p. 635-643, 2006.
- CHUI, Q.S. H.; ZUCHINI, R.; LICHITIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Química Nova*, v.24, n. 3, p. 374-380, 2001.
- DAMASCENO, L.H.S; ADORNO, M.A.T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B. A; ZAIAT, M. Development and validation of a HPLC method for the determination of alicarb, alicarb sulfoxide and alicarb sulfone in liquid samples from anaerobic reactors. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 19, n. 6, p. 1158-1164, 2008.
- DANKO, A.S., PINHEIRO, F., ABREU, A.A.; ALVES, M.M. Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components. *Environmental Engineering and Management Journal*, v. 7, n.5, p. 531-536, 2008.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, n. 1, p. 13-28, 2001.
- 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, São Carlos, 1987.
- DINAMARCA, C.; BAKKE, R. Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications. *Water Science and Technology* v. 59, n. 7, p. 1441-1447, 2009.
- DUARTE, I.C.S; OLIVEIRA, L.L; BUZZINI, A.P.; ADORONO, M. A. T; VARESCHE, M. B. A. Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. *Journal of Chemical Society*, v.17, n. 7, p. 1360-1367, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FANG, H.H.P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 1, p. 87-93, 2002.
- FANG, H.H.P., ZHANG, T.; LIU, H. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, n. 1, p. 112-118, 2002.
- FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- FERNANDES, B.S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F.R.; AGUILA, N.K.S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, v. 14, p. 143–148, 2010.

- GAVALA, H.N.; SKIADAS, L.V.; AHRING, B.K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 9, p.1164-1175, 2006.
- GODON, J.J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P.; HABOUZIT, F.; MOLETTA, R. Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science and Technology*, v. 36, n. 6-7, p. 49-55, 1997.
- GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNAand rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.
- GUWY, RA.J; HAWKES, F.R.; HAWAKES, D.L.; ROZZI, A. G. Hydrogen production in a high rate fluidized bed anaerobic digester. *Water Research*, v. 31, n. 6, p. 1291-1298, 1997.
- 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, n. 2, p. 172-184, 2007.
- HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES D. L.; HUSSY I. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1339 1347, 2002.
- HU, B.; CHEN, S.L. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, n. 15, p. 3266-3273, 2007.
- HUNG, C.H.; CHANG, Y.T.; CHANG, Y.J. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8437-8444, 2011.
- HWANG, J.H.; CHOI, J.A.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; BHATNAGAR, A.; MIN, B.; SONG, H.; KUMAR, E.; CHOI, J.; LEE, E.S.; KIM, Y.J.; UM, S.; LEE, D.S.; JEON, B.H. Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 24, p. 9702-9710, 2009.
- KAWAGOSHI, Y.; HINO, N.; FUJIMOTO, A.; NAKAO, M.; FUJITA, Y.; SUGIMURA, S.; FURUKAWA, K. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, n. 5, p. 524-530, 2005.
- KESKIAN, T.; AKÖYESK, E.; AZBAR, N. Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed material of ceramic rings and pumice stone. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 23, p 15160-15167, 2011.
- KIM D.H.; HAN S.K.; KIM S.H.; SHIN H.S. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 15, p. 2158–2169, 2006a.
- KIM, S.H.; HAN, S.K.; SHIN, H.S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochemistry, v. 41, n. 1, p. 199-207, 2006b.

- LAY, J.J.; LEE, Y.J.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, v. 33, n. 11, p. 2579-2586, 1999.
- LAZARO, C. Z. Obtenção e caracterização filogenética de concsórcio microbiano de bactérias fototróficas púrpuras não-sulforosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2009.
- LEE, K.S.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 4, p. 465-472, 2006.
- LEE, K.S.; LO, Y.S.; LO, Y.C.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology Letters*, v. 25, n. 2, p. 133-138, 2003.
- LEE, Y.J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 77, n. 6, p. 694-698, 2002.
- LEE, Z.K.; LI, S.L.; LIN, J.S.; WANG, Y.H.; KUO, P.C.; CHENG, S.S. Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 19, p. 5234-5241, 2008.
- LEITE, J.A.C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M., Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 2, p. 579-586, 2008.
- LEVENSPIEL, O. Engenharia das reações químicas. 3 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.
- LI, Y.F.; REN, N.Q.; CHEN, Y.; ZHENG, G.X. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, n. 6, p. 755-760, 2007;
- LIMA, D. M. F. Influência da razão de recirculação na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- LIN, C.Y.; LAY, C.H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, n. 1, p. 41-45, 2004.
- LIN, C.Y.; CHANG, R.C. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, n. 7, p. 715-720, 2004.
- LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.H.; WANG, W.; ZHOU, Q. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 3, p. 959-964, 2010.
- LUO, G.; KARAKASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Long-Term Effect of Inoculum Pretreatment on Fermentative Hydrogen Production by Repeated Batch

Cultivations: Homoacetogenesis and Methanogenesis as Competitors to Hydrogen Production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 8, p. 1816-1827, 2011.

- MAINTINGUER, S.I.; FERNANDES, B.S.; DUARTE, I.C.S.; SAAVEDRA, N.K.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, 2008.
- MATHEWS, J.; WANG, G.Y. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 17, p. 7404-7416, 2009.
- MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, v. 99, 59-67, 2008.
- MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H-2-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, p. 947-953, 2007.
- MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H-2 production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere*, v. 64, n. 3, p. 350-358, 2006.
- NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. 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.
- OH, S.E.; GINKEL, S.V.; LOGAN, B.E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science Technology*, v. 37, p. 5186-5190, 2003.
- PECINA, R.; BONN, G.; BURTSCHER, E. BOBLETER, O. High-performance liquidchromatographic elution behavior of alcohols, aldehydes, ketones, organic-acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase. *Journal of Chromatography*, v. 287, n. 2, p.245-258, 1984.
- PEIXOTO, G. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 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, n. 15, p. 8953-8966, 2011.
- PURDY, K.J.; EMBLEY, T.M.; TAKII, S.; NEDWELL, D.B. Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 10, p. 3905-3907, 1996
- REN, N.Q.; GUO, W.Q.; WANG, X.J.; XIANG, W.S.; LIU, B.F.; WANG, X.Z.; DING, J.; CHEN, Z.B. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 16, p.4318-4324, 2008.

- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SÁ, L.R.V. Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato. Dissertação (Mestrado). Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- SCARLATA, C.J.; HYMAN, D.A. Development and validation of a fast high pressure liquid chromatography method for the analysis of lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation products. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 14, p. 2082-2087, 2010.
- SHIDA, G.M.; BARROS, A.R.; DOS REIS, C.M.; DE AMORIM, E.L.C.; DAMIANOVIC, M.; 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, n. 9, p. 3679-3688, 2009.
- SHIN, J.H.; YOON, J.H.; AHN, E.K.; KIM, M.S.; SIM, S.J.; PARK, T.H. Fermentative hydrogen production by the newly isolated Enterobacter asburiae SNU-1. *International Journal of Hydrogen Energy*; v. 32, p. 192 – 199, 2007
- SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p.8524-8533, 2011.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 21st ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 2005.
- 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, n. 15, p.1535-1542, 2005.
- van GINKEL, S.; SUNG, S.W.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technology*, v. 35, n. 24, p. 4726-4730, 2001.
- VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. *Journal of Chromatography A*, v. 824, n. 2, p. 159-167, 1998.
- WANG, J.L.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 2, p. 799-811, 2009.
- WANG, J.L.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 12, p. 2934-2941, 2008a.
- WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 20, p. 5392-5397, 2008b.

- ZHAO, Q.B.; YU, H.Q. Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 5, p. 1353-1358, 2008.
- ZHANG, Y.F.; SHEN, J.Q. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 4, p. 441-446, 2006.
- ZHU, H.G.; BELAND, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, n. 14, p. 1980-1988, 2006.