Vera Tainá Franco Vidal Mota

Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico)

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Vera Tainá Franco Vidal Mota

Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico)

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

Orientador: Prof. Titular. Marcelo Zaiat

Versão corrigida

São Carlos

2018

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Franco Vidal Mota, Vera Tainá
F917p Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico) / Vera Tainá Franco Vidal Mota; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. tratamento anaeróbio. 2. dois estágios. 3. hidrogênio. 4. pH. 5. metano. 6. UASB. 7. reator de leito fixo estruturado. 8. biorreator com membranas . I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciatura e Bacharel **VERA TAINÁ FRANCO VIDAL MOTA.**

Título da tese: "Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico)".

Data da defesa: 04/09/2018.

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Prof. Titular **Marcelo Zaiat** **(Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Prof. Dr. **David Alejandro Jeison Núñes** (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso/PUCV)	Aprovado
Prof. Dr. **Marcos Von Sperling** (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)	Aprovado
Profa. Dra. **Magali Christe Cammarota** (Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)	Aprovado
Prof. Dr. **Edson Luiz Silva** (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)	Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Agradecimentos

A todos que cruzaram os meus caminhos, influenciando e contribuindo no processo de produção da tese. Com especial afeto e reconhecimento, meus sinceros agradecimentos...

Aos meus pais, Pércio e Lucinha, por todo o amor, alicerce e coragem. Meu pai, com seu entusiasmo e otimismo, ampliando as minhas perspectivas. Minha mãe, com sua amizade e generosidade, com quem sempre posso contar. Aos meus queridos irmãos, Antônio, Ceci, Cristiana, Luciara, Angélica e Emanuel, pela base, sustentada por carinho, união e cumplicidade. E a toda a minha grande família, carinhosamente à Pita e à vovó Lourdes (*deixando saudades*), e aos sobrinhos e sobrinhas, que despertam alegria e esperança.

Ao meu orientador, professor Marcelo Zaiat, pela orientação e amizade. Com muita dedicação, cuidado e sabedoria, sempre esteve presente, compartilhando conhecimentos, dando todo o apoio e incentivo, e mostrando as virtudes da jornada acadêmica. Meu muitíssimo obrigada!

À turma companheira para todas as horas, Alê, Gui, Mirian, Raíssa, Carol, May, Juliana, que fizeram dos encontros de todos os dias uma inesquecível amizade, tornando esses tempos em São Carlos mais proveitosos e divertidos.

Ao Rafael, por todo o amor, companheirismo e dedicação, me trazendo tantas coisas boas e surpreendentes, e me apoiando em todos os momentos.

Ao professor David Jeison, pelo fundamental apoio para a realização do estágio no exterior, confiança, solicitude nas mais diversas situações, e por contribuir com orientações e discernimento para a minha compreensão do fazer ciência.

Aos professores Marcos von Sperling, Edson Silva (Tininho), Magali Cammarota, por aceitarem o convite para participarem da banca examinadora, pela maestria com que avaliaram o trabalho, e pelas valiosas contribuições para a versão final da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por viabilizar a pesquisa, por meio da bolsa concedida e recursos para o desenvolvimento do projeto (N.^{os} Processos: Doutorado 2014/22475-3, Bepe-doutorado 2017/05819-9, Projeto Temático 2015/06246-7).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do programa de pós-graduação e pelo primeiro ano de bolsa.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Processos Biológicos. À Elô, pela dedicação e prestatividade. À Vanessa, Giz, Carla, Cebola, Fabrício, Fiaz, Rodrigo, Jéssica, Ju, Inaê, Moara, Jaqueline, Felipe, Ana Flávia, Mariê, Lili, pela colaboração e amizade. À Carolina Sabatini, Janja e Isabel, pelo apoio e suporte no laboratório. À Laís, Renata, Thaís, Drica, Inês, Valéria, Camila, Leandro, Carol, Lucas, Rachel, pelo convívio e trocas de experiências. Ao professor Eugênio Foresti, inspiração e exemplo de sabedoria.

Agradeço a solicitude da Priscila e da Sá para atender às nossas demandas cotidianas e o apoio de todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento para cumprimento das atividades com excelência.

Aos que me acolheram no Chile. Agradeço ao Sean, Yandee, Ricardo, Celine, Eduardo, Elsa e Manuel, que me proporcionaram momentos de sociabilização e cultura em Valparaíso. Aos funcionários e colegas da Escuela de Ingeniería Bioquímica, Isabel, Soraya, Mônica, Rolando, Estela, Alberto, María Ignacia, Nathalie, Patricia, Isabel Marchant, Paula, Natalia, Edgar e Francisco, pelo suporte e consideração.

Ao Tiago Palladino, Celine, Elô e Alejandra, pela ajuda nas análises microbiológicas. E também ao Eric e ao Djalma pela realização do sequenciamento no LBE.

Às pessoas com quem tive a oportunidade de compartilhar moradias e com as quais muito aprendi. Obrigada Nathee, quem me recebeu com muita dedicação na cidade, Maraíssa e Flávia, pela longa e amistosa convivência, colegas da República Pedra 90, pela acolhida e descontração, Giz, Gustavo, Carol, Diego, Ted, Nalu, Djava, pelos bons momentos de trocas de ideias e confraternizações, ao Rafael, pela hospitalidade e carinho na volta à São Carlos, ao Gui e à Mirian, pela solidariedade e companheirismo.

Aos amigos e colegas do SHS. Com especial carinho agradeço à querida Ana Elisa, Jamil, Thaíla, Fernanda, Wesley, Tiago, Rafa e Paulo.

Às amigas que levo no coração e sempre estão presentes, compartilhando experiências, não importando a distância, Luiza, Sâmara, Jac, Mari, Elisa e Laura.

Grata!

“A vida virtuosa é aquela inspirada pelo amor
e guiada pelo conhecimento”

Bertrand Russell

Resumo

Mota, V. T. F. V. (2018) Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico) (Tese de Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

A presente pesquisa teve por objetivo avaliar a produção biológica de hidrogênio em longo prazo, e os impactos da separação das principais etapas da digestão anaeróbia, acidogênese e metanogênese, sobre a eficiência do tratamento em reatores de leito fixo estruturado e sobre o desempenho da filtração em biorreatores com membrana. O efluente utilizado foi à base de sacarose e a temperatura foi mantida em 30ºC. Na primeira etapa experimental, avaliou-se a produção de H_2 em três configurações de reatores: leito fixo estruturado (FB), UASB granular (UG) e UASB floculento (UF-1). Na segunda etapa experimental, um reator UASB acidogênico (UF-2) foi combinado a um reator metanogênico de leito fixo estruturado (RM). Um reator de estágio único de leito fixo estruturado (RU) foi operado em paralelo. Na última etapa experimental, foram avaliados dois biorreatores anaeróbios conjugados com módulos externos de membranas tubulares, nomeadamente 1-AnMBR, que foi alimentado com efluente bruto, e 2-AnMBR, que foi alimentado com efluente acidificado. Na primeira etapa, sob um TDH de 3,3 h (COV = 33 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$), os reatores FB, UG e UF-1 apresentaram produção de H_2 contínua, porém instável, com rendimentos de aprox. 1,5, 0,8 e 1,2 $molH_2.mol^{-1}sacarose_{consumida}$, respectivamente. O reator UF-1 apresentou uma estabilidade relativamente melhor e, por isso, esta configuração foi utilizada nos experimentos seguintes. No reator UF-2, aumentou-se o TDH para 4,6 h (COV = 25 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$), o que significativamente promoveu a melhoria do desempenho. Nenhum alcalinizante foi adicionado e o pH do efluente permaneceu em torno de apenas 2,7. Contudo, uma produção de H_2 contínua, estável e por longa duração foi atingida, de 175 $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$ (= 4,2 $LH_2.L^{-1}d^{-1}$), com rendimento de 3,4 $molH_2.mol^{-1}sacarose_{consumida}$, concomitante com a produção de ácido acético e etanol. Nos reatores metanogênicos, o TDH aplicado foi gradativamente reduzido (53-18 h no RM e 56-23 h no RU). Após os sistemas atingirem estabilidade, os valores de DQO permaneceram inferiores no efluente do RM, sobretudo pela redução da concentração de SSV, equivalente a 92 $mg.L^{-1}$, enquanto que no RU essa concentração foi de 244 $mg.L^{-1}$. No final da operação, o rendimento energético do sistema de dois estágios foi de 20,69 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$, sendo 90% proveniente do CH_4 e 10% do H_2. Este rendimento foi 34% maior do que o obtido no reator de estágio único, que foi de 15,48 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$. Por fim, avaliando-se o desempenho da filtração nos biorreatores com membrana, verificou-se que a permeabilidade operacional foi, na maior parte do tempo, superior no 2-AnMBR. A pré-acidificação do efluente levou à redução de cerca de 56-59% na concentração de sólidos voláteis suspensos e totais no 2-AnMBR e à modificação no perfil do tamanho das partículas. No 1-AnMBR, porém, não havia partículas de pequenas dimensões, tais quais encontradas no reator acidogênico, indicando reduzido crescimento suspenso de bactérias acidogênicas. Embora os valores de fluxo crítico tenham sido muito semelhantes para ambos os AnMBR, testes de resistência específica da torta indicaram maior resistência do lodo do 1-AnMBR (1,02 x 10^{13} m^{-1}), comparado ao lodo do 2-AnMBR (1,03 x 10^{12} m^{-1}) e ao lodo acidogênico (7,44 x 10^{11} m^{-1}). Portanto, essa pesquisa demonstrou, por meio da aplicação do tratamento anaeróbio em dois estágios, a viabilidade da produção contínua de hidrogênio em pH extremamente ácido e com mínimos requerimentos operacionais, a redução da concentração de sólidos suspensos no efluente de reatores de leito fixo estruturado, o potencial de aumento da recuperação de bioenergia e de redução da incrustação em membranas de ultrafiltração.

Palavras-chave: tratamento anaeróbio em dois estágios, hidrogênio, pH, metano, UASB, reator de leito fixo estruturado, biorreator com membranas anaeróbio

Abstract

Mota, V. T. F. V. (2018) Hydrogen production in extreme acid conditions and evaluation of performance and energy recovery potential in two-stage treatment systems (acidogenic-methanogenic) (Doctoral Thesis). São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos.

This study assessed long-term hydrogen production and the impacts of separating the main stages of anaerobic digestion (acidogenesis and methanogenesis) on treatment efficiency in structured fixed-bed reactors and on filtration performance in anaerobic membrane bioreactors. Sucrose based wastewater was used and the temperature was maintained at 30°C. In the first experimental phase, H_2 production was evaluated in three different acidogenic reactors: structured fixed-bed (FB), granular UASB (UG) and flocculated UASB (UF-1). In the second experimental phase, an acidogenic UASB reactor (UF-2) was combined with a structured fixed-bed methanogenic reactor (RM). A single-stage structured fixed-bed reactor (RU) was operated in parallel. In the last experimental phase, two sidestream anaerobic membrane bioreactors were evaluated: 1-AnMBR, which was fed with raw effluent; and, 2-AnMBR, which was fed with biologically acidified effluent. During the first operational phase, under an HRT of 3.3 h (OLR = 33 $gCOD.L^{-1}d^{-1}$), the FB, UG and UF-1 reactors showed continuous but unstable H_2 production, with yields of approximately 1.5, 0.8 and 1.2 $molH_2.mol^{-1}sucrose_{consumed}$, respectively. The UF-1 reactor showed relatively better stability; therefore, this configuration was used in the next experiments. In the UF-2 reactor, the HRT was increased to 4.6 h (OLR = 25 $gCOD.L^{-1}d^{-1}$), which significantly improved the overall performance. No alkalizing agent was added, and effluent pH values remained around only 2.7. However, continuous, stable and long-term H_2 production was achieved of 175 $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$ (= 4.2 $LH_2.L^{-1}h^{-1}$), with yields of 3.4 $molH_2.mol^{-1}sucrose_{consumed}$, concomitant with acetic acid and ethanol production. In the methanogenic reactors, the HRT was gradually reduced and, when the systems reached stability, COD values remained lower in the RM effluent. This was mainly due to the reduction of VSS concentrations, equivalent to 92 $mg.L^{-1}$, while in the RU this value was 244 $mg.L^{-1}$. At the end of the operation, the energy yield of the two-stage system was 20.69 $kJ.g^{-1}COD_{added}$, with 90% coming from CH_4 and 10% from H_2. This yield was 34% greater than that obtained in the single-stage system, which was 15.48 $kJ.g^{-1}COD_{added}$. Finally, regarding the filtration performance in the membrane bioreactors, the operational permeability was higher in the 2-AnMBR most of the time. The pre-acidification of the effluent led to the 56-59% reduction in the volatile total and suspended solid concentrations, and to modification in the particle size profile in the 2-AnMBR. Nevertheless, in the 1-AnMBR, there were no small particles such as were found in the sludge of the acidogenic reactor, indicating less suspended growth of acidogenic biomass. Although the critical flux values were very similar for both AnMBRs, a higher specific cake resistance was verified in the 1-AnMBR sludge (1.02×10^{13} m^{-1}), as compared to the 2-AnMBR sludge (1.03×10^{12} m^{-1}) and to the acidogenic sludge (7.44×10^{11} m^{-1}). Therefore, this study demonstrated, through the application of two-stage anaerobic treatment, the viability of continuous hydrogen production in extreme acid pH and with minimum operating requirements, the reduction of solid concentrations in the effluent of structured fixed bed reactors, as well as the potential for increased bioenergy recovery and for fouling reduction of ultrafiltration membranes.

Keywords: two-stage anaerobic treatment, hydrogen, pH, methane, UASB, structured fixed-bed reactor, anaerobic membrane bioreactor

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Concepção básica do tratamento anaeróbio de dois estágios 29
Figura 3.2 - Etapas da digestão anaeróbia 29
Figura 3.3 - Configurações de BRMan 38
Figura 3.4 - Rotas de produção de H_2 pela fermentação escura e os produtos associados 44
Figura 3.5 - Parâmetros operacionais e de desempenho obtidos em estudos para produção de biohidrogênio em reatores acidogênicos 47
Figura 4.1 - Desenho esquemático dos reatores acidogênicos 57
Figura 4.2 - Material suporte do reator acidogênico de leito fixo estruturado 58
Figura 4.3 - Desenho esquemático dos sistemas de um e dois estágios 65
Figura 4.4 - Material suporte dos reatores metanogênico e único de leito fixo estruturado 65
Figura 4.5 - Desenho esquemático do 1-AnMBR e do 2-AnMBR 69
Figura 4.6 - Fotos dos biorreatores e dos módulos de membranas 70
Figura 4.7 - Vista em detalhes das membranas 71
Figura 5.1 - Curvas E(t) obtidas para o TDH de 3 h nos reatores de leito estruturado e UASB 78
Figura 5.2 - Produção volumétrica de H_2 e pH nos reatores FB, UG e UF-1 79
Figura 5.3 - Rendimento de H_2 nos reatores FB, UG e UF-1 ao longo da operação 80
Figura 5.4 - Aparência do lodo do inóculo e no final da primeira fase experimental 81
Figura 5.5 - Foto dos reatores no final da Etapa 1 de operação (138º dia) 83
Figura 5.6 - Relação entre a PVH e a concentração de SSV no efluente 84
Figura 5.7 - Produção de biogás em função do TDH durante a fase de instabilidade operacional 85
Figura 5.8 - Produção volumétrica de H_2 e pH no reator UF-2 87
Figura 5.9 - Rendimento de H_2 no reator UF-2 ao longo da operação 87
Figura 5.10 - Aspecto geral do reator UF-2 durante a operação 88
Figura 5.11 - Relação entre as PVH e os respectivos percentuais de H_2 no biogás dos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 (Fases 1 e 2) 89
Figura 5.12 - Remoção de DQO solúvel nos reatores acidogênicos 91
Figura 5.13 - Remoção de sacarose nos reatores acidogênicos 91
Figura 5.14 - Rendimento de hidrogênio 92
Figura 5.15 - Árvore filogenética baseada nas sequências do 16S rDNA encontradas em abundância >1,0% nos reatores acidogênicos 98
Figura 5.16 - Classificação taxonômica bacteriana Kraken do reator UF-2 101
Figura 5.17 - Categorias funcionais das sequências metagenômicas KO do reator UF-2 103
Figura 5.18 - Vias metabólicas de produção de hidrogênio comuns para Clostridium e Ethanoligenens (F, G) 104
Figura 5.19 - Metabolismo do piruvato 106
Figura 5.20 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator FB 111
Figura 5.21 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator UG 111
Figura 5.22 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator UF-1 111
Figura 5.23 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator UF-2 112

Figura 5.24 - Análises de Gram do lodo do reator UF-2 113
Figura 5.25 - Imagens de MEV do lodo do inóculo 114
Figura 5.26 - Imagens de MEV do lodo do reator FB 115
Figura 5.27 - Imagens de MEV do lodo do reator UG 116
Figura 5.28 - Imagens de MEV do lodo do reator UF-1.....117
Figura 5.29 - Imagens de MEV do lodo do reator UF-2.....118
Figura 5.30 - Esquema proposto para explicar as mudanças no reator UF-2 que levaram ao aumento da produção de hidrogênio 123
Figura 5.31 - Curvas E(t) obtidas nos ensaios hidrodinâmicos dos reatores metanogênicos .127
Figura 5.32 - pH afluente e efluente do RM e do RU.....129
Figura 5.33 - Alcalinidade bicarbonato e relação AI/AP no RM e no RU 129
Figura 5.34 - Ácidos orgânicos no efluente do RM e do RU 130
Figura 5.35 - Valores de DQO dos afluentes dos reatores UF-2, RM e RU.....133
Figura 5.36 - DQO efluente do RM e do RU.....133
Figura 5.37 - Remoção de DQO solúvel e total dos sistemas de um e dois estágios 133
Figura 5.38 - Sólidos suspensos voláteis no efluente do RM e do RU 135
Figura 5.39 - Composição do biogás nos sistemas de um e dois estágios 136
Figura 5.40 - Produção volumétrica de metano nos sistemas de um e dois estágios.....137
Figura 5.41 - Relação AI/AP e níveis de AVT no efluente durante a adaptação dos AnMBR 143
Figura 5.42 - Variação temporal da DQO do permeado do 1-AnMBR e do 2-AnMBR.....145
Figura 5.43 - Perfil de sólidos no sobrenadante dos reatores AC, 1-AnMBR e 2-AnMBR...147
Figura 5.44 - SMP nos reatores AC, 1-AnMBR e 2-AnMBR 147
Figura 5.45 - Distribuição do tamanho das partículas nos reatores AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR 149
Figura 5.46 - Observação macroscópica do lodo dos reatores AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR .151
Figura 5.47 - Permeabilidade da membrana durante a operação contínua 152
Figura 5.48 - Resistência total aparente da membrana 153
Figura 5.49 - Ensaios de fluxo crítico com concentração de SSV ajustada para 171 $mg.L^{-1}$ .154
Figura 5.50 - TMP vs. tempo durante filtração dead-end do lodo 155

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Reações comuns da degradação anaeróbia 32
Tabela 3.2 - Estudos comparando reatores de um e de dois estágios 35
Tabela 4.1 - Condições operacionais no decorrer da presente tese 56
Tabela 4.2 - Dimensões dos reatores acidogênicos 57
Tabela 4.3 - Denominação dos reatores acidogênicos 61
Tabela 4.4 - Dimensões dos reatores dos sistemas de um e de dois estágios 64
Tabela 4.5 - Parâmetros operacionais dos sistemas de dois estágios e de um estágio 67
Tabela 4.6 - Análises e pontos de amostragem do 1-AnMBR e 2-AnMBR 74
Tabela 5.1 - Parâmetros hidráulicos dos reatores acidogênicos 78
Tabela 5.2 - Ácidos orgânicos e respectivas porcentagens teóricas de sacarose acidificada e de rendimento de hidrogênio nos reatores acidogênicos 93
Tabela 5.3 - Sequências do 16S rDNA (região V4-5) com abundância > 1% nos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 e > 5% no inóculo, classificadas usando o SINA (v1.2.11) 97
Tabela 5.4 - Parâmetros de desempenho dos reatores acidogênicos 122
Tabela 5.5 - Comparação da produção de H_2 em reatores contínuos alimentados com sacarose 125
Tabela 5.6 - Parâmetros hidráulicos do RM e do RU 127
Tabela 5.7 - Desempenho do tratamento nos sistemas UF-2+RM e RU 138
Tabela 5.8 - Potencial de rendimento energético nos sistemas UF-2+RM e RU 139
Tabela 5.9 - Sequências do 16S rDNA (região V4-5) com abundância > 5% para cada domínio no RM e no RU, classificadas usando o SINA (v1.2.11) 141
Tabela 5.10 - Características do afluente: mínimo - máximo (média ± desvio padrão) 144
Tabela 5.11 - TDH e COV no reator AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR (média ± desvio padrão) 144
Tabela 5.12 - Medianas dos parâmetros analisados na fração solúvel (< 0,45 µm) dos reatores 148

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1-AnMBR	Biorreator com membrana anaeróbio de estágio único (no presente estudo)
2-AnMBR	Biorreator com membrana anaeróbio precedido de reator acidogênico (no presente estudo)
AAV	Alcalinidade a ácidos voláteis
AB	Alcalinidade a bicarbonato
AnSFBR	*Anaerobic structured fixed-bed reactor* – reator anaeróbio de leito fixo estruturado
AC	Reator acidogênico utilizado para acidificação do afluente do biorreator com membrana anaeróbio (no presente estudo)
AnMBR	*Anaerobic membrane bioreactor* – Biorreator com membrana anaeróbio
AGV	Ácidos graxos voláteis
AT	Alcalinidade total
AVT	Ácidos voláteis totais
BRM	Biorreator com membranas
BRMan	Biorreator com membranas anaeróbio
CG	Cromatografia em fase gasosa
CH_4	Gás metano
CO_2	Gás dióxido de carbono
COV	Carga orgânica volumétrica
CSTR	*Continuous stirred tank reactor* – reator tanque agitado contínuo
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DQO	Demanda química de oxigênio
EGSB	*Expanded granular sludge bed* – Reator anaeróbio de leito granular expandido
EPS	*Extracellular polymeric substances* – Substâncias poliméricas extracelulares
FB	Reator de leito estruturado utilizado para acidogênese (no presente estudo)
H_2	Gás hidrogênio
HPLC	*High performance liquid chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência
HY	Rendimento de hidrogênio
LE	Reator de leito estruturado
MBR	*Membrane bioreactor* – biorreator com membrana
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MY	Rendimento de metano
OTU	Unidade taxonômica operacional
pb	Pares de bases
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PVH	Produção volumétrica de hidrogênio, por unidade de volume útil do reator
PVM	Produção volumétrica de metano, por unidade de volume útil do reator
RA	Reator acidogênico

RM	Reator metanogênico de leito fixo estruturado, alimentado com efluente acidificado (no presente estudo)
RU	Reator anaeróbio de leito fixo estruturado de estágio único, alimentado com efluente bruto (no presente estudo)
SMP	*Soluble microbial products* – Produtos microbianos solúveis
SSV	Sólidos suspensos voláteis
STV	Sólidos totais voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* – Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo
UF-1	Reator UASB floculento utilizado para acidogênese (no presente estudo, na primeira etapa experimental)
UF-2	Reator UASB floculento utilizado para acidogênese (no presente estudo, na segunda etapa experimental)
UG	Reator UASB granular utilizado para acidogênese (no presente estudo)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

2 OBJETIVOS 27

2.1 OBJETIVO GERAL 27

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 28

3.1 TRATAMENTO ANAERÓBIO EM DOIS ESTÁGIOS 28

3.1.1 ETAPAS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA **29**

3.1.2 VISÃO GLOBAL DO PROCESSO **31**

3.1.3 VANTAGENS DEMONSTRADAS NOS SISTEMAS EM DOIS ESTÁGIOS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES **33**

3.1.4 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE DUPLO ESTÁGIO CONJUGADO COM MEMBRANAS **37**

3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATORES ACIDOGÊNICOS 42

3.2.1 MICRORGANISMOS E ROTAS METABÓLICAS **42**

3.2.2 PANORAMA DA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO EM REATORES CONTÍNUOS **46**

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

4 MATERIAIS E MÉTODOS 56

4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATORES ACIDOGÊNICOS 56

4.1.1 CONFIGURAÇÕES DOS REATORES ACIDOGÊNICOS E INÓCULO **56**

4.1.2 ENSAIOS HIDRODINÂMICOS **58**

4.1.3 SUBSTRATO **60**

4.1.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS **60**

4.1.5 ANÁLISES PARA MONITORAMENTO 61

4.1.6 OBSERVAÇÕES MICROBIOLÓGICAS 62

4.1.7 ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) 62

4.1.8 ANÁLISES DE METAGENÔMICA *SHOTGUN* 63

4.2 REATORES METANOGÊNICOS DE LEITO ESTRUTURADO DE UM E DE DOIS ESTÁGIOS 64

4.2.1 APARATO EXPERIMENTAL, INÓCULO E TESTES HIDRODINÂMICOS 64

4.2.2 SUBSTRATO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS 66

4.2.3 ANÁLISES PARA MONITORAMENTO 67

4.2.4 ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO NGS 68

4.3 BIORREATORES COM MEMBRANA ANAERÓBIOS 68

4.3.1 APARATO EXPERIMENTAL 68

4.3.2 INÓCULO, SUBSTRATO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS 72

4.3.3 ANÁLISES PARA MONITORAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DO LODO E DOS SMP 73

4.3.4 DESEMPENHO E TESTES DE FILTRAÇÃO 74

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 77

5.1 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO NOS REATORES ACIDOGÊNICOS 77

5.1.1 CONDIÇÕES HIDRODINÂMICAS NOS REATORES ACIDOGÊNICOS 77

5.1.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO COM DIFERENTES REATORES (TDH DE 3,3 H) 78

5.1.3 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO CONTÍNUA, ESTÁVEL E EM LONGO PRAZO (TDH DE 4,6 H) 84

5.1.4 COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS PRODUZIDO NOS REATORES ACIDOGÊNICOS 88

5.1.5 REMOÇÃO DE SACAROSE, RENDIMENTO E ROTAS METABÓLICAS DE PRODUÇÃO DE H_2 90

5.1.6 COMPOSIÇÃO MICROBIANA DOS REATORES FB, UG, UF-1 E UF-2 96

5.1.7 Inferência das rotas metabólicas pela metagenômica *shotgun* **101**

5.1.8 Análises microscópicas do lodo **110**

5.1.9 Interação entre os parâmetros analisados e os impactos da produção de H_2 em baixo pH **121**

5.2 Sistemas de um e de dois estágios: qualidade do efluente e eficiência da produção de energia **126**

5.2.1 Ensaios hidrodinâmicos dos reatores metanogênicos **126**

5.2.2 Partida dos reatores **127**

5.2.3 pH, alcalinidade e ácidos orgânicos **128**

5.2.4 DQO e SSV **132**

5.2.5 Composição do biogás e produção de metano **135**

5.2.6 Comparação do desempenho do tratamento e rendimento energético nos sistemas de um (RU) e de dois (UF-2+RM) estágios **137**

5.2.7 Composição microbiana do RM e do RU **140**

5.3 AnMBR: impacto da acidificação em etapa prévia sobre o desempenho e a filtração **142**

5.3.1 Adaptação dos reatores **142**

5.3.2 Desempenho do tratamento **143**

5.3.3 Sólidos e produtos microbianos solúveis **146**

5.3.4 Desempenho da filtração **151**

6 CONCLUSÕES **157**

7 RECOMENDAÇÕES **161**

REFERÊNCIAS **163**

1 INTRODUÇÃO

Os reatores anaeróbios são amplamente aplicados para o tratamento de efluentes domésticos e industriais. Além de ser uma tecnologia relativamente simples e de baixo custo para a remoção de poluentes, sobretudo de matéria orgânica biodegradável, pode-se obter energia pela recuperação do biogás produzido. Uma forma de melhorar o desempenho de reatores anaeróbios é por sistemas de dois estágios, que consistem na separação das duas principais etapas do tratamento: acidogênese e metanogênese.

Aplicado ao tratamento de efluentes líquidos, vários estudos apontam que o tratamento em dois estágios pode implicar na maior remoção de demanda química de oxigênio (DQO), maior rendimento e percentual de metano no biogás, e tolerância a maiores cargas orgânicas. Isso ocorre pelo fato das bactérias acidogênicas geralmente apresentarem as maiores velocidades de crescimento e metabólicas, além de maior resistência a condições adversas. Assim, a aplicação de um reator acidogênico anteriormente a um reator metanogênico é uma estratégia para controlar as condições para cada grupo microbiano, como o tempo de detenção hidráulica, pH e idade do lodo. Estas medidas de controle podem contribuir para evitar o acúmulo de ácidos orgânicos, que ocorre devido a velocidades de produção maiores quando comparadas às velocidades de consumo dos mesmos. No caso de afluência de compostos tóxicos ou choques de carga orgânica, a passagem do efluente pelo reator acidogênico pode evitar a inibição e a "lavagem" das arqueias metanogênicas, por mecanismos de remoção e diluição. Estes fatores, aliados ao menor crescimento de bactérias acidogênicas no reator metanogênico, podem contribuir para a maior eficiência do sistema.

Entretanto, apesar dos potenciais benefícios, o tratamento em dois estágios muito raramente é empregado em sistemas em escala real, devido principalmente aos maiores custos de implantação e, em razão da própria escassez de experiências, às maiores dificuldades de projeto. Logo, as vantagens possibilitadas pelo tratamento em dois estágios devem superar os seus desafios para a sua aplicação em larga escala. Nesse contexto, na presente pesquisa, especial enfoque é dado às aplicações e potenciais vantagens do tratamento em dois estágios, considerando aspectos ainda pouco explorados. São eles: (i) recuperação do hidrogênio produzido na etapa acidogênica, (ii) comparação da eficiência do tratamento e da produção de bioenergia (hidrogênio e metano) em reatores metanogênicos de leito fixo estruturado de um e

de dois estágios, e (iii) avaliação dos impactos da ocorrência da acidogênese em etapa prévia sobre o desempenho da filtração em biorreatores com membrana.

Em reatores anaeróbios de estágio único, o hidrogênio produzido durante a acidogênese é, em sua maior parte, prontamente convertido a metano. A separação das etapas em sistemas de dois estágios torna possível a recuperação do hidrogênio na primeira etapa, oferendo a possibilidade de produção de energia adicional em estações de tratamento de efluentes. Entretanto, a produção biológica contínua e sustentável de H_2 ainda representa um desafio, devido às mudanças nas rotas metabólicas para rotas não produtoras de H_2, e à existência concomitante de microrganismos produtores e consumidores H_2 nos reatores acidogênicos. Os dados atuais publicados na literatura relatam inibição da produção de H_2 pela fermentação escura em pH inferior a 4,0. Assim, devido à constante produção de CO_2 e ácidos orgânicos, geralmente é necessária a adição de agentes alcalinizantes nos reatores. No entanto, essa prática impacta significativamente nos custos operacionais, aumenta potencialmente a concentração de sais no efluente, reduzindo a sustentabilidade do processo. Além disso, na faixa de pH usualmente aplicada, de 4,5 a 6,5, os microrganismos consumidores de H_2 podem estar ativos. Considerando que a aplicação de reatores acidogênicos, seja para a acidificação do efluente e/ou para recuperação de hidrogênio, somente é viável e sustentável se os requisitos e custos operacionais forem mínimos, no presente estudo a fermentação foi investigada em diferentes configurações de reatores acidogênicos, com baixos requisitos operacionais e sem a adição de agentes controladores de pH.

Em relação à metanogênese, muitos esforços têm sido empregados para a otimização do processo e obtenção de efluentes de maior qualidade, desenvolvendo-se configurações de reatores mais robustas e eficientes. Os reatores anaeróbios de leito fixo estruturado surgiram como uma alternativa aos de leito fixo empacotado (filtros anaeróbios). Tendo sido desenvolvida no final da década de 90 no Laboratório de Processos Biológicos – LPB/USP (grupo de pesquisa no qual a presente tese se insere) – esta é uma tecnologia desde então estudada em reatores de escala de bancada. Diversas vantagens foram demonstradas, destacando-se a redução de caminhos preferenciais, e a prevenção de entupimentos e de acúmulo de sólidos. Assim, para uma comparação sistemática entre sistemas de um estágio e de dois estágios, em termos de eficiência do tratamento e de produção de biogás, reatores de leito fixo estruturado foram utilizados para a metanogênese.

Outra configuração de reator anaeróbio relativamente nova, mas com casos de sucesso em aplicações em escala real, é a dos biorreatores com membrana anaeróbios (BRMan). Nestes reatores, mecanismos de retenção da biomassa por adesão (biofilme) e aglutinação (flocos e grânulos) não são imperativos, pois membranas de micro ou ultrafiltração são utilizadas, proporcionando completa retenção da biomassa e um efluente livre de sólidos suspensos. Com isso, é possível obter efluentes com maior qualidade, virtualmente sem bactérias e fungos, e até mesmo adequado para pós-tratamento com fins de reúso e recuperação de nutrientes. As principais limitações para o uso dos BRMan são atreladas aos requerimentos energéticos, de manutenção e de áreas de membranas. Por isso, a elucidação dos fatores contribuintes para a incrustação (*fouling*) das membranas tem sido objeto de intensas pesquisas, com o intuito de otimizar as condições operacionais e reduzir os custos. Há diversas estratégias relacionadas à adequação dos parâmetros de operação, tipo de membrana empregada, adição de agentes anti-incrustantes e configuração de reatores. Geralmente avalia-se os impactos destas medidas em sistemas nos quais a acidogênese e a metanogênese ocorrem integralmente em um único reator. Entretanto, é sabido que as bactérias acidogênicas liberam produtos metabólicos no meio, possuem elevadas velocidades de multiplicação e podem ter crescimento suspenso, contribuindo para a incrustação das membranas. Visando avaliar os impactos da ocorrência da acidogênese em uma etapa prévia sobre o desempenho da filtração em BRMan metanogênico, nesta pesquisa se comparou um BRMan de estágio único a um BRMan precedido de um reator acidogênico.

Considerando que pesquisas fundamentais se fazem necessárias para um melhor compreendimento e otimização da produção de H_2 em reatores acidogênicos e que os impactos da separação das etapas da digestão anaeróbia sobre o desempenho dos sistemas em termos de operação, eficiência do tramento e produção de bioenergia devem ser explorados, a avaliação de diferentes configurações de reatores acidogênicos e sem o controle de pH, e a comparação de sistemas de estágio único a sistemas de dois estágios utilizando reatores metanogênicos de leito fixo estruturado e reatores metanogênicos conjugados com membranas, utilizando efluente à base de sacarose como substrato, foram baseadas nas seguintes hipóteses:

1. A forma de retenção da biomassa (biofilme, grânulos e flocos) pode influenciar na produção de hidrogênio, porém, por mecanismos ainda não completamente elucidados.

2. É possível produzir hidrogênio sem a adição de agentes controladores de pH durante a fermentação, controlando-se as condições operacionais para o favorecimento das rotas metabólicas desejadas.

3. A separação da acidogênese contribui para a maior eficiência da metanogênese, por possibilitar um maior controle sobre o processo e reduzir as limitações termodinâmicas associadas às concentrações de H_2 no meio, sobrepondo às limitações de transferência de massa causadas pelo maior distanciamento entre os microrganismos produtores e consumidores dos produtos intermediários.

4. A recuperação do H_2 produzido na etapa acidogênica e os maiores rendimentos de CH_4 resultam em maior potencial de produção de bioenergia no sistema de dois estágios.

5. A ocorrência da acidogênese em etapa prévia contribui para a redução do crescimento da biomassa acidogênica em reatores metanogênicos, contribuindo para a melhoria da qualidade do efluente final em reatores de leito fixo estruturado.

6. A redução do crescimento de bactérias acidogênicas nos reatores metanogênicos alimentados com efluente acidificado altera as propriedades do lodo, levando à redução das concentrações de sólidos suspensos, de partículas de menores dimensões e de produtos microbianos solúveis, o que, por sua vez, implica na redução do potencial de incrustação em membranas aplicadas em sistemas de BRM.

Para cada uma dessas hipóteses há um objetivo específico correspondente, de forma a guiar a condução dos experimentos da presente pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse projeto foi estudar a aplicação de reatores anaeróbios de dois estágios, em condições mesofílicas, visando à recuperação do hidrogênio produzido na etapa acidogênica, ao aumento do potencial de produção de bioenergia, à estabilidade do tratamento e, em reatores conjugados com membranas, à melhoria do desempenho da filtração.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse projeto foram:

- Aplicar diferentes configurações de reatores acidogênicos, com baixos requisitos operacionais e distintas formas de retenção da biomassa, e indicar as possíveis influências sobre a produção de hidrogênio.
- Estudar a produção de hidrogênio sem a adição de agentes controladores de pH, e apontar os fatores que influenciam as rotas fermentativas nessas condições.
- Avaliar a estabilidade de reatores de leito fixo estruturado alimentados com efluente bruto e acidificado sob cargas orgânicas volumétricas crescentes.
- Avaliar o rendimento de hidrogênio e metano em sistemas de dois estágios e estimar o potencial de produção de bioenergia, comparando-se a sistemas de estágio único.
- Comparar a qualidade do efluente final em termos de matéria orgânica solúvel e particulada em reatores metanogênicos de leito fixo estruturado alimentados com efluente bruto e acidificado.
- Avaliar as características do lodo relacionadas à incrustação das membranas e comparar o desempenho da filtração em biorreatores com membrana anaeróbios alimentados com efluente bruto e acidificado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tratamento anaeróbio em dois estágios

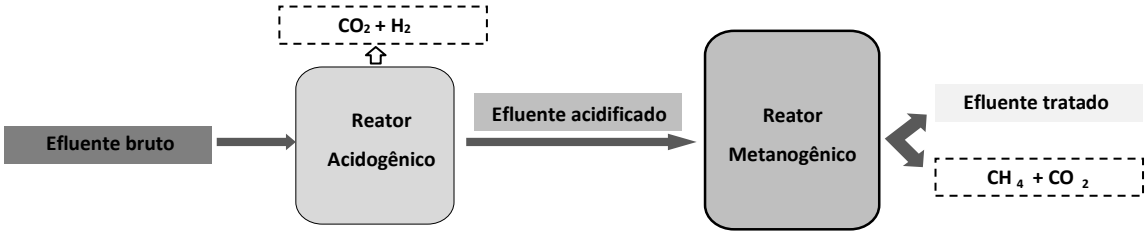
O tratamento anaeróbio apresenta muitas vantagens em relação ao tratamento aeróbio. McCarty (1964) destaca que, enquanto no tratamento aeróbio grande parte da matéria orgânica é apenas convertida para outras formas (novas células), em que a disposição do lodo ainda representa um grande problema, no tratamento anaeróbio a maior parte dos materiais biodegradáveis é de fato estabilizada e convertida a gás metano. Além da baixa produção de lodo (2-8 vezes inferior à que ocorre nos processos aeróbios), outras vantagens do tratamento anaeróbio são o baixo requerimento de nutrientes (N e P), reduzido consumo de energia por não haver fornecimento de oxigênio, baixos custos de implantação, demanda de área reduzida, possibilidade de preservação da biomassa ativa após longos períodos sem alimentação do reator, e geração de gás metano como subproduto (McCarty, 1964; Lettinga et al., 1980; Beccari et al., 1996; Chernicharo, 2007). Como desvantagens, o tratamento anaeróbio geralmente apresenta menores eficiências de remoção de matéria orgânica e nutrientes em relação ao tratamento aeróbio e apresenta alguns problemas particulares, como a emissão de odores desagradáveis, lentidão no processo de partida na ausência de lodo adaptado, corrosão, possibilidade de distúrbios na presença de compostos tóxicos ou na ausência de nutrientes, produção de escuma e espuma, e dificuldade de lidar com altas variações de carga em reatores anaeróbios de alta taxa (Lettinga et al., 1980; Leitão et al., 2006; Chernicharo, 2007). Contudo, a maioria destes problemas pode ser contornada com a devida operação e controle dos reatores anaeróbios e/ou conjugação com outros sistemas de pré ou pós-tratamento.

Uma das estratégias para aumentar a estabilidade nos reatores anaeróbios é por meio do tratamento em dois estágios (acidogênico-metanogênico), o qual foi proposto inicialmente por Pohland e Ghosh (1971). Fundamentalmente, a separação das etapas é feita pela aplicação de dois reatores anaeróbios em série, em que no primeiro ocorre a predominância das reações acidogênicas e no segundo das reações metanogênicas (Figura 3.1).

O objetivo da separação é permitir a identificação das etapas limitantes do processo e possibilitar a obtenção de condições ideais para cada grupo microbiano (Ke et al., 2005) tendo em vista que os microrganismos envolvidos nas etapas acidogênica e metanogênica são bastante distintos em relação às constantes cinéticas, às restrições termodinâmicas, e aos requisitos

nutricionais e ambientais (Aquino & Chernicharo, 2005). A seguir, são descritas em detalhes as etapas da digestão anaeróbia.

Figura 3.1 - Concepção básica do tratamento anaeróbio de dois estágios

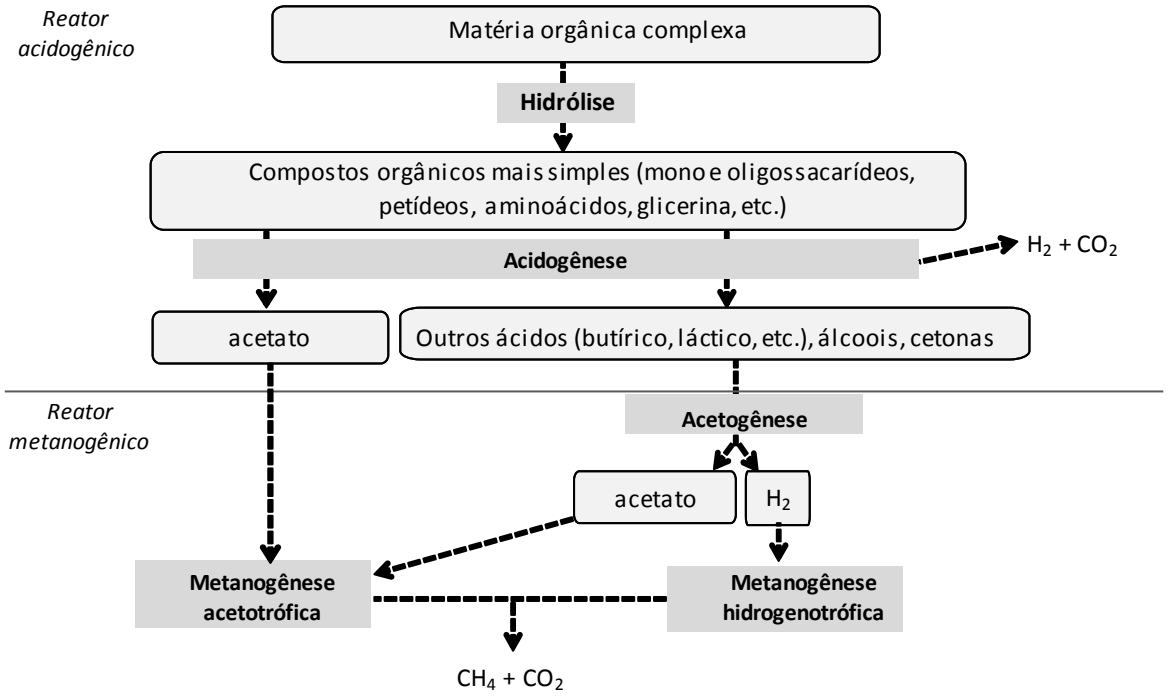


Fonte: própria autora

3.1.1 Etapas da digestão anaeróbia

Durante a degradação anaeróbia ocorre a transformação de matéria orgânica e inorgânica, na ausência de oxigênio molecular, envolvendo um amplo espectro de microrganismos anaeróbios facultativos e obrigatórios. O processo é dividido, de forma bem simplificada, em basicamente duas etapas: acidogênese e metanogênese, em que várias reações interligadas ocorrem. A Figura 3.2 ilustra o processo, destacando-se as etapas predominantes em cada reator em sistemas de dois estágios.

Figura 3.2 - Etapas da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Cohen et al. 1980; Lettinga et al. (1996) citado por Chernicharo (2007)

3.1.1.1. Hidrólise e Acidogênese

A etapa inicial da degradação anaeróbia é essencialmente uma fase de DQO praticamente constante, em que as moléculas orgânicas são reorganizadas, por meio de reações de hidrólise e fermentação (Bal & Dhagat, 2001). As bactérias hidrolíticas compreendem um consórcio de bactérias facultativas e anaeróbias obrigatórias e, através da secreção de enzimas extracelulares solúveis, fazem a conversão de carboidratos, proteínas pouco solúveis ou insolúveis e lipídeos em açúcares simples, aminoácidos, ácidos graxos e glicerina, respectivamente. Os reatores anaeróbios favorecem a hidrólise devido à elevada idade do lodo e à maior variedade de bactérias hidrolíticas. Além da solubilização de substratos complexos do efluente, a hidrólise é importante para que ocorra a solubilização e degradação de compostos provenientes da lise celular devido ao decaimento bacteriano, prevenindo a acumulação destes compostos (Gerardi, 2006).

Os substratos simples são transportados e difundidos através da membrana celular e são oxidados anaerobiamente ou fermentados para ácidos graxos de cadeia curta, álcoois, dióxido de carbono, cetonas, hidrogênio e amônia (Bahl & Dhagat, 2001; Aquino & Chernicharo, 2005). Os aceptores de elétrons podem ser o nitrato, sulfato, dióxido de carbono ou uma molécula orgânica. No item 3.2 é descrito com maiores detalhes o processo de fermentação, destacando-se as rotas que podem formar hidrogênio.

3.1.1.2. Acetogênese e Metanogênese

A maioria dos ácidos orgânicos produzidos na etapa acidogênica não é substrato direto da metanogênese, exceto os ácidos fórmico e acético. Dessa forma, é muito importante que os demais ácidos orgânicos sejam convertidos a acetato. As chamadas bactérias acetogênicas sintróficas convertem diversos ácidos orgânicos (ex: butirato, propionato) e alcoóis (ex: etanol), que são produzidos na etapa acidogênica, a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Há também as bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio, chamadas de homoacetogênicas, que combinam bicarbonato e hidrogênio para formar acetato (Foresti, 1994; Lettinga et al., 1996 citado por Chernicharo, 2007).

A etapa final de conversão anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono é mediada por arqueias metanogênicas. As arqueias são um grupo distinto de microrganismos por apresentarem características morfológicas e fisiológicas de bactérias, de eucariontes e exclusivas (Madigan et al., 2015). As arqueias metanogências são anaeróbias obrigatórias

estritas. Isso quer dizer que elas são inibidas ou morrem na presença de oxigênio molecular livre por não possuírem as enzimas superóxido dismutase e catalase, que destroem as espécies reativas do oxigênio formadas como subprodutos no interior das células (Gerardi, 2006; Madigan et al., 2015). Em função de sua fisiologia, as arqueias metanogênicas são divididas em dois grupos principais, um que forma metano a partir de ácido acético ou metanol, e o segundo que produz metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono. A metanogênese acetotrófica (clivagem do acetato) e a metanogênese hidrogenotrófica (redução do dióxido de carbono) respondem por cerca de 70% e 30% da produção de metano em digestores anaeróbios, respectivamente (McCarty, 1964; Foresti, 1994; Chernicharo, 2007). Além destes grupos, existem as metanogênicas metilotróficas, que produzem metano por meio da retirada do grupo metil de substratos simples. No entanto, a porcentagem de metano produzida por esta via é mínima (Gerardi, 2006).

3.1.2 Visão global do processo

O balanço de massa da degradação anaeróbia envolve uma complexa interação dos microrganismos e é influenciado por diversos parâmetros cinéticos, termodinâmicos e de transferência de massa. Na Tabela 3.1 são apresentadas algumas reações comuns que ocorrem em reatores anaeróbios e o rendimento energético de cada uma delas.

Na digestão anaeróbia os microrganismos acidogênicos são os que mais se beneficiam energeticamente (vide ΔG^0) e possuem baixo tempo mínimo de geração (~30 minutos), apresentando as mais elevadas velocidades de crescimento do consórcio microbiano. Desta forma, a etapa acidogênica só será limitante do processo se o material a ser degradado não for facilmente hidrolisado (Aquino & Chernicharo, 2005). Por outro lado, os microrganismos metanogênicos acetotróficos e hidrogenotróficos apresentam tempo de geração mínimo de 2 a 3 dias e de 6 horas, respectivamente (Mosey, 1983 citado por Aquino & Chernicharo, 2005). Segundo Metcalf e Eddy (2003), o coeficiente de crescimento celular (Y) das bactérias acidogênicas situa-se na faixa entre 0,06 e 0,12 $gSSV.g^{-1}DQO$ enquanto que dos microrganismos metanogênicos situa-se entre 0,02 e 0,06 $gSSV.\ g^{-1}DQO$.

A produção de acetato pelas bactérias acetogênicas sintróficas não é termodinamicamente favorável nas condições padrão (Tabela 3.1) e somente ocorrerão se a concentração dos produtos hidrogênio e acetato for suficientemente baixa (Aquino & Chernicharo, 2005). No entanto, a atividade destes microrganismos é de fundamental importância nos reatores

anaeróbios, haja vista que, para a estabilização da matéria orgânica, os ácidos orgânicos devem ser convertidos a ácido acético, que é o principal precursor da metanogênese, e o acúmulo de ácidos orgânicos leva à redução do pH e inibição da metanogênese.

Tabela 3.1 - Reações comuns da degradação anaeróbia

Etapa	Reação	ΔG_0 (kJ/mol)	Reação
Acidogênese	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$ glicose acetato	-206	3.1
	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$ glicose propionato	-358	3.2
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2\ CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$ glicose butirato	-255	3.3
Acetogênese	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ propionato acetato	+76,1	3.4
	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ butirato acetato	+48,1	3.5
	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$ lactato acetato	-4,2	3.6
	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ etanol acetato	+9,6	3.7
	$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$ hidrogênio acetato	-104,6	3.8
Sulfetogênese	$SO_4^{2-} + 4H_2 \rightarrow H_2S + 2H_2O + 2OH^-$ sulfato sufeto	-151,9	3.9
Metanogênese	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$ acetato metano	-31	3.10
	$H_2 + 0{,}25HCO_3^- + 0{,}25H^+ \rightarrow 0{,}25CH_4 + 0{,}75H_2O$ hidrogênio metano	-33,9	3.11
	$HCOO^- + 0{,}25H_2O + 0{,}25H^+ \rightarrow 0{,}25CH_4 + 0{,}75HCO_3^-$ formiato metano	-32,6	3.12
$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ propionato acetato		ΔG_0 = +76,1	3.4
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$ acetato metano		ΔG_0 = -31	3.10
$3H_2 + 0{,}75HCO_3^- + 0{,}75H^+ \rightarrow 0{,}75CH_4 + 2{,}25H_2O$ hidrogênio metano		ΔG_0 = -101,7	3.11
$CH_3CH_2COO^- + 1{,}75H_2O \rightarrow 1{,}75CH_4 + 1{,}25HCO_3^- + 0{,}25H^+$ propionato metano		ΔG_0 = -56,6	3.13

Fonte: Adaptado de Foresti (1994), Lun et al. (1995), Lettinga et al. (1996) *citado por* Chernicharo (2007), Aquino & Chernicharo (2005)

Assim, o balanço de hidrogênio e acetato nos reatores anaeróbios depende da atividade de diversos microrganismos. As bactérias acidogênicas produzem dióxido de carbono e hidrogênio, enquanto as arqueias hidrogenotróficas combinam CO_2 e H_2 para formar metano. Ao usar o hidrogênio para produzir metano, a pressão do hidrogênio diminui. Esta diminuição da pressão de hidrogênio favorece a produção de acetato pelas bactérias acetogênicas

sintróficas. Por fim, as arqueias metanogênicas acetoclásticas usam acetato para produzir metano e dióxido de carbono. Dessa forma, fica clara a importância de cada grupo microbiano para a funcionalidade dos reatores anaeróbios. A reação 3.13 (Tabela 3.1), que é a soma das reações 3.4, 3.10 e 3.11, mostra a reação global da conversão de propionato em metano, destacando-se o ΔG^0 final negativo. Isso ilustra que o consórcio entre acetogênicas e metanogênicas torna favorável a reação de conversão dos ácidos intermediários em metano, o que de fato ocorre naturalmente em reatores anaeróbios em condições estáveis (Aquino & Chernicharo, 2005).

3.1.3 Vantagens demonstradas nos sistemas em dois estágios para o tratamento de efluentes

Conforme comentado anteriormente, as bactérias acidogênicas apresentam as maiores velocidades de crescimento e de utilização do substrato do consórcio microbiano e geralmente são mais resistentes a condições de estresse no ambiente. Dessa forma, e aliada às limitações cinéticas e termodinâmicas, pode ocorrer o acúmulo de produtos da acidogênese, principalmente os AGV (Aquino & Chernicharo, 2005). O desequilíbrio na produção e consumo de ácidos orgânicos é um dos principais fatores que afetam a estabilidade dos sistemas anaeróbios e pode rapidamente resultar em um digestor inoperável, sendo esta uma situação difícil de corrigir (McCarty, 1964; Foresti, 2002). Avaliando-se as reações que ocorrem durante a digestão anaeróbia, verifica-se que o H_2 no meio inibe a acetogênese sintrófica (ex: reações 3.4-3.7 – Tabela 3.1). Portanto, a separação da acidogênese com a liberação do hidrogênio produzido nesta etapa pode favorecer as reações subsequentes da digestão anaeróbia, contribuindo inclusive para a produção de metano pela via acetotrófica, sendo o hidrogênio para a via hidrogenotrófica provido pelas reações da acetogênese.

Como o acúmulo e excesso de produtos da acidogênese ocorre geralmente em situações de choques de carga orgânica, os sistemas anaeróbios de duplo estágio são indicados principalmente para o tratamento de efluentes concentrados, com alto teor de matéria orgânica biodegradável. Além disso, a introdução de um reator acidogênico permite a otimização das condições requeridas para a conversão de compostos orgânicos complexos (recalcitrantes) em ácidos orgânicos e outros compostos mais simples (Ke et al., 2005). Isto, por sua vez, reduz o risco de efeitos inibitórios e tóxicos destes compostos sobre os microrganismos envolvidos na metanogênese, que são de lento crescimento e predominam no segundo reator.

Ghosh et al. (1985) avaliaram o desempenho de reatores anaeróbios de duplo estágio tratando diversos tipos de efluentes industriais em escala de laboratório, piloto e plena e compararam a reatores de estágio único. No caso das plantas-piloto, todas consistiam de reatores de mistura para a acidogênese e reatores UASB para a metanogênese, em temperatura mesofílica. Os efluentes utilizados nos sistemas de tratamento eram ricos em matéria orgânica e com baixo teor de sólidos, compreeendendo efluente de destilarias (enzimas, leveduras e etanol), de produção de açúcar de beterraba, e de produção de ácido cítrico. A planta em escala real descrita era para tratamento de efluente de indústria de linho, a 30°C. O reator UASB metanogênico era alimentado com efluente acidificado durante o processo de obtenção das fibras vegetais e possuía operação intermitente, devido ao processo de produção sazonal (seis meses por ano). Em escala de laboratório, comparou-se o sistema de dois estágios a um reator de estágio único para o tratamento de efluente de indústria de refrigerantes. Segundo os autores, as vantagens mais significativas do processo em duas etapas (acidogênico-metanogênico) são a possibilidade de operação com cargas orgânicas mais elevadas, o aumento do poder calorífico dos gases produzidos e uma eficiência de remoção de DQO equivalente ou superior aos reatores anaeróbios convencionais de alta taxa. Estas vantagens proporcionam o aumento da produção de energia líquida, redução nos custos de implantação e de operação e maior estabilidade do processo.

Na Tabela 3.2 são apresentados exemplos de estudos em que os benefícios da segregação das etapas foram demonstrados comparando-se reatores de dois estágios a reatores convencionais, de estágio único, para o tratamento de efluentes líquidos.

Cabe ressaltar que, apesar das vantagens apresentadas pelo tratamento anaeróbio em dois estágios, há pouco relatos de sua aplicação em escala real e escassez de informações sobre as plantas existentes, como nos trabalhos de Ghosh et al. (1985), Young et al. (2000), van Groenestijn et al. (2006) e Ma et al. (2017). Isso se deve, em parte, aos maiores custos de implementação e dificuldades de projeto e operação, decorrentes da própria relativa falta de experiência sobre o processo e a aplicação para diferentes substratos (Ke et al., 2005; Rapport et al., 2008). Mas vale ressaltar que, conforme demonstrado por Chen et al. (2009) e De Lille et al. (2016), ferramentas de modelagem matemática, adaptando-se modelos geralmente empregados para reatores de estágio único, podem ser utilizadas para reatores de dois estágios tratando efluentes de altas e baixas concentrações.

Tabela 3.2 - Estudos comparando reatores de um e de dois estágios

Reatores	Substrato	Principais vantagens observadas do sistema de dois estágios	Ref.
Todos de mistura, com agitação, a 30°C, sendo os reatores metanogênico e único de fluxo ascendente	Sintético à base de glicose	Maior tolerância a maiores cargas biológicas, redução no acúmulo de ácido propiônico e maior estabilidade quando submetidos a choques de carga.	Cohen et al., 1980; 1982
Fermentador (acidogênico) e leito fluidizado (metanogênico e estágio único) a 35°C	Sintético à base de glicose	Maior eficiência de remoção de DQO para concentrações afluentes maiores, muito menor concentração de sólidos suspensos no efluente, maior rendimento de metano, ligeira maior estabilidade frente à redução de temperatura, ao aumento da vazão e da concentração afluente.	Bull e tal., 1984
Filtro anaeróbio de fluxo ascendente (acidogênico) e reatores de alta taxa (metanogênico e estágio único) mesofílicos	Efluente de indústria de refrigerante	Maior tolerância a maiores COV (pelo aumento da concentração de DQO afluente e pela redução do TDH), maior percentual de metano no biogás, maior produção volumétrica de metano (embora rendimento por DQO aplicada equivalente ao reator de estágio único), potencialmente menor requerimento energético para operação.	Ghosh et al., 1985
Tipo quimiostatos a 37°C	Efluente à base de amido	Maior estabilidade frente à redução do tempo de retenção de sólidos, redução da concentração de propionado, aumento da concentração de metanogênicas acetoclásticas	Zhang & Noike, 1991
Mistura a 55°C (acidogênico: por agitação, metanogênico: por recirculação)	Vinhaça de cana-de-açúcar	Aumento do rendimento de metano e enriquecimento em 17% do percentual de metano no biogás (de 52,6-59,5% para 60,8-66,6%).	Yeoh, 1997
Todos de mistura a 35°C, sendo o reator único com recirculação do lodo (contato)	Sintético à base de glicose	Maior eficiência de remoção de DQO.	Azbar & Speece, 2001
Mistura (acidogênico) e UASB (metanogênico e estágio único) a 35°C	Sintético rico em gorduras	Maior estabilidade quanto à eficiência de remoção de DQO e produção de metano quando submetido ao aumento de carga orgânica e concentração do afluente, redução de escuma no reator metanogênico	Kim et al., 2004b
Fermentador a 30°C (acidogênico, inoculado com *Kluyveromyces lactis*) e batelada sequencial a 50°C (metanogênico e único)	Soro de leite	Maior eficiência de remoção de DQO, maior rendimento de metano por DQO removida, maior percentual de metano no biogás, menor requerimento de alcalinizantes	Göblös et al., 2008
Frascos em batelada, com agistação, a 37°C	Vinhaça de milho	Redução do tempo necessário para atingir 80% de remoção de DQO, maior rendimento de metano e de bioenergia (hidrogênio e metano).	Nasr et al., 2012
Leito empacotado (acidogênico) e UASB (metanogênico e estágio único) a 55°C	Vinhaça de cana-de-açúcar	Aumento no percentual de metano e maior eficiência de remoção de DQO.	Ferraz Júnior et al., 2016

Possíveis desvantagens do tratamento anaeróbio em dois estágios envolvem a possibilidade de redução da eficiência de transferência de massa (Aquino & Chernicharo, 2005), menor rendimento de metano pela via hidrogenotrófica (Reith et al., 2003) e a redução da remoção de matéria orgânica por unidade de volume, ou seja, maior volume requerido (Lun et al., 1995). Em comparação a reatores de estágio único, o maior requerimento de volume em reatores de dois estágios pode ocorrer, segundo Lun et al. (1995), quando se utilizam culturas suspensas no reator acidogênico, em que o volume necessário para a etapa acidogênica seria maior em relação aos reatores de lodo granular, ou caso a separação de etapas seja incompleta, em que no primeiro reator poderia haver abundância de outros microrganismos além das bactérias acidogênicas. Como salientado por Rapport et al. (2008), é esperado que o crescimento da aplicação comercial do tratamento em duplo estágio ocorra à medida que a maior complexidade e os custos iniciais de implantação sejam superados pelas melhorias ao processo.

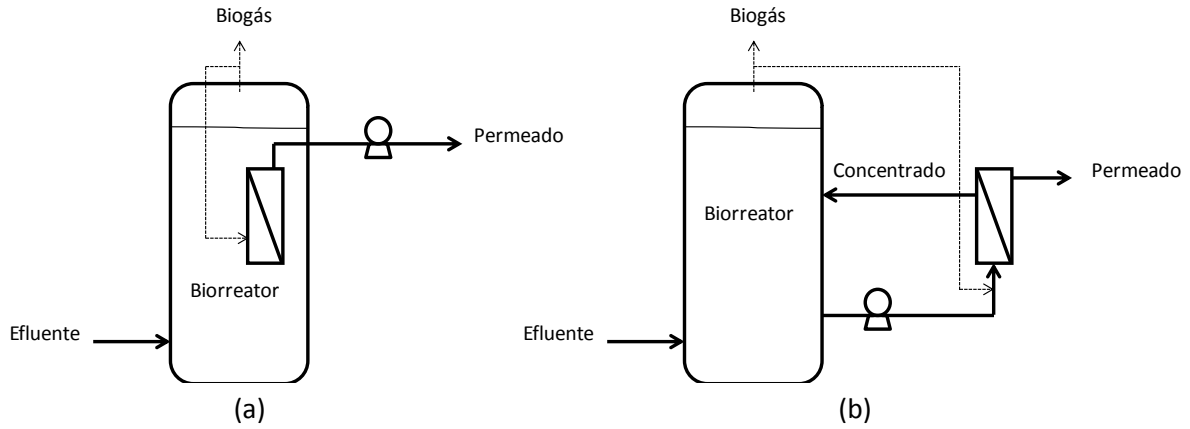
Conforme pode ser visto na Tabela 3.2, diversas configurações de reatores metanogênicos já foram aplicadas em sistemas de dois estágios. A inovação em termos de configurações de reatores tem sido uma das principais estratégias para melhorar a eficiência do tratamento anaeróbio. Neste contexto, inserem-se os biorreatores anaeróbios com leito fixo estruturado (AnSFBR – *anaerobic structured fixed-bed reactor*) e os biorreatores com membrana anaeróbios (BRMan ou AnMBR – *anaerobic membrane bioreactor*). Em relação aos AnMBR, alguns trabalhos já utilizaram sistemas de dois estágios, em parte com o intuito de melhorar a filtração, como apresentado no item 3.1.4. Já os AnSFBR compreendem uma tecnologia relativamente nova, a qual foi pela primeira vez descrita em periódico internacional por Picanço et al. (2001). Desde então, tem sido aplicada em vários estudos no LPB/USP (Mockaitis et al., 2014; Ferraz Júnior et al., 2016; Fuess, et al., 2017). Em relação aos reatores de leito fixo empacotado, de leito expandido e de leito fluidizado, os AnSFBR apresentam diversas vantagens, como o menor acúmulo de sólidos, redução de canais preferenciais, maior capacidade de retenção de biomassa (Mockaitis et al., 2014) e menor consumo de energia (Fuess et al., 2017). Ressalta-se que no estudo de Fuess et al. (2017), reatores UASB e AnSFBR foram aplicados na fase metanogênica de sistemas de dois estágios, sendo alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar previamente acidificada. Nesse estudo, verificou-se um melhor desempenho global do ABFSB, especialmente quando os reatores foram submetidos às maiores cargas (acima de 20 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$). Assim, considerando-se o potencial de aplicação de reatores de leito fixo estruturado, essa configuração foi uma das escolhidas para ser estudada na presente pesquisa.

3.1.4 Tratamento anaeróbio de duplo estágio conjugado com membranas

Os mecanismos tradicionais de retenção de biomassa em reatores anaeróbios de alta taxa são por adesão (biofilme), floculação, granulação e retenção intersticial (Chernicharo, 2007). No entanto, a retenção da biomassa por estes mecanismos depende de uma série de fatores, influenciados pelas características do efluente e pelas condições operacionais, as quais podem ser difíceis de controlar. Dessa forma, quando os mecanismos de agregação da biomassa não podem ser assegurados, a conjugação da digestão anaeróbia à filtração por membranas representa uma tecnologia bastante promissora (Jeison, 2007). Os biorreatores com membrana (BRM ou MBR: *membrane bioreactor*) são baseados na conjugação de um reator biológico e um módulo de membranas porosas de baixa pressão – microfiltração ou ultrafiltração. Segundo Jeison (2007), os poros destas membranas aplicadas para tratamento de efluentes podem variar de 0,02-0,5 µm. Em relação ao material, há dois tipos principais de membranas: cerâmicas e poliméricas. Exemplos de polímeros empregados são difluoreto de polivinilideno (PVDF), polietilsulfona, polietileno e polipropileno (Judd, 2006). Diferentes configurações de módulos de membranas podem ser empregadas, destacando-se placa-e-quadro, fibra oca e tubular.

Os BRM podem ter módulo externo ou módulo submerso. A Figura 3.3 ilustra basicamente estas configurações em BRM anaeróbio (BRMan). A configuração com módulo externo (*sidestream*) requer uma recirculação ascendente, com certa velocidade tangencial, da suspensão do tanque biológico para o módulo de membrana (Wisniewski, 2007). Os BRM com módulo submerso consistem na instalação do módulo de membrana dentro do tanque biológico, demandando menor quantidade de energia (Judd, 2006). Alternativamente, o módulo pode ser submerso em um tanque externo ao tanque biológico e essa opção tem sido muito utilizada por permitir maior flexibilidade operacional (Wever & Brannock, 2008). Neste caso, a limpeza das membranas é facilitada, pois não é necessária a retirada do módulo de dentro do tanque biológico. Em sistemas anaeróbios, esta configuração em que o módulo é submerso em um tanque à parte, por vezes é chamada de BRMan de dois estágios (*two-stage AnMBR*) (Shin & Bae, 2018), mas não deve ser confundida com os também chamados BRMan de dois estágios, em que os reatores acidogênicos e metanogênicos são separados.

Figura 3.3 - Configurações de BRMan



(a) módulo submerso e (b) módulo externo
Fonte: Mota, 2012

Os BRM aeróbios são amplamente utilizados, principalmente para o tratamento de esgotos domésticos, com tendência crescente no mercado global e de expansão de escala. No entanto, especialmente nos últimos 10 anos, têm se intensificado as pesquisas e aplicações dos BRMan (Meng et al., 2017). No que diz respeito à difusão da tecnologia de BRMan, a incrustação (*fouling*) das membranas, que se caracteriza pela deposição de soluções e partículas em seus poros e superfície, representa o maior desafio (Lin et al., 2013). O fenômeno da incrustação está diretamente relacionado às áreas de membrana requeridas, pressão de operação e necessidade de limpeza, impactando nos custos de instalação e de operação e vida útil das membranas.

Diversos fatores interferem na incrustação das membranas, como a configuração do reator, o material da membrana, tipo de substrato, estratégias usadas para evitar a deposição de sólidos e as características inerentes do lodo. A formação de torta, que se caracteriza pela acumulação na superfície da membrana de materiais incrustantes de tamanhos muito maiores do que os dos poros (Meng et al., 2009), e tem sido reportada como o principal mecanismo que leva à redução do fluxo transmembrana em BRMan externos e submersos (Jeison, 2007).

Estudos de Jeison e van Lier (2007) e Jeison et al. (2009) apontam que as bactérias acidogênicas impactam negativamente no desempenho da filtração em BRMan, por crescerem em grande parte como células suspensas, contribuindo para a maior viscosidade do líquido reacional (lodo e efluente no interior do reator). Esses resultados foram obtidos a partir de experimentos utilizando BRMan termofílicos alimentados com mistura de ácidos graxos voláteis (AGV) comparados àqueles alimentados com afluentes parcialmente ou não acidificados. Tanto o

BRMan submerso (Jeison e van Lier, 2007) quanto o externo (Jeison et al., 2009) alimentados com uma mistura de AGV exibiram valores de fluxo crítico muito mais altos, juntamente com um menor crescimento de bactérias acidogênicas e uma menor produção de produtos microbianos solúveis (SMP).

Assim, infere-se que em um sistema de tratamento anaeróbio de duplo estágio, o reator metanogênico apresente menor crescimento de biomassa suspensa e SMP, o que pode contribuir para a redução da incrustação e, consequentemente, melhoria do desempenho da filtração em BRMan. Entretanto, a não acidificação completa do efluente, a transferência de biomassa acidogênica e de seus produtos microbianos para os reatores metanogênicos, temperatura aplicada, entre outros fatores, podem levar a resultados diferentes dos observados por Jeison e van Lier (2007) e Jeison et al. (2009).

Em ensaios com reatores em batelada, não conjugados com membranas, sem agitação, alimentados com vinhaça, Mota (2012) mediu a filtrabilidade do lodo, em teste com papel de filtro, e verificou que a filtrabilidade do lodo metanogênico foi cerca de quatro vezes superior à do lodo acidogênico. Entretanto, dando continuidade à pesquisa, em que um BRMan de duplo estágio de fluxo contínuo e sob agitação foi empregado para o tratamento da vinhaça (Mota et al., 2013), a filtrabilidade do lodo metanogênico foi bastante inferior à verificada para os testes em batelada. Como as concentrações de lodo foram próximas, vários outros fatores podem ter interferido para o fenômeno, tais como a carga orgânica específica, o tempo de detenção, o modo de operação (contínuo *vs*. batelada) e a agitação.

Dereli et al. (2015) realizaram diferentes testes de filtração para comparar a filtrabilidade do lodo metanogênico de reatores alimentados com soro de leite bruto e com soro de leite biologicamente acidificado (proveniente de um reator acidogênico em batelada). Verificou-se que os reatores alimentados com o substrato não acidificado apresentaram maior crescimento de bactérias acidogênicas e, como consequência, menor tamanho médio das partículas e maior resistência específica à filtração. Entretanto, segundo os autores, não se verificou um impacto significativo das bactérias acidogênicas na determinação do fluxo crítico quando o lodo foi submetido a testes em curto prazo com módulos externos de membrana tubular. Porém, como apontado pelos autores, para uma melhor avaliação do comportamento do lodo no que se refere ao potencial de incrustação, seriam necessários testes nos reatores operando continuamente com o sistema de filtração. Como em BRM acumulam-se sólidos suspensos e partículas solúveis que

não passam através da superfície da membrana e da camada de torta, as propriedades do líquido reacional modificam-se com o passar do tempo.

Wu et al. (2017) compararam BRMan fluidizados (AFMBR – *anaerobic fluidized MBR*) de um e de dois estágios com carvão ativado granular (CAG) para o tratamento de efluentes municipais. No entanto, o primeiro reator do sistema de dois estágios – um reator anaeróbio fluidizado (AFBR) com CAG – não era propriamente acidogênico. Este foi utilizado principalmente para retenção de sólidos orgânicos e degradação de compostos solúveis (49% da remoção de DQO foi obtida no AFBR). Ambos os AFMBR exibiram resultados comparáveis, exceto quando submetidos a valores de fluxo transmembrana mais elevados, de 30 $L.m^{-2}h^{-1}$, que a incrustação foi mais severa no AFMBR de estágio único.

Apesar das indicações da melhoria, como consequência da separação de estágios, das propriedades do lodo metanogênico que afetam a filtração em membranas, foram encontrados relativamente poucos trabalhos utilizando a configuração de um reator acidogênico seguido de um BRM metanogênico (Saddoud & Sayadi, 2007; Saddoud et al., 2007; Jeong et al., 2010; Gimenez et al., 2011; Wijekoon et al., 2011; Mota et al., 2013; Santos et al., 2017).

Saddoud & Sayadi (2007) descrevem o tratamento de efluente de matadouro por meio de um BRMan externo a 37°C. Até o 110º dia de operação o BRMan era de estágio único. Além do aumento da eficiência de remoção de DQO de 94% para 99% e do rendimento de metano de 0,2 para 0,3 $L.g^{-1}DQO_{removida}$, o tratamento em duplo estágio proporcionou um aumento no fluxo atingível médio de 2,22 para 2,45 $L.m^{-2}h^{-1}$. Já no estudo de Saddoud *et al.* (2007) avaliou-se o tratamento de efluentes de laticínios. Inicialmente o sistema era constituído de reatores de mistura completa acidogênico e metanogênico (37°C), seguidos por um decantador secundário, em que o lodo sedimentado no decantador era retornado ao reator metanogênico. Após um período de 26 dias, um módulo externo de membrana cerâmica foi conjugado ao reator metanogênico. O aumento da retenção dos sólidos pela membrana contribuiu para uma melhoria na qualidade do efluente final, em que a eficiência de remoção de DQO subiu de 79% para 98,5%.

No estudo de Wijekoon et al. (2011) também se utilizou um módulo de membrana cerâmica externo para tratamento de efluente concentrado (melaço sintético), mas em temperatura de 55°C. O lodo para inoculação dos reatores acidogênico e metanogênico foi adaptado separadamente. Após início da operação do BRMan, a COV foi aumentada progressivamente

de 5 a 8 e finalmente a 12,0 gDQO.$L^{-1}d^{-1}$. O melhor desempenho foi sob COV de 8 gDQO.$L^{-1}d^{-1}$, em que a remoção de DQO e DBO foi de 81% e 96%, respectivamente. Aspectos relacionados ao desempenho da filtração não foram detalhados neste estudo.

Giménez et al. (2011) apresentaram os resultados de uma planta piloto tratando efluente doméstico, a 33°C. A planta consistia de um reator acidogênico (1,3 m^3) e dois reatores metanogênicos (0,8 m^3 cada), sendo que nestes últimos foram utilizadas membranas de fibra oca submersas. No primeiro reator o pH foi mantido entre 5,5 e 6,5 e o efluente acidificado era bombeado para os reatores metanogênicos. Nestes últimos, parte do biogás era recirculado para o provimento do cisalhamento na superfície da membrana. A operação com fluxo de 10 L.$m^{-2}h^{-1}$ e concentração de sólidos de 22 gST.L^{-1}, o qual os autores consideram como uma condição sub-crítica, permitiu a operação com pressões abaixo de 0,1 bar. Nenhuma incrustação irreversível foi observada. A eficiência média de remoção de DQO foi bastante satisfatória (87%), com TDH de 20 a 6 horas.

Utilizando também BRMan submerso com membranas de fibra oca, Mota et al. (2013) avaliaram o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar previamente acidificada em um reator acidogênico de fluxo ascendente. Em relação ao período de adaptação (sem membranas), a remoção de DQO no BRMan aumentou de 86% para 97%, enquanto a remoção de cor não se alterou (56-57%). Verificou-se maior concentração de SMP no reator acidogênico, sugerindo maior liberação de produtos microbianos pelas bactérias acidogênicas. A formação de torta foi o principal mecanismo de incrustação das membranas, sendo esta em sua maior parte removível. A continuação da operação com redução progressiva do TDH de 5,3 para 3,1 d não impactou significativamente o desempenho do tratamento (Santos et al., 2017).

Por estes trabalhos, verifica-se que desempenhos bastante satisfatórios em relação à remoção de poluentes têm sido reportados para BRMan de dois estágios, porém, em relação ao desempenho da filtração, há poucas informações disponíveis sobre os possíveis impactos da acidogênese em etapa prévia. Considerando a incrustação das membranas como o principal desafio para a aplicação de BRMan, a presente pesquisa visa contribuir nesse sentido, comparando-se BRMan de um e de dois estágios.

3.2 Produção de hidrogênio em reatores acidogênicos

A produção de bioenergia pela digestão anaeróbia é possível com a recuperação dos gases hidrogênio e metano. Há muitos anos a conversão da matéria orgânica presente nos resíduos sólidos e efluentes líquidos a gás metano é apontada como uma das grandes vantagens do tratamento anaeróbio devido ao poder calorífico deste gás (McCarty, 1964). O foco na produção biológica de hidrogênio por vias fermentativas, por sua vez, é relativamente recente e, embora a produção biológica de hidrogênio ainda seja pouco expressiva, é uma alternativa que tende a crescer à medida que as tecnologias vão sendo aprimoradas (Drapcho et al., 2008). O gás hidrogênio produzido pela fermentação da biomassa tem um grande potencial como combustível alternativo ambientalmente sustentável, uma vez que a sua combustão gera apenas água e energia.

O tratamento anaeróbio em duplo estágio torna possível a recuperação do hidrogênio produzido na etapa acidogênica, que em um reator de estágio único em condições estáveis seria, em sua maior parte, prontamente convertido a metano pelas arqueias hidrogenotróficas. Entretanto, a produção biológica contínua de hidrogênio em sistemas de tratamento anaeróbio não é uma tecnologia consolidada, sendo afetada por diversos parâmetros operacionais, como o tempo de detenção hidráulica, concentração do substrato, propriedades do lodo, configuração dos reatores e microrganismos presentes (Yu & Mu, 2006; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Lin et al., 2011). Estes fatores devem ser investigados a fim de aumentar a produção de bioenergia nos sistemas de tratamento anaeróbio.

3.2.1 Microrganismos e rotas metabólicas

A produção de hidrogênio em reatores acidogênicos ocorre por duas vias principais: Clostridial e Enterobacterial (ou ácida mista), conforme denominado por Sikora et al. (2013). Na primeira, açúcares são metabolizados a piruvato, acetil-CoA e finalmente a ácidos orgânicos, destacando-se acetato e butirato. A produção de H_2 é mediada por FeFe-hidrogenases, que catalisam a oxidação de ferredoxina (proteína que atua como carreador de elétrons) e a redução de prótons a hidrogênio gasoso. Já na segunda, no processo de conversão de piruvato a acetil-CoA, ocorre produção concomitante de formiato. A produção de H_2 se dá principalmente pela clivagem do formiato, catalisada por NiFe-hidrogenases. Embora com exceções, a via Clostridial é característica sobretudo para microrganismos anaeróbios estritos, como membros da família Clostridiaceae (ex: *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Ethanoligenens*), enquanto a via

Enterobacterial para microrganismos facultativos, como membros da família Enterobacteriaceae (ex: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*), sendo que espécies de *Bacillus* são reportadas para ambas as vias (Sikora et al., 2013). Segundo Ruggeri et al. (2015), as FeFe-hidrogenases são cerca de 10-100 vezes mais eficientes que as NiFe-hidrogenases.

Utilizando a glicose como modelo de substrato, tem-se que na glicólise, que é uma etapa comum para ambas as vias Clostridial e Enterobacterial, NADH é formado. É relatado que alguns clostrídios possuem a capacidade de formação de H_2 a partir do NADH por uma hidrogenase bifurcativa, em que NADH e ferredoxina são oxidados simultaneamente e íons H^+ são reduzidos a H_2 (Cai et al., 2011). Entretanto, geralmente a contribuição do NADH para a formação de H_2 pode ocorrer devido à transferência de elétrons do NADH para a ferredoxina pela enzima NADH:ferredoxina oxidorredutase (NFOR), a qual está presente em alguns microrganimos, incluindo bactérias termofílicas e clostrídios (Cai et al., 2011). A ferredoxina reduzida então é oxidada quando há redução acoplada de H^+, formando então H_2, em um processo mediado por FeFe-hidrogenases. Muitos estudos indicam que pode ocorrer formação de H_2 pela via do NADH em algumas bactérias que realizam a fermentação pela via Enterobacterial, como *Enterobacter aerogenes*, embora por mecanismos não completamente elucidados (Nakashimada et al., 2002; Zhang et al., 2009; Pi et al, 2016).

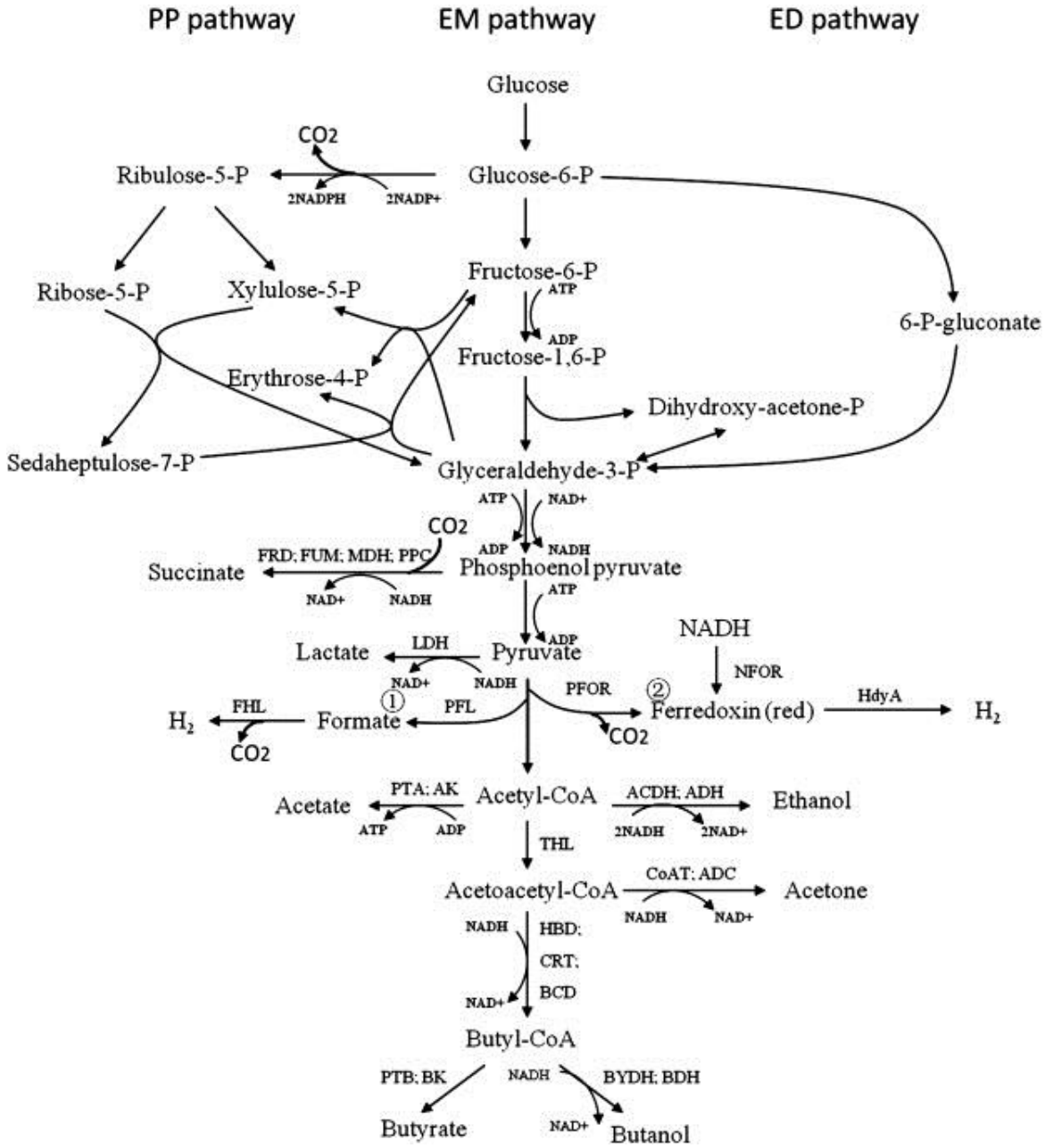
Na via Clostridial, a conversão do piruvato a acetil-CoA e CO_2 é acoplada à redução de ferredoxina, pela enzima piruvato:ferredoxina oxidorredutase (PFOR). Este é o principal mecanismo de produção de H_2 nesta via, pela subsequente oxidação da ferredoxina por FeFe-hidrogenases juntamente à redução de prótons. Alguns microrganismos que utilizam a via Clostridial também podem formar formiato a partir do piruvato pelo complexo piruvato formiato liase (PFL). Entretanto, há evidências que nos microrganismos que podem expressar PFOR e PFL em condições anaeróbias, a atividade específica da PFL é muito menor (Castro et al., 2013). Além disso, não se sabe da habilidade de quebra do formiato para a produção de H_2 nestes microrganismos, como ocorre nos microrganismos facultativos (Cai et al., 2011).

Na via Enterobacterial o mecanismo de formação de H_2 se dá principalmente pela clivagem do formiato, o qual é produto da conversão do piruvato a acetil-CoA pelo complexo PFL. A clivagem do formiato é mediada pelo complexo formiato hidrogênio liase (FHL), em que atuam enzimas do tipo formiato desidrogenase, na reação de oxidação de formiato a CO_2, e NiFe-hidrogenases, na reação de redução de prótons a H_2 (Sawers, 2005; Hallenbeck & Ghosh, 2009).

Sawers (2005) descreve detalhadamente o processo em *Escherichia coli* e explica que a oxidação do formiato é acoplada à redução do nitrato.

A Figura 3.4 ilustra as vias fermentativas que levam à formação de H_2. Simplificadamente, os saldos das reações bioquímicas levando à produção de H_2 são mostrados nas reações 3.14-3.20.

Figura 3.4 - Rotas de produção de H_2 pela fermentação escura e os produtos associados



Legenda: ① Via do formiato (referência *E. coli*) ②Via da ferredoxina (referência: *Clostridium* sp.).

*HdyA: Hidrogenase

Fonte: Cai et al. (2011)

- *Glicólise:*

glicose + 2 NAD^+ → 2 piruvato + 2 NADH + 2 H^+ (3.14)

2 NADH + 2 Fd_{ox} → 2 NAD^+ + 2 Fd_{red} (3.15)

2 Fd_{red} + 2 H^+ → 2 Fd_{ox} + 2 H_2 (3.16)

- *Piruvato a acetil-CoA e CO_2 (via Clostridial):*

2 piruvato + 2 CoA + 2 Fd+ → 2 acetil-CoA + 2 CO_2 + 2 Fd_{red} + 2 H^+ (3.17)

2 Fd_{red} + 2 H^+ → 2 Fd_{ox} + 2 H_2 (3.18)

- *Piruvato a acetil-CoA e formiato (via Enterobacterial):*

2 piruvato + 2 CoA → 2 acetil-CoA + 2 formiato (3.19)

2 formiato → 2 CO_2 + 2 H_2 (3.20)

Conforme pode ser constatado pela análise da Figura 3.4 e das Reações 3.14-3.20, o rendimento máximo é equivalente a 4 mols de H_2 por mol de glicose, como poderia ocorrer na via Clostridial, com a formação exclusiva de acetato. Porém, na experiência prática, os rendimentos geralmente são muito menores, destacando-se alguns motivos explicados a seguir.

A via de formação de H_2 intermediada pela enzima NFOR (Reação 3.15) é fortemente inibida pelo H_2 no meio; segundo Sikora et al. (2013) pressões parciais de H_2 > 60 Pa inibem a atividade da NFOR. Além disso, o consumo do NADH produzido na etapa da glicólise para a formação de lactato, etanol, ácido butírico, entre outros possíveis produtos mais reduzidos, também reduz a formação de H_2 por esta via. Inclusive, para muitos microrganismos que realizam a fermentação pela via Clostridial não é conhecida a habilidade de formação de H_2 pela via do NADH, incluindo o gênero *Ethanoligenens* (Lee et al., 2009). Portanto, restando então a via mediada pela PFOR, o rendimento passa a ser de até 2 mols de H_2 por mol de glicose. A PFOR também é inibida pelo H_2 no meio, mas é menos sensível, estando ativa em pressões parciais de H_2 de até $3x10^4$ Pa (Sikora et al., 2013). A ocorrência de outras rotas metabólicas onde há consumo de piruvato sem formação de acetil-CoA, destacando-se a formação de lactato, acarreta ainda em um menor rendimento.

Na via Enterobacterial, a formação de lactato também leva à redução do rendimento de H_2, reduzindo a disponibilidade de piruvato para a formação de formiato. Conforme comentado anteriormente, a formação de H_2 pela via do NADH não é consolidada em microrganismos facultativos (Cai et al., 2011). Fatores relacionados à eficiência da clivagem do formiato são determinantes para o rendimento de H_2 por esta via. Segundo Sawers (2005), a transcrição do complexo FHL é induzida pela acidez do meio externo, sendo que a decomposição do formiato

em condições ácidas é uma forma para manter o pH do meio e reduzir a concentração do mesmo na célula. No estudo de Noguchi et al. (2010), verificou-se que a NiFe-hidrogenase que catalisa a redução do íon hidrogênio no complexo FHL encontra-se ativa em *E. coli* em valores de pH externo de 2,5 e 2,0, tendo papel fundamental para a sobrevivência das células em ambientes anaeróbios extremamente ácidos.

Portanto, o aumento do rendimento de H_2 depende dos microrganismos presentes e das rotas metabólicas estabelecidas. Estratégias como a redução da pressão parcial de H_2 no meio favorece a sua formação por mecanismos termodinâmicos. A formação de lactato deve ser evitada, pois consome o piruvato sem que haja formação de ferredoxina reduzida (via Clostridial) ou formação de formiato (via Enterobacterial). O consumo de H_2 por rotas como a do ácido propiônico (Reação 3.2) ou homoacetogênicas (Reação 3.8) também diminuem o rendimento líquido. A manutenção de condições adequadas para a expressão e atividade das enzimas envolvidas, destacando-se as hidrogenases, é crucial para a formação de H_2.

3.2.2 Panorama da produção biológica de hidrogênio em reatores contínuos

Na maioria dos estudos de investigação da produção biológica de hidrogênio por vias fermentativas em sistemas de tratamento de efluentes foram aplicados reatores UASB e algumas de suas variações, como os reatores de leito granular expandido (EGSB) e os reatores anaeróbios com recirculação. Há também estudos com configurações alternativas, como reatores de leito fixo empacotado e de leito fixo estruturado. Na Tabela 3.3 são apresentados alguns exemplos e os principais parâmetros operacionais e de avaliação do desempenho para a produção de hidrogênio.

Figura 3.5 - Parâmetros operacionais e de desempenho obtidos em estudos para produção de biohidrogênio em reatores acidogênicos

Reator	Vol. útil - L	Vel. Sup. - $m.h^{-1}$	Substrato	Conc. substrato - $gDQO.L^{-1}$	TDH - h	COV - $gDQO.L^{-1}d^{-1}$	pH	Temp - °C	H_2 no biogás - %	PVH - mL $H_2.L^{-1}h^{-1}$	HY - mol $H_2.mol^{-1}$ hexose(1)	Referência
UASB com grânulos e flocos	0,22	n.i.	glicose + nutrients	4,85	R1: 27/ R2, R3: 24(2)	R1: 4,3/ R2, R3: 4,85	4,5	70	n.i.	R1: ~38/ R2: ~28/ R3: ~33	R1: 2,47/ R2: 1,14/ R3: 1,87 (med)	Kotsopoulos et al., 2006
UASB - CN/AC(3)	5	0,031-0,062	glicose + nutrients	10,7	24-12	10,7-21,4	4,5	n.i.	40	142,5-231 (máx.) (↑)/ 115	2,45 (máx.)-2,23 (↓)/ 1,42	Liu et al., 2012
UASB granular com recirculação	2,0	2(4)	glicose + nutrients	1,15	5,5	5	4,5	35	66-77	72	2,6	Mendonza & Buitrón, 2013
UASB granular	0,2	n.i.	glicose + nutrients	5,2	5	25,1	3,7	70	51	86	1,1	Tähti et al., 2013
UASB granular	3	0,08-0,32	sacarose + nutrients	20	24-4 (8 otm.)	20-120 (60 otm.)	6,7	35	42,4 (otm.)	278 (otm.)	1,0 (otm.)	Chang & Lin, 2004
UASB granular	2,1	n.i.	sacarose + nutrients	5,33	30-24-18	4,26-7,11	7,0-4,5	38	56,6	50	1,44	Mu & Yu, 2006
UASB granular	2,1	n.i.	sacarose + nutrients	5,33-28,1/ 10,67	18/ 30-2	7,1-37,4/ 8,5-128,0	4,4	38	57-37 (↓)/ 44-42 (↓)	50-190 (↑)/ 33-202 (↑)	1,44-1,00 (↓)/ 0,78-0,49 (↓)	Yu & Mu, 2006
UASB granular	2	0,11-0,43	sacarose + nutrients	20	24-6 (8 otm.)	20-80 (60 otm.)	6,7	35	52,4 (otm.)	581 (otm.)	1,45 (otm.)	Chang & Lin, 2007
UASB granular	4	0,023-0,049	sacarose + nutrients	3-17 (14 otm.)	12-22 (16 otm.)	4,4-30 (21,2 otm.)	4,0	30	26-50	123 (otm.)	0,27-1,65 (1,62 otm.)	Zhao et al., 2008
UASB	15,7	n.i.	sac. (açúcar mascavo) + N e P	4	8	12	4-4,5	35	47,4	15,9	0,27	Wang & Li, 2010

Reator	Vol. útil - L	Vel. Sup. - $m.h^{-1}$	Substrato	Conc. substrato - $gDQO.L^{-1}$	TDH - h	COV - $gDQO.L^{-1}d^{-1}$	pH	Temp - °C	H_2 no biogás - %	PVH - mL $H_2.L^{-1}h^{-1}$	HY - mol $H_2.mol^{-1}$ hexose[1]	Referência
Leito fixo sem (1) e com grânulos (2)	1,5	n.i.	melaço de açúcar de beterraba	54	18	72	5,0	n.i.	35,7 (1)/ 48,6 (2)	141,3 (1)/ 277,0 (2)	1,4 (1)/ 2,7 (2)	Chojnacka, et al., 2011
UASB granular	4,5	n.i.	sacarose + nutrientes	5-10	50-12	2,4-20	4,4	55	52	~150-~50 (↑)	1,21-1,53 (↑)	Dong et al., 2011
LE com cilindros de PEBD	2,5	0,311-0,995[5]	sacarose + nutrientes	2	2	24	n.i. (6,5 afluente)	25	45,7-56,2 (méd), 61,9-75,6 (máx.)	73,5-124,8 (méd), 145,2-289,8 (máx.)	0,45-0,7 (méd), 1,2-2,0 (máx.) 2,11 (otm.)	Lima & Zaiat, 2012
UASB granular (<2 mm)	4,0	n.i.	sacarose + nutrientes	1-9	10	2,4-21,6 (16,8 otm.)	4,0	36	35-55	120 (máx.)	1,47	Ning et al., 2013
LE com cilindros de PEBD [6]	2,5	0,249	sacarose + nutrients	2	2	24	n.i. (6,5 afluente)	25	n.i.	15,1-47,3 (méd), 59,8-195,6 (máx.)	0,35-1,05 (méd), 1,55-3,45 (máx.)	Penteado et al., 2013
UASB granular	4,0	n.i.	efluente de manipueira	14,5	11,6-2,3 (3,9 ot.)	30-150 (90 otm.)	5,5	55	40 (otm.)	22 (otm.)	- [7]	Intanoo et al., 2014
UASB granular	3,5	0,022-0,066	xilose + nutrients	10-50 (30 otm.)	4-12 (6 otm.)	120 (otm.)	n.i.	35	n.i.	2086	3,6 (máx.)	Jung et al., 2013
Reator em bateladas sequenciais (granular)	6	n.a.	vinhaça da produção de tequila	0,5-3,0/ 1,5-5,0	24/ 24-12	0,5-6/ 1,5-10	5,5	25/ 35	7,1/ 21,0 - 29,2	6,8-2,3/ 14,3-18,5/ 24,7-44,4	1,07-3,09	Buitrón & Carvajal, 2010
Reator em bateladas sequenciais – lodo granular	4 (SBR1)/ 0,6 (SBR2)	n.a.	vinhaça de produção de tequila	0,5 - 5,0 (SBR1)/ 2,0 - 16,0 (SBR2)	18 (SBR1)/ 6 (SBR2)	0,7 – 6,7 (SBR1)/ 8 – 64 (SBR2)	5,5	35		<5 - 27,7 (↑) (SBR1)/ <10 - 57,4 (↑) (SBR2)	n.i.	Buitrón et al., 2014
UASB floculento	4,6	0,23-0,45	soro de queijo	10 (diluído)	24-12	10-20	5	30	<1-20 (↑)	~0-5,1	n.i.	Castelló et al., 2009
UASB floculento: R1, R2: UASB	1,3	1,5[8]	soro de queijo + nutrientes	R1, R3: 1,25-5/	R1, R3: 6/ R2,	R1, R3: 5-20/ R2, R4: 20[9]	5,9-5,4	22-25	R1: 98 (máx.)/ R3: 76 (máx.)/	R1: 47 (máx.)-14/ R2: 59 (máx.)-16/	n.i.	Reyes et al., 2012

Reator	Vol. útil - L	Vel. Sup. - $m.h^{-1}$	Substrato	Conc. substrato - $gDQO.L^{-1}$	TDH - h	COV - $gDQO.L^{-1}d^{-1}$	pH	Temp - °C	H_2 no biogás - %	PVH - mL $H_2.L^{-1}h^{-1}$	HY - mol $H_2.mol^{-1}$ hexose[(1)]	Referência
granular: R3, R4				R2, R4: 20-5[(9)]	R4: 24-6[(9)]				R2: 49 (méd.)/ R4: 31 (méd.) [(9)]	R3: 5 (méd.)/ R4: 135 (máx.)-15[(9)]		
UASB granular	0,47-1,3 [(10)]	n.i.	soro de queijo + nutrients	R1: 5/ R2: 5-10/ R3: 20-16 [(10)]	R1, R2: 6/ R3: 10-8 [(10)]	R1: 20/ R2: 20-40/ R3: 48[(10)]	R1: 5,6-4,5/ R2, R3: 5,3-5,5 [(10)]	n.i.	n.i.	R1: 5-3,75/ R2: 11,25/ R3: 20,4-45,4	n.i.	Reyes et al., 2014
UASB granular	1,35	n.i.	soro de látex	36	67-24	14-36	5,5	55	27-32 (↑)	28-66 (↑)	0,56-0,40 (↓)	Kongjan et al., 2014
UASB	10	0,25 [(11)]	PET efluente de esterificação	1,5-3,0 (diluído)	16	2,2-4,5	n.i.	11-25	10-80	n.i.	n.i.	Huang et al., 2004
UASB com *Clostridium* PEG-imobilizado	5	n.i.	efluente da produção de óleo de palma	79,2-19,8/ 19,8-79,2 (60,0 otm.) (diluído)	24-6/ 12 (12 otm.)	79,2/ 38,4-158,4 (120 otm.)	5,5	37	52	336 (máx.)	3 (máx.)	Singh, et al., 2013
UASB granular e UASB-FF [(12)] e recirculação	2,55	1,0 [(13)]	efluente da produção de óleo de palma + nutrientes	4,68-25,88	24-12	4,7-51,8	5,5	38	56,6	75,4	n.i.	Mohammadi et al., 2014
UASB	20	0,085	lodo prensado	12,48 (diluído)	30	10	5,5-6	room	752-59	3,6	n.i.	Radjaram & Saravanane, 2011

Otm.: condição considerada ótima pelos autores. Máx.: máximo. Méd.: média. Inoc.: inóculo. N.i.: não informado. N.a.: não se aplica. As setas (↑)(↓) indicam a tendência de aumento ou redução conforme as mudanças operacionais. (1) 1 mol de glicose como DQO = 0,5 mol sacarose = 1,2 mol xilose. 1 mol H_2/ mol glicose = 2 mol H_2/ mol sacarose = 0.83 mol H_2/ mol xilose. (2) Três reatores foram avaliados com diferentes estratégias de partida: R1: adição de bromoetanosulfonato de sódio (BMS) e recirculação, R2: BMS, R3: recirculação (em alguns períodos, BMS foi adicionado no R3). Razão de recirculação = 3.3. (3) Dois reatores UASB foram operados, um deles com nanotubos de carbono (CN) e o outro com carvão ativado (AC) para retenção do lodo. (4) Velocidade atingida com recirculação. (5) Velocidade atingida com recirculação em razões de 0,25 a 3,0. (6) Os reatores foram inoculados com lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro (SI) e efluente suíno (Sw) ou por autofermentação (A). (7) 0,46/DQO aplicada ou 1,33/DQO removida. (8) Velocidade atingida com recirculação. (9) Dois tipos de inóculo: grânulos desagregados (R1 e R2) e grânulos intactos (R3 e R4), e duas estratégias de partida: aumento da COV com TDH constante (R1 e R3) e COV constante com redução do TDH (R2 e R4). (10) Três estratégias foram usadas para evitar a metanogênese: redução do pH (R1), choque de carga (R2), redução do TDH (R3), além do tratamento térmico (R3). (11) Velocidade atingida com recirculação. Razão de recirculação = 3. (12) *Up-flow anaerobic sludge blanket-fixed film*. (13) Velocidade atingida com recirculação.

Os parâmetros operacionais mais amplamente avaliados foram o TDH, a concentração de substrato e a COV. No estudo conduzido por Chang e Lin (2004), por exemplo, verificou-se que a produção de hidrogênio foi bastante afetada pelo TDH. Foram aplicados TDH de 4 a 24 horas, sendo a produção de hidrogênio praticamente constante em TDH de 8 a 20 horas, mas drasticamente reduzida em TDH de 4 e 24 horas.

Huang et al. (2004) avaliaram o efeito combinado da COV e da temperatura sobre a produção de hidrogênio. Para avaliar o efeito de histerese, iniciou-se o experimento com a temperatura de 25ºC com redução até 11ºC e posterior incremento gradual até 25ºC. Sob a menor carga, equivalente a 2,2 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$, a produção foi positivamente relacionada à temperatura e nenhum efeito de histerese foi observado. Já para a maior carga, de 4,5 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$, embora a produção de hidrogênio tenha diminuido com a redução da temperatura e aumentado com o aumento da temperatura, a concentração de H_2 foi bem maior quando a temperatura aumentou no segundo estágio do experimento. Os autores levantaram a hipótese de que tal efeito ocorreu devido ao fato de que as bactérias consumidoras de hidrogênio seriam mais sensíveis às variações de temperatura do que as bactérias produtoras de hidrogênio. À medida que a temperatura foi reduzida, a atividade bacteriana diminuiu, resultando na redução da concentração de H_2. Quando a temperatura voltou a aumentar, a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio foi recuperada mais rapidamente do que a das bactérias consumidoras de hidrogênio, resultando em uma rápida produção de H_2.

Mu & Yu (2007) simularam a produção de hidrogênio em reator UASB por meio de recursos de algoritmo genético e rede neural. Os parâmetros de entrada no modelo foram: COV, TDH e alcalinidade bicarbonato, enquanto os parâmetros de saída foram: concentração, velocidade de produção e rendimento de H_2, carbono orgânico total e AGV no efluente. O modelo GA-NN (*genetic algorithm-neural network*) validado previu que a concentração de substrato afluente teve um efeito negativo tanto na concentração quanto no rendimento de H_2, mas teve um efeito positivo na produção de H_2. Os resultados previstos também indicam que concentrações de substrato acima de 27 $gCOD.L^{-1}$ inibiram a degradação do substrato a AGV e etanol. Portanto, a adequada concentração de substrato seria essencial para obter um melhor controle sobre a produção de H_2 em reator UASB granular.

Zhao et al. (2008) indicam que o rendimento de hidrogênio foi dependente individualmente da concentração afluente de sacarose e do TDH, entretanto, segundo os autores, o efeito interativo destes parâmetros não foi significativo.

Aplicando-se reatores operados em bateladas sequenciais para o tratamento de vinhaça da produção de tequila, Buitrón e Carvajal (2010) avaliaram o efeito de vários parâmetros sobre a produção de hidrogênio: concentração do substrato, temperatura e TDH. A temperatura teve um efeito positivo sobre o rendimento de H_2. Utilizando glicose na concentração de 2 $g.L^{-1}$ para ativação do lodo, no TDH de 12 h o rendimento foi de 1,07 e 3,09 $molH_2.mol^{-1}$glicose a 25°C e 35°C, respectivamente, enquanto que no TDH de 24 h foi de 1,15 e 1,92 $molH_2.mol^{-1}$glucose a 25°C e 35°C, respectivamente. Utilizando a vinhaça da produção de tequila como substrato, o percentual médio de hidrogênio no biogás foi de 7,1% a 25°C em TDH de 24 h, e 21,0% e 29,2% a 35°C em TDH de 24 h e 12 h, respectivamente. A temperatura mais baixa, de 25°C, favoreceu a produção de solventes, sendo que as concentrações de acetona e de etanol foram 1,6 e 6,6 vezes superior, respectivamente, a 25ºC em relação a 35°C. Quando a temperatura foi mantida a 35°C, os AGV foram os principais metabólitos. Segundo os autores, dentre os parâmetros avaliados (concentração inicial do afluente, TDH e temperatura), o TDH teve a maior influência sobre a produção de hidrogênio, em que o menor TDH resultou na maior produção volumétrica de H_2. Além disso, com o TDH de 24 h, em ambas as temperaturas, houve produção concomitante e significativa de metano (até 35-44% no biogás). Observou-se uma relação inversa entre o rendimento de hidrogênio e a remoção de carbono. No TDH de 24 h, parte do carbono contido no substrato foi convertido a metano e dióxido de carbono, com eficiências de remoção de 23% a 35ºC e de 42% a 25ºC. A máxima produção de hidrogênio e a menor eficiência de remoção de carbono (16%) foi no TDH de 12 h. Posteriormente, também utilizando reator em bateladas sequenciais para o tratamento de vinhaça da produção de tequila, Buitrón et al. (2014) avaliaram especificamente o efeito da concentração de substrato afluente. Em condições de TDH de 18 h, a concentração afluente variou de 0,5 a 5,0 $gDQO.L^{-1}$, enquanto em condições de TDH de 6 h, esta foi de 2 a 16 $gDQO.L^{-1}$. Em ambas as condições o aumento da concentração do substrato teve um efeito positivo tanto sobre a produção volumétrica de hidrogênio quanto na produção específica. Os valores máximos de produção volumétrica e específica foram equivalentes a 57,4 ± 3,9 $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$ e 918 $mLH_2.g^{-1}SSV.d^{-1}$, obtidos com a maior DQO avaliada (16 $g.L^{-1}$) no TDH de 6 h.

Outro exemplo de estudo em que se avaliou a concentração do substrato foi conduzido por Jung et al. (2013) utilizando a xilose como fonte de carbono. Após concluírem que entre 12 e 4 horas o TDH de 6 horas foi o melhor, a concentração afluente foi gradualmente aumentada de 20 para 50 $gDQO.L^{-1}$. Até 30 $gDQO.L^{-1}$, observou-se aumento da velocidade e do rendimento de hidrogênio (máximo de 2,98 mol $H_2.mol^{-1}$xilose) e o acetato foi o metabólito predominante. No entanto o posterior aumento para 40 $gDQO.L^{-1}$ e, principalmente, para 50 $gDQO.L^{-1}$ resultou na redução da

produção e rendimento de H_2, tendo concomitantemente aumentado as concentrações de lactato e etanol.

Singh et al. (2013) avaliaram separadamente o efeito da COV e do TDH utilizando reator inoculado com *Clostridium* imobilizado em polietileno glicol. Primeiramente fixou-se a COV em 79,2 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$ e o TDH foi reduzido gradualmente de 24 para 6 horas. A velocidade de produção de hidrogênio aumentou de 220 para 317 mL de $H_2.L^{-1}h^{-1}$. O rendimento de hidrogênio aumentou de 0,17 para 0,3 $LH_2.g^{-1}DQO_{removida}$ quando o TDH foi reduzido de 24 para 12 h. A velocidade de produção de hidrogênio foi essencialmente constante quando o TDH foi reduzido de 12 para 6 h, porém, nesta situação houve uma grande diminuição no rendimento de hidrogênio de 0,3 L para 0,14 L $H_2.g^{-1}DQO_{removida}$. Assim, considerou-se o TDH de 12 horas adequado para estudar o efeito de diferentes valores de COV: 38,4, 79,2, 120,0, e 158,4 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$. Os resultados indicaram que a velocidade de produção de hidrogênio aumentou de 261 mL $H_2.L^{-1}h^{-1}$ para 336 mL $H_2.L^{-1}h^{-1}$, e que o rendimento aumentou de 0,16 para 0,35 $LH_2.g^{-1}DQO_{removida}$ quando a COV aumentou de 38,4 para 120 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$. No entanto, quando a carga foi posteriormente aumentada para 158,4 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$, a velocidade de produção e o rendimento de hidrogênio foram reduzidos para 221 $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$ e 0,14 L $H_2.g^{-1}DQO_{removida}$, respectivamente. Verificou-se ainda a influência da concentração de células. No TDH de 12 h e COV de 79,2 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$, a velocidade de produção e o rendimento de hidrogênio aumentaram com o aumento da concentração de células imobilizadas de 6 para 12% m/v, mas reduziram com o posterior aumento de células para 15% m/v.

Rafrafi et al. (2013) observaram a predominância de *Clostridium pasteurianum* em seis de sete reatores com diferentes inóculos, pré-tratados ou não termicamente, nas mesmas condições operacionais (mistura completa, 10 $g.L^{-1}$ glicose, TDH de 6 h, pH 5,5, 37°C). No entanto, o rendimento de H_2 diferiu entre os reatores (de 1,2 a 2,3 $molH_2.mol^{-1}glicose_{consumida}$), sendo estas diferenças atribuídas às espécies sub-dominantes. Enquanto *Bacillus* e *Lactobacillus* contribuíram negativamente para a produção de H_2 ao desviar parte da glicose para a produção de lactato, a presença de *Escherichia coli* contribuiu positivamente ao produzir H_2. Porém, embora os autores se refiram às estruturas das comunidades microbianas como estáveis, o tempo de operação foi de 10 a 12 dias, o que pode não ser suficiente para se ter certeza da estabilidade do processo em longo prazo. Yokoi et al. (1995) utilizaram cultura de *Enterobacter aerogenes*, e verificaram que esta bactéria era capaz de crescer em condições ácidas aerobiamente e anaerobiamente, em pH 3,3 e 4,0, respectivamente. Em reator contínuo, obtiveram produção estável de H_2 em pH entre 4,5 e 6,0, com PVH e HY de aproximadamente $120mL.L^{-1}h^{-1}$ e 1 $molH_2.mol^{-1}glicose$. Entretanto,

quando o pH foi reduzido de 4,5 para 4,1, a produção de H_2 caiu abruptamente até cessar, assim como o consumo de glicose. Os autores atribuíram estes resultados ao menor crescimento e lavagem das células em pH menor que 4,5, e à inibição do crescimento e da produção de H_2 causada pelos ácidos orgânicos (acético, succínico e láctico), sobretudo nas suas formas livres. Como uma forma de controlar o pH e reduzir o consumo de hidróxido de sódio no mesmo, Intanoo et al. (2014) aplicaram uma razão de recirculação de 1:1 do efluente do reator metanogênico no reator acidogênico.

Alguns autores reportam dificuldades em inibir completamente a metanogênese em reatores acidogênicos. No estudo de Castelló et al. (2009), a manutenção de um pH baixo (média de 5,0) não foi suficiente para controlar a metanogênese; o metano foi produzido simultaneamente com o hidrogênio, sugerindo que a biomassa metanogênica foi capaz de se adaptar ao baixo pH. No estudo de Reyes et al. (2014), tentou-se inibir a metanogênese pelo choque de carga. Embora inicialmente tenha-se obtido um efeito positivo na velocidade de produção de hidrogênio pela seleção de bactérias produtoras de hidrogênio, no decorrer da operação os microrganismos selecionados desviaram os elétrons para a produção de compostos mais reduzidos. Além disso, o choque de carga levou ao aumento da concentração de ácidos não dissociados, o que causou a inibição da produção de hidrogênio. Assim, testou-se o tratamento térmico como outra estratégia pra inibir a metanogênese. Somente no segundo tratamento térmico conseguiu-se inibir completamente a atividade metanogênica. Porém, este tratamento, que visa à seleção de microrganismos com capacidade de esporulação, foi capaz de selecionar tanto as bactérias produtoras de hidrogênio como as bactérias homoacetogênicas, que consomem o hidrogênio para formação de acetato, reduzindo a capacidade de produção de hidrogênio no reator.

Reyes et al. (2012) avaliaram a influência do tamanho das biopartículas do inóculo, utilizando grânulos desagregados e grânulos intactos para inoculação do reator, da COV e do TDH sobre a produção de hidrogênio. Foram avaliadas as formas de inoculação: grânulos desagregados (R1 e R2) e grânulos intactos (R3 e R4), e diferentes estratégias de partida para aumento gradual da COV: pelo aumento da concentração afluente (R1 e R3), e pela redução do TDH (R2 e R4), permitindo a comparação de ambos os parâmetros combinados (retenção do lodo: R1 e R2 x R3 e R4) e estratégias de operação (R1 e R3 x R2 e R4). Nos reatores inoculados com lodo granular, a produção de gás iniciou-se nas primeiras 12 horas após a inoculação, enquanto que nos reatores inoculados com grânulos desagregados a produção de gás somente se iniciou após cerca de 40-70 horas de operação contínua. Segundo os autores, o aumento gradual da COV levou ao crescimento lento de microrganismos com um grânulo denso, e o baixo TDH pode levar ao arraste dos microrganismos com baixa capacidade de adesão. Concluiu-se que elevada COV e TDH constante

proporcionaram aumento da atividade hidrogenogênica da biomassa. O lodo granular apresentou atividade hidrogenogênica específica (AHE) 36% maior que a o lodo desagregado. Curiosamente, a biomassa dos reatores inoculados com lodo desagregado no 33º dia apresentou AHE 57-65% menor comparada ao inóculo, mas esses valores foram maiores no 82º dia. Já a AHE da biomassa dos reatores inoculados com lodo granular reduziu em 90-60% em relação ao inóculo. Também se verificou que um ou mais tratamentos térmicos não foram suficientes para eliminar completamente a biomassa metanogênica do lodo.

Naturalmente, há muitos outros trabalhos sobre produção biológica de hidrogênio em reatores acidogênicos que não foram abordados no presente texto. Mas, de forma geral, como pode-se observar pelos dados da Tabela 3.3, os estudos apresentam resultados bastante variáveis em termos de produção e rendimento de hidrogênio. Diferentes estratégias para melhorar as condições operacionais foram avaliadas, como tratamento térmico do lodo, recirculação do efluente e adição de agentes alcalinizantes. Mesmo naqueles em que houve uma tentativa de otimizar as condições operacionais, é difícil extrapolar para outros reatores. Por exemplo, Chang & Lin (2004, 2007), Zhao et al. (2008) e Ning et al. (2013) avaliaram a COV ótima para produção de hidrogênio a partir de sacarose aplicando-se reatores UASB com lodo granular na faixa de temperatura mesofílica. Os resultados foram bem distintos em relação à carga ótima e à produção volumétrica de hidrogênio, enquanto os valores de rendimento de hidrogênio foram mais próximos. As COV consideradas ótimas foram (em $gDQO.L^{-1}d^{-1}$) 16,8 (Ning et al., 2013), 21,2 (Zhao et al., 2008) e 60,0 (Chang & Lin, 2004, 2007), correspondendo a produções volumétricas (em $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$) de 120, 123 e 278-581, respectivamente, e rendimento de hidrogênio (em $molH_2.mol^{-1}hexose$) de 1,47, 1,62 e 1,0-1,45, respectivamente.

Tais variações entre os estudos explicam-se pela complexidade e até mesmo necessidade de estabelecimento de condições instáveis nos reatores acidogênicos para que se consiga recuperar hidrogênio, que depende essencialmente do consumo do substrato, das rotas de fermentação estabelecidas, da inibição da atividade homoacetogênica e hidrogenotrófica, e das condições de transferência do gás. Portanto, verifica-se a necessidade de estudos fundamentais para compreensão e gerenciamento dos parâmetros que governam a produção em longo prazo de hidrogênio. Por isso, na presente pesquisa optou-se por utilizar um meio à base de sacarose, que é um substrato presente em diversos tipos de efluentes e resíduos, para a avaliação da produção de H_2 sem adição de reguladores de pH e comparação do desempenho entre diferentes configurações de reatores, visando a sustentabilidade do processo.

3.3 Considerações finais

Constata-se que o tratamento anaeróbio em dois estágios pode oferecer vantagens sobre o tratamento anaeróbio de estágio único, especialmente quando aplicado ao tratamento de efluentes concentrados sujeitos à rápida acidificação. A separação das etapas permite um maior controle sobre o processo, contribui para a redução do acúmulo produtos intermediários e reduz a formação de CO_2 nos reatores metanogênicos, resultando em um biogás com maior teor de metano. Contudo, a aplicação em larga escala é escassa e encontra resistência, sobretudo devido aos maiores custos de implantação e dificuldades de projeto. Assim, a ampliação do emprego dos sistemas em dois estágios para o tratamento de efluentes somente é viável se as vantagens oferecidas se sobrepuserem a essas limitações.

A ocorrência da acidogênse em um reator anterior ao metanogênico tem sido avaliada por oferecer uma alternativa no sentido de se aproveitar produtos da fermentação, incluindo o gás hidrogênio. A produção biológica de hidrogênio oferece a possibilidade de recuperação de energia adicional em plantas de tratamento de efluentes, embora ainda não seja uma realidade em escala industrial. Isso se deve em parte às dificuldades de uma produção de hidrogênio sustentável, não somente no sentido ambiental e econômico (por geralmente requerer adição de insumos e energia), mas também no sentido de ser contínua e estável por longos períodos de tempo. Dessa forma, pesquisas com foco na sustentabilidade do processo se fazem necessárias.

Em relação à etapa metanogênica, diversas configurações de reatores que proporcionam o aumento da eficiência têm sido desenvolvidas, entre elas os reatores de leito fixo estruturado e os biorreatores com membrana anaeróbios. Os AnSFBR surgem como uma alternativa promissora frente aos reatores de leito fixo empacotado, expandido e fluidizado, e, portanto, os fatores que afetam o seu desempenho devem ser explorados para potencializar a aplicação dessa configuração. Já a tecnologia dos AnMBR encontra-se mais consolidada no mercado e detaca-se pela retenção completa de sólidos suspensos. Entretanto, o fenômeno da incrustração das membranas está intrinsicamente relacionado aos custos, ao reduzir a vida útil e demandar maiores áreas de membranas e aumentar os requerimentos de operação. Portanto, a investigação de estratégias para minimizar a incrustração das membranas é de grande relevância para a aplicação dessa tecnologia.

Assim, na presente pesquisa, foram avaliados potenciais de aplicação do tratamento em dois estágios, pelo estudo da produção de H_2 em longo prazo, sem a adição de alcalinizantes e em diferentes reatores, e pela avaliação do desempenho de reatores metanogênicos com configurações de AnSFBR e AnMBR, alimentados com efluentes bruto e biologicamente acidificado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em três etapas de operação, utilizando diferentes configurações de reatores, em condições mesofílicas e alimentados com efluente à base de sacarose, conforme descrito na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Condições operacionais no decorrer da presente tese

Etapa	S_0 aprox.	Sistema	Configuração	Forma de inoculação
1	5 gDQO.L^{-1}	Acidogênico	UASB	Lodo triturado[1]
	5 gDQO.L^{-1}	Acidogênico	UASB	Grânulos
	5 gDQO.L^{-1}	Acidogênico	Leito estruturado	Lodo triturado
2	1, 1,5 e 5 gDQO.L^{-1}	Dois estágios	UASB + Leito estruturado	Lodo triturado
	1, 1,5 e 5 gDQO.L^{-1}	Estágio único	Leito estruturado	Lodo triturado
3	5 gDQO.L^{-1}	Dois estágios	UASB + BRMan externo[2]	Autoinoculação[3] + grânulos
	4 e 5 gDQO.L^{-1}	Estágio único	BRMan externo[2]	Lodo batido + triturado

1. Lodo em que os grânulos foram completamente triturados em um liquidificador. 2. Os BRMan consistiam de reatores UASB acoplados a módulos externos de membranas tubulares. 3. A autoinoculação refere-se ao processo de crescimento do lodo por fermentação natural, no reator acidogênico.

Os dados obtidos com cada configuração foram avaliados, considerando aspectos quantitativos e qualitativos relacionados à eficiência de produção de bioenergia, de remoção de poluentes e à estabilidade operacional.

4.1 Avaliação da produção de hidrogênio em reatores acidogênicos

4.1.1 Configurações dos reatores acidogênicos e inóculo

Foram avaliadas duas configurações de reatores acidogênicos – UASB e leito fixo estruturado – e três formas de inoculação e retenção da biomassa – grânulos, flocos e biofilme. Todos os reatores eram cilíndricos, de fluxo ascendente, com volume útil aproximado de 2,2 L. As dimensões eram idênticas, conforme apresentadas na Tabela 4.2 e na Figura 4.1.

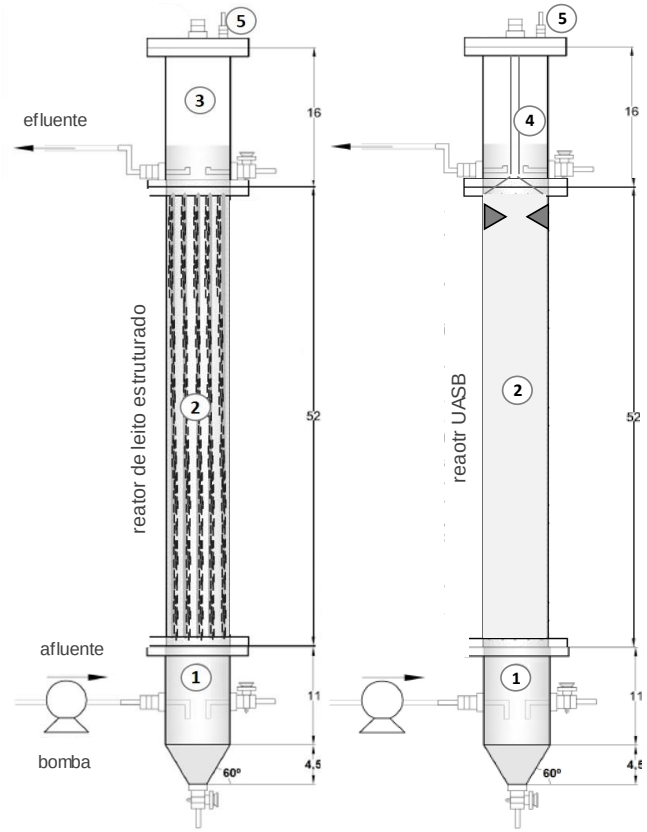
A configuração de reator de leito estruturado (Picanço et al., 2001) é uma alternativa aos reatores de leito empacotado (desordenado) ao prevenir a formação de caminhos preferenciais e acúmulo de sólidos. Em relação ao material suporte, Silva et al. (2006) verificaram que o polietileno favoreceu a colonização por bactérias hidrolíticas e fermentativas. Fernandes et al., 2013; Ferraz Júnior et al., 2015 indicaram a capacidade do polietileno de servir como material de adesão para bactérias produtoras de H_2, utilizando reatores anaeróbios de leito empacotado (desordenado)

preenchidos com aparas de polietileno de baixa densidade (PEBD). Baseando-se nesses estudos prévios, no reator acidogênico de leito fixo estruturado foi utilizado cilindros de polietileno como material suporte. Para tanto, hastes de metal foram dispostas de forma ordenada, e cilindros de polietileno foram inseridos alternadamente, conforme ilustrado na Figura 4.2.

Tabela 4.2 - Dimensões dos reatores acidogênicos

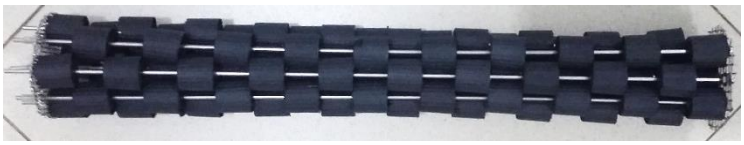
Parâmetros	UASB	Leito estruturado
Diâmetro interno (cm)	6,3	6,3
Área interna (cm²)	31,1	31,1
Altura total (cm)	82,2	82,2
Volume total (L)	2,5	2,5
Altura útil (cm)	76,7	76,7
Volume útil reacional (L)	2,2	2,2
Volume contendo cilindros de polietileno (L)	-	1,7
Porosidade do leito (%)	-	82

Figura 4.1 - Desenho esquemático dos reatores acidogênicos



1. Câmara de distribuição. 2. Zona reacional. 3. *Headspace*. 4. Separador trifásico. 5. Saída do biogás.
Fonte: própria autora

Figura 4.2 - Material suporte do reator acidogênico de leito fixo estruturado



A fonte do inóculo foi lodo granular proveniente de um reator UASB de estágio único que trata efluente de um abatedouro de aves, localizado na cidade de Pereiras, SP. Exceto para a inoculação do reator UASB granular (UG), o lodo foi batido em um liquidificador até a completa desintegração dos grânulos em partículas menores que 1 mm. A concentração inicial de lodo foi a mesma para todos os reatores, equivalente a 15 $gSTV.L^{-1}$. Nos primeiros três dias após a inoculação, o lodo, juntamente com o substrato, foi continuamente recirculado nos reatores, na mesma vazão de operação, mantendo-se um circuito fechado, a fim de contribuir para a adaptação da biomassa e, no caso do reator de leito fixo estruturado, também para a adesão dos microrganismos ao material suporte. Ressalta-se que nenhum tipo de pré-tratamento foi aplicado. Ou seja, os reatores foram inoculados com o lodo *in natura*, com elevada diversidade microbiana.

4.1.2 Ensaios hidrodinâmicos

Foram conduzidos ensaios para a verificação das condições hidrodinâmicas conforme o procedimento de estímulo-resposta descrito por Levenspiel (1999), com aplicação contínua do traçador. Para tanto, os reatores foram inicialmente preenchidos com água de torneira e alimentados com solução de NaCl 10 g/L. A água de torneira e a solução de NaCl foram previamente calibradas. A concentração do traçador salino na saída dos reatores foi monitorada, em intervalos regulares, por um período equivalente a três vezes o TDH teórico. As medições foram feitas utilizando sondas de condutividade (CON-BTA Vernier), acopladas a uma interface USB (Go!Link Vernier), conectada a um computador. A aquisição dos dados foi realizada por meio do software Logger Lite (Vernier). Os TDH avaliados foram de aproximadamente 1,5, 3,0, 6,0 e 9,0 horas.

Para o cáculo dos parâmetros hidrodinâmicos, os dados obtidos no experimento foram analisados em planilhas do Excel. Inicialmente o perfil temporal da concentração de NaCl foi normalizado, obtendo se a função F(t) (Equação 4.1):

$$F(t) = \frac{C(t)}{C*} \qquad (4.1)$$

Em que:

C(t) = concentração de NaCl no tempo t.

C* = concentração máxima de NaCl medida no efluente.

A partir da função F(t) obteve-se a curva de distribuição do tempo de residência E(t) em função do tempo (Equação 4.2):

$$E(t) = \frac{dF}{dt} \tag{4.2}$$

Com os valores da função E(t) obteve-se o TDH médio (θ) (Equação 4.3):

$$TDH\ médio\ (\theta) = \frac{\int_{t0}^{t} tE(t)dt}{\int_{t0}^{t} E(t)dt} \tag{4.3}$$

Para a análise dos parâmetros hidráulicos com base nos modelos teóricos de dispersão e tanques em série (N-CSTR) calculou-se inicialmente a variância para cada ensaio (σ^2) (Equação 4.4) e a variância adimensional ($\sigma^2\theta$) (Equação 4.5):

$$\sigma^2 = \frac{\int_{t0}^{t} (t-\theta)^2 E(t)dt}{\int_{t0}^{t} tE(t)dt} \tag{4.4}$$

$$\sigma^2\theta = \frac{\sigma^2}{\theta^2} \tag{4.5}$$

Por fim, então obteve-se o número de dispersão adimensional (D/uL) (Equação 4.6) e o número de reatores de mistura perfeita de igual volume em série (N) (Equação 4.7):

$$D/uL = \frac{\sigma^2\theta}{2} \tag{4.6}$$

$$N = \frac{1}{\sigma^2\theta} \tag{4.7}$$

Quando o número de dispersão tende a zero, isso significa que a dispersão é irrelevante e o reator tem fuxo pistonado, enquanto que se D/uL > 0,2, o fluxo de mistura é mais apropriado para caracterizar a sua hidrodinâmica. O inverso ocorre com o parâmetro N, que simula o comportamento do reator pelo número (N) de reatores de mistura ideal em série. Assim, geralmente considera-se que se o reator avaliado apresentar N > 30 a hidrodinâmica é mais aproximada ao fluxo pistonado.

4.1.3 Substrato

O substrato era constituído de sacarose (açúcar demerara orgânico Native®), como única fonte de carbono, acrescido de uma solução de macro e micronutrientes (Jeison, 2007), nas seguintes concentrações ($mg.L^{-1}$): sacarose (4450), NH_4Cl (170,0), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (8,0), KH_2PO_4 (37,0), $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ (9,0), $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ (2,0), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (2,0), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,5), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,03), $ZnCl_2$ (0,05), H_3BO_3 (0,05), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0,09), $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ (0,10), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,05) e HCl 36% (1 $\mu L.L^{-1}$). Foi utilizado açúcar comercial em razão dos menores custos em relação à sacarose P.A. Utilizou-se água de torneira para a preparação da alimentação e nenhum agente de tamponamento foi adicionado. O afluente apresentava valor inicial de pH de 6,5, em média, e era mantido a 4°C em câmara fria.

4.1.4 Condições operacionais

Na primeira etapa experimental, o TDH foi de aproximadamente 3,3 h, correspondendo a uma vazão de 16,3 $L.d^{-1}$ e uma COV de 33,1 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$. A carga orgânica específica inicial foi de 2,6 $gDQO.g^{-1}STV.d^{-1}$, mas ressalta-se que a concentração de lodo dentro do reator, durante a operação, não foi analisada e, portanto, a carga orgânica específica alterou-se ao longo do tempo. As velocidades ascensionais correspondentes eram de cerca 0,22 $m.h^{-1}$ e 0,26 $m.h^{-1}$ nos reatores UASB e de leito fixo estruturado, respectivamente. Após um período de operação contínua de cerca de 150 dias, os reatores foram desativados e completamente esvaziados.

Na segunda etapa experimental, em que se comparou sistemas de dois estágios (acidogênico-metanogênico) e estágio único, um reator UASB inoculado com lodo batido foi aplicado para a fase acidogênica, prosseguindo-se a investigação da produção de H_2 em reatores acidogênicos contínuos e em longo prazo. Para tanto, uma nova inoculação foi realizada, utilizando-se os mesmos procedimentos adotados na primeira etapa. Nos primeiros 80 dias de operação, o reator acidogênico operou com TDH variável, que se situou em uma faixa entre 2,8 e 6,1 h. Devido aos resultados observados, na fase seguinte, que durou cerca de 150 dias, o reator operou com TDH médio de 4,6 h, correspondendo a uma vazão de 11,7 $L.d^{-1}$ e uma COV de 25,0 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$.

A temperatura foi mantida em 30 ± 2 °C, dentro de uma câmara com controle de temperatura.

A denominação dada aos reatores, conforme suas respectivas configurações e condições operacionais é apresentada na Tabela 4.3. A sigla FB do reator de leito estruturado vem da tradução em inglês – *structured fixed-bed reactor* – e optou-se por utilizá-la para que fosse a mesma utilizada nas publicações internacionais.

Tabela 4.3 - Denominação dos reatores acidogênicos

Reator	Configuração	Etapa	TDH (h)	COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$)
FB	Leito estruturado	1	3,3	33,1
UG	UASB granular	1	3,3	33,1
UF-1	UASB floculento	1	3,3	33,1
UF-2	UASB floculento	2	4,6	25,0

4.1.5 Análises para monitoramento

A vazão de biogás foi mensurada por meio de medidor on-line de gás Milligas counter (Ritter). A composição em termos do percentual de H_2, CH_4 e CO_2 foi analisada por cromatografia em fase gasosa (Shimadzu GC-2010), com as seguintes especificações: detector de condutividade térmica, fluxo de 12 $mL.min^{-1}$, argônio como gás de arraste, coluna capilar Carboxen 1010, temperatura inicial do detector e do injetor de 200 e 230 °C, respectivamente, temperatura do forno: 130-135 ºC, 300 µL de volume de amostra.

A degradação da sacarose e o grau de acidificação foram monitorados pelas análises de glicose, frutose e ácidos orgânicos (láctico, acético, fórmico, butírico/isobutírico, propiônico, valérico/isovalérico) do afluente e do efluente, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado foi Sistema Shimadzu com detectores de UV/DAD (210 nm) e Índice de Refração (em série), coluna Aminex HPX-87H, solução de H_2SO_4 0,005M como eluente, fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$, temperatura do forno de 43°C, e injeção automática de 100 µL. As amostras foram preparadas filtrando-se em membrana de 0,22 µm, e adicionando-se 40 µL de solução de H_2SO_4 1 N (2 M) para cada 1 mL de amostra (Penteado et al., 2013).

O etanol foi determinado por cromatografia em fase gasosa, pelo equipamento Shimadzu GC-2010, com detector de ionização de chama (FID), fluxo de 1,5 $mL.min^{-1}$, gás de arraste hidrogênio, temperatura do injetor e do detector de 250°C e 280°C, respectivamente. Devido a problemas técnicos, o etanol foi analisado somente nas amostras do reator UF-2.

Adicionalmente, foram analisados no afluente e no efluente o pH (pHmetro digital Hatch) e a DQO. No efluente também se analisou a série sólidos suspensos (SST, SSV e SSF). As análises foram conduzidas conforme o *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2005). No efluente, para a medição da DQO e sólidos suspensos, as amostras foram filtradas em papel de filtro com poros de 1,2 µm, em que o material filtrado foi analisado quanto à DQO solúvel e o material retido no filtro foi analisado quanto à concentração de sólidos suspensos.

As análises estatísticas foram feitas usando o software *Statistica* 13. Para a escolha dos testes estatísticos, primeiramente aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para checar se os dados apresentavam distribuição normal ou não. Adotou-se o nível de confiança de 95% para todos os testes.

4.1.6 Observações microbiológicas

A granulometria do inóculo e do lodo do reator UG foi determinada. Para tanto, os grânulos foram distribuídos em placas de Petri e foram feitas imagens de fotografia, que foram então analisadas quando à distribuição do tamanho das biopartículas, utilizando-se o *software* Image-Pro Plus 4.5.

O aspecto morfológico do inóculo e do lodo dos reatores ao final de cada etapa experimental foi analisado por microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 3%, centrifugadas, desidratadas em soluções de etanol sucessivamente mais concentradas (30, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%), secas a 30 °C por 24 horas, e então cobertas com banho de platina. No caso do inóculo e reatores FB, UG e UF-1, as especificações do microscópio eletrônico utilizado eram: lente Zeiss Gemini, detector SE2, ampliação 10.000x, EHT 2KV, WD 8,1 mm. Já o lodo do reator UF-2 foi observado em microscópio de modelo FE-SEM, FEI Inspect F50, FEI Inc.

4.1.7 Análises de Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

A biomassa foi coletada de diferentes alturas dos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 ao final da operação. As células foram separadas por centrifugação (6000 g, 10 min, 4 °C). O DNA genômico foi extraído e purificado usando o protocolo de Griffiths et al. (2000). A quantidade e a pureza do DNA foram medidas por espectrofotometria (Infinite NanoQuant M200, Tecan). O DNA extraído foi enviado para LBE (Laboratoire de Biotechnologie de L'Environnement), INRA, localizado em Narbonne, França. A região do gene V4-5 do gene 16S rDNA foi amplificada com o *forward primer* CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTA e o *reverse primer* GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCGYCAATTCMTTTRAGT, mais os respectivos *linkers*, ao longo de 30 ciclos de amplificação, a uma temperatura de anelamento de 65°C. Em um segundo reator de PCR de 12 ciclos, foi adicionada uma sequência indexada. Os produtos de PCR resultantes foram purificados e carregados no cartucho Illumina MiSeq para sequenciamento pareado de 375 e 380 pares de bases (pb). As análises de sequenciamento foram conduzidas no centro de sequenciamento GeT PlaGe, em Toulouse, França (get.genotoul.fr). As sequências diretas e reversas foram retidas após a montagem e verificação da qualidade usando

uma versão ligeiramente modificada do Procedimento de Operação Padrão para os dados do MiSeq, de Kozich et al., 2013, na versão Mothur 1.35.0 (Schloss et al., 2009). Para classificação taxonômica, utilizou-se o banco de dados SILVA SSU Ref NR 99 versão 128 (Pruesse et al., 2012). As sequências encontradas foram depositadas no GenBank (número de acesso RM612196-RM613645).

Para a construção de uma árvore filogenética com as sequências mais abundantes, estas foram comparadas com aquelas inseridas no banco de dados GenBank, usando o programa BLAST (Altschul et al., 1990). As análises filogenéticas das sequências foram feitas no software MEGA7 - *Molecular Evolutionary Genetic* (Kumar et al., 2016), utilizando o modelo de Kimura para distâncias evolucionárias (Kimura, 1980), e o método de Neighbor-Joining com valores de *bootstrap* calculados a partir de 500 corridas.

4.1.8 Análises de metagenômica *Shotgun*

Ao final da Etapa 2 de operação, o lodo do reator UF-2 foi também analisado por metagenômica *Shotgun*, para além da identificação microbiana, melhor conhecimento do potencial genômico da biomassa, e indicação das possíveis rotas metabólicas de consumo de carboidratos e de produção de H_2. O DNA foi extraído seguindo a mesma metodologia apresentada no item 4.1.7, e enviado para o MR DNA (Molecular Research LP), Shallowater, TX, EUA. A biblioteca foi preparada usando o kit de preparação de amostras Nextera DNA (Illumina) seguindo o guia do usuário do fabricante. A concentração de DNA foi avaliada utilizando o Kit de Ensaio QsdNA HS da Qubit (Life Technologies). 50 ng de DNA foi usado para preparar a biblioteca. A amostra sofreu a fragmentação simultânea e adição de sequências adaptadoras. Estes adaptadores são utilizados durante uma PCR de ciclo limitado (5 ciclos), na qual foram adicionados índices únicos à amostra. Após a preparação da biblioteca, a concentração de DNA final da biblioteca foi medida usando o kit de ensaio QsDNA HS da Qubit (Life Technologies) e o tamanho médio da biblioteca em números de pb foi determinado usando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). 10 pM da biblioteca foi agrupada utilizando o cBot (Illumina) e a extremidade emparelhada sequenciada durante 500 ciclos utilizando o sistema HiSeq 2500 (Illumina). As análises foram então processadas no programa Kraken v. 1.0: http://ccb.jhu.edu/software/kraken/ (Wood & Salzberg, 2014) e no sistema MG-RAST v. 4.0.3: http://www.mg-rast.org/ (Meyer et al., 2008) Foram gerados gráficos Krona (Ondov et al., 2011) e os genomas das bactérias predominantes e enzimas foram consultados na base de dados KEGG (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa et al., 2016; Kanehisa et al., 2017).

4.2 Reatores metanogênicos de leito estruturado de um e de dois estágios

4.2.1 Aparato experimental, inóculo e testes hidrodinâmicos

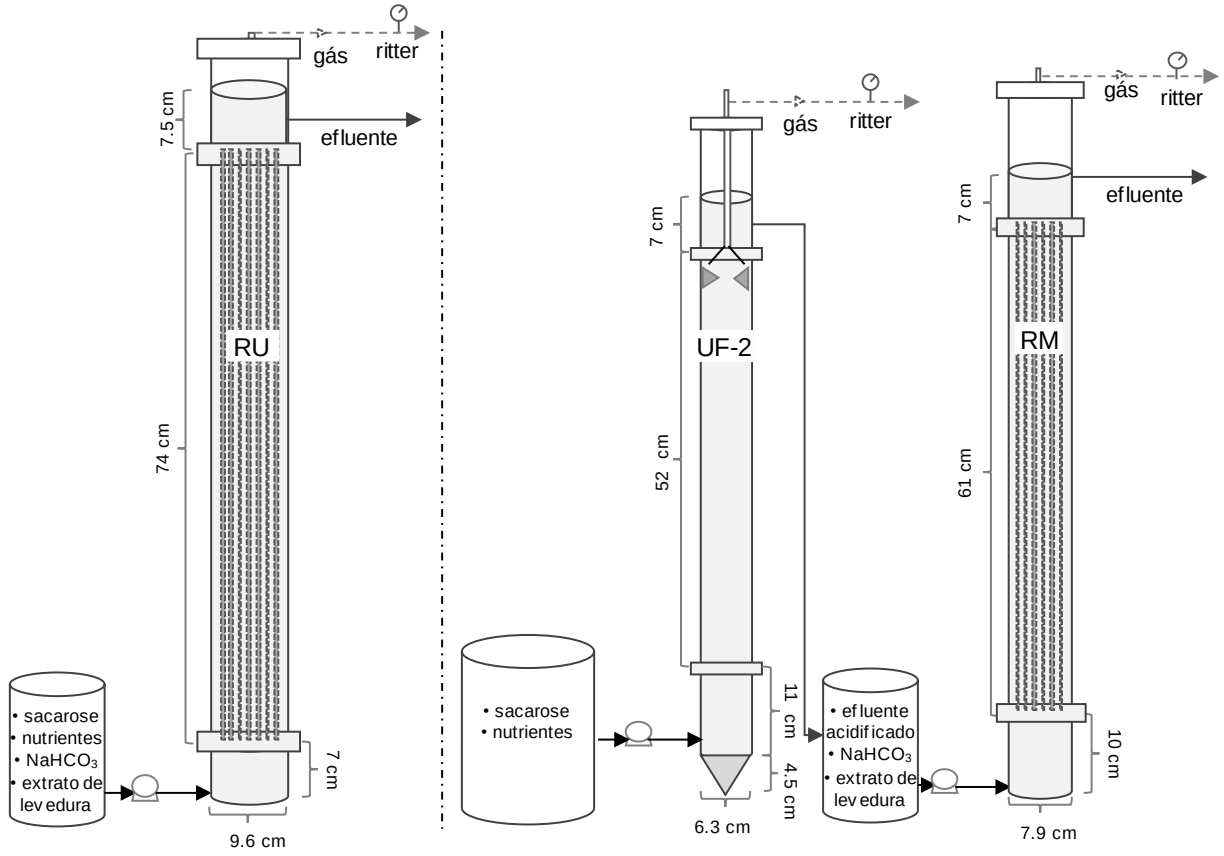
Conforme detalhado no item 4.1.4, um reator UASB inoculado com lodo triturado, denominado UF-2, foi utilizado na segunda etapa de operação para a acidogênese. A configuração do sistema de dois estágios consistiu então do reator UF-2 seguido de um reator metanogênico (RM) de leito fixo estruturado, que foi alimentado com o efluente acidificado. O sistema de estágio único consistia apenas de um reator de leito fixo estruturado (RU). O RM e o RU eram cilíndricos, de acrílico, com diâmetro interno de 7,9 e 9,5 cm, respectivamente, e volume útil de 3,8 e 6,4 L, respectivamente. As dimensões dos reatores são apresentadas na Tabela 4.4. A Figura 4.3 apresenta o desenho esquemático dos reatores.

Tabela 4.4 - Dimensões dos reatores dos sistemas de um e de dois estágios

Parâmetros/ Reator	UF-2	RM	UF-2 + RM	RU
Diâmetro interno (cm)	6,3	7,9	-	9,5
Área interna (cm²)	31,1	49,0	-	71,6
Altura total (cm)	82,2	90,0	-	94,0
Volume total (L)	2,5	4,4	6,9	6,8
Altura útil (cm)	76,7	78,5		89,0
Volume útil reacional* (L)	2,2	3,8	6,1	6,4
Volume contendo suporte (L)	-	3,4	3,4	5,4
Porosidade do leito (%)	-	90	90	90
Vol. útil, exceto material suporte (L)	-	3,6	5,8	5,9

No caso, o material suporte escolhido para o leito do RM e do RU foi espuma de poliuretano. Essa escolha se embasou no estudo de Picanço et al.. (2001), em que se verificou, em reatores de leito fixo estruturado, que a espuma de poliuretano e a cerâmica especial apresentaram melhor capacidade de adesão da biomassa em relação aos materiais suportes de PVC e brita, devido à maior área superficial. Comparada ao polietileno de baixa densidade, Silva et al. (2006) observaram melhor capacidade de colonização de arqueias em espuma de poliuretanto. Assim, para a montagem do RM e do RU, tiras de espumas de poliuretano foram colocadas verticalmente no leito, conforme apresentado na Figura 4.4.

Figura 4.3 - Desenho esquemático dos sistemas de um e dois estágios



RU: reator de estágio único, UF-2: reator acidogênico, RM: reator metanogênico
Fonte: própria autora

Figura 4.4 - Material suporte dos reatores metanogênico e único de leito fixo estruturado

A fonte de inóculo do RM e do RU foi lodo granular, triturado em um liquidificador até a completa destruição dos grânulos, proveniente de um reator UASB de estágio único que trata efluente de um abatedouro de aves localizado na cidade de Tietê, SP. A concentração inicial foi equivalente a 15 gSTV.L^{-1}. Nos primeiros dias após a inoculação, o lodo juntamente com o afluente, colocado até o preenchimento do volume útil dos reatores, foram recirculados em sistema fechado para o favorecimento da adesão da biomassa ao material suporte.

Para a determinação do regime de escoamento e determinação do TDH real em relação ao TDH teórico, foram conduzidos ensaios para a verificação das condições hidrodinâmicas conforme a metodologia descrita no item 4.1.2. O TDH teórico avaliado foi de aproximadamente 9,0 h para o RM e para o RU.

4.2.2 Substrato e condições operacionais

O afluente do RU era semelhante ao afluente do reator UF-2, ou seja, à base de sacarose e nutrientes inorgânicos, conforme descrito no item 4.1.3, porém, acrescido de bicarbonato de sódio e de extrato de levedura e, nos períodos de adaptação, com valores de DQO reduzidos. Já o RM foi alimentado com o efluente acidificado proveniente do reator UF-2, acrescentado de bicarbonato de sódio e extrato de levedura.

Inicialmente, para a adaptação da biomassa, o RU foi alimentado com efluente na concentração aproximada de 1000 mgDQO.L^{-1} e o afluente do RM foi diluído 5,0 vezes (adaptação 1). Após 18 dias, a DQO do afluente do RU foi aumentada para 1500 mg.L^{-1} e o afluente do RM passou a ser diluído 3,3 vezes (adaptação 2). Após 38 dias de adaptação, o RM passou a ser alimentado com o efluente acidificado sem diluir e a concentração do afluente do RU foi aumentada para aprox. 5000 mgDQO.L^{-1}. O afluente de todos os reatores era mantindo em câmara fria, a 4°C.

Para a DQO em torno de 5000 mg.L^{-1}, no afluente do RM e do RU, a concentração de bicarbonato de sódio era de 5000 mg.L^{-1} e a de extrato de levedura de 200 mg.L^{-1}. A partir do 74º dia de operação, a concentração de bicarbonato de sódio foi reduzida para 4160 mg.L^{-1}. Já nos períodos de adaptação 1 e 2, as concentrações de nutrientes, extrato de levedura e bicarbonato de sódio foram diluídas na mesma proporção que o substrato orgânico, equivalente a 5,0 e 3,3 vezes, correspondendo a concentrações de 1000 e 1500 mg.L^{-1} de bicarbonato de sódio, e de 40 e 60 mg.L^{-1} de extrato de levedura, respectivamente.

No período da adaptação 1, o RM e o RU operaram com vazões aproximadas de 12 mL.min^{-1} (17,3 L.d^{-1}). Para manter a carga orgânica, no período de adaptação 2, reduziu-se as vazões para 8 mL.min^{-1} (11,5 L.d^{-1}). No início da operação, com o aumento da concentração afluente de DQO, a vazão foi reduzida para cerca de 2,3 mL.min^{-1} (3,3 L.d^{-1}), com o objetivo de se manter a COV aplicada durante a adaptação. Contudo, devido aos sinais de sobrecarga no RM e no RU, a vazão foi reduzida no 58º dia de operação. Como o volume útil reacional do sistema de dois estágios (UF-2+RM) e de um estágio (RU) eram bastante próximos (Tabela 4.4) e o reator UF-2 estava recebendo uma vazão muito maior (aprox. 11,7 L.d^{-1}, item 4.1.4), os TDH do sistema de dois estágios estavam até então inferiores, resultando em COV superiores às do RU. Para manter as COV equivalentes em ambos os sistemas, a partir do 58º dia, foram colocadas bombas de alimentação separadas para o RM e o RU, de forma a possibilitar que fossem alimentados com vazões distintas. Assim, até o 130º dia de operação, os sistemas de dois e de um estágio receberam cargas orgânicas equivalentes e crescentes (aumentos graduais de cerca de 20%). A partir de então, o sistema de dois estágios passou a receber cargas crescentes e superiores às do RU, a qual se

manteve a mesma até o 156º dia de operação. Na última etapa, que se estendeu do 157º ao 178º dia de operação, as cargas do RM e do RU foram aumentadas em 50%. Naturalmente, houve variações nas concentrações do afluente e de vazão em relação aos valores pretendidos. Na Tabela 4.5, são descritos os valores médios de concentração afluente de DQO, TDH e COV registrados ao longo da operação.

Tabela 4.5 - Parâmetros operacionais dos sistemas de dois estágios e de um estágio

Reatores acidogênico e metanogênico separadamente							
Reatores			**UF-2**			**RM**	
Etapa	Tempo (dias)	S_0 ($mgDQO.L^{-1}$)	TDH (h)	COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$)	S_0 ($mgDQO.L^{-1}$)	TDH (h)	COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$)
Adap. 1	0-17	4525	4,16	26,12	706	5,36	3,16
Adap. 2	18-38	4677	7,71	14,55	1220	8,71	3,36
1	39-58	4597	4,76	23,19	3913	29,84	3,15
2	59-93	4777	4,69	24,46	3868	48,51	1,91
3	94-101	4588	4,35	25,31	4857	36,04	3,23
4	102-129	4955	4,61	25,77	4741	29,38	3,87
5	130-136	4809	4,47	25,84	5050	24,49	4,95
6	137-156	4743	4,42	25,77	4763	20,43	5,60
7	157-178	4825	4,45	26,05	4443	13,65	7,81
Sistemas de dois estágios e de um estágio							
Sistemas			**UF-2 + RM**			**RU**	
Etapa	Tempo (dias)	S_0 ($mgDQO.L^{-1}$)	TDH (h)	COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$)	S_0 ($mgDQO.L^{-1}$)	TDH (h)	COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$)
Adap. 1	0-17	-*	9,52	3,51	894	8,69	2,47
Adap. 2	18-38	-*	16,42	3,06	1522	14,43	2,53
1	39-58	4597	34,60	3,19	4594	47,61	2,32
2	59-93	4777	53,20	2,16	4730	56,47	2,01
3	94-101	4588	40,39	2,73	4948	40,77	2,91
4	102-129	4955	34,00	3,50	4918	34,01	3,47
5	130-136	4809	28,95	3,99	5124	34,01	3,62
6	137-156	4743	24,84	4,58	4836	34,01	3,41
7	157-178	4825	18,09	6,40	4931	22,77	5,20

* Para o período de adaptação, a concentração inicial de DQO do sistema de dois estágios não é apresentada pelo fato de o efluente do reator UF-2 ter sido diluído para a alimentação do RM.

4.2.3 Análises para monitoramento

Foram realizadas análises da composição e produção volumétrica do biogás, SSV, pH, sacarose, glicose, frutose, ácidos orgânicos (láctico, acético, fórmico, butírico/isobutírico, propiônico, valérico/isovalérico), DQO total e/ou DQO filtrada em membrana de 1,2 μm do afluente e do efluente dos reatores, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 4.1.5. No efluente do RM e do RU foi também analisada a razão alcalinidade intermediária: alcalinidade parcial (AI/AP), conforme o método de Ripley et al. (1986), e as concentrações de alcalinidade total (AT),

alcalinidade a bicarbonato (AB), alcalinidade a ácidos voláteis totais (AAV) e ácidos voléteis totais (AVT), conforme o método de Kapp (Kapp, 1984 citado por Buchauer, 1998). O método de Kapp foi escolhido pela sua robustez e praticidade frente a outros métodos titrimétricos para a finalidade de (Mota et al., 2015). O procedimento é feito titulando-se as amostras do pH original até os valores de pH 5,0, 4,3 e 4,0, com uma solução de normalidade conhecida de H_2SO_4. A interpretação é feita conforme as equações 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11:

$$AT\ (mgCaCO_3/L) = \frac{Vol.\ H_2SO_{4_{pH3}}\ x\ N\ H_2SO_4\ x\ 50000}{Vol.amostra} \quad (4.8)$$

$$AVT\ (mgHAc/L) = \frac{Vol.H_2SO_{4_{pH5\ a\ 4}}\ x\ N\ H_2SO_4\ x\ 131340}{Vol.amostra} -\ (0{,}0616\ x\ AT) -\ 10{,}9 \quad (4.9)$$

$$AAV\ (mgCaCO_3/L) = 0{,}5\ x\ AGV \quad (4.10)$$

$$AB(mgCaCO_3/L) = AT - AAV \quad (4.11)$$

Em que:
AT = alcalinidade total
AVT = concentração de ácidos voláteis totais
AAV = alcalinidade a ácidos voláteis
AB = alcalinidade a bicarbonato

4.2.4 Análises de Sequenciamento NGS

Ao final da operação, amostras de lodo da parte inferior e média dos reatores foram retiradas para extração do DNA genômico e sequenciamento da região V4-5 do gene 16S rDNA, conforme metodologia descrita no item 4.1.7.

4.3 Biorreatores com membrana anaeróbios

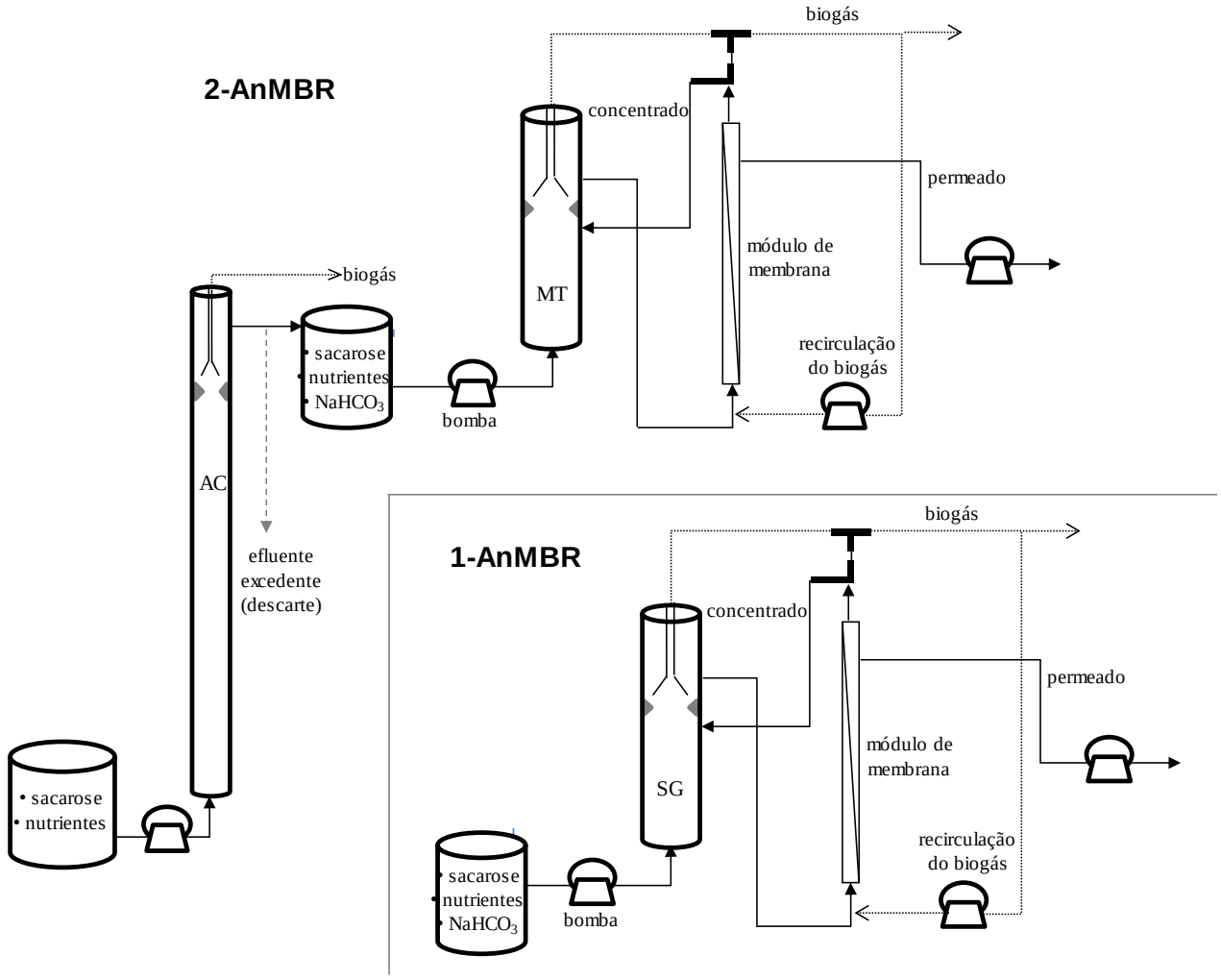
Esta etapa da pesquisa foi realizada como parte do Estágio de Pesquisa no Exterior, no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LBA), Escola de Engenharia Bioquímica (EIB), Pontifícia Universidade Católica de Valparaíso (PUCV), cidade de Valparaíso, Chile, com a supervisão do professor David Jeison.

4.3.1 Aparato experimental

Foram avaliados dois biorreatores com membrana anaeróbios (AnMBR: *anaerobic membrane bioreactor*), sendo um deles de um estágio, denominado 1-AnMBR, e o outro de dois estágios, denominado 2-AnMBR. Os AnMBR consistiam de reatores UASB idênticos, feitos de acrílico,

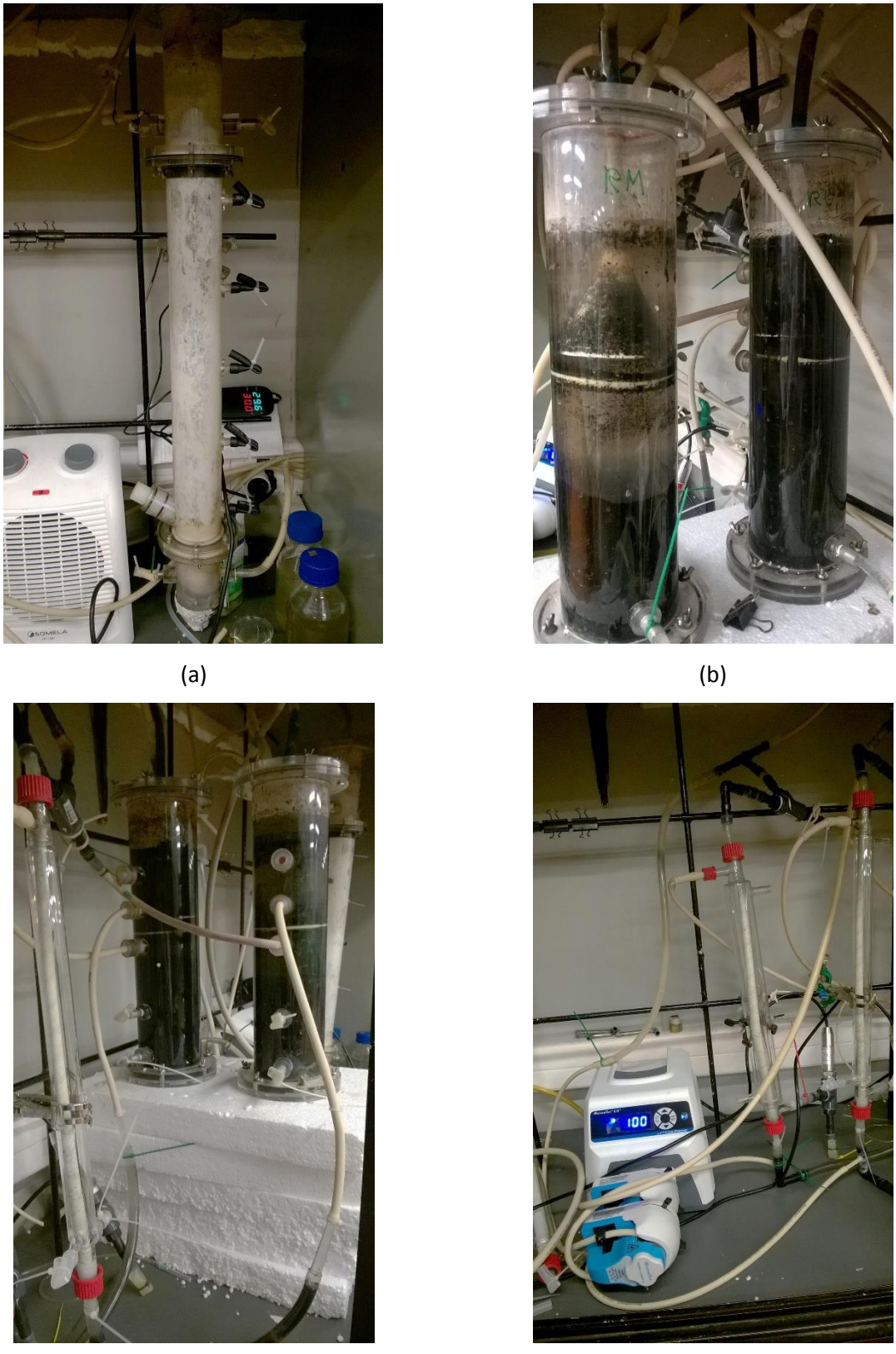
com 9,4 cm de diâmetro interno e volume útil de 2,1 L, acoplados externamente a módulos de membranas tubulares de ultrafiltração. No sistema 2-AnMBR, o AnMBR era precedido de um reator acidogênico, tipo UASB, com as mesmas dimensões descritas no item 4.1.1. Individualmente, o reator acidogênico, o reator metanogênico alimentado com efluente acidificado, e o reator de estágio único foram denominados reatores AC (*acidogenic*), MT (*methanogenic*) e SG (*single-stage*), respectivamente. A configuração dos sistemas é ilustrada na Figura 4.5 e fotos dos biorreatores são mostradas na Figura 4.6.

Figura 4.5 - Desenho esquemático do 1-AnMBR e do 2-AnMBR



AC: reator acidogênico, MT: reator metanogênico, SG: reator de estágio único
Fonte: própria autora

Figura 4.6 - Fotos dos biorreatores e dos módulos de membranas



(a) (b)

(c) (d)

Reator acidogênico precedente ao 2-AnMBR (a), 2-AnMBR (esquerda) e 1-AnMBR (direita) (b), AnMBR conjugados com os módulos de membranas (c), módulos de membranas e bomba de recirculação do biogás (d)
Fonte: própria autora

As membranas foram adquiridas da X-Flow Pentair (Holanda), sendo do tipo Helix tubular UF (Figura 4.7). Consistem em membranas de ultrafiltração tubulares, hidrofílicas, material de fluoreto de polivinilideno (PVDF) fundido em suporte de poliéster/ poliolefina. Tamanho médio dos poros de 0,03 μm e diâmetro hidráulico de 8 mm. A área de filtração e o comprimento das membranas correspondiam, respectivamente, a 0,011058 m² e 44,0 cm no 2-AnMBR e de 0,00917 m² e 36,5 cm no 1-AnMBR. A maior área de filtração no 2-AnMBR foi utilizada com o intuito de se aplicar maiores vazões, mantendo-se valores de fluxo transmembrana equivalentes aos aplicados no 1-AnMBR.

Figura 4.7 - Vista em detalhes das membranas

Fonte: xflow.pentair.com

As membranas foram montadas verticalmente em módulos de tubos de vidro (Figura 4.4c,d). O sentido do fluxo do líquido era de dentro para fora, sendo impulsionado por *airlift*. O próprio biogás produzido nos reatores era bombeado para o interior dos módulos de membranas em um sistema de recirculação. Para isso, a mangueira de coleta do biogás no separador trifásico era bifurcada, em que parte do biogás era recirculado e o excedente era encaminhado para o aparato de medição (ritter) e/ou liberado (em um recipiente com água para impedir uma possível troca de gases com o ambiente). Uma saída adicional de gás foi colocada na parte superior dos AnMBR, adjacente à saída do separador trifásico, para evitar a pressurização interna dos reatores nos momentos de alta produção de biogás, e esta saída era conectada à outra mangueira de coleta do biogás. Para cada AnMBR, o mesmo valor da vazão de alimentação era o da vazão de permeado, o que se conseguiu utilizando uma bomba peristáltica (Cole-Parmer Masterflex L/S), equipada com um cabeçote para duas mangueiras, sendo uma para alimentação e outra para o permeado. O controle do ciclo de filtração e o registro dos dados de pressão transmembrana (TMP) foram feitos utilizando-se o software LabVIEW Measurement (National Instruments).

4.3.2 Inóculo, substrato e condições operacionais

A sacarose foi utilizada como única fonte de carbono, preparando-se uma solução conforme descrito no item 4.1.3, mas preparada com açúcar cristal branco. A DQO afluente almejada para a alimentação do reator AC era de 5000 $mg.L^{-1}$ e a alimentação do 2-AnMBR era o efluente do reator AC sem diluição. Durante os primeiros 44 dias de operação dos AnMBR, a DQO afluente do 1-AnMBR também era de 5000 $mg.L^{-1}$. Entretanto, devido a uma acumulação de ácidos orgânicos, em que as concentrações de AVT passaram de 1000 $mgHAc.L^{-1}$, a DQO afluente do 1-AnMBR foi reduzida para aproximadamente 4000 $mg.L^{-1}$. Na alimentação dos AnMBR, bicarbonato de sódio foi adicionado como alcalinizante, em uma concentração de 3320 $mg.L^{-1}$. Entretanto, após o 44º dia de operação, aumentou-se a concentração de $NaHCO_3$ no afluente do 1-AnMBR para 4160 $mg.L^{-1}$, para favorecer a recuperação de valores de pH neutros neste reator, que se encontrava acidificado. O afluente dos reatores era mantido em geladeira, a 4°C.

A princípio, o reator acidogênico foi inoculado com lodo granular, batido em liquidificador, proveniente de uma indústria de Tabaco, localizada em Valparaíso, Chile, em concentração inicial de 15 $gSTV.L^{-1}$. Porém, devido à lentidão no processo de partida, em que altas concentrações de carboidratos foram registradas no efluente do reator AC, após aproximadamente 60 dias, o lodo do reator foi descartado e adotou-se a auto-fermentação como estratégia de inoculação, logo antes do início da operação dos AnMBR. O processo de auto-fermentação se deu pela adição de sacarose, na concentração aproximada de 5000 $mgDQO.L^{-1}$, com nutrientes, nas mesmas concentrações apresentadas no item 4.1.3, e extrato de levedura, para favorecimento do crescimento microbiano, na concentração de 200 $mg.L^{-1}$. O afluente e efluente do reator AC foi recirculado em sistema fechado por três dias, na mesma vazão de alimentação, a fim de favorecer a retenção dos flocos de bactérias. Imediatamente, iniciou-se a operação em modo contínuo.

Os reatores MT e SG foram inoculados com o lodo do tratamento de efluente da indústria de tabaco, porém com os grânulos intactos, em uma concentração inicial de 15 $gSTV.L^{-1}$. A escolha da configuração semelhante a um reator UASB tinha por objetivo conseguir a parcial sedimentação e granulação do lodo. Segundo Martin-Garcia et al. (2011) e Shen (2011), a granulação do lodo em AnMBR possibilita a melhoria das características do lodo no que tange à filtração, resultando em melhores fluxos.

Nos primeiros 60 dias aproximadamente, os reatores MT e SG operaram sem a conjugação com o módulo de membranas, sendo este período classificado como de adaptação. As principais análises de monitoramento foram pH, alcalinidade bicarbonato e AVT, pelo método de Kapp, conforme

descrito no item 4.2.3. Simultaneamente com a conjugação dos módulos de membrana nos reatores metanogênicos, ocorreu a substituição do lodo do reator AC.

Os AnMBR operaram em ciclos de 10 minutos de filtração seguido de um minuto de relaxação. O biogás era recirculado e introduzido a uma velocidade de 215 $m.h^{-1}$ nas membranas tubulares. Este procedimento era necessário para a operação em sistema *airlift* e para a prevenção da incrustação das membranas. O fluxo transmembrana foi ajustado para 9,8 $L.m^{-2}h^{-1}$, correspondendo a um TDH de 25,9 h no 1-AnMBR e de 21,6 h no 2-AnMBR. No reator AC, o TDH foi mantido em aproximadamente 7,5 h. Entretanto, naturalmente ocorreram variações na concentração inicial do substrato e nos valores de vazão, em relação aos valores almejados.

4.3.3 Análises para monitoramento, caracterização do lodo e dos SMP

O afluente, efluente acidificado (proveniente do reator AC), sobrenadante dos AnMBR (líquido reacional contendo lodo, efluente e SMP, retirado da parte do decantador do separador trifásico dos AnMBR, que era conduzido para o sistema de filtração das membranas) e o permeado (efluente dos AnMBR) eram amostrados e analisados três vezes por semana.

Os seguintes parâmetros e respectivas metodologias foram empregados: DQO total e DQO filtrada em membrana de 0,45 µm, sólidos totais, fixos e voláteis (ST, STF e STV), sólidos suspensos totais, fixos e voláteis (SST, SSF e SSV) retidos em filtro de 0,60 µm, pelo *Standard Methods* (APHA, 2005); proteínas: método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951); carboidratos: método colorimétrico de Dubois (Dubois et al., 1956); pH: pHmetro digital; alcalinidade total e bicarbonato, ácidos voláteis totais: método titrimétrico de Kapp (descrição no item 4.2.3); razão alcalinidade intermediária/ alcalinidade parcial (AI:AP): método titrimétrico de Ripley (Ripley et al., 1986); sacarose (glicose, frutose) e ácidos orgânicos (ácidos fórmico, láctico, acético, propiônico, (iso)butírico e (isso)valérico): conforme metodologia descrita no item 4.1.5. A Tabela 4.6 apresenta quais análises foram feitas para cada ponto de amostragem.

Ao final da operação, os sobrenadantes (não centrifugados) dos três reatores foram analisados quanto à distribuição dos tamanhos das partículas, utilizando o analisador de tamanho de partículas por difração a laser (SALD-3101, Shimadzu), que mede partículas na faixa de 0,05 a 3000 µm.

Para medir a vazão de gás, foi utilizado um medidor Milligas Ritter®, o qual foi alternado entre os três reatores. A composição do biogás em termos de H_2, CH_4 e CO_2 foi analisada por cromatografia em fase gasosa, em equipamento Clarus, Perkin Elmer, equipado com um detector de condutividade térmica TCD, utilizando 1 mL de volume de amostra.

Tabela 4.6 - Análises e pontos de amostragem do 1-AnMBR e 2-AnMBR

	Afluentes AC e 1-AnMBR	Afluente 2-AnMBR, efluente AC	Sobrenadantes 1-AnMBR e 2-AnMBR	Permeados 1-AnMBR e 2-AnMBR
DQO total	X	X		X
DQO filtrada		X	X	
Sólidos totais e suspensos		X	X	
Proteínas totais[1]		X	X	
Carboidratos totais[1]		X	X	
pH	X	X		X
Alcalinidade, AVT e AI:AP				X
Ácidos orgânicos		X		X

1. As análises de DQO, proteínas e carboidratos dos sobrenadantes do 1-AnMBR e 2-AnMBR referem-se à caracterização dos SMP e, portanto, todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,45 µm.

4.3.4 Desempenho e testes de filtração

Durante a operação contínua, os valores de fluxo transmembrana foram pré-fixados e os valores de pressão transmembrana eram mostrados instantaneamente e registrados a cada 10 minutos, pelo software LabVIEW Measurement. A permeabilidade operacional foi então calculada pela equação 4.12:

$$L_p = \frac{J}{TMP} \tag{4.12}$$

Em que:

L_p = permeabilidade da membrana ($L.m^{-2}h^{-1}bar^{-1}$)

J = fluxo transmembrana ($L.m^{-2}h^{-1}$)

TMP = pressão transmembrana (bar)

Já a resistência total da membrana, ou seja, a resistência intrínseca da membrana (R_m) somada à resistência pela incrustação (R_f), é inversamente proporcional à permeabilidade da membrana (equação 4.13):

$$R_t = \frac{TMP}{\mu J} = \frac{1}{\mu L_p} \tag{4.13}$$

Em que:

R_t = resistência total da membrana (m^{-1})

TMP = pressão transmembrana (Pa)

J = fluxo transmembrana ($m^3.m^{-2}s^{-1}$)

L_p = permeabilidade da membrana ($m.s^{-1}Pa^{-1}$)

μ = viscosidade dinâmica do líquido (Pa.s)

A resistência intrínseca da membrana (R_m) foi medida registrando-se os valores de TMP em valores de fluxos determinados, utilizando-se membrana nova e água destilada. Já a resistência total da membrana (R_t) era a resistência medida no tanque biológico durante a operação, sendo a soma da resistência intrínseca da membrana, com a resistência causada pela incrustação (formação de camada de torta, bloqueio de poros e adsorção), e a resistência causada pela polarização da concentração. A resistência total aparente da membrana (R_{ta}) foi definida como a soma da resistência intrínseca da membrana com a resistência causada pela incrustação (R_f). Experimentalmente, para a mensuração da R_{ta}, o módulo de membrana era desconectado do tanque biológico e utilizava-se água destilada para a filtração. Como nenhum procedimento havia sido utilizado para a remoção da incrustação (apenas, antes do teste, passava-se gentilmente água destilada no aparato experimental), pela diferença entre a R_{ta} e a R_m, era possível calcular a R_f, que é a soma da resistência pela incrustação interna (R_{if}), por adsorção e bloqueio de poros, e da resistência pela incrustação externa (R_c), pela formação de uma camada de torta consolidada. No entanto, a R_c medida geralmente é menor do que a R_c que ocorre durante a operação no tanque biológico, uma vez que a camada de torta fracamente aderida à membrana é destacada no momento de interrupção da filtração e de passagem de água destilada no aparato experimental previamente à medição da R_{ta}.

No final da operação, o fluxo crítico foi determinado. Para isso, coletou-se o líquido reacional do 1-AnMBR e do 2-AnMBR (lodo, SMP e substrato não degradado), da parte superior à manta de lodo. O procedimento foi feito utilizando concentrações iguais de SSV para ambos os reatores, diluindo-se com o permeado o lodo do que apresentava maior concentração de SSV. O método utilizado foi o de *flux-step* (Le Clech et al., 2003), registrando-se os valores de TMP sob valores de fluxo pré-determinados, os quais eram aumentados gradualmente. Pela relação pressão versus tempo, o fluxo crítico foi determinado a partir do ponto em que a pressão aumentava ao longo do tempo sob um determinado valor de fluxo, ou seja, $dTMP/dt \neq 0$, ao nível de significância de 10%.

Por fim, a resistência específica da torta (R_{sc}) foi avaliada para o lodo dos três reatores. Assim como para a determinação do fluxo crítico, coletou-se o líquido reacional da parte superior à manta

de lodo e a concentração de SSV foi ajustada para a de menor valor, diluindo-se os lodos com concentrações mais elevadas de SSV com o permeado ou água (no caso do reator AC). Sob um único valor de fluxo (9,8 $L.m^{-2}.h^{-1}$), os valores de pressão foram registrados a cada 3-4 segundos, em mecanismo de filtração *dead-end*. Para tanto, nenhum procedimento para evitar a incrustação foi aplicado, ou seja, a filtração ocorreu sem injeção de gás e a velocidades tangenciais negligenciáveis, não causando cisalhamento na superfície das membranas. A bomba de gás foi desligada, os módulos de membrana foram preenchidos com o líquido reacional, e assim eram continuamente, por bombeamento do líquido nas mesmas vazões do permeado.

As análises estatísticas foram processadas no software Minitab 18.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de hidrogênio nos reatores acidogênicos[1]

Em uma primeira etapa operacional foram comparadas três configurações de reatores acidogênicos: reator de leito fixo estruturado inoculado com grânulos desagregados (FB), reator UASB inoculado com grânulos intactos (UG) e reator UASB inoculado com grânulos desagregados (UF-1). Na segunda etapa, outro reator acidogênico (UF-2) foi aplicado em um sistema de duplo estágio (acidogênico-metanogênico), variando-se o TDH. Os resultados relativos à acidogênese – produção volumétrica de hidrogênio (PVH), efeito do pH sobre a fermentação, rendimento de H_2, composição dos gases, ácidos orgânicos produzidos, comunidade microbiana acidogênica – são discutidos neste item.

5.1.1 Condições hidrodinâmicas nos reatores acidogênicos

Inicialmente foram conduzidos ensaios hidrodinâmicos nos reatores de leito fixo estruturado e UASB. A Figura 5.1 apresenta a curva E(t) obtida para o TDH de aproximadamente 3 h. Na Tabela 5.1 são apresentados os parâmetros hidráulicos calculados nos ensaios hidrodinâmicos para os quatro TDH avaliados. Nota-se que o TDH teórico para o reator de leito fixo estruturado é ligeiramente inferior ao dos demais reatores por ter-se descontado, do volume útil total, o volume preenchido com material suporte; assim adotou-se como parâmetro para calcular o TDH o volume de 2,09 L para o reator de leito fixo estruturado e de 2,39 L para os reatores UASB. Cabe ressaltar que o mesmo critério não foi adotado para calcular os parâmetros operacionais durante o tratamento biológico, devido ao fato de ser impraticável calcular o volume efetivo dos reatores em razão do volume variável ocupado pela biomassa.

Verifica-se que, para todas as condições, os TDH medidos nos reatores apresentaram uma excelente aproximação aos TDH teóricos e, pela Figura 5.1, que nenhuma anomalia foi identificada (o padrão da curva E(t) do TDH de três horas foi observado também para os demais TDH avaliados), sendo o regime hidráulico caracterizado como de fluxo em pistão. Os baixos valores do coeficiente de dispersão ($D/uL<0,01$) e altos valores de números de reatores em série

[1] Esse estudo foi publicado no artigo: Mota, V. T., Ferraz Júnior, A. D., Trably, E., & Zaiat, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Research, 128,* pp. 350-361. doi: 10.1016/j.watres.2017.10.060.

(N>30) confirmam que o modelo hidráulico de fluxo pistonado se aplica para os reatores de leito estruturado e UASB nestas condições.

Figura 5.1 - Curvas E(t) obtidas para o TDH de 3 h nos reatores de leito estruturado e UASB

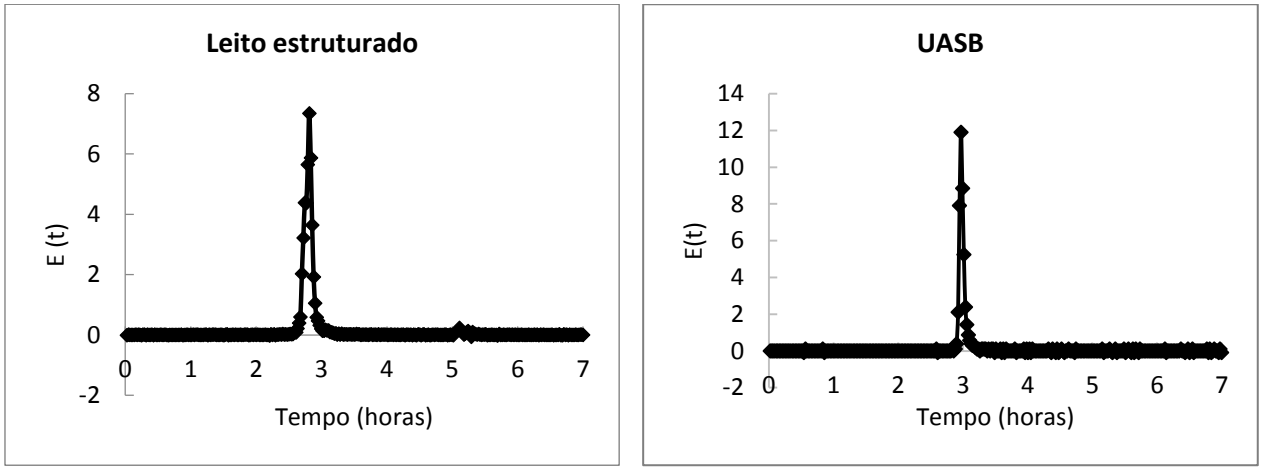


Tabela 5.1 - Parâmetros hidráulicos dos reatores acidogênicos

Reator	TDH teórico (h)	TDH médio (h)	TDHt/TDHm[(1)]	D/uL[(2)]	N[(3)]
Leito estruturado	1,33	1,37	1,03	0,00235	212
UASB	1,52	1,56	1,03	0,00141	355
Leito estruturado	2,72	2,83	1,04	0,00548	91
UASB	3,11	3,02	0,97	0,00316	158
Leito estruturado	5,36	5,67	1,06	0,00430	116
UASB	6,13	6,51	1,06	0,00471	106
Leito estruturado	8,71	8,80	1,01	0,00076	660
UASB	9,96	10,23	1,03	0,00055	913

1. Razão entre o TDH teórico e o TDH médio (calculado pelos testes hidrodinâmicos).
2. Número de dispersão adimensional (D = coeficiente de dispersão longitudinal que caracteriza o grau de mistura durante o fluxo, u = velocidade do fluido, L = comprimento do reator).
3. Número de reatores de mistura perfeita de igual volume em série.

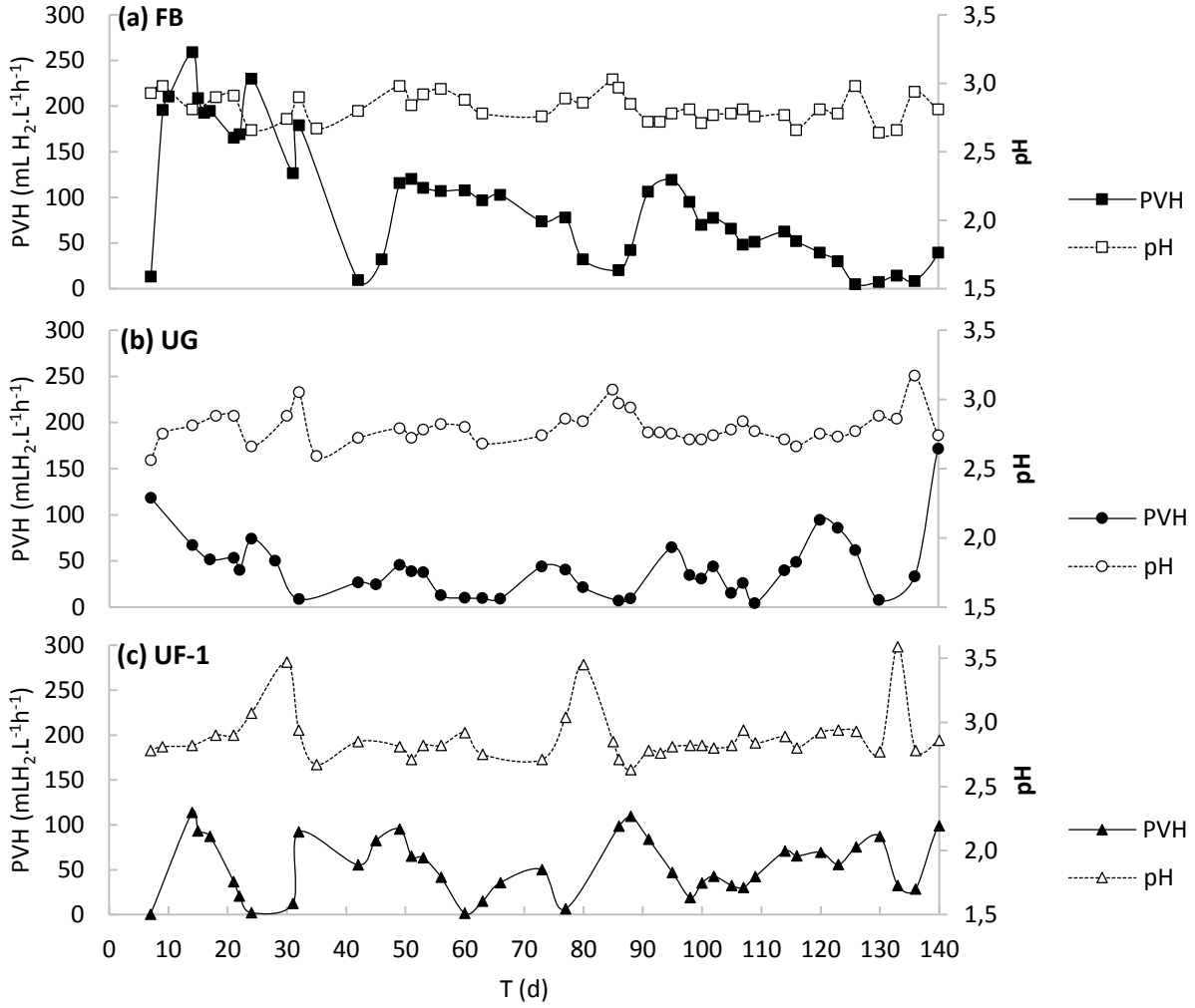
5.1.2 Produção de hidrogênio com diferentes reatores (TDH de 3,3 h)

Inicialmente, os parâmetros de projeto adotados foram TDH de 3,1 h, concentração inicial do substrato (sacarose) de 5 gDQO.L^{-1}, correspondendo à COV de 38,6 gDQO.L^{-1}d^{-1}. Entretanto, ocorreram variações na concentração inicial e na vazão de alimentação, decorrentes de problemas operacionais, tais como entupimento de mangueiras, falhas na bomba de alimentação, aumento da perda de carga nos reatores. Durante todo o período experimental, a concentração média do afluente foi de 4,6 gDQO.L^{-1}. Considerando-se as alterações nos parâmetros operacionais, a média do TDH e da COV foi de 3,3 horas e 33,1 gDQO.L^{-1}d^{-1}, respectivamente. Como comentado no

item 5.1.1, considerou-se o mesmo volume útil para os três reatores. Em razão do maior *headspace* em relação aos ensaios hidrodinâmicos, o volume útil considerado foi de 2,24 L.

Na Figura 5.2 são apresentados os valores da produção volumétrica de hidrogênio (PVH), por volume útil de reator, e do pH, quando comparadas as três configurações de reatores: FB, UG e UF-1. Embora o pH do substrato fosse próximo da neutralidade, com um valor médio de 6,5, o pH do efluente dos reatores apresentou valores muito baixos, com médias iguais a 2,8, 2,8 e 2,9 nos reatores FB, UG e UF-1, respectivamente (Figura 5.2). Como nenhum agente controlador de pH foi adicionado, a redução do pH ocorreu por auto-ajustamento, devido à produção de ácidos orgânicos e de gás carbônico. Apesar do baixo pH, a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) ocorreu praticamente durante todo o período experimental.

Figura 5.2 - Produção volumétrica de H_2 e pH nos reatores FB, UG e UF-1



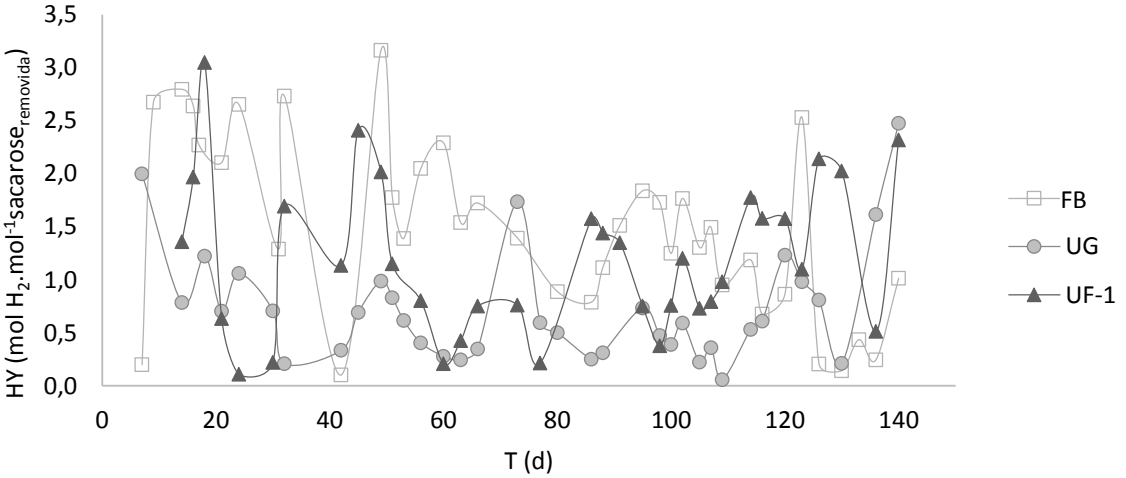
Aumentos pontuais no pH, acompanhados de uma redução na remoção de sacarose, da produção de ácidos orgânicos e de H_2 foram observados. Isto foi mais notável no reator UF-1, quando o pH atingiu valores acima de 3,4 nos dias 30, 80 e 133 (Figura 5.2). As mais baixas concentrações de

ácidos orgânicos no efluente foram relatadas nestes dias e a eficiência de remoção de sacarose foi nula nos dias 80 e 133. Nos dias 23, 29, 59, 60, 79 e 130, o reator UF-1 apresentou problemas de alimentação devido ao entupimento das mangueiras. É provável que a redução ou a interrupção da alimentação tenha levado ao decaimento microbiano, como pôde ser inferido pela menor turbidez do meio (análise a olho nu) e pela redução nas concentrações de SSV no efluente após esses eventos. Valores de pH acima de 3,0 acompanhados por uma redução drástica na conversão de sacarose também foram observados no reator UG, principalmente nos dias 32, 85 e 136, e no reator FB, no dia 85. Assim, é provável que a redução da conversão de sacarose tenha sido a causa do aumento do pH do efluente, pela diluição do líquido reacional com o afluente não fermentado.

As PVH médias foram equivalentes a (em $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$ ± desvio padrão): 95 ± 69 no reator FB, 45 ± 37 no reator UG, e 54 ± 32 no reator UF-1. Apenas os dados de PVH oriundos do reator UF-1 apresentaram distribuição normal. Conforme o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks, a PVH foi significativamente diferente entre os reatores, ao nível de significância de 5% ($p = 0,006$). A análise subsequente com o procedimento de comparações múltiplas indicou que a PVH não foi estatisticamente diferente entre os reatores UG e UF-1 ($p = 0,575$).

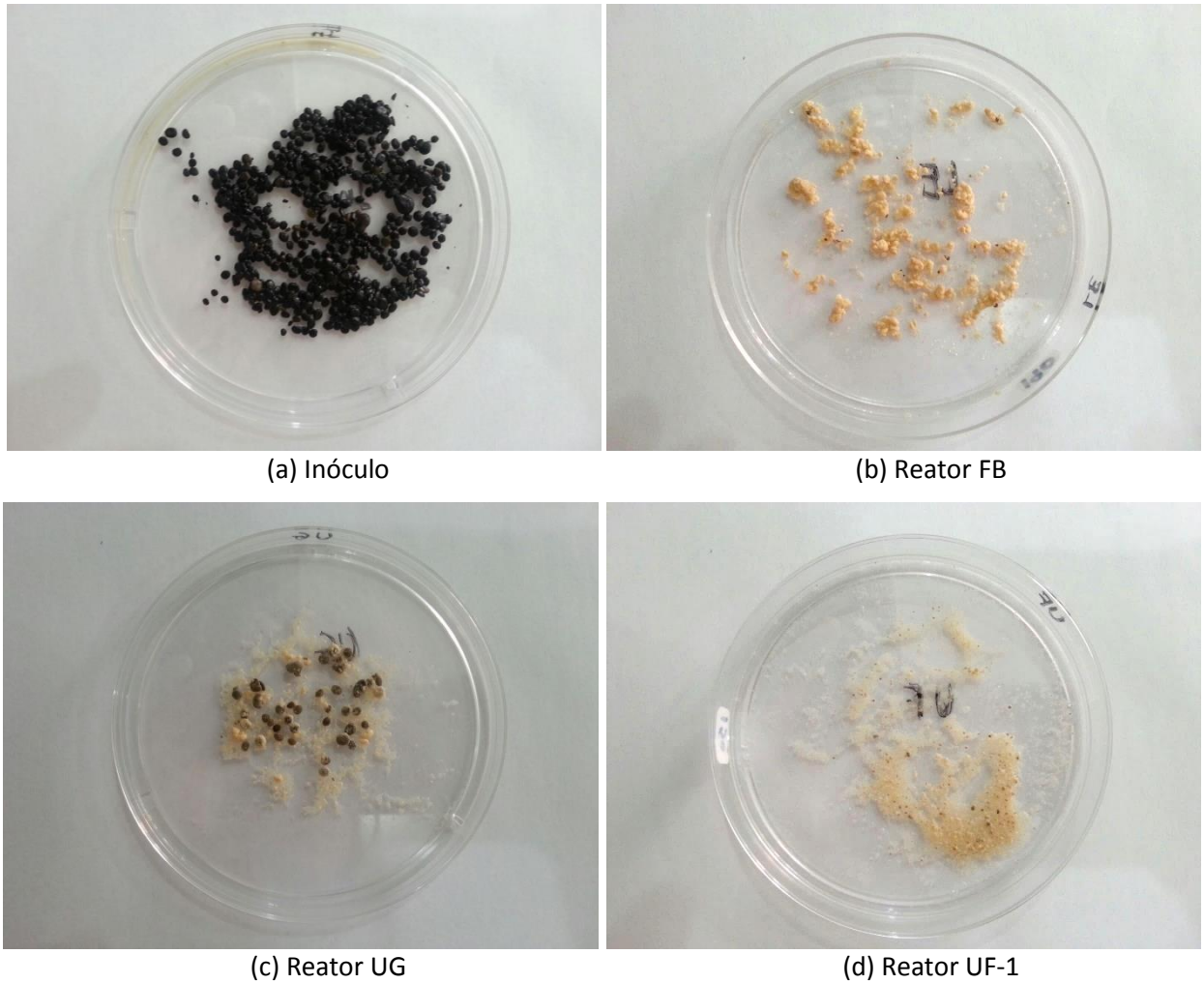
É possível observar que o reator FB, embora tenha tido uma produção de H_2 muito mais acentuada no início da operação, apresentou uma tendência de decaimento ao longo do tempo. Por outro lado, os reatores UG e UF-1 não atingiram produções de hidrogênio tão elevadas quanto o reator FB no início da operação, mas não mostraram tendência de redução. Especialmente o reator UF-1 apresentou maior estabilidade na produção com o passar do tempo. A mesma tendência foi observada quanto ao rendimento de hidrogênio (HY), conforme apresentado na Figura 5.3. No item 5.1.5 são apresentados as médias, medianas e quartis dos valores de HY.

Figura 5.3 - Rendimento de H_2 nos reatores FB, UG e UF-1 ao longo da operação



Uma possível explicação para a maior PVH inicial no reator FB seria a menor lavagem da biomassa inoculada devido à presença do material suporte, o que, por conseguinte, levaria à maior produção de hidrogênio. Foi observada biomassa "aprisionada" no meio suporte, mas esta não chegou a formar um biofilme espesso, notável. Assim, a presença dos cilindros de polietileno parece ter tido um papel relevante no início da operação para a retenção da biomassa, mas mais como uma barreira do que propriamente como um material suporte. A importância da presença da biomassa suspensa no reator FB ficou evidenciada com um acidente ocorrido no 39º dia, em que parte desta foi perdida devido a um vazamento. Como resultado, a produção de hidrogênio caiu bastante, voltando a se recuperar apenas quando a biomassa suspensa se restaurou, após cerca de uma semana. O lodo suspenso do reator FB apresentou flocos maiores e mais próximos da granulação que aqueles do reator UF-1 (Figura 5.4), provavelmente devido à tensão de cisalhamento e à seleção provocada pelo material suporte. Acredita-se que a barreira física do material suporte dificultou o fluxo principalmente dos flocos de maiores dimensões, enquanto os menores passavam com mais facilidade, saindo no efluente.

Figura 5.4 - Aparência do lodo do inóculo e no final da primeira fase experimental



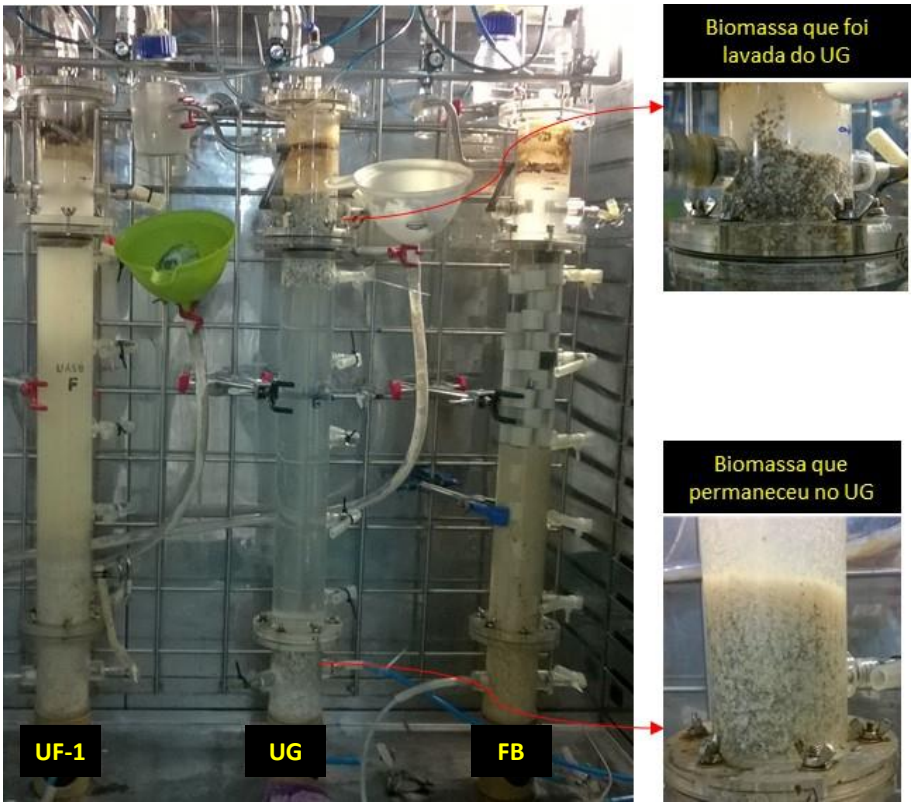
(a) Inóculo (b) Reator FB

(c) Reator UG (d) Reator UF-1

Contudo, acredita-se que a queda da produção e rendimento de H_2 no reator FB tenha sido causada pelo favorecimento da transferência de H_2 interespécies (entre os microrganismos) e, também, devido ao crescimento de bactérias lácticas (item 5.1.6). A proximidade entre os microrganismos é crucial para a eficiente transferência interespecífica de hidrogênio entre bactérias acetogênicas e arqueias hidrogenotróficas em flocos, biofilmes e grânulos (MacLeod et al., 1990; Davey & O'toole, 2000; Hulshoff Pol et al., 2004; Felchner-Zwirello et al., 2013). No entanto, como apontado por Dinamarca et al. (2011), este mecanismo talvez tenha papel relevante em reatores acidogênicos, pela transferência de H_2 entre bactérias produtoras e bactérias consumidoras de H_2. Entre estas últimas, pode-se citar as bactérias homoacetogênicas e as bactérias produtoras de propionato. Assim, a aglutinação da biomassa em flocos maiores e biofilme no reator FB pode ter prejudicado o rendimento de H_2 em longo prazo. Neste reator, ocorreu aumento na produção de ácido acético a partir do dia 77, porém não de H_2, indicando possível ocorrência de homoacetogênese. Penteado et al. (2013) avaliaram sete reatores de leito estruturado, inoculados com diferentes tipos de inóculo, e alimentados com sacarose. Ao longo de 60 dias de operação, a PVH reduziu consideravelmente em todos os reatores, e observou-se que o HY caía à medida que a porcentagem de ácido acético produzido pela homoacetogênese aumentava. O preenchimento dos reatores FB e UG com material suporte e grânulos, respectivamente, também pode ter prejudicado a produção de H_2 ao dificultar o escape do biogás produzido, aumentando a pressão parcial de H_2 no meio, o que inibe a sua própria produção (Sikora et al., 2013).

Visualmente, o lodo do reator UG apresentou uma tendência a se assemelhar ao lodo dos reatores inoculados com grânulos desagregados, sobretudo do reator UF-1, ou seja, os grânulos foram se reduzindo e a biomassa de coloração escura, contendo microrganismos metanogênicos, foi sendo cada vez mais escassa, o que pôde ser notado pela observação do aspecto do lodo que permaneceu no reator (Figura 5.4). Foi principalmente a partir do 135º dia que houve uma “lavagem” dos grânulos, em que o reator perdeu a maior parte da biomassa (Figura 5.5). A flotação dos grânulos provavelmente ocorreu devido à aderência das bolhas de gás às suas superfícies, e devido à redução da densidade dos mesmos. Isso ocorreu, pois, como as condições ambientais não eram favoráveis para a manutenção dos microrganismos metanogênicos, é provável que estes foram sofrendo processo de decaimento, por lise celular e consumo pelas bactérias hidrolíticas e acidogênicas. Consequentemente, os grânulos ficaram ocos e pouco densos. A crescente substituição de biomassa inativa dos grânulos por biomassa acidogênica suspensa no reator UG provavelmente foi responsável pela leve melhoria no seu desempenho relativo à produção de H_2 (Figura 5.2b).

Figura 5.5 - Foto dos reatores no final da Etapa 1 de operação (138º dia)

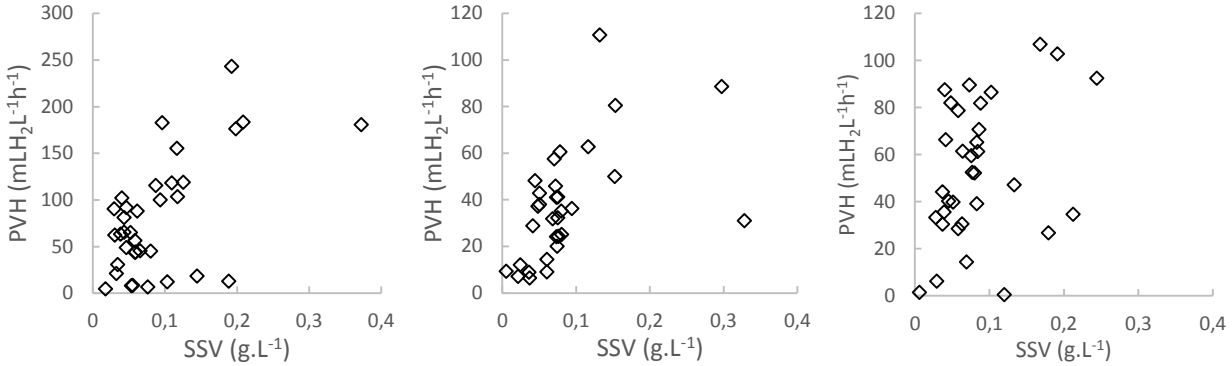


Já no reator UF-1, é provável que no início da operação o decaimento e a lavagem dos microrganismos ocorreram mais antecipadamente em razão do maior contato da biomassa com o meio provido pela desagregação dos grânulos e pela ausência inicial de mecanismo de retenção da biomassa. Essa pode ser a razão pela qual a produção de H_2 começou tardiamente neste reator e com menor intensidade. Semelhante fenômeno foi observado por Reyes et al. (2012), comparando-se a produção de H_2 em reatores inoculados com grânulos desagregados e intactos, em que nestes últimos a produção de gás iniciou-se nas primeiras 12 horas após a inoculação, enquanto que nos reatores inoculados com grânulos desagregados a produção de gás se iniciou após cerca de 40-70 horas de operação contínua. Por outro lado, a relativa maior estabilidade do reator UF-1 pode ter sido em decorrência da seleção de bactérias resistentes às condições adversas (baixo pH e alta concentração de ácidos orgânicos), além da maior concentração destas bactérias ao longo do tempo, que passaram a se auto-agregarem em partículas de pequenas dimensões. A maior seletividade de bactérias de interesse nos grânulos desagregados foi verificada por Reyes et al. (2012), que constataram que esta forma de inoculação resultou em maior atividade hidrogenogênica específica comparando-se aos grânulos intactos.

É interessante observar que houve correlação entre a PVH e a concentração de SSV no efluente, ao nível de significância de 5%, conforme mostrado na Figura 5.6. Como os dados não apresentaram distribuição normal, aplicou-se o teste de Spearman. Embora não muito forte, a

correlação foi positiva em todos os reatores, apresentado coeficientes R de 0,45 (p = 0,0063), 0,56 (p = 0,0014) e 0,40 (p = 0,0198) nos reatores FB, UG e UF-1, respectivamente. A concentração média de SSV foi equivalente a (em mg/L): reator FB: 89,9 ± 68,4; reator UG: 101,7 ± 95,9; reator UF-1: 90,9 ± 63,4.

Figura 5.6 - Relação entre a PVH e a concentração de SSV no efluente



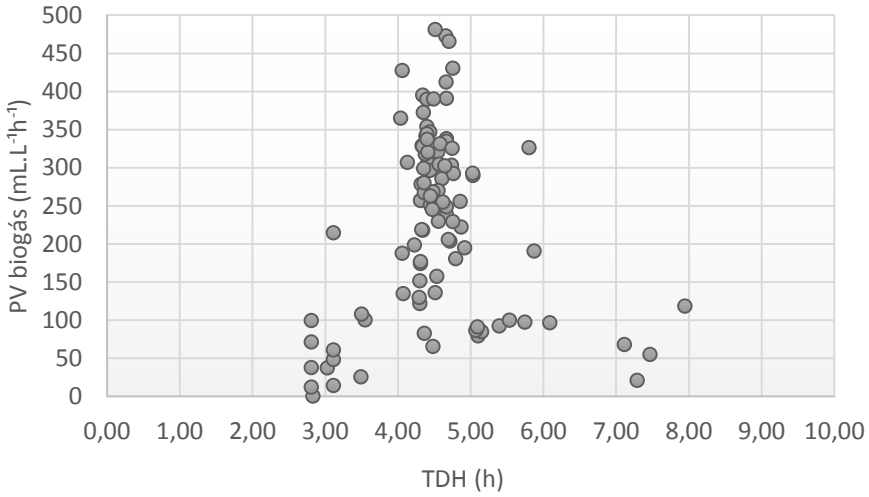
Em suma, o reator UG apresentou a menor PVH e o menor rendimento de H_2, sendo considerado menos vantajoso para utilização nas etapas posteriores. Embora os valores médios de PVH e rendimento tenham sido maiores no reator FB, estes apresentaram tendência de redução ao longo do tempo. O reator UF-1 apresentou PVH intermediária, mas com maior estabilidade em termos de produção, rendimento e concentração de H_2 no biogás. A partir do 80º dia de operação aproximadamente, o rendimento de H_2 no reator UF-1 apresentou tendência de melhoria, opostamente ao reator FB. Assim, visando uma produção de H_2 contínua e por longa duração, esta configuração, dentre as estudadas, pareceu ser a mais adequada. Ressalta-se ainda que o reator UASB floculento tem o maior potencial de aproveitamento do volume útil reacional para ser preenchido com biomassa suspensa ativa, mantendo maiores as concentrações de SSV, o que se correlacionou positivamente com a produção de H_2, mas sem formar associações microbianas muito densas, tais como grânulos e biofilme. Por estas razões, a configuração de reator UASB floculento foi escolhida para ser aplicada na segunda etapa experimental.

5.1.3 Produção de hidrogênio contínua, estável e em longo prazo (TDH de 4,6 h)

Baseado nos resultados obtidos na primeira etapa experimental, um reator UASB floculento foi aplicado na segunda etapa para a produção de H_2, denominado UF-2, sendo que este foi conjugado a um reator metanogênico. Nesta seção são discutidos apenas os resultados relativos ao desempenho da acidogênese.

Inicialmente os mesmos parâmetros operacionais de projeto da etapa anterior foram estabelecidos, ou seja, TDH e carga orgânica de aproximadamente 3,3 h e 33,1 gDQO.$L^{-1}d^{-1}$, respectivamente. Entretanto, estes parâmetros não foram mantidos em decorrência da flutuação da vazão, que ocorreu por falhas na bomba de alimentação. Nos primeiros 10 dias, a bomba parou diversas vezes, e, então, no 11º dia foi colocada uma outra bomba. Porém, esta não atingia as vazões pretendidas, mantendo valores inferiores, equivalentes a um TDH de aproximadamente 4,9 h. Esta bomba também apresentou falhas e o reator ficou alguns períodos sem receber alimentação. Assim, substituiu-se por outra, no 47º dia, mas novamente as vazões não foram mantidas por falhas na mesma ou entupimento das mangueiras, permanecendo uma fase de instabilidade operacional até o 80º dia. Neste período, foi observado que as maiores produções de biogás e de H_2 foram atingidas quando o reator operou com TDH entre 4 e 5 horas, conforme pode ser visualizado na Figura 5.7. Para esta avaliação, não foram considerados os dados obtidos quando a alimentação estava interrompida ou muito baixa.

Figura 5.7 - Produção de biogás em função do TDH durante a fase de instabilidade operacional



Desta forma, os parâmetros operacionais de projeto foram alterados, em que o TDH foi aumentado para 4,67 h e a carga reduzida para 25,7 gDQO.$L^{-1}d^{-1}$. Devido a algumas flutuações da vazão e da concentração inicial de substrato, os valores médios do TDH e da carga foram levemente diferentes dos de projeto, iguais a 4,62 h e 25,0 gDQO.$L^{-1}d^{-1}$, respectivamente. A partir do 80º dia de operação, as condições operacionais mantiveram-se estáveis (TDH = 4,62 ± 0,46 h). Assim, a operação do reator UF-2, que totalizou 224 dias, foi dividida em duas fases: (i) Fase 1: instabilidade operacional, com duração de 80 dias e (ii) Fase 2: condições operacionais fixadas e mantidas, com duração de 144 dias. Os resultados foram então avaliados separadamente para as duas fases de operação.

Como era de se esperar, na fase de instabilidade, a PVH foi bastante variável, equivalente a 57,8 ± 37,0 $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$ (Figura 5.8). No 11º dia da Fase 1, bicarbonato de sódio foi acidentalmente introduzido na alimentação do reator e o pH do efluente atingiu o valor máximo de 4,7. Valores de pH acima de 3,0 também foram registrados nos dias 47-53 (3,3-3,7) e 73-74 (3,1-3,6). Do 17º ao 46º dia da Fase 1, devido a falhas operacionais na bomba, a vazão estava reduzida e, consequentemente o TDH estava acima do almejado, situando-se entre 5 e 6 h. No entanto, com a troca da bomba e aumento da vazão entre os dias 47 e 53, a remoção de sacarose foi baixa (9-24%), levando à menor acidificação do efluente, e pode ter sido causada pela redução do TDH nestes dias (entre 2,8 e 3,1 h) e choque de carga. Já o aumento do pH no dia 73 provavelmente ocorreu pela interrupção da alimentação nos dias precedentes (por causa de problemas nas manqueiras de alimentação), o que pode ter ocasionado maior decaimento bacteriano, liberando diferentes produtos no meio e consumo de H^+. Consequentemente, quando o reator voltou a ser alimentado, o consumo e a acidificação da sacarose devem ter sido reduzidos, levando ao aumento do pH do efluente. Pela Figura 5.8, pode-se notar que se coincidiu o aumento do pH com a diminuição da PVH, assim como na etapa anterior. Isso pode ser explicado pelo fato de que a PVH reduziu como consequência do menor consumo de sacarose e, portanto, menor acidificação, e diluição do meio com o afluente (pH neutro), resultando em maiores valores de pH no efluente final. Para fins de comparação entre os reatores, nas análises estatísticas, não se considerou os dados do reator UF-2 durante a Fase 1, justamente pela instabilidade das condições operacionais.

Na Fase 2, a produção de hidrogênio foi contínua, estável e em longo prazo (Figura 5.8). Houve um grande aumento em relação aos resultados obtidos na etapa anterior, em que a PVH subiu para 175,2 ± 43,9 $mLH_2.L^{-1}h^{-1}$. A produção contínua de ácidos e de CO_2 no reator levou a uma forte acidificação do efluente, em que o pH médio foi de 2,7, mantendo-se sempre abaixo de 3,0. A produção de H_2 no reator UF-2 foi significativamente maior em relação aos reatores da Etapa 1, conforme o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,001$).

Durante a Fase 2 de operação do reator UF-2, o rendimento de H_2 também foi muito maior e mais estável ao longo do tempo, em relação à Fase 1 e aos reatores da Etapa 1 (Figura 5.9). Os dados de PVH e de HY apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,1$). No item 5.1.5 são apresentados os valores de mediana, média e quartis do HY no reator UF-2, comparando-se aos demais reatores acidogênicos.

Figura 5.8 - Produção volumétrica de H_2 e pH no reator UF-2

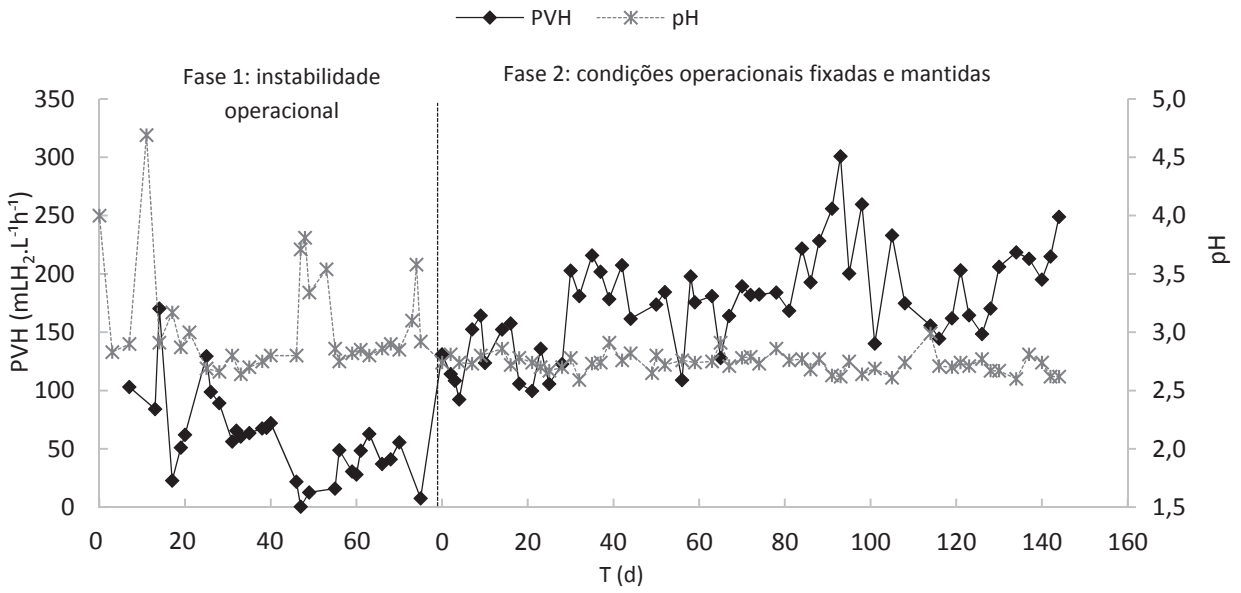
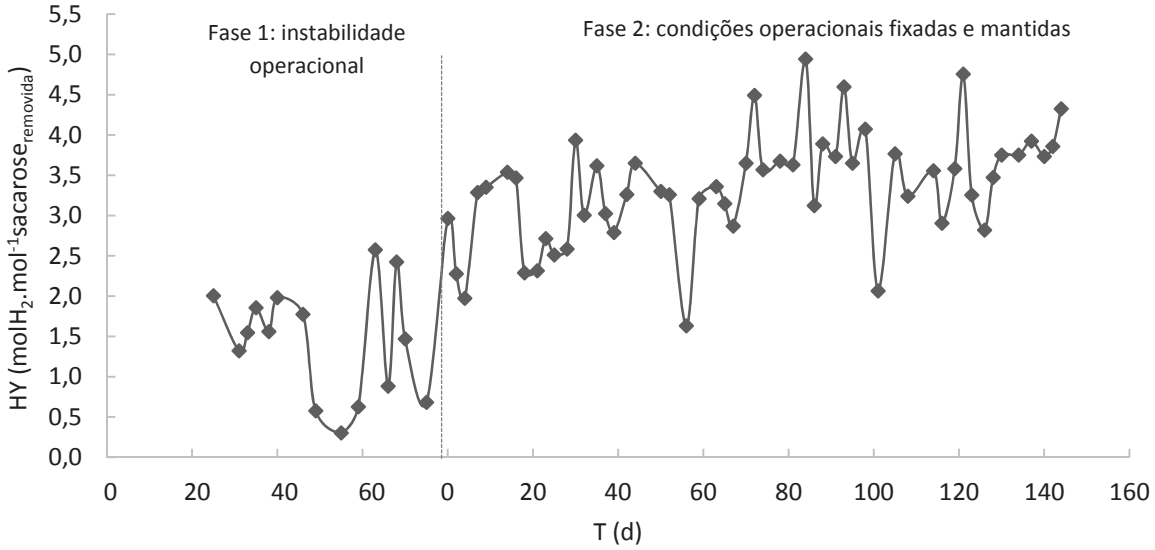


Figura 5.9 - Rendimento de H_2 no reator UF-2 ao longo da operação



A concentração de SSV no efluente foi bem maior do que a dos reatores FB, UG e UF-1, apresentando média de 295 ± 275 mgSSV.L^{-1}. Visualmente também era possível inferir maiores concentrações microbianas dentro do reator UF-2, pela altura da manta de lodo e turbidez do meio (Figura 5.10). Também se constatou uma correlação significativa (α = 0,05) entre SSV e PVH (Spearman R = 0,33). Por estes dados, infere-se que a manutenção de condições favoráveis para o crescimento da biomassa é importante para a obtenção de elevada produção de hidrogênio nestas condições. Conforme levantado por Dinamarca et al. (2011), a redução da distância entre os microrganismos em reatores acidogênicos talvez possa contribuir para a utilização do H_2 por bactérias homoacetogênicas. Assim, atenta-se para a possibilidade de o crescimento da biomassa

de forma suspensa (ao invés de grânulos ou biofilme) ser favorável para a produção de hidrogênio por oferecer menor contato entre os microrganismos, reduzindo a transferência de H_2 interespécies.

Figura 5.10 - Aspecto geral do reator UF-2 durante a operação

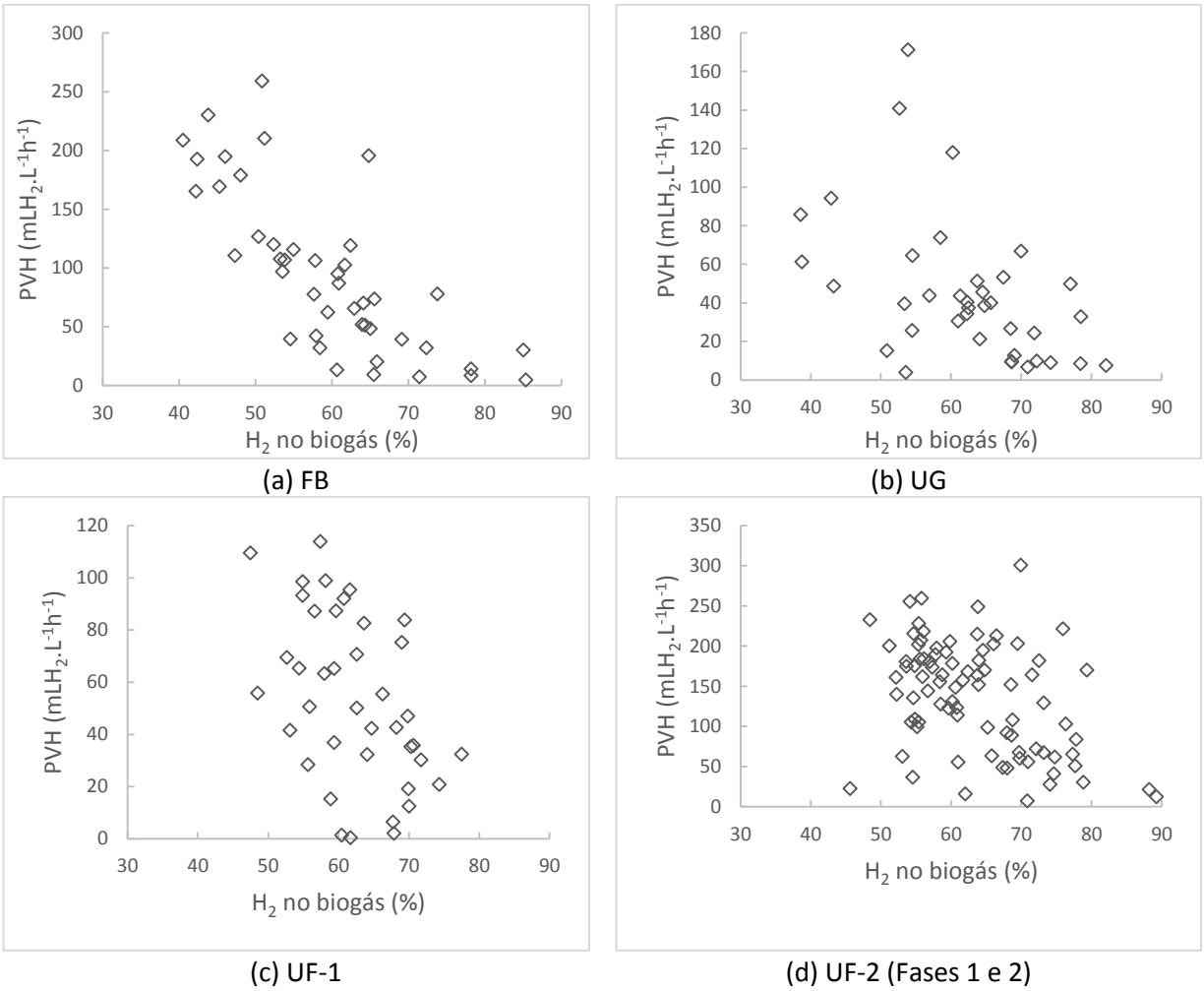
Provavelmente o aumento do TDH de 3,3 h (Etapa 1) para 4,6 h (Etapa 2, Fase 2) favoreceu a manutenção da biomassa no reator UF-2. Em alguns momentos ocorreu uma "descarga natural" de biomassa, que flotou semelhantemente ao que ocorreu no reator UG, conforme comentado no item 5.1.2. A flotação da biomassa é provável de ter ocorrido pela aderência de bolhas de gás na superfície dos flocos, reduzindo a densidade dos mesmos. Isso ficou evidenciado no 88º dia de operação da Fase 2 (Etapa 2), em que parte da manta de lodo flotou e, à medida que as bolhas de gases iam escapando para a atmosfera, os flocos de biomassa sedimentavam novamente.

5.1.4 Composição do biogás produzido nos reatores acidogênicos

O biogás dos reatores acidogênicos era composto exclusivamente de H_2 e CO_2. Em nenhum dos reatores foi detectado metano, levando à constatação que as condições ambientais estabelecidas, pelo baixo TDH, alta COV e diminuição natural do pH, foram suficientes para inibir completamente a metanogênese, mesmo utilizando inóculo de reator de estágio único sem nenhum tipo de pré-tratamento. O percentual médio de H_2 no biogás dos reatores FB, UG, UF-1, UF-2 (Fase 1) e UF-2 (Fase 2) foi de: 59,6±11,0, 62,1±10,8, 62,2±7,1, 72,0±10,6 e 59,5±5,9, respectivamente. O percentual de hidrogênio no biogás não foi significativamente diferente, segundo os testes de Kruskal-Wallis ANOVA (reatores FB, UG e UF-1) e de Kolmogorov-Smirnov (reator UF-2 (Fase 2) vs. reatores FB, UG e UF-1).

Ao contrário do que era de se esperar, foi observada uma tendência inversa entre o percentual de hidrogênio no biogás e a sua produção volumétrica nos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 (Fases 1 e 2), conforme ilustrado na Figura 5.11. Aplicando-se o teste não paramétrico de correlação de Spearman aos dados de todos os reatores, a correlação entre o percentual de H_2 no biogás e a PVH é negativa ao nível de significância de 5% (Spearman R =-0,44, p < 0,0000). Analisando separadamente os dados de cada reator, a correlação mais acentuada foi no reator FB (Sperman R = -0,71, p < 0,0000), seguidamente no reator UF-1 (Spearman R = -0,45, p = 0,0041) e no reator UG (Spearman R = -0,43, p = 0,0086). No reator UF-2 não houve correlação significativa quando analisadas as Fases 1 e 2 separadamente, mas em todo o período de operação a correlação também foi significativamente negativa (Spearman R = -0,40, p = 0,0001).

Figura 5.11 - Relação entre as PVH e os respectivos percentuais de H_2 no biogás dos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 (Fases 1 e 2)



A PVH ($mLH_2.L^{-1}h^{-1}$) é calculada pela multiplicação da vazão total de biogás ($mL.h^{-1}$) pela concentração relativa de hidrogênio no biogás ($molsH_2/(molH_2 + molsCO_2)$) e divisão do produto pelo volume útil do reator (L). Logo, era de se esperar que maiores concentrações de H_2 resultariam em maiores produções de H_2, mantendo-se a vazão total de biogás. Entretanto, observou-se

elevadas PVH mesmo quando as concentrações relativas de H_2 no biogás foram reduzidas e, logo, as oncentrações relativas de CO_2 aumentadas. Alguns fatores foram levantados para dar suporte a estas observações. Primeiramente, menores valores de pH favorecem o deslocamento do equilíbrio carbônico para a formação de CO_2 gasoso que, por sua vez, pode ter contribuído para o desprendimento de H_2 do meio, reduzindo o consumo e a solubilização do gás hidrogênio. A redução do pH, por sua vez, foi promovida pelo maior consumo (acidificação) do efluente, que poderia estar associado à formação de H_2. Outro fator levantado é relacionado à solubilidade dos gases. A constante de Henry que determina a razão da concentração na fase aquosa pela concentração na fase gasosa ($H^{cc} = C_{aq}/C_g$) é equivalente a 8,3 x 10^{-1} para o CO_2 e 1,9 x 10^{-2} para o H_2, em condições ideais a 25ºC. Portanto, a fração na fase aquosa do CO_2 tende a ser muito maior que a do H_2 em relação à fração destes na fase gasosa. Porém, as concentrações dos gases na fase líquida dos reatores podem atingir valores muito mais elevados do que os valores teóricos calculados, devido a limites de transferência de massa, conforme apresentado por Pauss et al. (1990). Assim, presume-se que quando a produção de gás era muito baixa, maior proporção de H_2 passava para a fase gasosa em relação ao CO_2, que em grande parte saía dissolvido no efluente. Já quando a produção de gás era maior, a transferência de CO_2 para a atmosfera era aumentada devido à maior turbulência e maiores concentrações de CO_2 dissolvido, enquanto a solubilidade do H_2 era afetada em menores níveis por este já ser um gás de baixa solubilidade.

5.1.5 Remoção de sacarose, rendimento e rotas metabólicas de produção de H_2

Os resultados das análises de remoção de DQO, remoção de sacarose e rendimento de hidrogênio das duas etapas operacionais, bem como das duas fases do reator UF-2, são apresentados conjuntamente em gráficos box-plot, para facilitar a comparação (Figuras 5.12 e 5.13). Os limites e a linha interna das caixas dos gráficos representam a distribuição dos dados em quartis (25%, 50% e 75%) e a média é representada por um "X". Os valores mínimos e máximos correspondem aos limites das barras, enquanto os *outliers*, que são os valores situados acima de 1,5 vezes o comprimento da caixa, são representados por círculos.

Figura 5.12 - Remoção de DQO solúvel nos reatores acidogênicos

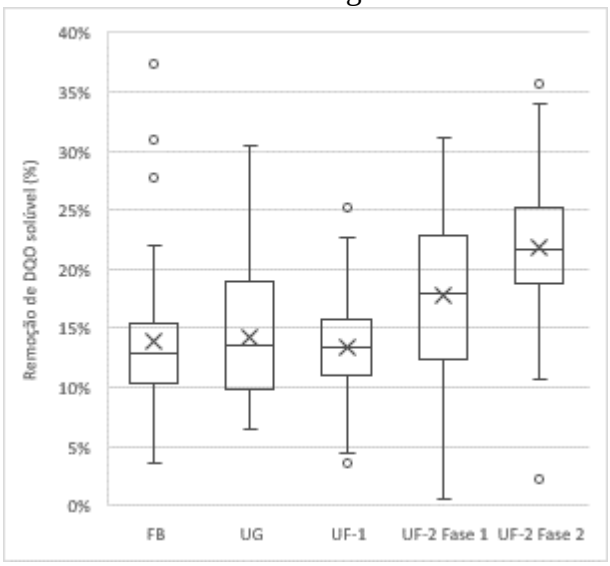
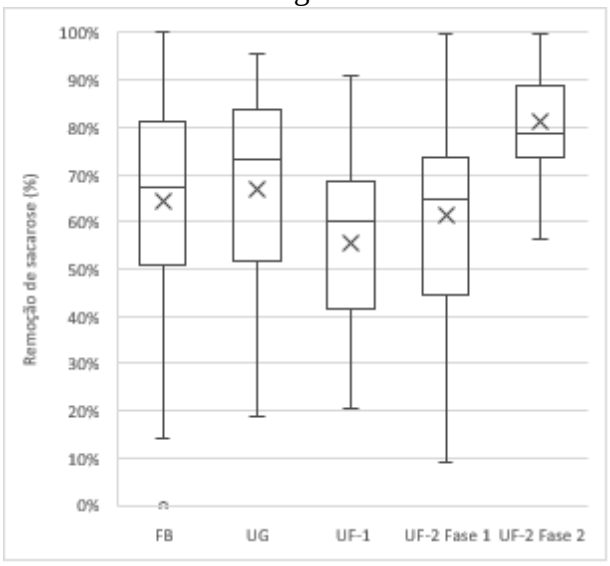


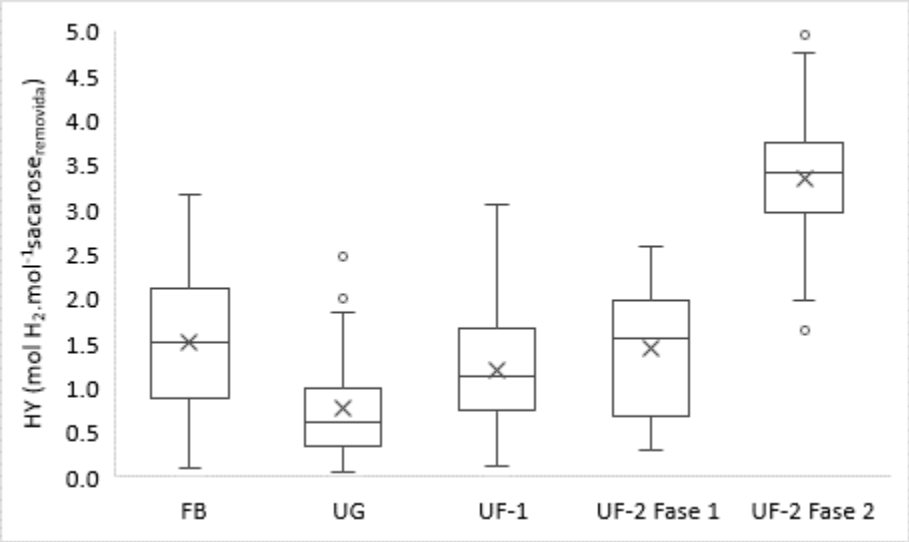
Figura 5.13 - Remoção de sacarose nos reatores acidogênicos



A remoção de DQO foi superior no reator UF-2 (Fase 2), conforme pode ser visto na Figura 5.13. Como a concentração de SSV foi bem maior neste reator, conforme comentado no item 5.1.3, e esta análise se refere à DQO solúvel, isto indica que uma parte da DQO removida a mais foi para o crescimento bacteriano. O maior TDH aplicado no reator UF-2 na Fase 2 provavelmente favoreceu a manutenção de maiores concentrações de lodo não somente pelo menor arraste, mas também por minimizar problemas de ordem cinética, como indicado pela maior remoção de sacarose nestas condições (Figura 5.13).

A remoção média de sacarose no reator UF-2 (Fase 2) foi de 81%, enquanto que nos reatores FB, UG e UF-1 foi de 64%, 67% e 56%, respectivamente. Porém, como a carga orgânica aplicada no reator UF-2 foi menor, as velocidades de remoção de sacarose foram próximas (em mmol de sacarose removida por litro por hora): 2,22 (FB), 2,38 (UG), 1,91 (UF-1) e 2,16 (UF-2 (Fase 2)). Desta forma, o aumento substancial da PVH observado no reator UF-2 em sua fase estável foi devido principalmente à melhoria no rendimento de H_2 (velocidade de remoção de sacarose (mmol $sacarose_{removida}.L^{-1}.h^{-1}$) x HY ($mmolH_2.mmol^{-1}sacarose_{removida}$) = PVH ($mmolH_2.L^{-1}.h^{-1}$)). O rendimento médio passou de 1,50, 0,76, 1,19 $molH_2.mol^{-1}$ $sacarose_{removida}$ nos reatores FB, UG e UF-1, respectivamente, para 3,35 $molH_2.mol^{-1}$ $sacarose_{removida}$ no reator UF-2 (Fase 2), como pode ser visto na Figura 5.14. Conforme as análises estatísticas, o HY diferiu significativamente entre os reatores da Etapa 1 (Kruskall-Wallis ANOVA, $p = 0,002$); no entanto, a diferença entre os reatores FB e UF-1 não foi significativa (teste de comparações múltiplas, $p = 0,413$). O teste de Kolmogorov-Smirnov confirmou que o HY obtido no reator UF-2 (Fase 2) foi significativamente superior ao obtido nos reatores FB, UG e UF-1 ($p < 0,001$).

Figura 5.14 - Rendimento de hidrogênio



Calculou-se a razão molar entre a sacarose consumida (acidificada) e cada ácido produzido ([sacarose]/[ácido]) e a razão entre o H_2 produzido ou consumido e cada ácido produzido ([H_2]/[ácido]), por meio dos valores das concentrações de cada ácido analisado no efluente e as equações estequiométricas simplificadas de conversão da sacarose em ácidos e H_2, apresentadas a seguir (Reações 5.1-5.5):

$$Via\ lactato: 1C_{12}H_{22}O_{11} + 1H_2O = 4CH_3CH(OH)COO^- + 4H^+ \quad (5.1)$$

$$Via\ acetato\ ou\ formiato: \ 1C_{12}H_{22}O_{11} + 5H_2O = 4CH_3COO^- + 4H^+ + 4CO_2 + 8H_2 \quad (5.2)$$

*Na fermentação mista, a Equação 5.2 é a soma da reação de produção de acetato e formiato ($1C_{12}H_{22}O_{11} + 5H_2O = 4CHOO^- + 4CH_3COO^- + 8H^+ + 4H_2$) e da reação seguida de quebra do formiato ($4CHOO^- + 4H^+ = 4CO_2 + 4H_2$). Como no presente estudo a concentração de formiato no efluente foi ~ 0, para fins de cálculo, considerou-se somente a concentração de acetato.

$$Via\ propionato: 1C_{12}H_{22}O_{11} + 4H_2 = 4CH_3CH_2COO^- + 4H^+ + 3H_2O \quad (5.3)$$

$$Via\ butirato: 1C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H^+ + 4CO_2 + 4H_2 \quad (5.4)$$

$$Via\ valerato: 1C_{12}H_{22}O_{11} + 2H_2 = 2CH_3CH_2CH_2CH_2COO^- + 2H^+ + 2CO_2 + 3H_2O \quad (5.5)$$

Assim, a concentração de sacarose acidificada foi calculada como sendo a soma da concentração de sacarose acidificada por cada via, conforme se segue: sacarose acidificada (mmol sacarose/ L) = S (mmol sacarose/ mmol ácido) x concentração de ácido (mmol ácido/ L). Tem-se que S (em mmol sacarose/ mmol ácido) = 0,25 via lactato, 0,25 via acetato, 0,25 via propionato, 0,50 via butirato, e 0,50 via valerato. A percentagem de sacarose acidificada para cada ácido foi então

determinada pela razão entre a respectiva concentração calculada de sacarose acidificada e a soma das concentrações calculadas de sacarose acidificada para todos os ácidos.

Para determinar a porcentagem do rendimento de H_2 por cada via, considerou-se o rendimento máximo ou consumo por cada rota, conforme o seguinte cálculo: HY teórico (mmol H_2/ mmol $sacarose_{consumida}$) = H (mmolH_2/ mmol ácido) x concentração de ácido por concentração de sacarose consumida (mmol ácido.L^{-1}/ mmol $sacarose_{consumida}$.L^{-1}). Em que H (mmolH_2/ mmol ácido) = 0 via lactato, 2 via acetato e / ou formiato, -1 via propionato, 2 via butirato, e -1 via valerato. A porcentagem HY foi então calculada pela razão entre o HY teórico de cada ácido e a soma do HY teórico pelas vias do acetato e/ou formiato e do butirato.

A Tabela 5.2 mostra as concentrações de ácidos orgânicos e as porcentagens de sacarose acidificada e de rendimento de H_2 para cada um deles.

Tabela 5.2 - Ácidos orgânicos e respectivas porcentagens teóricas de sacarose acidificada e de rendimento de hidrogênio nos reatores acidogênicos

Parâmetro	Reator	lactato	formiato	acetato	propionato	butirato	valerato
média (dp) - mmol L^{-1}	FB	5,8 (±5,5)	0,2 (±0,2)	3,9 (±3,9)	1,8 (±3,0)	1,0 (±1,6)	0,6 (±0,5)
	UG	8,0 (±7,5)	0,1 (±0,1)	3,7 (±2,0)	4,3 (±5,7)	1,7 (±2,0)	0,5 (±0,4)
	UF-1	7,0 (±6,8)	0,1 (±0,1)	3,2 (±1,9)	2,2 (±3,2)	0,7 (±1,0)	0,6 (±0,4)
	UF-2 (Fase 2)	3,6 (±1,3)	0,2 (±0,1)	7,8 (±2,7)	1,1 (±0,6)	1,1 (±0,6)	0,4 (±0,2)
sacarose acidificada calculada (dp) - %	FB	42 (±33)	26 (±20)		11 (±17)	14 (±20)	7 (±5)
	UG	44 (±33)	20 (±10)		18 (±21)	14 (±12)	5 (±3)
	UF-1	44 (±32)	24 (±14)		16 (±22)	9 (±13)	7 (±4)
	UF-2 (Fase 2)	25 (±8)	50 (±7)		7 (±3)	14 (±4)	5 (±2)
HY calculado (dp) - %	FB	0 (±0)	74 (±26)		-13 (±28)	26 (±26)	-6 (±4)
	UG	0 (±0)	75 (±19)		-27 (±33)	25 (±19)	-5 (±3)
	UF-1	0 (±0)	81 (±19)		-25 (±38)	19 (±19)	-8 (±5)
	UF-2 (Fase 2)	0 (±0)	88 (±3)		-6 (±3)	12 (±3)	-2 (±1)

Pelas análises da composição dos ácidos orgânicos no efluente, é possível inferir que as alterações nas rotas metabólicas foram fundamentais para a obtenção do maior rendimento de H_2 no reator UF-2. Comparando-se a distribuição relativa dos ácidos orgânicos do reator UF-2 em seu período estável com a dos demais, observa-se que o aumento da produção e rendimento de hidrogênio foram acompanhados de redução da concentração de propionato e de valerato, os quais são produzidos com o consumo de H_2, e de ácido láctico, que envolve o consumo de NADH e piruvato (reduzindo o potencial de produção de H_2 por competição pelo substrato); ao mesmo tempo houve aumento expressivo da concentração de acetato (Tabela 5.2). Na via Clostridial, sabe-se que a rota do acetato é a que possui maior potencial de rendimento de H_2. Na via Enterobacterial, o acetato

pode ser produzido juntamente com o formiato, que por sua vez pode ser transformado em H_2 pela sua clivagem.

As mudanças nas rotas metabólicas favorecendo a produção e o rendimento de H_2 no reator UF-2 (Fase 2) provavelmente se devem a uma série de fatores. As maiores concentrações de SSV e a menor carga orgânica aplicada decorrentes do maior TDH resultaram em menor carga específica (ou relação alimento/microrganismo, ou carga biológica). Com isso, a eficiência na conversão do substrato é aumentada, o que de fato foi verificado pela maior remoção da sacarose.

A sobrecarga orgânica na Etapa 1 parece ter sido o principal fator responsável pelos menores rendimentos de H_2, levando à formação de altas concentrações de lactato. De acordo com Cohen et al. (1984), a via do lactato é energicamente menos favorável e sua formação durante a acidogênese está associada à elevada disponibilidade de substrato, como em condições de reduzidos TDH e elevadas COV. Assim, o aumento do TDH na Etapa 2, com a consequente redução da COV e aparentemente maior concentração de biomassa no reator UF-2, provavelmente resultou em menor acúmulo de intermediários da degradação do substrato nas células. Supõe-se que a menor concentração de NADH e a menor demanda da regeneração do NAD^+ na etapa da glicólise resultaram em menor produção de lactato, favorecendo as outras vias, como a do acetato, que resulta na formação de H_2. Se assim o for, a manutenção de cargas biológicas específicas adequadas tem um papel fundamental para a produção de H_2 nestas condições. Além da influência das rotas metabólicas sobre a produção de lactato, a abundância relativa de *Lactobacillus* também foi maior nos reatores da Etapa 1 (item 5.1.6).

As concentrações de butirato foram relativamente baixas e similares em todos os reatores, sugerindo que a atividade das bactérias produtoras de butirato não foi severamente afetada pelas condições operacionais. No reator UG observou-se uma maior concentração de propionato. Como a formação de propionato é pouco provável de ocorrer em ambientes muito ácidos (Wang et al., 2006), o arranjo das bactérias em grânulos, ao criar um ambiente menos sujeito a variações de pH do meio externo, provavelmente foi favorável à formação de propionato. Durante o período de instabilidade do reator UF-2 (Fase 1), observou-se que nos momentos de queda ou interrupção da vazão, a concentração de propionato aumentou. Provavelmente a menor velocidade ascensional do líquido e o maior TDH resultaram em menor eficiência de transferência do H_2 para a fase gasosa e maior contato dos microrganismos devido à sua sedimentação, favorecendo o consumo de H_2 para a produção de propionato.

Os percentuais de acidificação da sacarose e de rendimento de H_2 apresentados na Tabela 5.2 são utilizados, sobretudo, para fins de comparação entre os reatores. A média da concentração total da sacarose acidificada correspondeu a 55%, 66%, 64% e 39% da concentração total de sacarose consumida nos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2, respectivamente. Os menores valores de concentrações de sacarose acidificada, calculados a partir das concentrações de ácidos no efluente, em relação aos valores de concentrações de sacarose consumida, calculados diretamente pelas concentrações de sacarose no afluente e efluente, podem ser em razão da ocorrência de reações metabólicas em que se formam outros produtos diferentes dos ácidos analisados, do consumo da sacarose para a formação de novas células bacterianas, pela conversão dos ácidos produzidos em outros compostos ao longo do comprimento do reator, e por erros nas técnicas de quantificação.

Assim como para o cálculo da sacarose acidificada, o HY calculado nem sempre foi equivalente ao HY medido. A média do HY calculado nos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 foi equivalente a 1,00, 0,78, 0,85 e 1,62 $mmolH_2.mmol^{-1}sacarose_{consumida}$, respectivamente, o que correspondeu a 67%, 103%, 71% e 48% do HY medido, respectivamente. Além dos possíveis erros de quantificação, levantou-se outras razões para tal fato. Quando o HY calculado foi maior que o HY medido, pode ter sido devido à consideração dos rendimentos máximos para cada via, o que não ocorre muitas vezes, seja pela inibição de algumas rotas ou pela coexistência de outras rotas levando aos mesmos ácidos. O HY calculado menor que o medido, por sua vez, pode ter sido devido à conversão dos ácidos produzidos em outros compostos ao longo do reator e, principalmente, à existência de outras rotas produtoras de H_2 não levadas em consideração.

As concentrações de etanol foram analisadas somente no efluente do reator UF-2. Estas análises seriam inicialmente realizadas por HPLC. Entretanto, foram constatados problemas técnicos no equipamento para a medição de etanol. Assim, esta análise teve que ser realizada por CG. Entretanto, como este problema foi constatado após a finalização da Etapa 1, não havia mais amostras de efluente dos reatores FB, UG e UF-1. No efluente do reator UF-2, conforme os dados do CG, a concentração média de etanol foi de 10,8 ± 5,4 $mmol.L^{-1}$. No balanço da DQO solúvel do efluente, a DQO do etanol correspondeu a 27%, enquanto a DQO dos ácidos analisados e da sacarose remanescente corresponderam a 33% e 24%, respectivamente. No efluente dos reatores da Etapa 1, a DQO dos ácidos e a DQO da sacarose remanescente corresponderam a uma fração maior, equivalentes a, respectivamente, 33% e 41% no reator FB, 45% e 37% no reator UG, e 32% e 53% no reator UF-1. Assim, pelo balanço de DQO, infere-se que as concentrações de etanol nos reatores da Etapa 1 não foram tão elevadas quanto no reator UF-2.

A princípio não era de se esperar tão altas concentrações de etanol no efluente do reator UF-2, uma vez que o etanol é um composto mais reduzido do que os ácidos e a sua formação geralmente está associada a reduções no rendimento de hidrogênio por fermentação. Entretanto, são propostas algumas rotas metabólicas de produção concomitante de etanol e H_2 (Xu et al., 2008; Lee et al., 2009). A Reação 5.6 apresenta a reação bioquímica proposta por Hwang et al.(2004) para a conversão bacteriana de glicose a etanol, acetato e H_2. Apesar de a via de produção concomitante de acetato e etanol ter um menor HY (2 molH_2.mol^{-1}hexose) em relação à via do acetato (4 molH_2.mol^{-1}hexose, Reação 5.2), a consideração dessa reação não mudaria os valores dos percentuais de HY apresentados na Tabela 5.2 (H = 2 mmolH_2.mmol^{-1}acetato). Entretanto, o percentual de sacarose acidificada seria maior para a via do acetato (S = 0,50 mmol sacarose.mmol^{-1}acetato). No entanto, como o etanol não foi analisado no efluente dos demais reatores, não foi possível fazer as estimativas para uma análise comparativa. A presença de etanol no efluente está em acordo com os resultados obtidos nas análises de sequenciamento e metagenômica *shotgun* (itens 5.1.6 e 5.1.7), que revelaram elevada abundância relativa de bactérias afiliadas a *Ethanoligenens harbinense* no reator UF-2.

$$Via\ etanol\ e\ acetato: C_6H_{12}O_6 + H_2O = CH_3CH_2OH + CH_3COO^- + H^+ + 2H_2 + 2CO_2 \qquad (5.6)$$

5.1.6 Composição microbiana dos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2

Foram obtidas 123838 sequências parciais do gene 16S rDNA, das quais, nos reatores, 94-99% foram atribuídas ao Filo Firmicutes, enquanto que no inóculo esse valor foi de 17%. As sequências atribuídas ao domínio Archaea foram encontradas em uma abundância de 9,6% no inóculo e de menos de 0,1% nos reatores, confirmando que as condições de operação obtidas dispensam um pré-tratamento para remoção de microrganismos metanogênicos. Tomando como base a unidade taxonômica operacional (OTU), o índice de diversidade de Shannon reduziu de 4,0 no inóculo para 1,2, 1,3, 1,4 e 0,7 nos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2, respectivamente, ao final da operação. As condições ambientais estabelecidas extremas, ressaltando-se os baixos valores de pH, certamente contribuíram para a redução da diversidade microbiana. Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados da abundância relativa das principais sequências encontradas. Aquelas que foram encontradas nos reatores com abundância igual ou superior a 1,0% são também apresentadas em uma árvore filogenética (Figura 5.15).

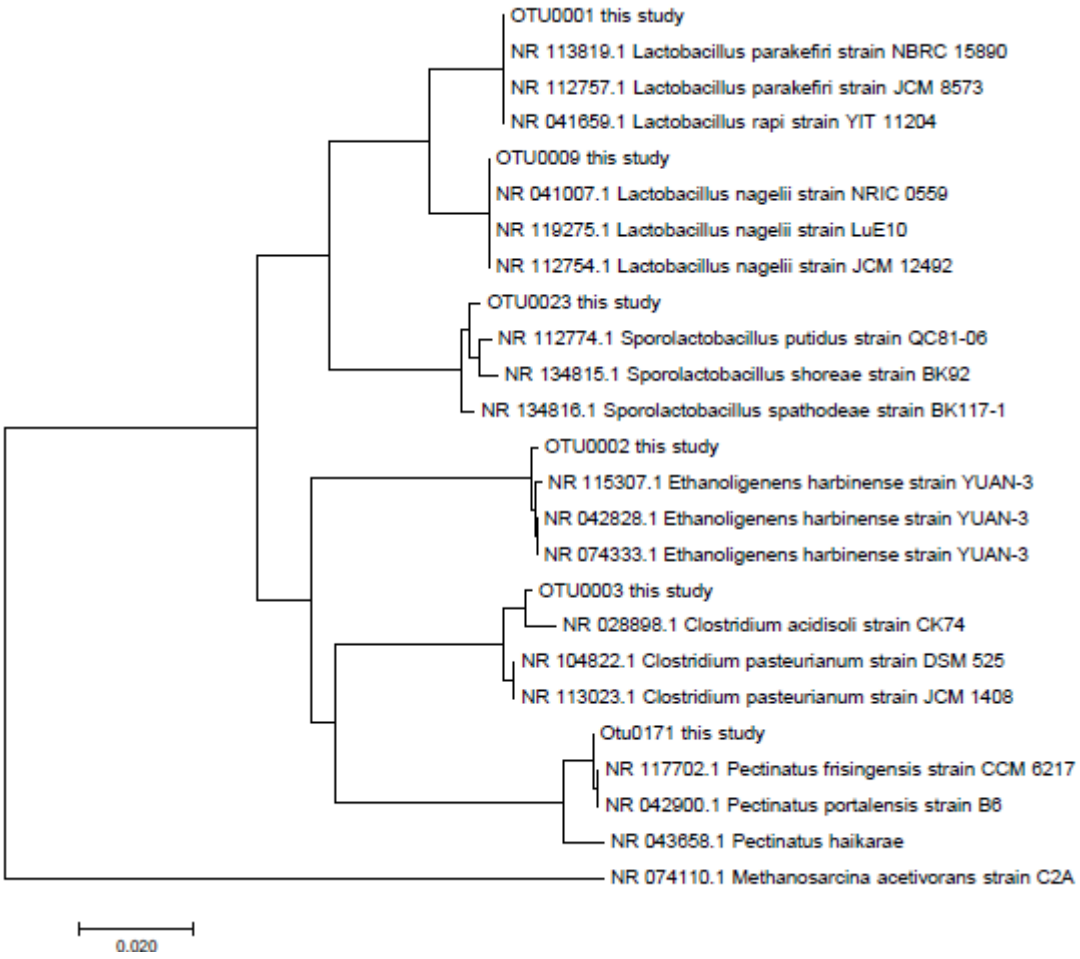
Tabela 5.3 - Sequências do 16S rDNA (região V4-5) com abundância > 1% nos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2 e > 5% no inóculo, classificadas usando o SINA (v1.2.11)

Domínio	OTU	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Inóculo*	FB	UG	UF-1	UF-2
Bacteria	OTU0002	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	*Ethanoligenens*	0%	40%	43%	41%	81%
	OTU0003	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	*unclassified*	0%	31%	31%	35%	15%
	OTU0009	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	*Lactobacillus*	0%	27%	20%	13%	0%
	OTU0023	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	*Sporolactobacillus*	0%	0%	3%	2%	1%
	OTU0001	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	*unclassified*	0%	0%	0%	7%	0%
	OTU0171	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	*Pectinatus*	0%	0%	0%	0%	1%
	OTU0008	Bacteroidetes	vadinHA17	unclassified	unclassified	*unclassified*	16%	0%	0%	0%	0%
	OTU0014	Bacteroidetes	vadinHA17	unclassified	unclassified	*unclassified*	6%	0%	0%	0%	0%
	OTU0146	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family XI	*Tissierella*	5%	0%	0%	0%	0%
Archaea	Otu002	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	*Methanosaeta*	85%	0%	0%	0%	0%
	Otu004	Euryarchaeota	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobacterium	*Methanobacterium*	5%	0%	0%	0%	0%

*No inóculo, do total de sequências, o domínio Bacteria representou 90,4% e o domínio Archaea 9,6%.

A classe Clostridia foi a mais abundante, seguida da classe Bacilli. Nos reatores da Etapa 1, Clostridia e Bacilli representaram cerca de 74% e 23% das sequências, respectivamente, e no reator UF-2, cerca de 99% e 1%, respectivamente. Apenas duas sequências, OTU0002 e OTU0003, apresentaram abundância relativa superior a 70% (Tabela 5.3). O alinhamento da sequência da OTU0002 na base de dados BLAST revelou 99% de identidade com a bactéria *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3. Já a OTU0003 apresentou 98% de identidade com a bactéria *Clostridium acidisoli* (*Figura 5.16*). Conforme reportado na literatura, *E. harbinense* e *C. acidisoli* são capazes de crescer e produzir hidrogênio em ambiente de pH muito baixo (< 4,0) (Kuhner et al., 2000; Xing et al., 2008; Carosia et al., 2017; Zhao et al., 2017). No entanto, até então, nunca havia sido demonstrado esta capacidade em ambientes com pH inferior a 3,0.

Figura 5.15 - Árvore filogenética baseada nas sequências do 16S rDNA encontradas em abundância >1,0% nos reatores acidogênicos



A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas proporções das distâncias evolutivas. Houve um total de 373 posições no conjunto de dados final.
Grupo externo: *Methanosarcina acetivorans*.

Apesar da estrutura microbiana ter sido bastante similar entre os reatores da Etapa 1, não se pode concluir que o mecanismo de retenção da biomassa não tem influência sobre a composição microbiana, pois as amostras de lodo foram retiradas ao final da operação, quando os reatores já estavam mais semelhantes entre si. Conforme discutido no item 5.1.2, uma grande parte da biomassa cresceu de forma suspensa, formando flocos, não somente no reator UF-1, mas também nos reatores FB e UG. No reator UF-2 é notável a maior abundância relativa de bactérias classificadas como *E. harbinense*, correspondendo a 81%. Por este resultado, infere-se que a *E. harbinense* foi primordial para o bom desempenho do reator UF-2.

Cabe uma ressalva de que os dados de abundância relativa devem ser interpretados com cautela, considerando que a técnica de sequenciamento do 16S é sujeita a muitos erros de quantificação (Haas et al., 2011), que o grau de eficiência da extração do DNA pode ter grande interferência nos resultados, e que os microrganismos identificados podem não estar necessariamente ativos. Enquanto a maioria das bactérias do gênero *Clostridium* é capaz de esporular, incluindo *C. acidisoli* (Kuhner et al., 2000), bactérias do gênero *Ethanoligenens* não são (Xing et al., 2006). Logo, a elevada abundância relativa de *Clostridium* nos reatores da Etapa 1 não significa que estas bactérias estavam ativas na mesma proporção. Além disso, salienta-se que a abundância absoluta de cada microrganismo muito provavelmente também interferiu nos resultados, como indicado pela maior produção e rendimento de H_2 associadas ao maior consumo de sacarose (item 5.1.5).

A bactéria *C. acidisoli* foi isolada primeiramente de solo de turfa ácido (pH ~ 3,0). Em laboratório, observou-se crescimento na faixa de pH de 3,6 a 6,9, em temperaturas de 5 a 37°C, sendo a faixa ótima entre 25 e 30°C (Kuhner et al., 2000). Em valores de pH de 4,0, 5,5 e 6,5, pela fermentação da glicose produziu-se lactato, acetato, butirato, H_2 e CO_2. No pH de 5,5, as concentrações finais de lactato, acetato e butirato foram de 3,0, 4,7 e 5,3 $mmol.L^{-1}$, respectivamente, e o HY foi de aproximadamente 1,8 $mmolH_2.mmol^{-1}glicose_{removida}$. Portanto, em relação à composição dos ácidos orgânicos, a proporção de butirato no estudo de Kuhner et al. (2000) foi bem maior do que no presente estudo (Tabela 5.2). Lee et al. (2009), estudando produção de H_2 por fermentação em reatores em batelada com pH final de 3,5, encontraram grande abundância de uma espécie afiliada ao *Clostridium sp*. HPB-16, que é uma espécie filogeneticamente próxima a *C. acidisoli*. Acetato e butirato foram os produtos predominantes na fase líquida. Segundo os autores, o hidrogênio foi formado pela via da descarboxilação do piruvato pela ferredoxina-hidrogenase, que é uma via comum de formação de H_2 por bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Ethanoligenens*.

E. harbinense YUAN-3 foi isolada de lodo de tratamento anaeróbio de melaço, por Xing et al. (2006). Os autores observaram crescimento em cultivo em pH na faixa de 3,5 a 9,0 e em

temperatura na faixa de 20 a 44°C, em que os valores ótimos para o crescimento foram de pH de 4,5 a 5,0, e temperatura de 35°C. Os produtos finais da fermentação da glicose foram acetato, etanol, H_2 e CO_2. A 35°C, obteve-se um rendimento de hidrogênio de até 2,8 molH_2.mol^{-1}glicose, juntamente com a produção de 1,1 mol de etanol e 0,7 mol de acetato por mol de glicose. No reator UF-2, o rendimento médio de etanol foi de 1,1 mol por mol de sacarose (= 0,6 mol por mol de hexose) e de acetato foi de 0,8 mol por mol de sacarose (= 0,4 mol por mol de hexose). É natural que haja diferenças nos rendimentos de etanol e acetato, levando em consideração que o reator UF-2 operou de modo contínuo, tinha uma microbiota mista, o que significa que muitos outras rotas metabólicas eram possíveis e, além disso, o lactato foi produzido em quantidades relativamente altas. No entanto, a proporção molar de etanol e acetato foi semelhante no reator UF-2 (= 1,4 etanol: 1 acetato) e no estudo de Xing et al. (2006) (= 1,6 etanol: 1 acetato). Como o rendimento máximo de hidrogênio obtido com a cultura pura de *E. harbinense* (Xing et al., 2006) foi maior que o rendimento teórico descrito na Reação 5.6 (item 5.1.5), é provável que esta bactéria seja capaz de produzir hidrogênio por outras rotas. O mesmo vale para *Ethanoligenens harbinense* strain B49, para a qual se relatou HY maior que 2,0 molH_2.mol^{-1}glicose no estudo de Xu et al. (2008). Os autores sugeriram a descarboxilação oxidativa do piruvato como a possível via de produção de H_2, conforme também descrito por Lee et al. (2009). No entanto, outras possíveis vias de produção concomitante de etanol e H_2 ainda não foram elucidadas (Zhao et al., 2017).

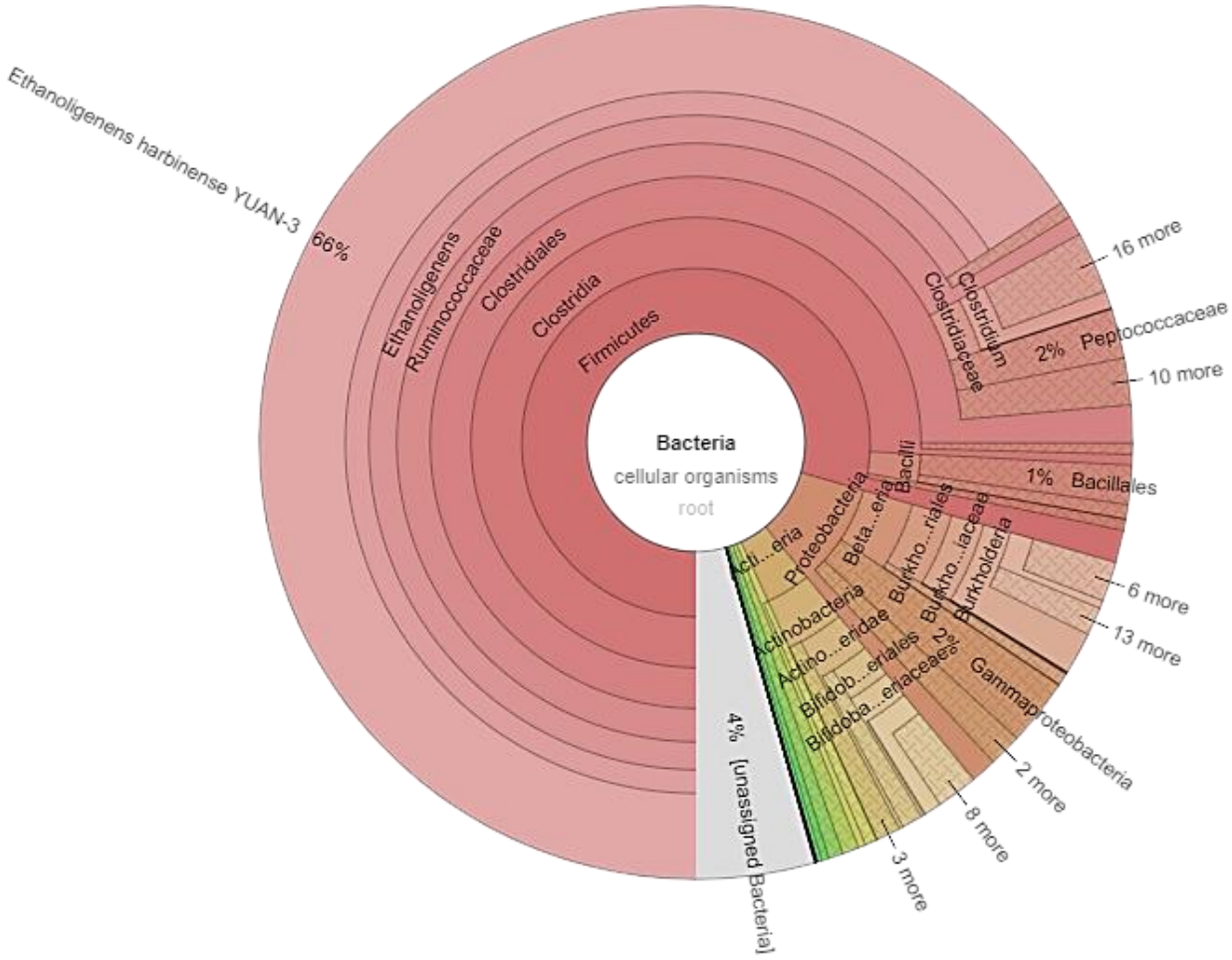
A proporção de bactérias do gênero *Lactobacillus* variou de 20 a 27% nos reatores da Etapa 1, e foi abaixo de 1% no reator UF-2. A sequência mais representativa de *Lactobacillus* foi afiliada à espécie *Lactobacillus nagelli* (Figura 5.16), que é reconhecida por fermentar glicose a ácido láctico, sem a produção de gases (Edwards et al., 2000). A excreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) por bactérias do ácido láctico protege-as contra ambientes hostis e favorece a formação de flocos e biofilme (Rafrafi et al., 2013), o que pode ter implicado em vantagens competitivas em condições de menores TDH. Portanto, é provável que a presença de *Lactobacillus* nos reatores FB, UG e UF-1 tenha contribuído para a maior produção de ácido lático e menor de hidrogênio, devido à redução da disponibilidade de piruvato para as vias produtoras de H_2. No entanto, as mudanças nas rotas metabólicas das bactérias predominantes provavelmente também contribuíram para as diferenças observadas, uma vez que tanto membros do gênero *Clostridium* (Kuhner et al., 2000) quanto do gênero *Ethanoligenens* (Xu et al., 2008) têm capacidade de produzir lactato à partir da fermentação da glicose.

A presença de *Pectinatus sp*. (OTU0171) no reator UF-2 provavelmente está associada com a fermentação alcoólica, sendo este gênero normalmente encontrado em processos de deterioração de cerveja (Chihib & Tholozan, 1999).

5.1.7 Inferência das rotas metabólicas pela metagenômica *shotgun*

A partir de uma mesma amostra do lodo do reator UF-2 ao final da operação, extraiu-se DNA para análise do sequenciamento do 16S rDNA (item 5.1.6) e para a análise de metagenômica *shotgun*. Em relação à taxonomia a partir das sequências geradas pela metagenômica *shotgun*, uma maior diversidade bacteriana em relação ao sequenciamento do 16S foi demonstrada pela classificação Kraken. Por esta classificação, em nível de gênero, 66% das bactérias pertenciam a *Ethanoligenens*, 4% a *Burkholderia*, 3% a *Clostridium*, 2% a *Bifidobacterium* e 1% a *Alteromonas*. Os demais gêneros possuíam, cada, menos de 1% da abundância relativa, e 4% das sequências não foram classificadas. A Figura 5.16 mostra os resultados da classificação Kraken por meio de um gráfico Krona.

Figura 5.16 - Classificação taxonômica bacteriana Kraken do reator UF-2



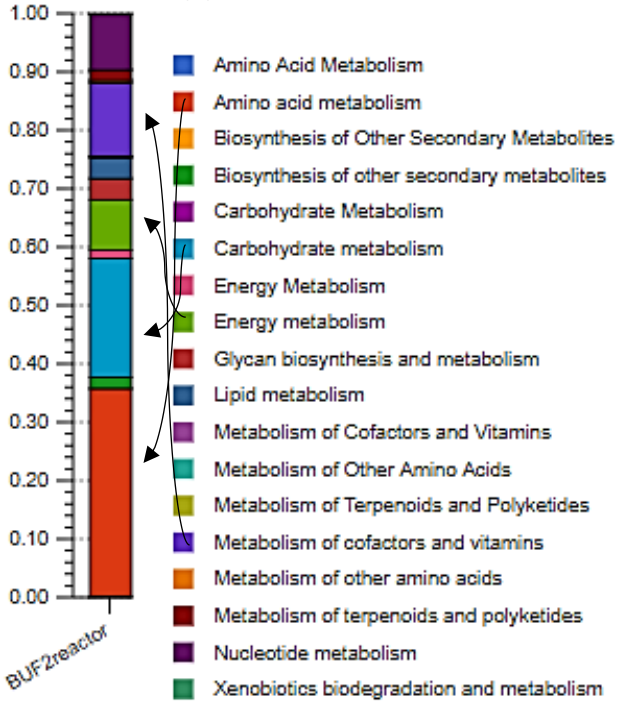
Fonte: https://molecular.egnyte.com/dl/5Qt7b6bHAJ

Comparando-se aos resultados do sequenciamento da região v4-5 do rDNA 16S pelo Silva v1.2.11 (Tabela 5.3), verifica-se que a sequência afiliada a *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 foi predominante em todos os casos, embora os percentuais sejam diferentes. Em relação à abundância de *Clostridium*, esta foi muito menor pela classificação Kraken. Em nível de espécies do gênero *Clostridium*, 22% das sequências não foram identificadas, e *C. pasteurianum* foi a espécie predominante do gênero (15%). No presente estudo, além da classificação taxonômica pelo Kraken, as sequências geradas pela metagenômica *shotgun* foram analisadas no sistema MG-RAST, o qual possui diversos bancos de dados, que permitem a análise dos resultados conforme o objetivo (taxonomia, função, RNA). Com base na classificação Silva SSU do MG-RAST, 76% das sequências pertenciam a *Ethanoligenens* (todas da espécie *E. harbinense*), 7% a *Anaerotruncus*, 6% a *Clostridium*, 2% a *Bifidobacterium*, 2% a *Ruminococcus*, e 1% a *Faecalibacterium*, sendo os demais gêneros com abundância <1%. Exceto *Clostridium* e *Bifidobacterium*, todos estes gêneros pertencem à família Ruminococcaceae. Verifica-se, portanto, que estes resultados foram similares aos obtidos pelo sequenciamento do 16S rDNA. Por outro lado, utilizando outras bases de dados no sistema MG-RAST, como a RefSeq, resultados bem diferentes foram obtidos. Neste caso, os gêneros predominantes foram: *Ethanoligenens* (37%), *Clostridium* (23%), *Bifidobacterium* (6%), *Bacillus* (2%) e *Desulfitobacterium* (2%). No entanto, para classificação taxonômica dos microrganismos pelas sequências geradas por metagenômica *shotgun*, o MG-RAST ainda apresenta muitas falhas (Randle-Boggis et al., 2016; Lindgreen et al., 2016) e o Kraken demonstra superioridade (Lindgreen et al., 2016). Portanto, os resultados indicam que a bactéria altamente predominante era afiliada a *E. harbinense*, mas não é possível afirmar qual a proporção exata. Provavelmente houve seleção de *E. harbinense* pelas condições extremas de baixo pH no meio, uma vez que *Ethanoligenens* tem capacidade de crescimento em ambientes acidófilos e de autoagregação em reatores contínuos, possuindo vantagem sobre *Clostridium* em baixo pH para produção de H_2 (Zhao et al., 2010). Acredita-se que as demais bactérias exerceram um papel secundário no desempenho do reator UF-2.

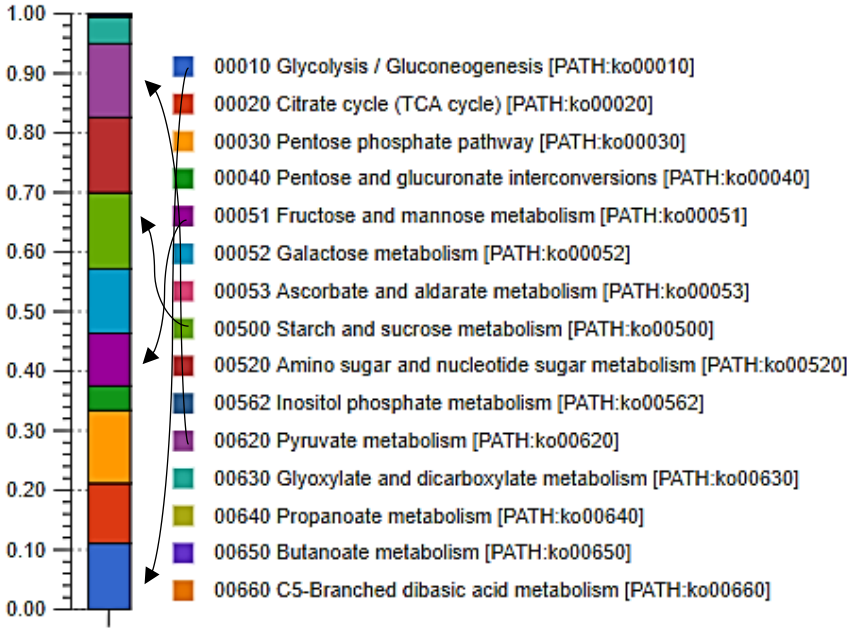
Utilizando-se a base de dados KEGG Orthologues (KO), o potencial genético em relação às funções metabólicas foi inferido (Figura 5.17). As outras bases de dados disponibilizadas no sistema MG-RAST para classificação do perfil metabólico e das enzimas – Subsystem, COG e NOG – também foram consultadas. Porém, a preferência foi pela KO devido ao maior número de sequências classificadas e possibilidade de ativar a extensão dos mapas metabólicos KEGG para verificar as enzimas encontradas para cada rota metabólica.

Figura 5.17 - Categorias funcionais das sequências metagenômicas KO do reator UF-2

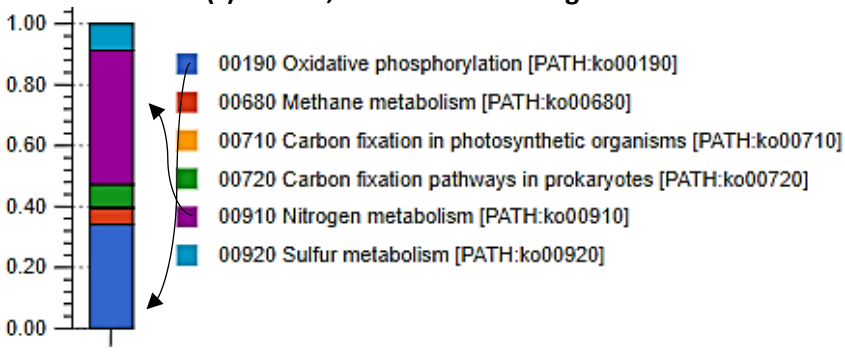
(a) Nível 2, Metabolismo



(b) Nível 3, Metabolismo de carboidratos



(c) Nível 3, Metabolismo energético

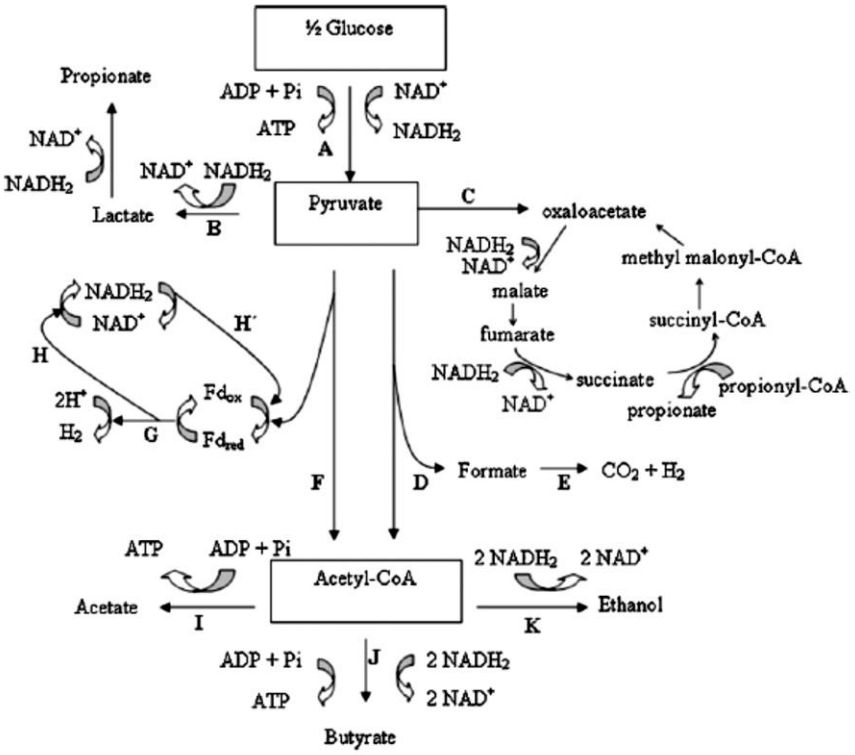


Fonte: MG-RAST, projeto BUF-2reactor

Verifica-se que as principais funções potenciais da comunidade microbiana eram relacionadas ao metabolismo de aminoácidos (35%) e de carboidratos (20%). O metabolismo energético correspondeu a 9% (Figura 5.17a). Tendo em vista a elucidação das possíveis rotas metabólicas que poderiam interferir na produção de hidrogênio, no presente estudo foram focadas as rotas do metabolismo de carboidratos e do metabolismo energético (Figura 5.17b,c).

Com base nos resultados da classificação taxonômica (Silva e Kraken) e das análises de monitoramento, as rotas-alvo foram da fermentação clostridial, com a formação dos principais produtos encontrados (acetato, etanol, lactato e H_2), e as enzimas-alvo foram aquelas descritas sobretudo para *E. harbinense*. Lee et al. (2009) consideram a via da descarboxilação do piruvato pela ferredoxina-hidrogenase como a principal via para a produção de H_2 para *Clostridium* e *Ethanoligenens*, assinalada pelas letras F e G na Figura 5.18. Portanto, essa via foi considerada prioritária para a análise dos resultados das sequências metagenômicas *shotgun*.

Figura 5.18 - Vias metabólicas de produção de hidrogênio comuns para *Clostridium* e *Ethanoligenens* (F, G)



Fonte: Lee et al. (2009)

Considerando *E. harbinense* como a principal bactéria da comunidade, foram utilizadas como referências as rotas metabólicas com as enzimas assinaladas identificadas no genoma de *E. harbinense*, disponíveis na plataforma KEGG (www.kegg.jp), e o modelo genômico proposto por Castro et al. (2013). Também foram consultadas na plataforma KEGG as enzimas presentes em

Clostridium pasteurianum, por esta espécie ser filogeneticamente próxima a *C. acidisoli* (Figura 5.15), que apareceu nos resultados do sequenciamento do 16S (as informações do genoma de *C. acidisoli* não estão disponíveis nesta plataforma). Assim, foram consideradas as seguintes enzimas como alvo, apresentadas conforme o código de hierarquia KEGG (dígito EC seguido do número) e as reações envolvidas (não balanceadas, disponível na plataforma KEGG (http://www.genome.jp):

- Piruvato oxidorredutase (EC 1.2.7.1). Importante na formação de ferredoxina reduzida, pela conversão de piruvato a acetil-CoA e CO_2: piruvato + CoA + ferredoxina oxidada ↔ acetil-CoA + CO_2 + ferredoxina reduzida + H^+.

- Piruvato formiato liase (EC 2.3.1.54). Outro caminho de conversão do piruvato a acetil-CoA, com a formação de formiato: piruvato + CoA ↔ acetil-CoA + formiato.

- Lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27). Conversão do piruvato a lactato (inibição da produção de H_2 por competição de substrato): piruvato + NADH + H^+ ↔ lactato + NAD^+.

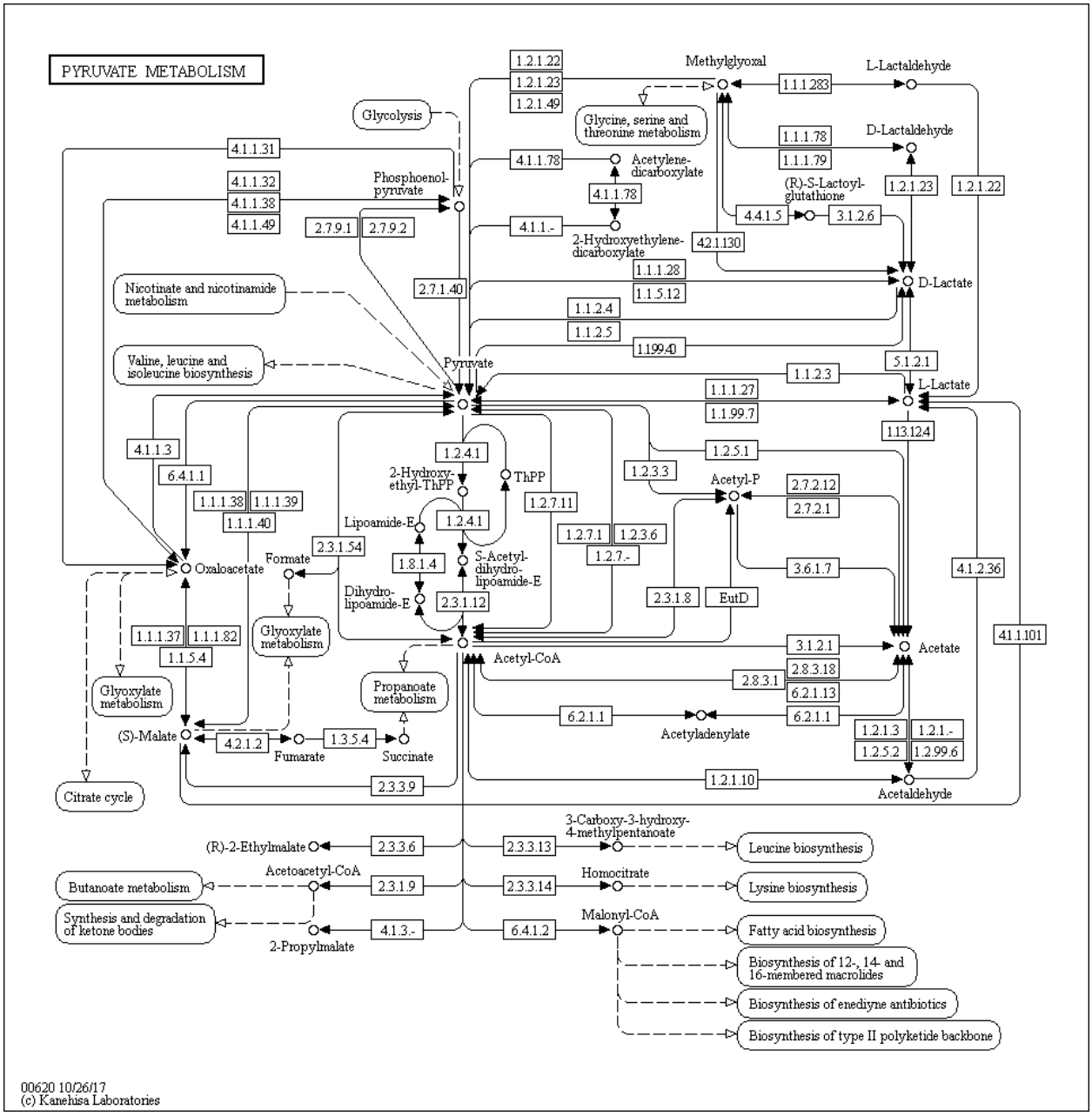
- Álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1). Formação de etanol: álcool primário + NAD^+ ↔ aldeído + NADH + H^+ / álcool secundário + NAD^+ ↔ cetona + NADH + H^+.

- Acetato quinase (EC 2.7.2.1). Formação de acetato: acetil-fosfato + ADP ↔ acetato + ATP.

- FeFe-hidrogenase (EC 1.6.5.3, a partir de 2018: EC 7.1.1.2). Formação de hidrogênio molecular a partir da ferredoxina reduzida: H^+ + ferredoxina reduzida ↔ H_2 + ferredoxina oxidada.

Para ilustração, a Figura 5.19 mostra as rotas metabólicas envolvidas no metabolismo do piruvato, com a referência hierárquica EC das enzimas envolvidas.

Figura 5.19 - Metabolismo do piruvato



Fonte: KEGG Reference Pathway

Na base KO, foram identificadas 1373307 sequências proteicas. Em relação à enzima piruvato oxidorredutase (PFOR, EC 1.2.7.1), que seria a principal responsável pela formação de acetil-CoA, CO_2 e ferredoxina reduzida nas rotas de produção de H_2, apenas quatro sequências foram atribuídas (duas da subunidade β, uma da subunidade α e uma da subunidade δ). Como os genes correspondentes à PFOR estão presentes no genoma tanto de *E. harbinense* quanto de *C. pasteurianum*, conforme verificado na plataforma KEGG, e têm importante atuação na formação de ferrodoxina reduzida na via clostridial (Gheshlaghi et al., 2009), era esperado encontrar maior abundância de sequências atribuídas a esta enzima. Assim, foram consultadas as outras bases de

dados no MG-RAST para verificação. Na base Subsystems, das 1069073 sequências proteicas identificadas, o resultado foi equivalente (quatro sequências no total). Já na base de dados COG, das 962673 sequências proteicas identificadas, 1066 foram atribuídas à PFOR ou a outra oxoácido ferredoxina redutase (*pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and related 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases*) subunidade γ (mais 1021 à subunidade α, 257 à subunidade β, e uma à subunidade δ). Entretanto, na base de dados COG não é especificada a enzima. Assim, acredita-se que as sequências encontradas na base COG podem pertencer também à enzima 2-oxoglutarato ferredoxina oxidoredutase (KGOR, EC 1.2.7.3), que é da mesma família da enzima PFOR, caracterizada por 2-oxoácido oxidoredutases. Na base de dados KO, adotada preferencialmente nesta análise, foram encontradas 1845 sequências atribuídas à KGOR referentes à subunidade α (mais 1397 à subunidade γ, 1369 à subunidade β, 518 à subunidade δ). A codificação da KGOR de fato é reportada para *E. harbinense*, mas, segundo Castro et al. (2013), a rota de redução da ferredoxina por esta enzima, pela reação de α-cetoglutarato a succinil-CoA, teria papel desprezível no suprimento de ferredoxina reduzida. Entretanto, consultando na plataforma KEGG o gene de codificação da PFOR em *E. harbinense*, Ethha_2733 (Castro et al., 2013), as enzimas correspondentes seriam EC 1.2.7.1 (PFOR) e EC 1.2.7.- (ou seja, outra enzima da mesma família, com uma proteína ferro-enxofre como aceptora). Portanto, estes resultados indicam que, no reator UF-2, o fornecimento de ferredoxina reduzida pode não ter sido pela PFOR, mas talvez pela KGOR ou outra enzima da mesma família. Porém, análises adicionais, consultas a outras plataformas e bases de dados, são necessárias para confirmar esta suposição.

Em relação à outra rota de conversão de piruvato a acetil-CoA, foram encontradas 3874 sequências relativas à enzima piruvato formiato liase (PFL, EC 2.3.1.54). Esta está presente no genoma de *E. harbinense* e de *C. pasteurianum*. Esta rota de conversão do piruvato não está acoplada à redução de ferredoxina. Somente poderia levar à produção de H_2 pela subsequente quebra do formiato em CO_2 e H_2. Porém, para tanto, seria necessário a presença do complexo formiato hidrogênio liase (FHL), do qual faz parte a enzima formiato desidrogenase (EC 1.2.1.2). Entretanto, raríssimas sequências atribuídas à formiato desidrogenase foram identificadas (36 sequências da subunidade α, sete da subunidade β, quatro da subunidade γ, e duas da subunidade γ). O complexo FHL tampouco está presente nas rotas de produção de H_2 por *Ethanoligenens* e *Clostridium* (Lee et al., 2009), mas sim pela fermentação ácida-mista ou enterobacterial (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

Outra via de conversão do piruvato é para lactato. Esta via tem a participação da enzima L-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27), que está presente no genoma de *E. harbinense* e *C. pasteurianum*. Foram encontradas 1286 sequências relativas a esta enzima na base de dados KO. Entretanto, também foram encontradas 1400 sequências relativas à enzima D-lactato desidrogenase (EC

1.1.1.28), que consta para *C. pasteurianum*, mas não no genoma de *E. harbinense* na base de dados KEGG. Este resultado pode ser um indicativo que a produção de lactato foi em parte devido a ação de outros microrganismos, diferentes da *E. harbinense*.

Sequências atribuídas a algumas enzimas que participam de outras vias de destinação do piruvato, encontradas em microrganismos que realizam fermentação homo e heteroláctica (bactérias do ácido láctico), como a piruvato desidrogenase (PDH, EC 1.2.4.1) e a piruvato oxidase (POX, EC 1.2.3.3) (Papadimitriou et al., 2016), foram encontradas em pequeno número (máx. de 126 sequências) em todas as bases de dados consultadas.

Em relação às vias de conversão do acetil-CoA, verificou-se a presença das enzimas-chave para formação de etanol e acetato, que foram os principais produtos da fase líquida, juntamente com o lactato. Em relação à enzima álcool desidrogenase (Adh, EC 1.1.1.1), que catalisa a formação de etanol a partir de um aldeído, foram atribuídas 1598 sequências. Além disso, outras 4106 sequências foram atribuídas à acetaldeído desidrogenase (Ald, EC 1.2.1.10) ou à Adh. A enzima acetaldeído desidrogenase também está na rota de formação de etanol, pela conversão de piruvato a acetaldeído. Devido ao conflito em relação ao número de sequências relacionadas à EC 1.2.1.10 ou EC 1.1.1.1, foi consultada também a base de dados Subsystems. Nesta foram atribuídas 2717 sequências à Adh, 1394 sequências à Ald, e 759 sequências a ambas as enzimas.

Já em relação às enzimas envolvidas na formação de acetato, na base de dados KO, 1495 sequências foram atribuídas à fosfato acetil transferase (EC 2.3.1.8), que catalisa a conversão de acetil-CoA a acetil-P, e 1990 sequências foram atribuídas à acetato quinase (EC 2.7.2.1), que atua na conversão de acetil-P a acetato. Quanto à enzima acetil-CoA sintetase (Acs, EC 6.2.1.1), que atua também na formação de acetato em outra via a partir do acetil-CoA, apenas 76 sequências foram encontradas. Verificou-se a ausência de sequências atribuídas à enzima CO-metilação acetil-CoA sintase (EC 2.3.1.169), que participa da via homoacetogênica, indicando que nas condições estabelecidas as bactérias homoacetogênicas foram inibidas.

Em relação às hidrogenases-alvo, a busca na literatura levou à conclusão que há escassez de informações sobre as hidrogenases de *E. harbinense* para uma busca efetiva nos resultados da análise de metagenômica *shotgun*, utilizando a plataforma KEGG. Castro et al. (2013) indicam que as hidrogenases de *E. harbinense* são identificadas pelos números EC 1.6.5.3 (gene Ethha_2293) e EC 1.12.1.4 (genes Ethha_2614-15-16), e descrevem a EC 1.6.5.3 como uma FeFe-hidrogenase. Conforme Zhao et al. (2010), a formação de H_2 por *E. harbinense* é principalmente catalisada por uma FeFe-hidrogenase. A enzima EC 1.6.5.3 (a partir de 2018: EC 7.1.1.2) é

formada por um complexo de várias subunidades, e o complexo é chamado NADH: ubiquinona redutase. Algumas de suas subunidades são descritas como hidrogenases, conforme pesquisado na plataforma KEGG. Na base de dados KO, 5661 sequências foram atribuídas à subunidade G, 4626 à subunidade F e 1228 à subunidade E desta enzima. Verificou-se também que genes que codificam algumas das subunidades da enzima EC 1.6.5.3 estão presentes nos genomas de *E. harbinense* e de *C. pasteurianum*. Em relação à hidrogenase bifurcativa EC 1.12.1.4, nas bases de dados KO e Subsystems, não foi atribuída nenhuma sequência à EC 1.12.1.4. Além disso, no genoma de *E. harbinense*, não foi encontrada esta enzima, sendo que os genes Ethha_2614-15-16 constam para a codificação da enzima EC 1.6.5.3, além do gene Ethha_2293. Também não consta a EC 1.12.1.4 no genoma de *C. pasteurianum*. Portanto, verifica-se informações truncadas em relação aos genes e respectivas hidrogenases de *E. harbinense* nas bases de dados e referências consultadas.

Na base de dados KO, a FeFe-hidrogenase EC 1.12.7.2, reportada para vários *Clostridium* inclusive *C. pasteurianum*, mas não para *E. harbinense*, possuía apenas 267 sequências atribuídas. Entretanto, os resultados obtidos na base de dados Subsystems foram bastante distintos. Foram encontradas 2613 sequências atribuídas à FeFe-hidrogenase EC 1.12.7.2, e 2533 sequências atribuídas à hidrogênio desidrogenase EC 1.12.1.2, enquanto na base de dados KO apenas uma sequência foi atribuída a esta última. A EC 1.12.1.2 não está presente nos genomas de *E. harbinense* e nem no de *C. pasteurianum*, conforme consulta na plataforma KEGG. Esta enzima atua na formação de H_2 com a oxidação do NADH. Porém, devido aos resultados divergentes entre as bases de dados, outras devem ser consultadas.

Consultando o genoma de *E. harbinense* na plataforma KEGG, verificou-se que os genes Ethha_0031 e Ethha_2695 codificam hidrogenases. Porém, não havia indicação de sequências na base de dados KO e nem de números na hierarquia EC para estas hidrogenases. Assim, foi consultada a base de dados COG, em que as enzimas são classificadas por categoria. Nesta, o maior número de sequências atribuídas a uma hidrogenase foi de 1350, referentes a uma FeFe-hidrogenase (*iron only hydrogenase large subunit, C-terminal domain*). Para verificar quais hidrogenases exatamente poderiam ser expressas nas condições estudadas, análises adicionais, como de metatranscriptômica e proteômica poderiam ser úteis.

Na base de dados KO, foram encontradas apenas cinco sequências atribuídas à enzima NADH-ferredoxina oxidorredutase (NFOR, EC 1.18.1.3), a qual atua na formação de ferredoxina reduzida pela oxidação do NADH e é extremamente sensível à pressão parcial de H_2 no meio (Sikora et al., 2013). Na base de dados Subsystems nenhuma sequência foi atribuída a esta enzima. Este resultado

sugere que a via de produção de H_2 pelo NADH acoplada à redução da ferredoxina pela NFOR, não teve papel relevante no reator UF-2, sendo o NADH em excesso, proveniente da glicólise, desviado para as rotas de produção de lactato e etanol, entre outros produtos mais reduzidos.

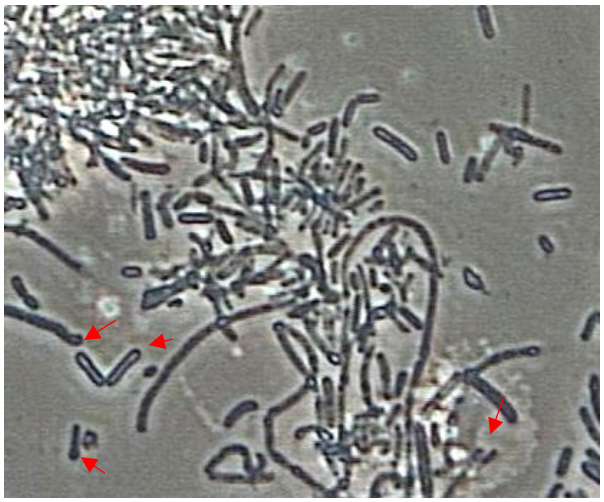
Considerando que no presente estudo o rendimento de H_2 real no reator UF-2 foi duas vezes maior do que o rendimento de H_2 calculado a partir dos ácidos formados (item 5.1.5), além de que outros trabalhos indicam maior rendimento de H_2 do que o teórico por *E. harbinense* (Xing et al., 2006; Xu et al., 2008), foram também especuladas outras possíveis rotas de produção de H_2. Os resultados sugerem que, no reator UF-2, a formação de H_2 pela via de quebra do formiato pelo complexo FHL e pela via da oxidação do NADH não foram relevantes, pelos motivos comentados acima. Uma das enzimas com maior número de sequências atribuídas foi a MoFe-nitrogenase EC 1.18.6.1, a qual é composta por duas proteínas: a dinitrogenase propriamente dita, com duas cadeias α e β, e a dinitrogênio redutase (Scott et al., 1992). Na base de dados KO, 12947 sequências foram atribuídas à cadeia α, 10892 à cadeia β, e 5526 à dinitrogênio redutase. Na base de dados Subsystems, foram 2763, 1513 e 1447 sequências atribuídas às cadeias α e β e à dinitrogênio redutase, respectivamente. Na base de dados COG, 15501 sequências foram atribuídas a ambas as cadeias e 2680 à dinitrogênio redutase. Embora a MoFe-nitrogenase seja associada tipicamente à fixação de N_2, com a formação de H_2 por uma reação dependente de ATP, atuando inclusive na formação de H_2 em bactérias fotossintéticas (Liang & Burris, 1988; Hallenbeck & Liu, 2016), na ausência de N_2 ela pode atuar como uma hidrogenase (Alberty, 1993; Rey et al., 2007). Entretanto, a expressão destas enzimas e a viabilidade termodinâmica destas reações nas condições estudadas requer uma investigação detalhada.

Cabe ressaltar que a as sequências metagenômicas são a partir do DNA e, portanto, esta análise não fornece informações sobre a expressão das enzimas referenciadas. Para tanto, seria necessário analisar o RNA transcrito das amostras, por uma análise de metatranscriptoma. Os resultados da metagenômica *shotgun* têm maior validade para avaliar a estrutura e o potencial genético da comunidade microbiana, sendo indicativos, mas não conclusivos das rotas metabólicas estabelecidas.

5.1.8 Análises microscópicas do lodo

O lodo proveniente do inóculo e dos reatores foi observado por microscopia óptica e de varredura. Nas Figuras 5.20 a 5.23 são mostradas as imagens de microscopia óptica do lodo dos reatores FB, UG, UF-1 e UF-2, respectivamente. As amostras de lodo foram retiradas durante a operação, do fundo, meio e topo dos reatores.

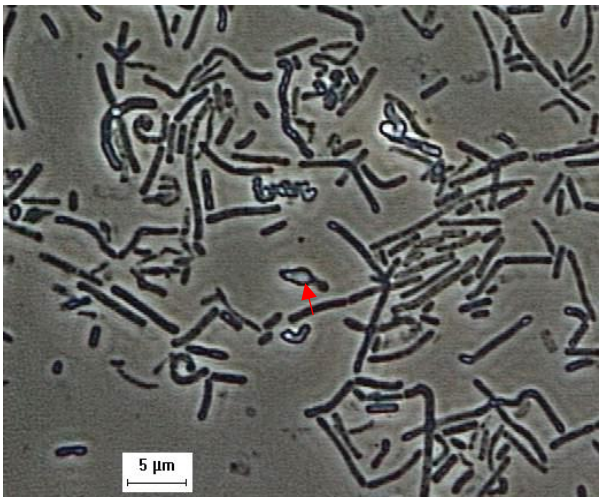
Figura 5.20 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator FB



(a) Predominância de bastonetes. Setas apontam esporos terminais.

(b) Predominância de bastonetes. Setas apontam bactérias espiraladas.

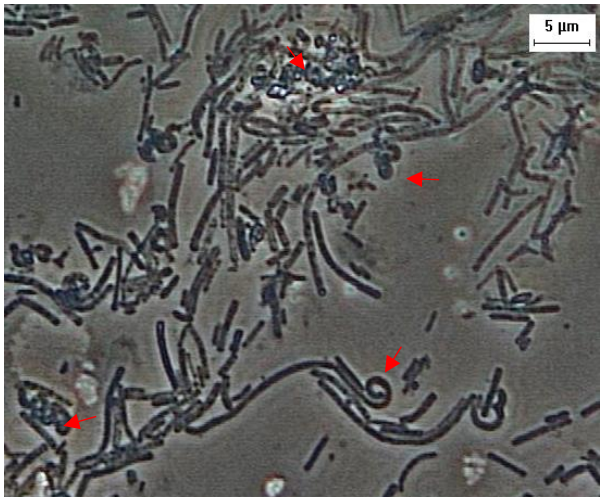
Figura 5.21 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator UG



(a) Predominância de bastonetes. Seta aponta estrutura semelhante a esporo.

(b) Setas apontam bactérias com formato semelhante a espiral e vibrião.

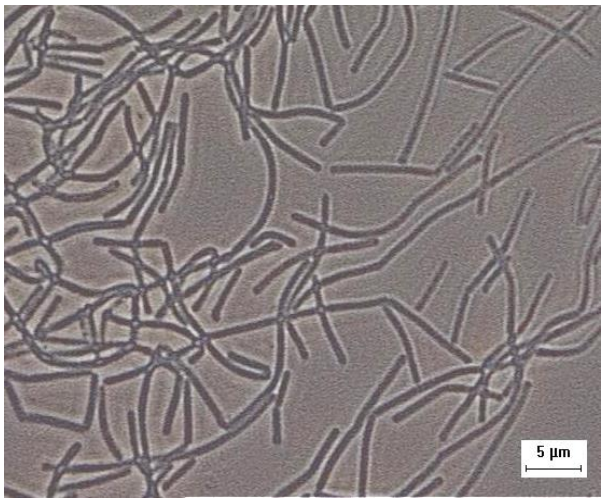
Figura 5.22 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator UF-1



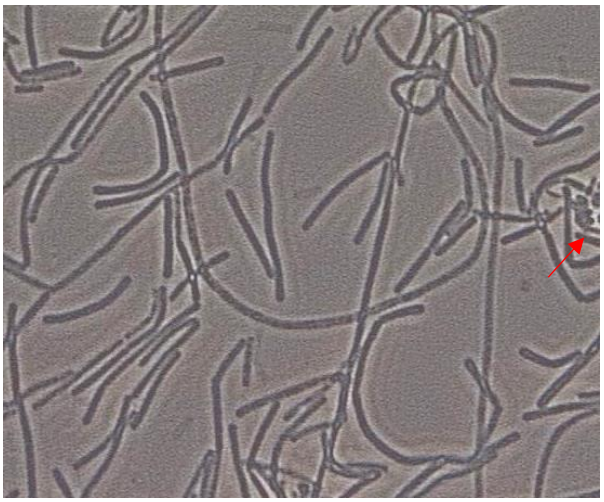
(a) Predominância de bastonetes. Setas apontam bactérias com formato espiralado ou curvo.

(b) Setas apontam bactérias com formato curvado e um possível *Clostridium*.

Figura 5.23 - Análises de microscopia óptica do lodo do reator UF-2



(a) Predominância de bastonetes em longas cadeias.

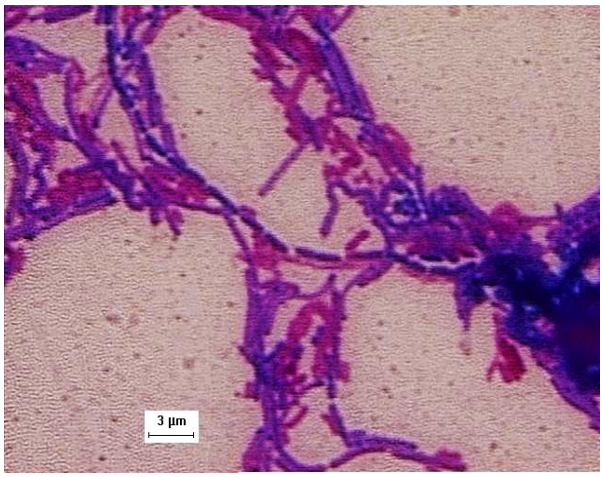


(a) Predominância de bastonetes. Seta aponta uma bactéria com formato espiralado.

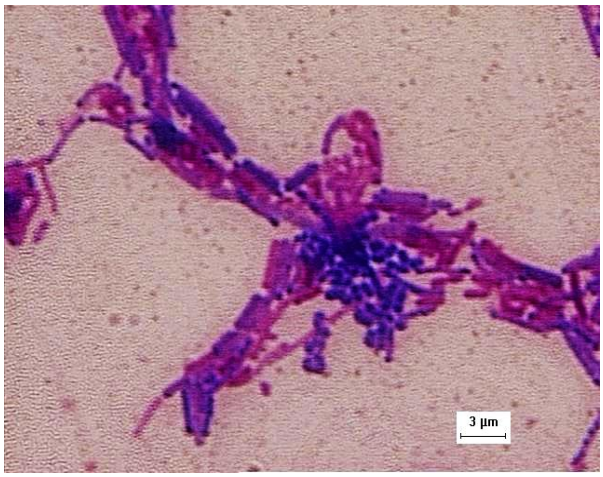
Observa-se a elevada predominância de bastonetes em todos os reatores, o que está em acordo com as análises de sequenciamento do 16S rDNA e da metagenômica shotgun, sendo esta a forma usual das bactérias dos gêneros identificadas predominantemente, *Ethanoligenens* (Xing et al., 2006) e *Clostridium* (Riley, 2012). As cadeias de bastonetes aparentavam ser mais longas nos reatores UASB floculentos, sobretudo no reator UF-2, formando grandes filamentos. Possivelmente, o maior TDH no reator UF-2 favoreceu a formação das cadeias mais longas e, com isso, o aumento da concentração celular no reator. Conforme os resultados de biologia molecular, a bactéria predominante no reator UF-2 era afiliada à espécie *E. harbinense*; entretanto, Xing et al. (2006) observaram apenas filamentos curtos desta bactéria, de até oito células. Talvez as diferenças sejam em decorrência da forma de cultivo (batelada vs. contínuo).

No lodo do reator UF-2 foi aplicada a técnica de Gram, conforme apresentado na Figura 5.24. As imagens correspondentes às letras “a”, “b”, “c”, “d” são do lodo no meio da operação, enquanto as imagens correspondentes às letras “e, “f” foram feitas ao final da operação.

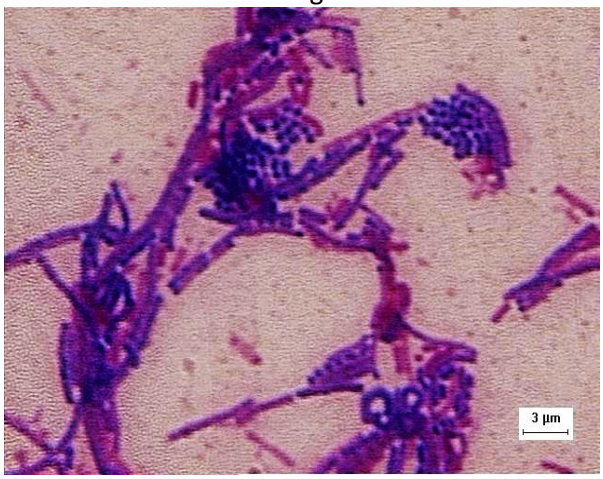
Figura 5.24 - Análises de Gram do lodo do reator UF-2



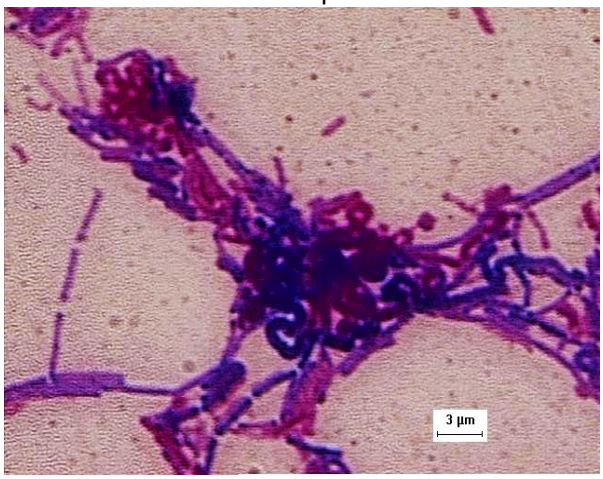
(a) Muitos bastonetes em cadeia, Gram-positivos e Gram-negativos.



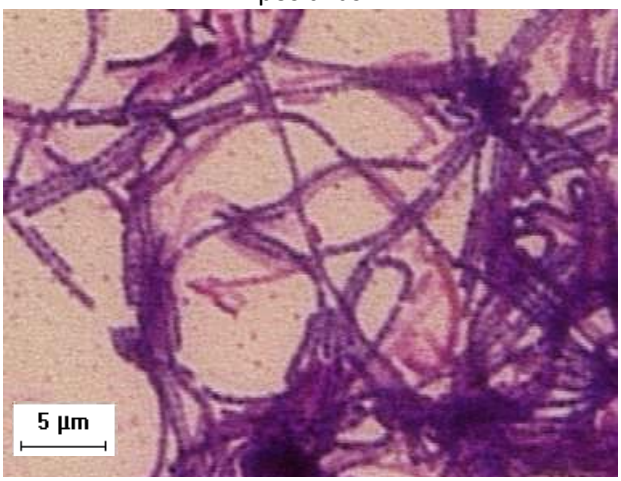
(b) Bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, cocos Gram-positivos.



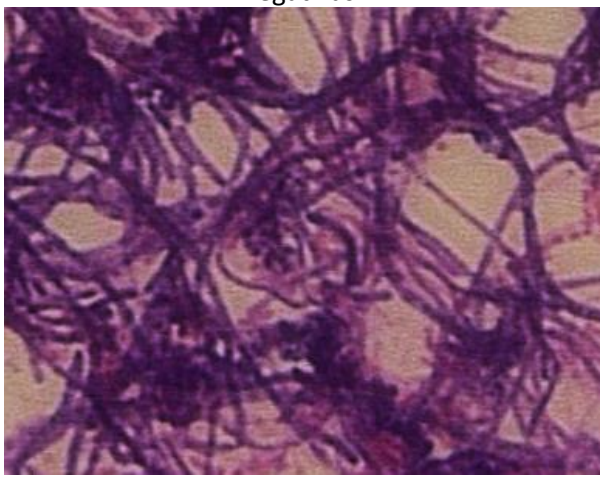
(c) Bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, cocos Gram-positivos, bactérias espiraladas Gram-positivas.



(d) Bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, bactérias espiraladas Gram-positivas e Gram-negativas.



(e) Final da operação. Predominância de bastonetes Gram-positivos, alguns Gram-negativos.

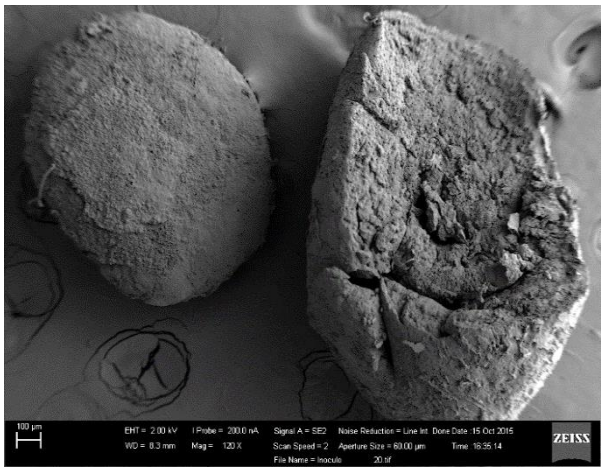


(f) Final da operação. Presença de bactérias espiraladas Gram-positivas.

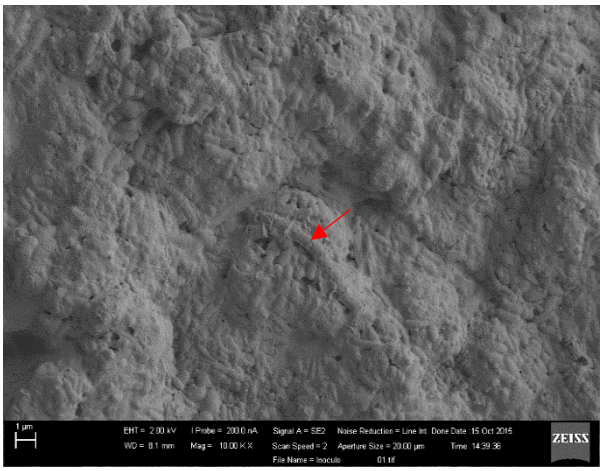
Por fim, as Figuras 5.25-5.29 mostram as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos lodos provenientes do inóculo, reator FB, reator UG, reator UF-1 e reator UF-2,

respectivamente. O microscópio utilizado para o lodo do reator UF-2 era de um modelo diferente, conforme explicado no item 4.1.6, por isso a melhor qualidade das imagens.

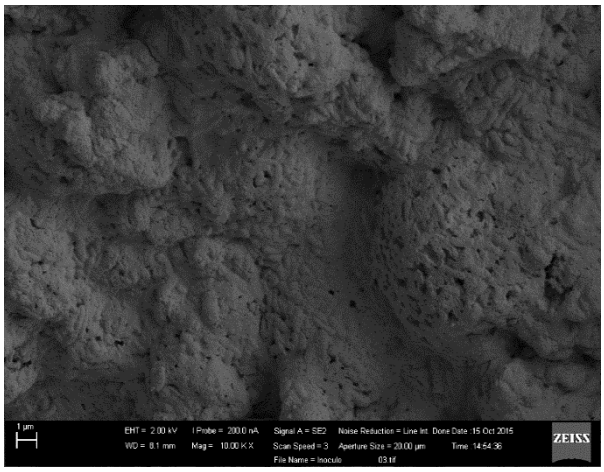
Figura 5.25 - Imagens de MEV do lodo do inóculo



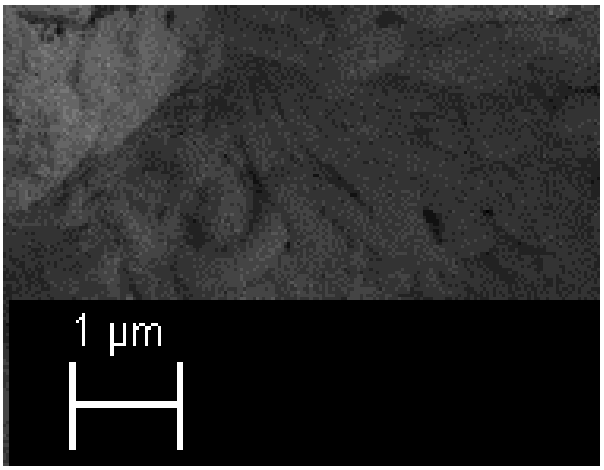
(a) Grânulo inteiro e corte.



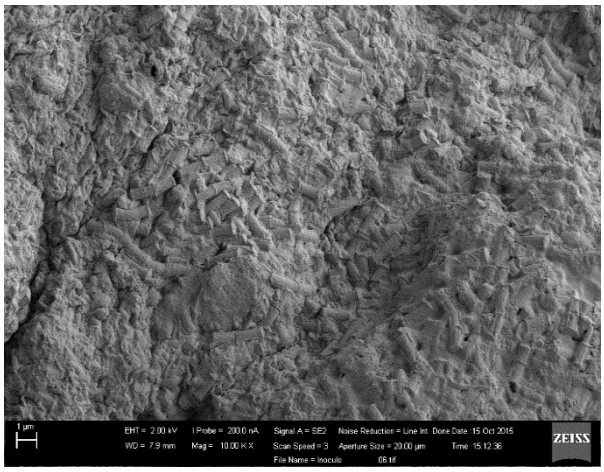
(b) Bastonetes. A seta aponta uma provável *Methanosaeta.*



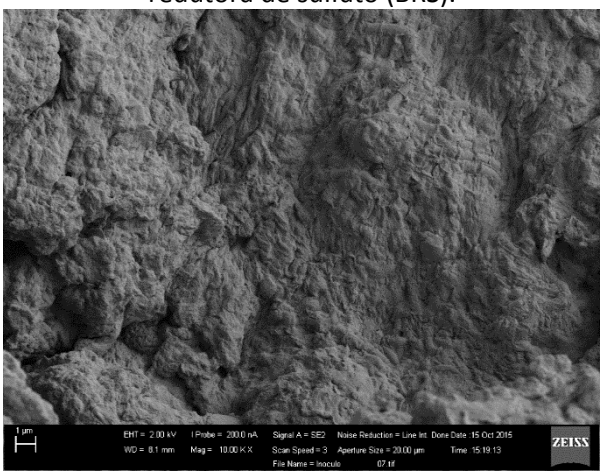
(c) Bactérias agregadas em estrutura aparentemente rígida.



(d) Detalhe de um bastonete curvo de cerca de 1 µm de comprimento, indicativo de bactéria redutora de sulfato (BRS).

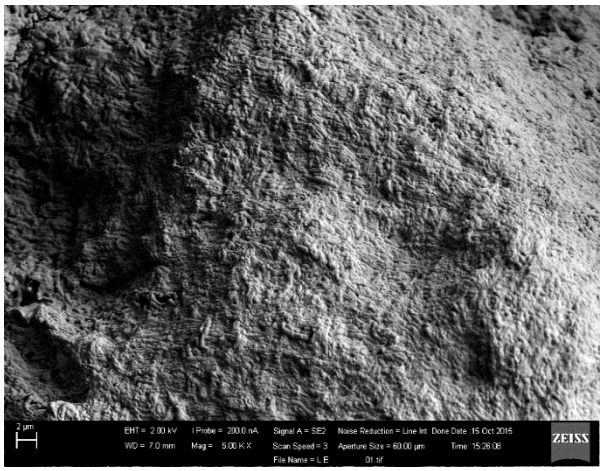


(d) Possível afloramento de *Methanosaeta.*

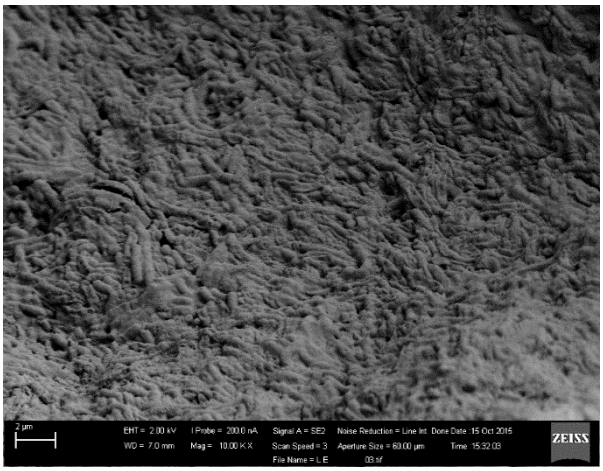


(e) Algumas *Methanosaeta* e bastonetes.

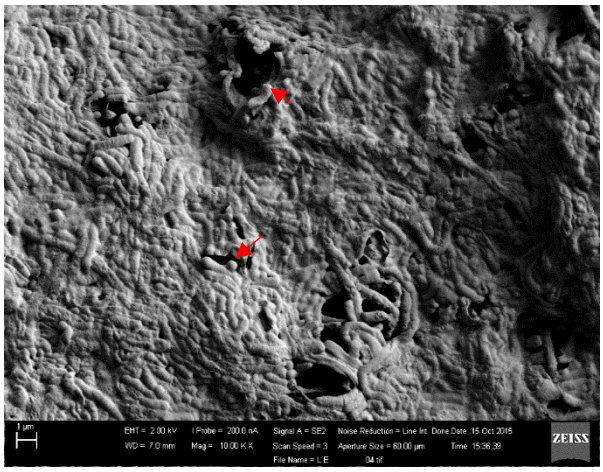
Figura 5.26 - Imagens de MEV do lodo do reator FB



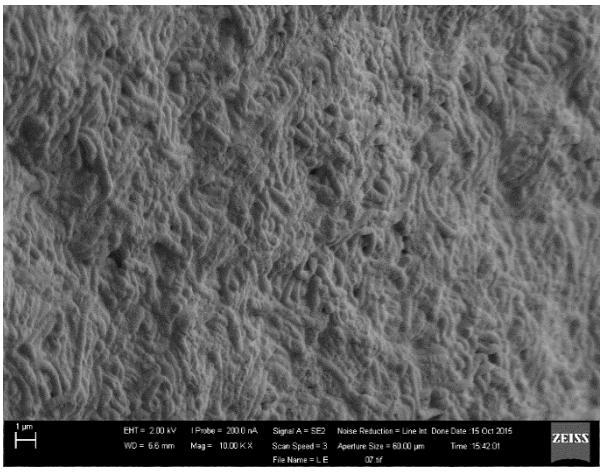
(a) Massa densa e amorfa contendo muitos bastonetes.



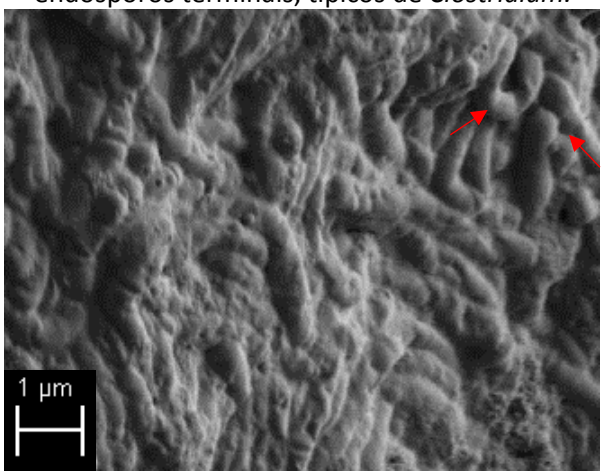
(b) Muitos bastonetes adensados.



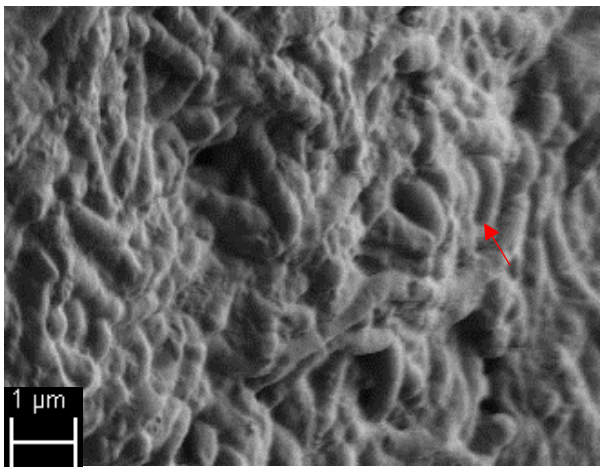
(c) As setas apontam estruturas semelhantes a endósporos terminais, típicos de *Clostridium.*



(d) Bactérias adensadas. Predominância de bastonetes.

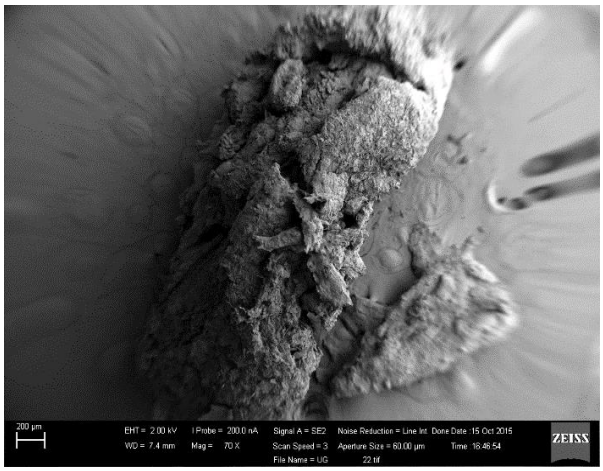


(e) Zoom da imagem “d”. Setas apontam célula aparentemente curva (esquerda) e estrutura semelhante a *Clostridium.*

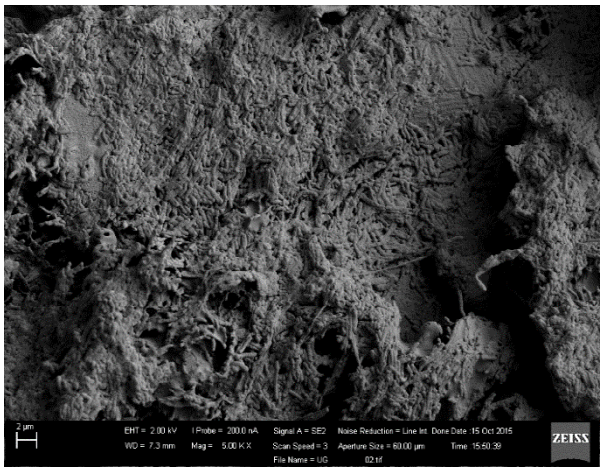


(f) Zoom da imagem “d”. Seta aponta bactéria aparentemente em formato espiralado.

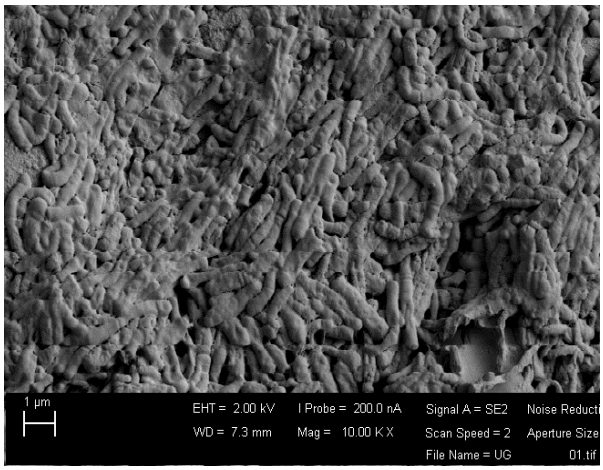
Figura 5.27 - Imagens de MEV do lodo do reator UG



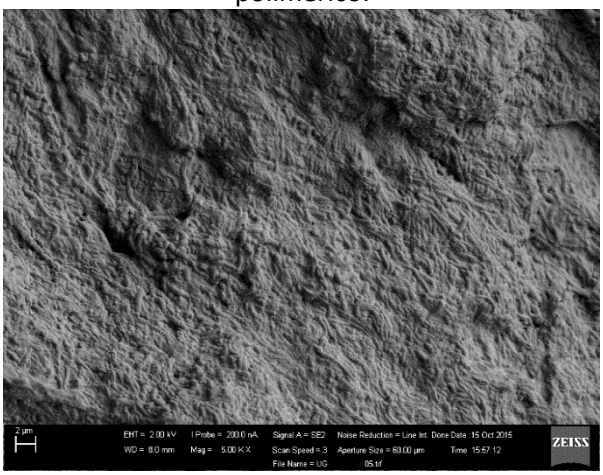
(a) Grânulo disforme.



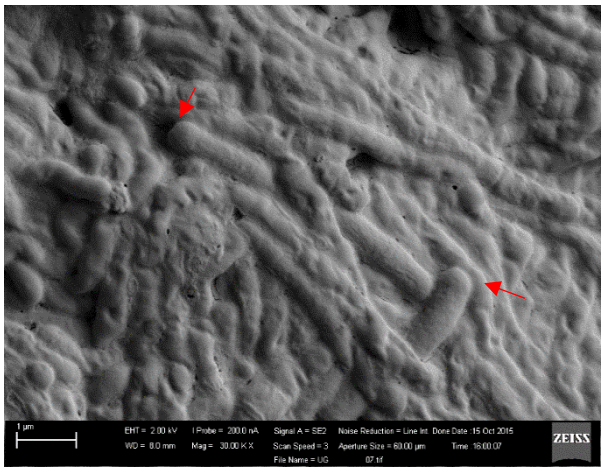
(b) Muitos bastonetes agregados em material polimérico.



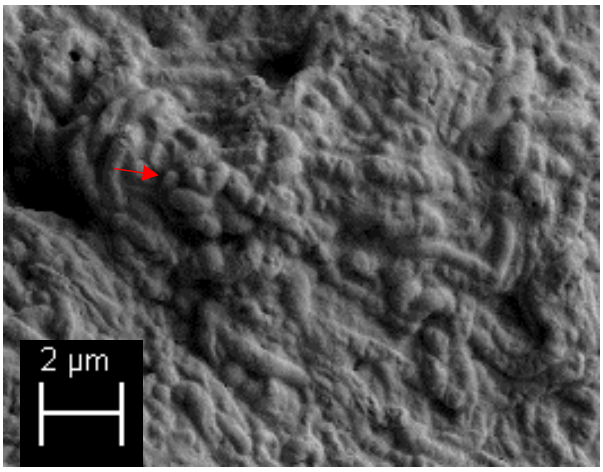
(c) Predominância de bastonetes.



(d) Bactérias bastante adensadas. Predominância de bastonetes, raras espiroquetas e algumas bactérias se assemelhando a *Clostridium*.

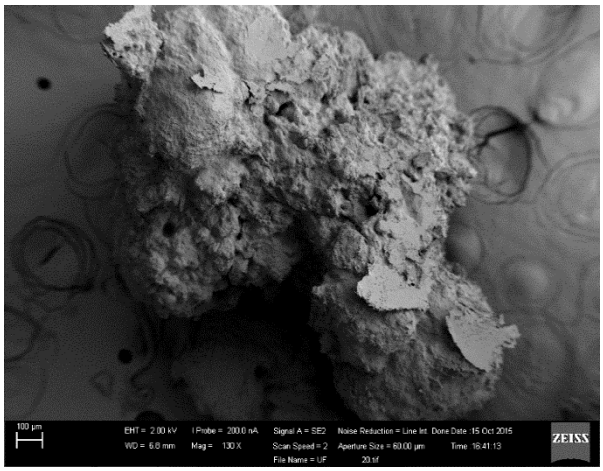


(e) Zoom da imagem “d”. Setas apontam possíveis clostrídios esporulando.

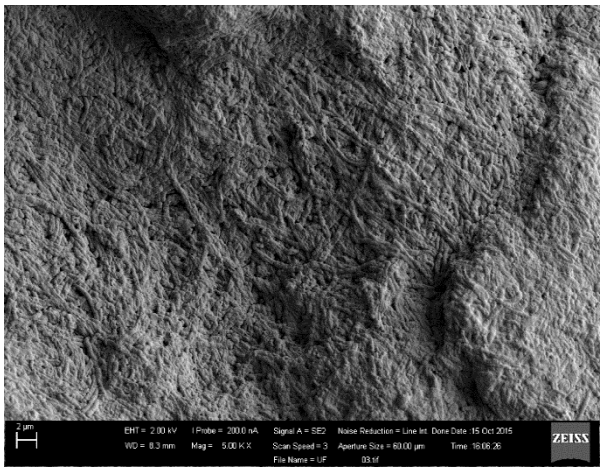


(f) Zoom da imagem “d”. Seta aponta bactéria curvada.

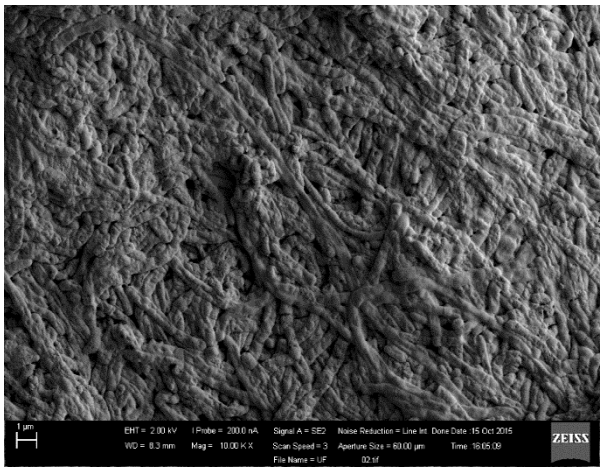
Figura 5.28 - Imagens de MEV do lodo do reator UF-1



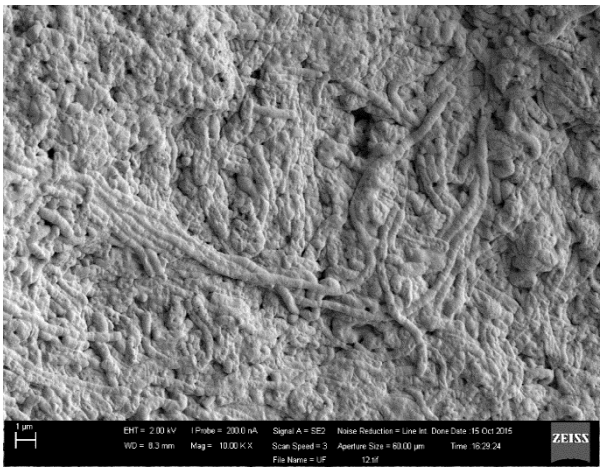
(a) Imagem panorâmica de um floco.



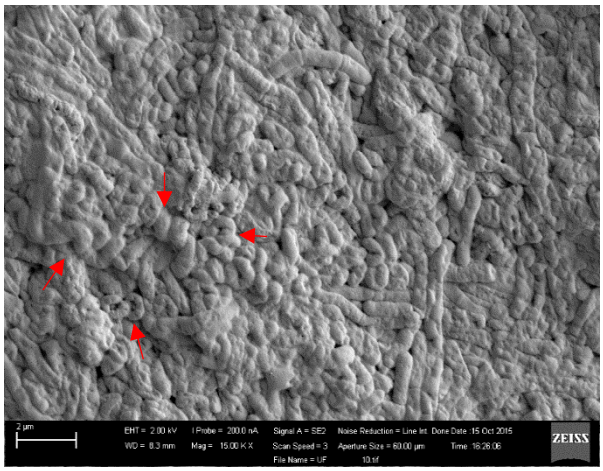
(b) Bactérias agregadas. Predominância de bastonetes.



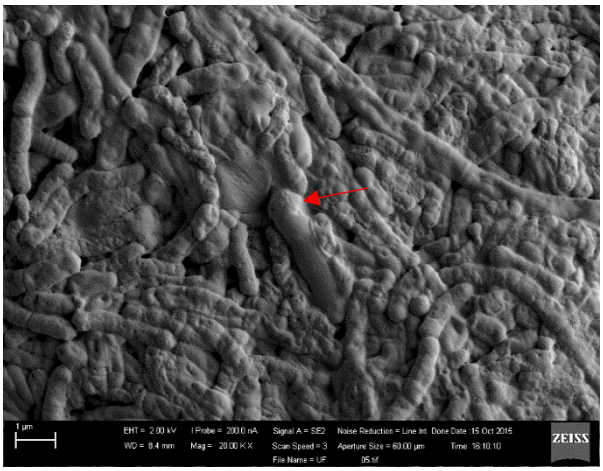
(c) Detalhe dos bastonetes em cadeia, formando filamentos.



(d) Filamentos entrelaçados.

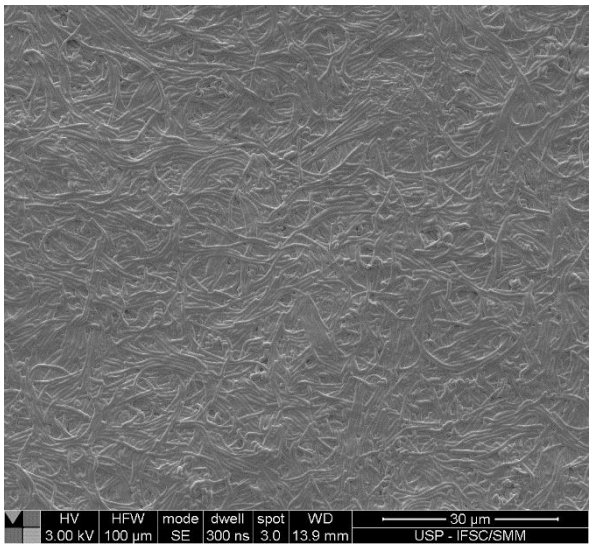


(e) Setas apontam bactérias em formato de espiroquetas (3 setas na centro-esquerda) e de vibrião ou espirilo ou bastonete curvo (seta abaixo).

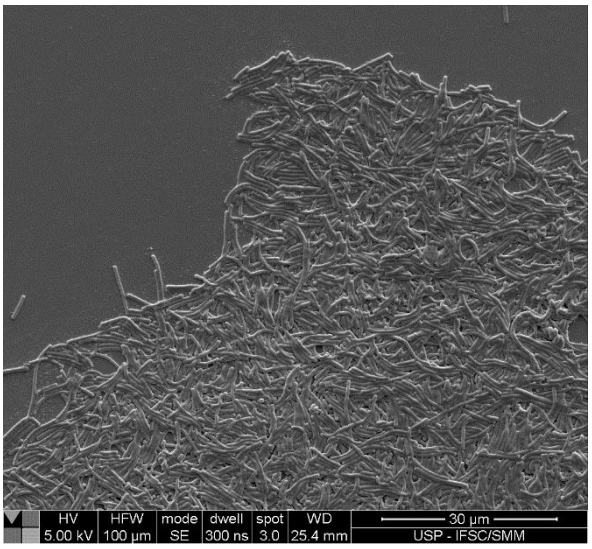


(f) Zoom de estrutura semelhante a *Clostridium* (centro).

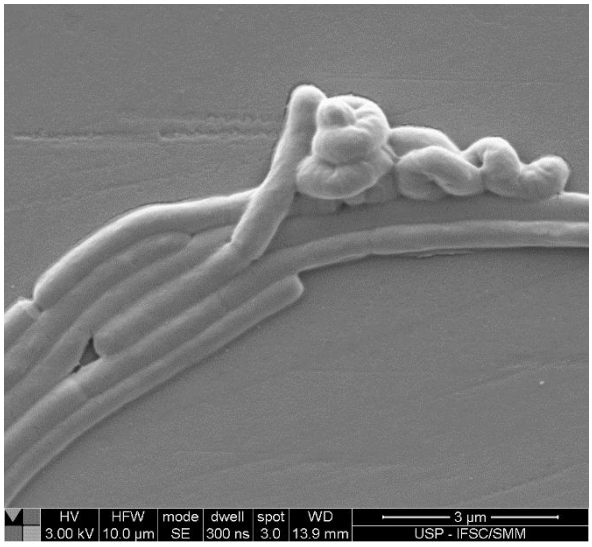
Figura 5.29 - Imagens de MEV do lodo do reator UF-2



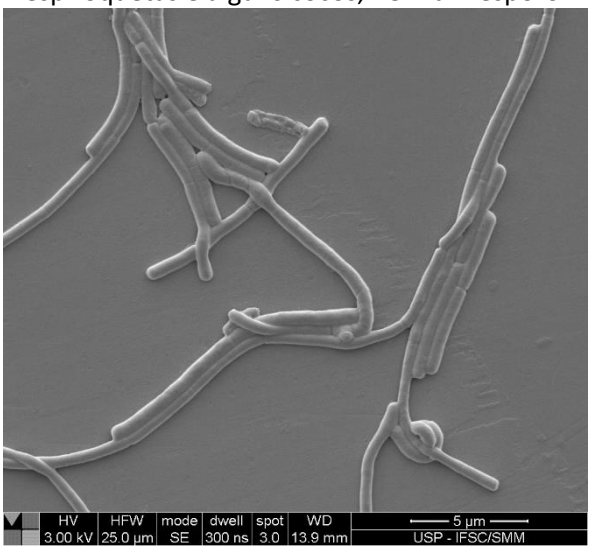
(a) Visão panorâmica do adensamento das bactérias.



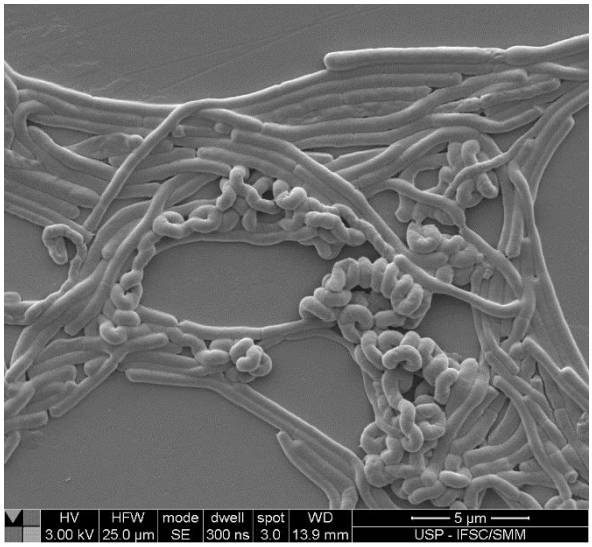
(b) Muitos bastonetes, bastonetes em cadeia, espiroquetas e alguns cocos, nenhum esporo.



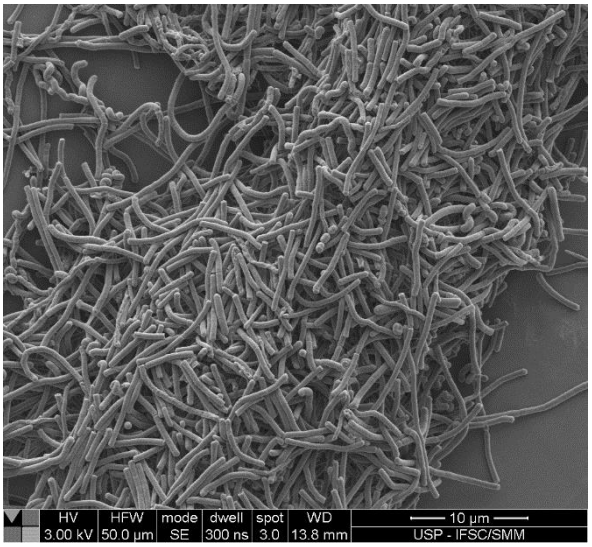
(c) Detalhe de uma bactéria espiralada associada a bastonetes em cadeia.



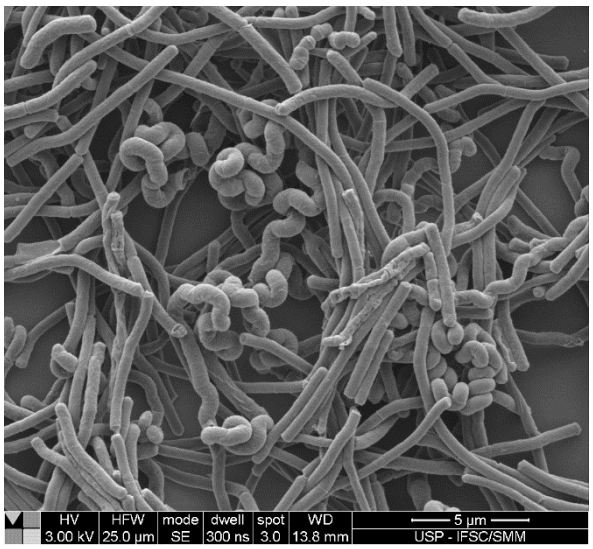
(d) Detalhe de filamentos de bastonetes.



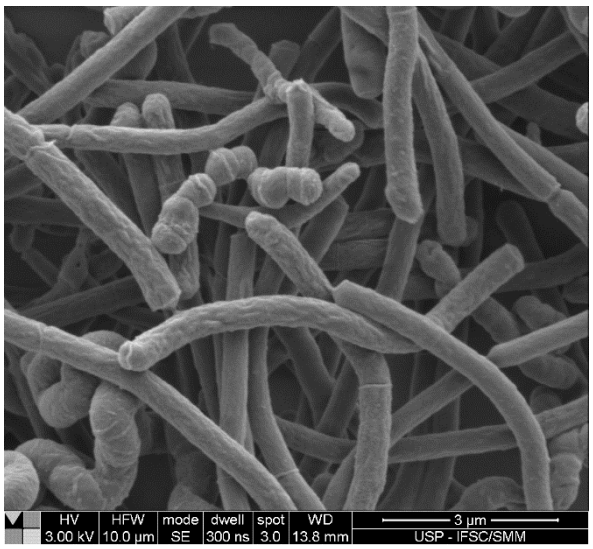
(e) Muitas bactérias espiraladas associadas a bastonetes.



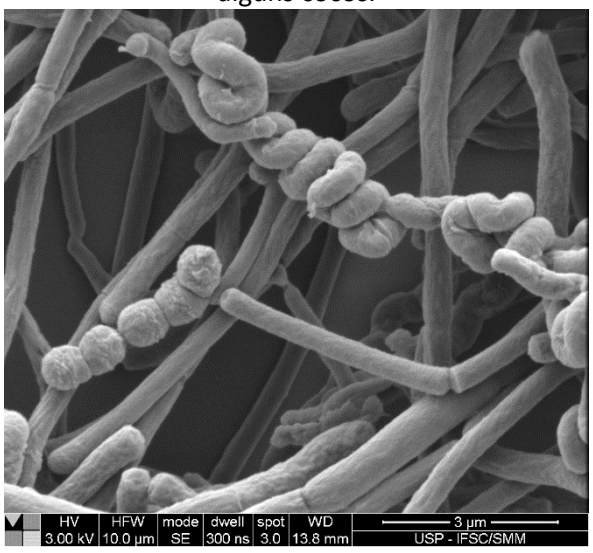
(f) Agrupamento das bactérias. Predominância de bastonetes, várias espiraladas, alguns cocos.



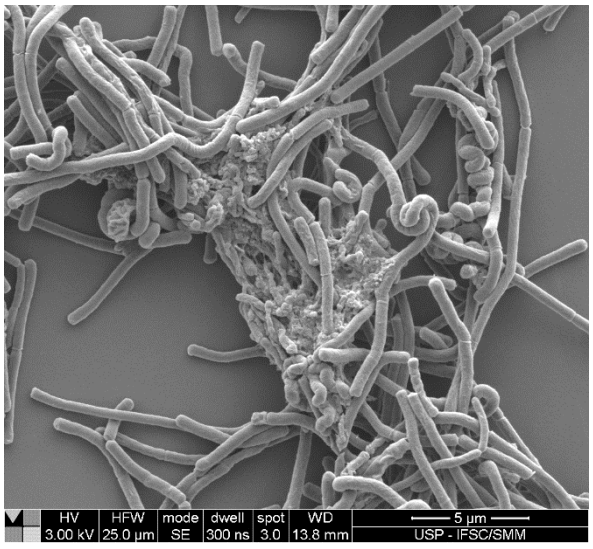
(g) Muitos bastonetes, bactérias espiraladas, alguns cocos.



(h) Detalhe de cocos se duplicando ou diplococos e bactéria curva.



(i) Detalhe das três formas de bactérias identificadas: bastonetes, espiroquetas e cocos.



(j) Bactérias sobre material polimérico.

Embora raros, foi possível detectar bactérias com esporos terminais, assemelhando-se a *Clostridium*, nos reatores FB, UG e UF-1. Entretanto, como na análise de sequenciamento do 16S rDNA a presença de bactérias do gênero *Clostridium* foi notória nestes reatores, é provável que estavam em sua maioria bem adaptadas ao meio, não estando sempre em sua forma esporulada. No reator UF-2, nenhum esporo foi observado, o que pode ser devido à menor abundância de *Clostridium*, como indicado pelas análises moleculares.

Em todos os reatores foram visualizadas bactérias aparentemente espiraladas, que puderam ser visualizadas com maior nitidez nas imagens de MEV do reator UF-2. Foram observadas também algumas bactérias curvas, principalmente nos reatores UG e UF-1, que não foi possível distinguir se eram bastonetes curvos, espirilos ou vibriões. Curiosamente, não foram detectadas nas análises de sequenciamento do 16S rDNA gêneros de bactérias tipicamente espiraladas ou vibriões. Os gêneros identificados em maior abundância pela biologia molecular, *Ethanoligenens* e

Clostridium, são caracterizados por bactérias em forma de bastonetes Gram-positivos, assim como os *Lactobacillus*. No presente estudo, as bactérias chamadas de "espiroquetas" ou "espiraladas" apresentavam uma aparência diferente do formato típico de espiroquetas, e não foram encontradas imagens na literatura de bactérias muito semelhantes a estas. Nas imagens de Gram do reator UF-2, as bactérias espiraladas foram vistas em coloração Gram-positiva, mais abundante, mas também em Gram-negativa. Uma hipótese é que as bactérias no presente estudo chamadas de "espiroquetas" ou "espiraladas", observadas tanto na microscopia óptica quanto na microscopia eletrônica, sejam bastonetes retorcidos, por alguma razão ainda não conhecida. Bactérias do gênero *Clostridium* tem capacidade de pleomorfismo, ou seja, podem alterar sua forma e tamanho, conforme as condições ambientais (Riley, 2012). Entretanto, uma outra possibilidade, não excludente, é que a extração do DNA ou as análises de sequenciamento tenha sido menos eficiente para alguns gêneros de bactérias. Nas análises de metagenômica shotgun, classificação Kraken, foi detectado o Filo Spirochaetes em pequena proporção (0,6%). Apesar de que a prevalência de espiroquetas não é comum em reatores anaeróbios, Fernandez et al. (1999) observaram grandes proporções de espiroquetas em UASB metanogênico (estágio único), alimentado com glicose, e duas espécies foram identificadas: *Spirochaeta stenostrepta* e *Spirochaeta sp. str. Antarctica*. Segundo os autores, espiroquetas são capazes de fermentar glicose em acetato, CO_2 e H_2, gerando quantidades variáveis de lactato e etanol, dependendo da espécie. Já as imagens de bactérias aparentemente espiraladas, com formato mais rígido, tal como podem ser vistas nas Figuras 5.23 e 5.30h, assemelham-se a espirilos. Levanta-se a possibilidade de serem bactérias do gênero *Campylobacter* ou próximas filogeneticamente, pois os reatores foram inoculados com lodo de estação de tratamento de efluente de abatedouro de aves e estas bactérias têm as aves como principal reservatório, e nas análises de metagenômica também foram detectados alguns membros da família Campylobacteraceae (0,009% pela classificação Kraken). As bactérias do gênero *Campylobacter* são Gram-negativas, têm formato de "vírgula" ou "S" e estrutura mais rígida do que as espiroquetas. Carlone e Lascelles (1982) verificaram que a espécie *Campylobacter fetus jejuni* cresce em ambiente contendo H_2 e CO_2, aeróbia e anaerobiamente, e a presença de formiato favorece o seu crescimento. Os autores detectaram atividade de hidrogenase e formiato desidrogenase na membrana das células.

No reator UF-2, embora nas análises de sequenciamento do 16S rDNA e da metagenômica *shotgun* bactérias reconhecidamente Gram-negativas, tais como as enterobactérias, apareceram em proporção abaixo de 1% (classificação Silva e Kraken), pelas imagens de Gram, parecia haver uma estrita interação entre os bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, tendo em vista a proximidade destes. Segundo Riley (2012), *Clostridium* eventualmente podem ser vistos como

Gram-negativos. Outras possibilidades incluem a inviabilidade das células, que poderiam conferir a elas problemas de coloração, ou sub-quantificação de bactérias Gram-negativas. Bactérias em formato de cocos também foram raramente encontradas no reator UF-2, como podem ser vistas em algumas imagens de Gram, em que se revelaram Gram-positivos, e de MEV. Pelas análises de metagenômica (classificação Kraken), os cocos poderiam ser dos gêneros *Bacillus* e *Streptococcus*, os quais representaram 0,5% e 0,3% da abundância relativa de bactérias, respectivamente.

Pelas imagens de MEV, constatou-se a presença de arqueias metanogênicas, provavelmente do gênero *Methanosaeta* no inóculo, as quais não foram detectadas no lodo acidogênico, corroborando com o fato de que as condições ambientais impostas foram suficientes para selecionar bactérias acidogênicas e inibir os microrganismos metanogênicos.

5.1.9 Interação entre os parâmetros analisados e os impactos da produção de H_2 em baixo pH

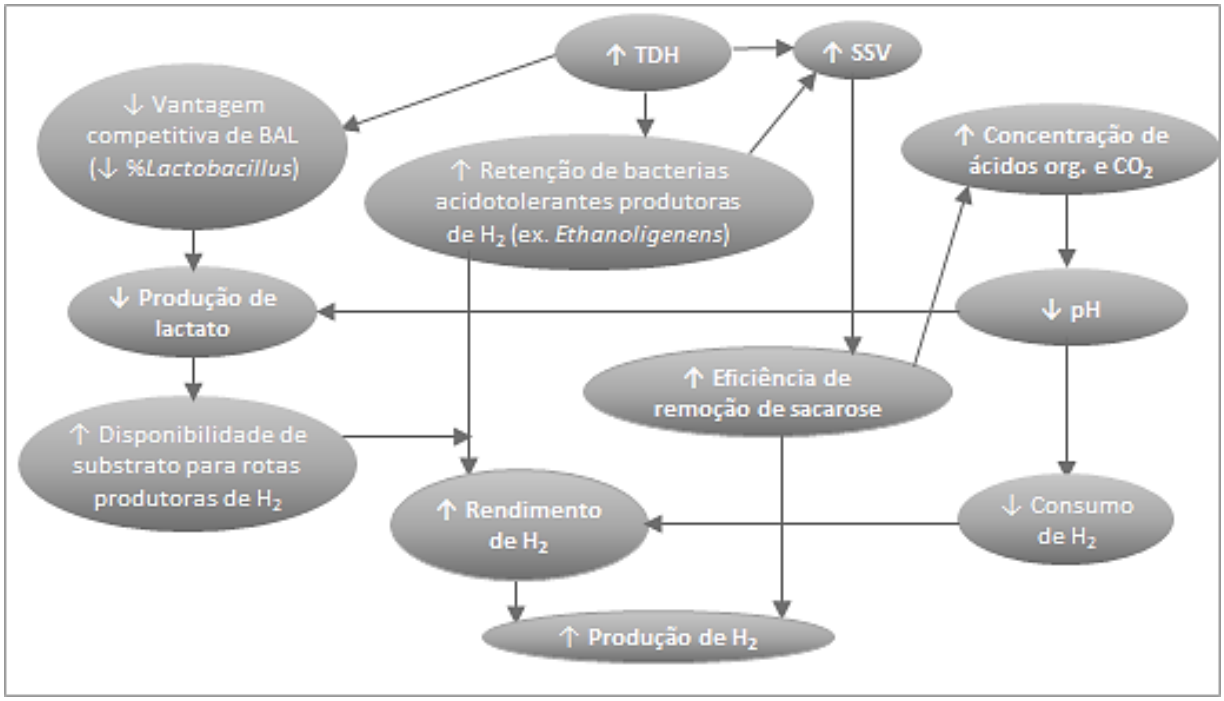
Na Tabela 5.4 são mostrados de forma geral os resultados obtidos com os reatores acidogênicos. Na Fase 1 do reator UF-2, caracterizada por instabilidade operacional, as médias dos resultados de PVH, HY e remoção de sacarose ainda foram superiores às do reator UF-1. Isto se deve principalmente às melhorias no desempenho nos períodos em que o reator UF-2 operou com TDH entre 4 e 5 horas. Assim, na Fase 2, com o aumento do TDH de 3,3 para 4,6 h e, por conseguinte, redução da COV de 33 para 25 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$, o reator UF-2 apresentou produção de H_2 em longo prazo contínua e satisfatória. A maior estabilidade, indicada pelos menores valores de coeficiente de variação (CV), e a melhoria da produção e do rendimento de hidrogênio alcançadas no reator UF-2 são notórias.

Tabela 5.4 - Parâmetros de desempenho dos reatores acidogênicos

Parâmetro	Reator	Mínimo	Máximo	Média	DP	CV
PVH ($mLH_2/L.h$)	FB	4,9	259,3	**94,9**	68,6	72%
	UG	4,0	171,4	**44,7**	37,5	84%
	UF-1	0,4	114,0	**53,7**	32,2	60%
	UF-2 (Fase 1)	0,5	170,3	**57,8**	37,0	64%
	UF-2 (Fase 2)	92,3	300,8	**175,2**	43,9	25%
H_2 no biogas (%)	FB	40,5	85,4	**59,6**	11,0	18%
	UG	38,6	82,1	**62,1**	10,8	17%
	UF-1	47,5	77,5	**62,2**	7,1	11%
	UF-2 (Fase 1)	45,6	91,4	**71,4**	10,2	14%
	UF-2 (Fase 2)	48,4	75,9	**59,8**	5,9	10%
HY ($molH_2.mol^{-1}$ $sacarose_{removida}$)	FB	0,10	3,16	**1,50**	0,83	55%
	UG	0,06	2,47	**0,76**	0,56	74%
	UF-1	0,11	3,05	**1,19**	0,71	60%
	UF-2 (Fase 1)	0,30	2,58	**1,44**	0,70	48%
	UF-2 (Fase 2)	1,63	4,94	**3,35**	0,68	20%
Remoção de sacarose (%)	FB	0,0	100,0	**64,3**	23,0	36%
	UG	18,7	95,7	**66,8**	21,4	32%
	UF-1	0,0	90,8	**53,1**	19,1	36%
	UF-2 (Fase 1)	9,0	99,8	**61,5**	23,2	38%
	UF-2 (Fase 2)	56,1	99,7	**80,3**	9,9	12%

Vários parâmetros acompanharam a melhoria no desempenho relativo à produção de H_2 no reator UF-2 em relação aos demais reatores. Estes incluem: aumento na concentração de SSV efluente; maior remoção de sacarose; produção menor de ácido láctico e maior de ácido acético, e alta produção de etanol; pH sempre abaixo de 3,0; e, aparentemente, cadeias mais longas de bastonetes. A Figura 5.30 apresenta um modelo proposto da relação entre estes parâmetros que levou à maior produção de H_2 no reator UF-2.

Figura 5.30 - Esquema proposto para explicar as mudanças no reator UF-2 que levaram ao aumento da produção de hidrogênio



Em síntese, levanta-se a hipótese de que, nas condições avaliadas, o aumento do TDH propiciou maior remoção de sacarose e maior concentração de SSV, devido ao menor arraste de bactérias. Também possibilitou a formação de cadeias mais longas de bastonetes, contribuindo para a adaptação dos microrganismos às condições ácidas do meio. O aumento de bactérias acidotolerantes produtoras de H_2, como *Ethanoligenens*, foi favorecido, enquanto as bactérias do ácido láctico (BAL), como *Lactobacillus*, perderam vantagem competitiva. O aumento da concentração de SSV e o maior TDH resultaram em menor carga orgânica específica, o que aumentou a eficiência de remoção de sacarose. O aumento da remoção de sacarose, por sua vez, levou ao aumento da concentração de produtos da fermentação, como os ácidos orgânicos, CO_2 e H_2; este último refletindo diretamente na maior PVH. As elevadas concentrações de ácidos orgânicos e de CO_2 causaram a redução do pH do meio. A manutenção de condições muito ácidas, aliada à menor carga específica e ao menor crescimento de *Lactobacillus*, resultaram em redução da produção de lactato. Assim, aumentou-se a disponibilidade de piruvato para outras rotas metabólicas, produtoras de H_2, como a rota de produção concomitante de acetato e etanol, levando ao aumento do rendimento e da produção de hidrogênio.

Por outro lado, não se pode elevar o TDH para valores muito acima do adequado, pois o aumento do TDH resulta na menor COV (mantendo o efluente na mesma concentração) e, com isso, as velocidades de remoção volumétrica de substrato são reduzidas, reduzindo também as velocidades de produção volumétrica de H_2. COV muito baixas também podem levar ao decaimento celular,

reduzindo a concentração de biomassa. Além disso, valores de TDH muito elevados podem resultar no aumento do pH, pelo consumo de CO_2, H^+ e ácidos orgânicos, e no aumento de H_2 no meio líquido, devido à redução das taxas de transferência para o meio gasoso causadas pela menor turbulência. O aumento do pH e de H_2 no meio líquido então pode favorecer o crescimento de bactérias consumidoras de H_2, tais como as produtoras de propionato e homoacetogênicas, e reduzir o potencial competitivo das bactérias produtoras de H_2 tolerantes às condições ácidas.

A produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas, em que os valores de pH foram de aproximadamente 2,8 nos reatores FB, UG e UF-1 e de 2,7 no reator UF-2, foi surpreendente. Vários estudos em reatores anaeróbios indicam a redução drástica ou a cessação da produção de hidrogênio em valores de pH abaixo de 4,5-4,0 (Yokoi et al., 1995; Lay, 2000; Mizuno et al., 2000; Lee et al., 2002; Kim et al., 2004a; Liu & Shen, 2004; Hwang et al., 2004; Chen et al., 2005; Liu et al., 2006; Chojnacka et al., 2011; Ruggeri et al., 2015). Conforme descrito, em meios muito ácidos, a produção de hidrogênio é inibida devido a mudanças nas rotas metabólicas, em que há desvio para a produção de compostos mais reduzidos que os ácidos orgânicos voláteis, geralmente solventes como acetona e álcoois, além de ácido láctico (Bahl et al., 1982; Lay, 2000; Mizuno et al., 2000; Kim et al., 2004a). Uma explicação para este fenômeno está no fato da molécula carreadora de elétrons ferredoxina, quando o pH reduz e o ambiente se torna mais redutor (potencial redox mais negativo), ter sua atividade como aceptora de elétrons aumentada, enquanto sua capacidade de doar elétrons para os prótons, catalisada por [FeFe]-hidrogenase para formar H_2, é reduzida. Assim, nestas condições, os elétrons são desviados para a produção de lactato e etanol, ao invés de H_2 (Ruggeri et al., 2015). Além disso, a diminuição drástica da produção de hidrogênio em pH abaixo de 4,5-4,0 pode ser influenciada pela redução do crescimento microbiano (Dabrock et al., 1992; Yokoi et al., 1995; Chen et al. 2005; Ruggeri et al., 2015), devido em parte à maior concentração das formas não dissociadas dos ácidos orgânicos, e à inibição da atividade das hidrogenases (Adams et al., 1981 citado por Ruggeri et al., 2015; Ghimire et al., 2015; Ruggeri et al., 2015; Roy & Das, 2016).

Há poucos relatos na literatura de produção de H_2 em pH abaixo de 4,0 em reatores acidogênicos contínuos (Xing et al., 2008; Tähti et al., 2013; Carosia et al., 2017). Xing et al. (2008) avaliaram a capacidade da *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 de produzir H_2 em um reator de mistura completa, a 35°C, por 21 dias. O pH do meio foi mantido acima de 3,5 e foi observada que a produção de H_2 não foi fortemente afetada quando o pH atingiu os menores valores, em torno de 3,6. O rendimento obtido foi de cerca de 1,5 $molH_2.mol^{-1}$glicose. Carosia et al. (2017) encontraram em um reator acidogênico de leito fluidizado, a 30°C e inoculado com lodo misto pré-tratado

termicamente, a predominância de bactérias afiliadas a *Ethanoligenens harbinense*. Apesar da adição de agentes tampão (HCl e $NaHCO_3$), o pH do efluente foi de aproximadamente 3,7, e o rendimento ótimo de H_2 obtido foi de 0,76 $molH_2.mol^{-1}glicose_{adicionada}$. Tähti et al. (2013) estudaram a produção de H_2 um reator UASB em condições termofílicas extremas (70°C) por cultura mista. A queda no rendimento de H_2, o qual foi relativamente baixo (cerca de 0,73 $molH_2.mol^{-1}glicose_{adicionada}$), foi acompanhada pela redução do pH para valores em torno de 3,7. No presente estudo, apesar do menor pH até então relatado para reatores hidrogenogênicos contínuos, a produção e o rendimento de H_2 obtidos no reator UF-2 situam-se em uma faixa elevada comparando-se a outros estudos semelhantes de produção de H_2 pela fermentação da sacarose em reatores contínuos mesofílicos (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Comparação da produção de H_2 em reatores contínuos alimentados com sacarose

Reator	COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$)	pH efluente	Temp. (°C)	H_2 no biogás (%)	PVH* ($mLH_2.L^{-1}h^{-1}$)	HY ($molH_2.mol^{-1}$ sacarose)	Ref.
Mistura	48,6	5,5	26	63	542	3,9	Fang et al., 2002
Mistura	80	5,25	35	55	506	2,3	Kyazze, et al., 2006
UASB	7,1 - 37,4/ 8,5 - 128	4,4	38	57 - 37/ 44 - 42	50 - 190/ 33 - 202	2,9 - 2,0/ 1,6 – 1,0	Yu e Mu, 2006
UASB	4,4 - 30	4,0	30	26 - 50	4 - 122	0,5 – 3,3	Zhao et al., 2008
UASB	12	4 - 4,5	35	45 (aprox.)	12 (aprox.)	0,3	Wang e Li, 2010
Leito-fixo	24	4,4	25	46 - 56	73 - 125	0,9 - 1,4	Lima e Zaiat, 2012
Leito-fixo	24	4,8	25	54 - 62	15,1 – 61,6	0,7 – 2,1	Penteado et al., 2013
UASB	21,6	4,0	36	40 (aprox.)	92 (aprox.)	1,6 (aprox.)	Ning et al., 2013
Leito-fixo estruturado	24,0	6,5	25	70	12 - 25	0,4 - 0,6	Anzola-Rojas e Zaiat, 2016
UASB (UF-2)	25,0	2,7	30	60	175	3,4	Presente estudo

*Condições de referência: 25 °C e 1 atm.

Portanto, a manutenção do ambiente extremamente ácido permitiu o crescimento e seleção de microrganismos acidotolerantes capazes de produzir H_2 nestas condições. Este estudo demonstra que é possível produzir continuamente biohidrogênio sem a necessidade de adição de agentes alcalinizantes. Esta pode ser considerada a principal vantagem, uma vez que a alcalinização de reatores acidogênicos é um grande desafio para a aplicação destes reatores, implicando nos custos e sustentabilidade do processo (Ghimire et al., 2015). Além disso, dispensa-se o pré-tratamento do lodo ao evitar naturalmente a homoacetogênese e a metanogênese (Roy e Das, 2016).

5.2 Sistemas de um e de dois estágios: qualidade do efluente e eficiência da produção de energia[2]

São apresentados os resultados da comparação dos sistemas de um e de dois estágios, em que se aplicou reatores de leito fixo estruturado para a metanogênese. O reator único (RU), que recebia efluente bruto, foi comparado ao reator metanogênico (RM), que recebia o efluente acidificado proveniente do reator acidogênico UF-2. Os resultados específicos da etapa acidogênica foram apresentados no item 5.1 e no presente item são apresentados os resultados globais dos sistemas de um e de dois estágios.

5.2.1 Ensaios hidrodinâmicos dos reatores metanogênicos

Foram realizados ensaios para verificação das condições hidrodinâmicas nos reatores RU e RM. O resultado do ensaio do reator UASB acidogênico separadamente foi apresentado no item 5.1.1. Para a realização dos ensaios hidrodinâmicos, o RM e o RU já estavam com o material de enchimento, as hastes de espumas de poliuretano. Assim como para os reatores acidogênicos, para os cálculos dos ensaios hidrodinâmicos, foi considerado o volume útil excluindo-se o volume ocupado pelo material suporte, ou seja, volume de 3,6 L e 5,9 L para o RM e o RU, respectivamente, pois, assim é mais adequado para avaliação do regime hidrodinâmico e da existência de zonas mortas. Porém, para cálculo dos parâmetros de operação, considerou-se os valores de volume útil total, por ser mais prático e realista para estimativa de área e volume requeridos, bem como para comparação de cargas aplicadas. Além disso, durante a operação, o volume ocupado pela biomassa é variável e, portanto, o volume útil também sofre variações.

A Figura 5.31 apresenta as curvas da distribuição E(t) obtidas nos ensaios hidrodinâmicos. Para melhor interpretação dos resultados, os dados foram ajustados à curva SGompertz, utilizando o software Origin 2017. Na Tabela 5.6 são apresentados o resumo dos parâmetros hidráulicos. O TDH teórico foi calculado pela razão entre o volume útil dos reatores e a vazão aplicada durante os ensaios.

[2] Esse estudo foi publicado no artigo: Mota, V. T., & Zaiat, M. Two- vs. single-stage anaerobic reactors: Evaluation of effluent quality and energy production potential using sucrose-based wastewater, *Water Science and Technology*, *In press*. (Data do aceite: 02 de novembro de 2018) doi: 10.2166/wst.2018.470.

Figura 5.31 - Curvas E(t) obtidas nos ensaios hidrodinâmicos dos reatores metanogênicos

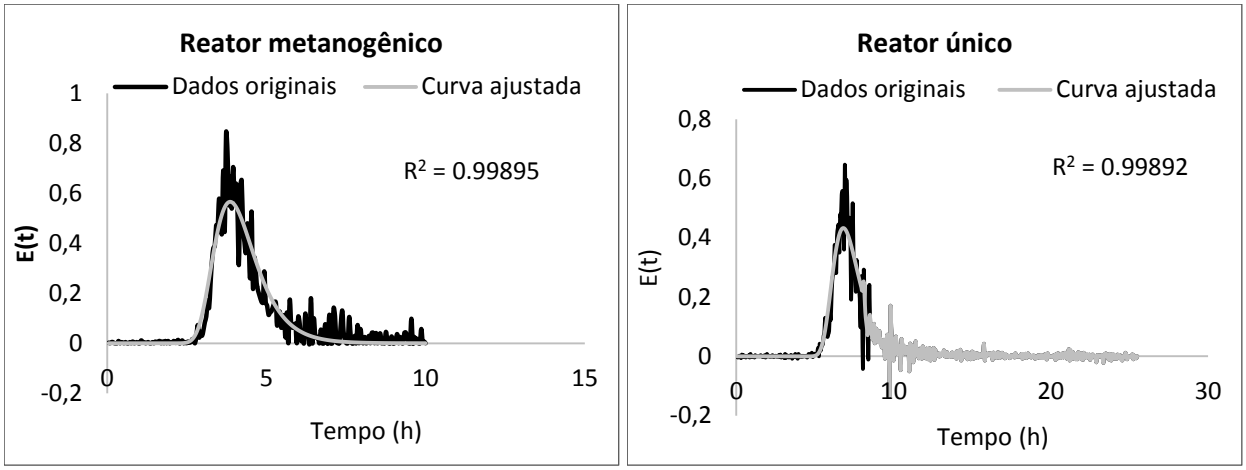


Tabela 5.6 - Parâmetros hidráulicos do RM e do RU

Reator	TDH teórico (h)	TDH médio (h)	TDH_t/TDH_m (1)	D/uL (2)	N (3)	R^2 (4)
RM	4,88	4,23	1,15	0,0188	26,6	0,99895
RU	8,08	7,46	1,08	0,0181	27,6	0,99892

1. Razão entre o TDH teórico e o TDH médio, calculado pelos testes hidrodinâmicos.
2. Número de dispersão adimensional (D = coeficiente de dispersão longitudinal que caracteriza o grau de mistura durante o fluxo, u = velocidade do fluido, L = comprimento do reator).
3. Número de reatores de mistura completa e igual volume em série.
4. R2 ajustado pela curva não-linear SGompertz

Pelos gráficos e parâmetros hidráulicos obtidos, infere-se que o regime hidrodinâmico do RM e do RU se aproxima mais do regime de escoamento pistonado, apresentando grau de mistura muito baixo. O TDH médio foi bem próximo ao TDH teórico, sugerindo a não ocorrência substancial de zonas mortas.

5.2.2 Partida dos reatores

Os sistemas de um e de dois estágios foram operados paralelamente e, à medida que os parâmetros de desempenho do tratamento – ácidos voláteis e DQO – atingiam estabilidade, a carga no sistema era aumentada. Conforme descrito no item 4.2 (Metodologia), o afluente do RM e do RU foi suplementado com extrato de levedura e tamponado com bicarbonato de sódio. Durante o período de adaptação, a concentração inicial do afluente do RM e do RU foi reduzida, preparando-se uma alimentação menos concentrada para o RU e diluindo-se o efluente do reator UF-2 em 5,0 e 3,3 vezes para alimentação do RM. Conforme mostrado na Tabela 4.5, o valor médio de DQO afluente durante a adaptação foi de 706 e 894 $mg.L^{-1}$ (Adaptação 1) e 1220 e 1522 $mg.L^{-1}$ (Adaptação 2) ao RM e o RU, respectivamente. Para manter a carga orgânica equivalente nos dois períodos da adaptação, o TDH do RM foi estabelecido em 5,3 e 8,0 h, respectivamente, e do RU em 8,8 e 13,3 h, respectivamente. Contudo, ocorreram algumas variações e os TDH médios nos períodos de Adaptação 1 e 2 foram, respectivamente, de 5,4 e 8,7 h no RM, e de 8,7 e 14,4 h no RU. No período

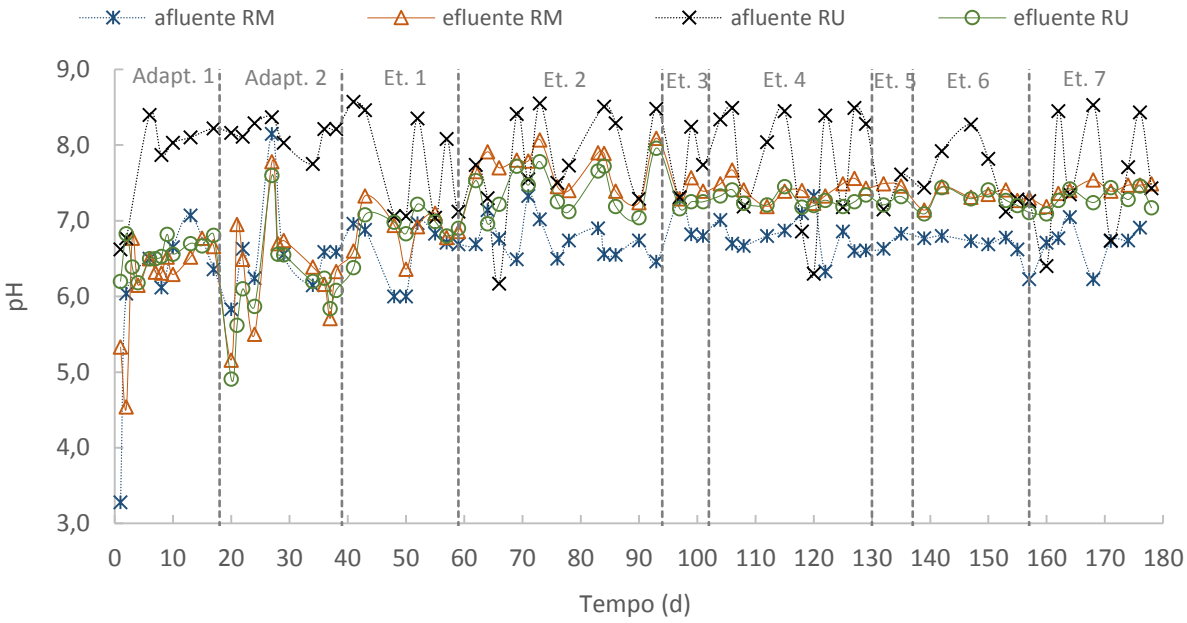
da Adaptação 2, ocorreram problemas operacionais no reator UF-2 que resultaram em aumento do seu TDH. Com isso, apesar da maior carga no RM, a carga do sistema UF-2 + RM foi ligeiramente inferior em relação ao período anterior. Como não se diluiu o afluente do reator UF-2, durante a adaptação, a carga do sistema combinado foi superior à carga do RU, apesar do TDH dos dois sistemas ter sido bastante próximo (Tabela 4.5).

Após a adaptação, o RM foi alimentado com efluente do reator UF-2 sem diluir e o RU foi alimentado com afluente da mesma concentração de sacarose do afluente do reator UF-2, de aproximadamente 5 $gDQO.L^{-1}$. Na Etapa 1, as vazões do RM e do RU foram mantidas aproximadamente iguais e a carga equivalente à aplicada durante a adaptação. Como o volume útil total do sistema UF-2 + RM era próximo ao do RU, mas a vazão do reator UF-2 era muito maior, a carga do sistema combinado foi superior (Tabela 4.5). Assim, com o intuito de manter cargas iguais para os sistemas de um e de dois estágios, a partir da Etapa 2, as vazões do RM e do RU foram ajustadas de modo que o TDH total fosse equivalente nos dois sistemas. Devido às melhorias na remoção de DQO atingidas no sistema combinado, este passou a operar com COV maiores que do RU a partir da Etapa 5, que se estendeu até a Etapa 7. As condições operacionais foram mantidas no RU entre as Etapas 4 e 6 (Tabela 4.5).

5.2.3 pH, alcalinidade e ácidos orgânicos

O pH do afluente e do efluente no RM e no RU se manteve próximo da neutralidade. O pH médio do afluente do RM foi de 6,6 enquanto do afluente do RU foi de 7,8. Embora a concentração de bicarbonato de sódio adicionada tenha sido a mesma, como o afluente do RM já era acidificado, o pH foi inferior. O pH do afluente do RU sofreu maiores variações por este ser um afluente facilmente acidificável e altamente rico em nutrientes. Assim, mesmo sendo mantido na câmara fria a 4°C, frequentemente apresentava sinais de acidificação (o que não ocorreu no afluente dos reatores acidogênicos, por não ter sido tamponado com bicarbonato nem suplementado com extrato de levedura). O pH médio do efluente foi de 7,1 e 7,0 no RM e no RU, respectivamente (Figura 5.32).

Figura 5.32 - pH afluente e efluente do RM e do RU



Na Figura 5.33 são mostrados os dados de alcalinidade bicarbonato (AB) e da relação AI/AP no RM e no RU. Na Figura 5.34 são apresentados os resultados da composição dos ácidos orgânicos identificados por cromatografia líquida e a concentração total de AVT determinada por titulação.

Figura 5.33 - Alcalinidade bicarbonato e relação AI/AP no RM e no RU

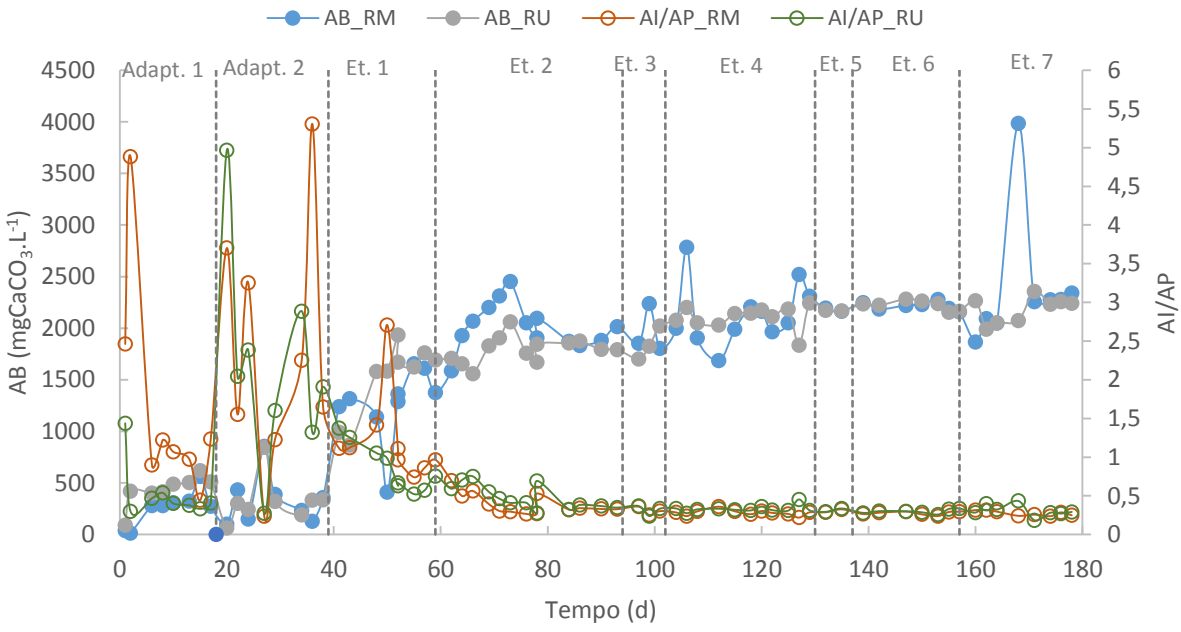
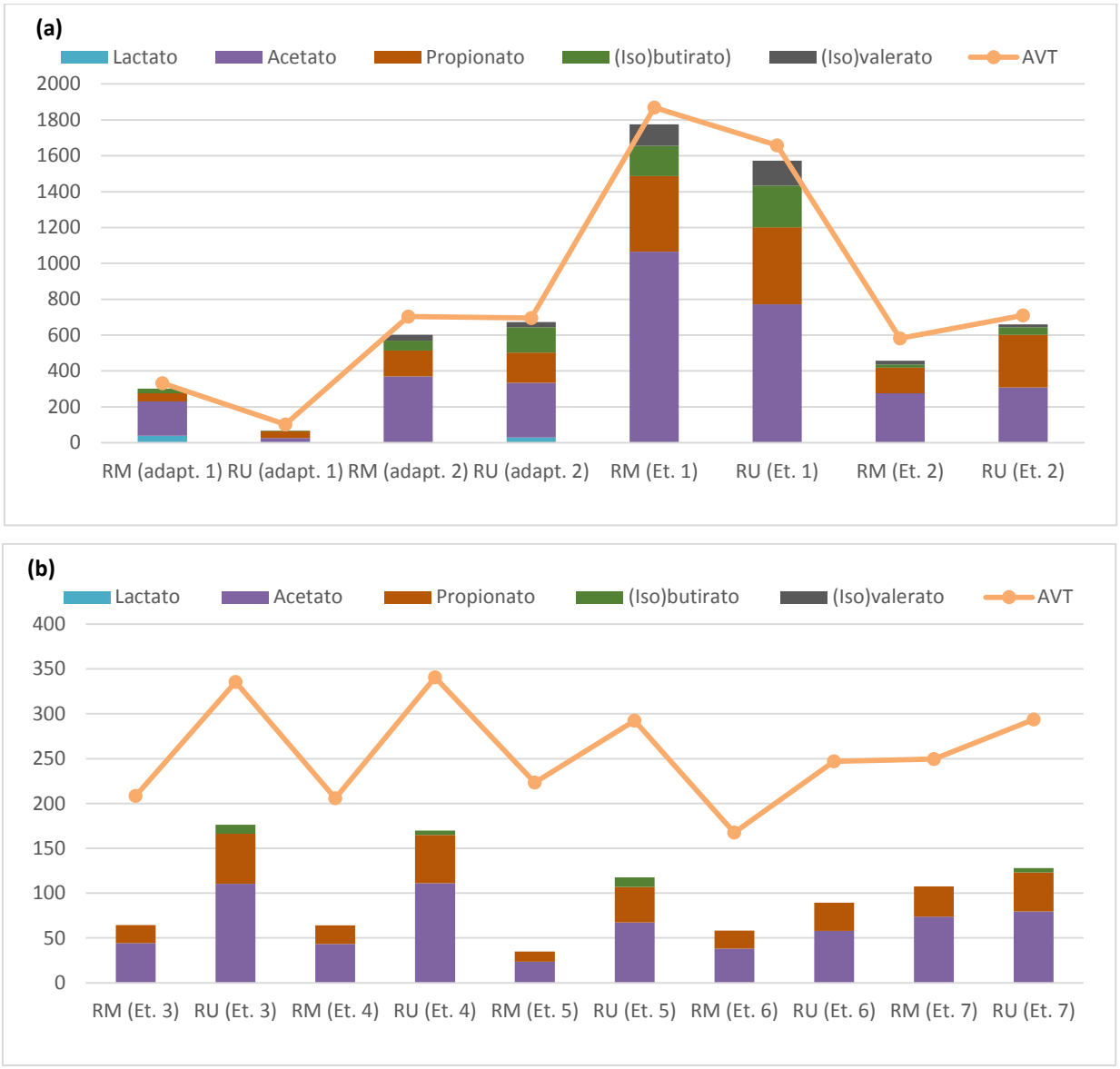


Figura 5.34 - Ácidos orgânicos no efluente do RM e do RU



Durante a partida (a) e após atingirem condições de estabilidade (b)

Durante a Adaptação 1, o efluente do RU apresentou menores concentrações de AVT e maiores concentrações de AB do que o efluente do RM. Provavelmente isto se deve à menor carga orgânica aplicada no RU em relação ao sistema UF-2+RM (Tabela 4.5). O aumento da concentração do afluente no segundo período da adaptação provocou o aumento na concentração de AVT em ambos os reatores, apesar da carga ter sido mantida bem próxima em relação ao período anterior. Este aumento foi mais acentuado no RU. Entre os dias 25 e 27, o RM e o RU foram alimentados apenas com água, bicarbonato de sódio e nutrientes para evitar o acúmulo de AVT e, eventualmente, o colapso dos sistemas. Após a adaptação, a alimentação dos reatores com efluente bruto causou um aumento ainda maior nas concentrações de AVT, apesar da COV ter sido mantida (Tabela 4.5), indicando que a maior concentração inicial do substrato pode por si só causar inibição. Como as

concentrações de AVT estavam acima de 1000 $mg.L^{-1}$, limite inibitório para as arqueias metanogênicas (Foresti, 2002), na Etapa 2 a carga foi reduzida aumentando-se o TDH. Esta medida foi suficiente para recuperar os sistemas.

A partir da Etapa 2, em que as vazões foram ajustadas para manter o TDH próximo para os dois sistemas, o RM passou a apresentar um melhor desempenho, como pode ser observado pelas menores concentrações de ácidos orgânicos. O subsequente aumento da carga nas Etapas 3 e 4, com valores acima da Etapa 1, não alterou o desempenho dos sistemas, sugerindo que as altas concentrações de ácidos orgânicos detectadas anteriormente foram em consequência do choque de carga e limitações cinéticas, devido ao lento crescimento das arqueias metanogênicas. Como as concentrações de AVT e de DQO foram menores no efluente do RM, nas Etapas 5-7 o sistema de dois estágios passou a operar com cargas maiores que o sistema único. As concentrações de AVT se mantiveram baixas e nenhum sinal de sobrecarga foi observado. Na Etapa 7, as cargas de ambos os reatores foram aumentadas em aproximadamente 50%, mas os impactos sobre o desempenho do tratamento foram brandos, demonstrando que os sistemas já se encontravam bem adaptados, com uma comunidade metanogênica estabelecida. A partir da Etapa 3 até o final da operação, as concentrações dos ácidos orgânicos ficaram abaixo de 200 $mg.L^{-1}$. Acompanhando as baixas concentrações de ácidos orgânicos, os níveis de alcalinidade a bicarbonato mantiveram-se acima de 1700 $mgCaCO_3.L^{-1}$ e a relação AI/AP abaixo de 0,5 no RM e no RU (Figura 5.34), indicando estabilidade operacional. A não correlação entre a soma das concentrações dos ácidos medidos por cromatografia e a concentração de AVT dos dados relativos às Etapas 3 a 7 (Figura 5.34b) provavelmente se deve à imprecisão do método de titulação quando as concentrações de ácidos orgânicos são baixas em relação às concentrações de bicarbonato (Mota et al., 2015).

Em relação às espécies de ácidos analisadas no efluente final, o aumento da concentração na Etapa 1 resultou em acúmulo de ácido acético, propiônico, butírico e valérico. Com a redução da carga na Etapa 2, reduziu-se a concentração de todos os ácidos, mas foi somente a partir da Etapa 3 que as concentrações caíram substancialmente. Os ácidos láctico, fórmico e (iso)valérico passaram a não ser mais detectados, e o ácido (iso)butírico foi detectado apenas no RU em concentrações muito baixas ($<11\ mg.L^{-1}$). As concentrações de ácido acético e propiônico permaneceram predominantes, indicando limitações cinéticas das arqueias acetoclásticas e limitações termodinâmicas nas reações da acetogênese, respectivamente. A degradação de ácidos orgânicos, principalmente de propionato, pode ser inibida devido a concentrações relativamente baixas de hidrogênio dissolvido e de acetato e, também, por limitações relacionadas à transferência de hidrogênio interespécies (Kim et al., 2002; Aquino & Chernicharo, 2005). Nos períodos de estabilidade (Etapas 3-7), as concentrações de ácidos no efluente do RM foram bem inferiores às

do efluente do RU até mesmo nos períodos em que as cargas orgânicas aplicadas no sistema de dois estágios (UF-2+RM) foram superiores (Etapas 5-7), levando à constatação que, nas condições avaliadas, a separação dos estágios reduziu os problemas relacionados às limitações cinéticas, termodinâmicas e de transferência de massa.

5.2.4 DQO e SSV

A DQO solúvel no efluente apresentou a mesma tendência observada para as concentrações de ácidos orgânicos. Durante o período da Adaptação 1, apesar da diluição do afluente, a DQO efluente apresentou valores relativamente elevados, com valor médio de 484 $mg.L^{-1}$ no RM e de 184 $mg.L^{-1}$ no RU. A redução na diluição do afluente de 5 para 3,3 vezes, no período da Adaptação 2, resultou em aumento da DQO efluente, que mais que duplicou no RM (média de 1028 $mg.L^{-1}$) e aumentou cerca de nove vezes no RU (média de 1200 $mg.L^{-1}$). Para o cálculo destas médias não foram incluídos os resultados entre o 25º e 27º dia de operação, pois nestes dias os reatores foram alimentados com afluente contendo apenas nutrientes, sem o substrato orgânico, conforme comentado no item 5.2.3.

O início da operação, Etapa 1, com o aumento da DQO da alimentação do RM e do RU para valores entre 4 e 5 $g.L^{-1}$ (Figura 5.35), contudo, provocou um grande aumento na DQO efluente (Figura 5.36). A acidificação do RM e do RU provavelmente foi um fator determinante para o baixo desempenho. A eficiência média de remoção de DQO no sistema UF-2+RM foi de apenas 43,3%, e no RU foi de 51,8%. Durante a Etapa 2, quando o TDH foi aumentado, as eficiências de remoção aumentaram substancialmente, com médias de 85,8% e 79,8% no sistema UF-2+RM e no RU, respectivamente. A maior eficiência de remoção do sistema UF-2+RM a partir da Etapa 2 indica que as maiores cargas orgânicas aplicadas em relação ao RU na Etapa 1 e durante a adaptação foi um fator considerável para o seu pior desempenho nestes períodos.

A Figura 5.37 apresenta as médias de remoção de DQO a partir da Etapa 3, quando os reatores já haviam atingido estabilidade e a DQO total do efluente também passou a ser monitorada. Verifica-se a partir de então uma elevada remoção de DQO, acima de 85%, indicando que os reatores já se encontravam bem adaptados e com uma suficiente população de arqueias metanogênicas. O aumento progressivo da carga no RM, em aproximadamente 20% até a Etapa 6, também não prejudicou o seu desempenho. A remoção de DQO solúvel e total no sistema UF-2+RM passou de 85,8% e 76,1%, na Etapa 2, para 98,1% e 96,0%, na Etapa 6, respectivamente. Na Etapa 7, com o aumento da carga em aproximadamente 50% no RM e no RU, a remoção de DQO foi ligeiramente reduzida; a remoção de DQO total no sistema UF-2+RM passou de 96,0% para 93,4% e no RU de 89,9% para 86,6% (Figura 5.37).

Figura 5.35 - Valores de DQO dos afluentes dos reatores UF-2, RM e RU

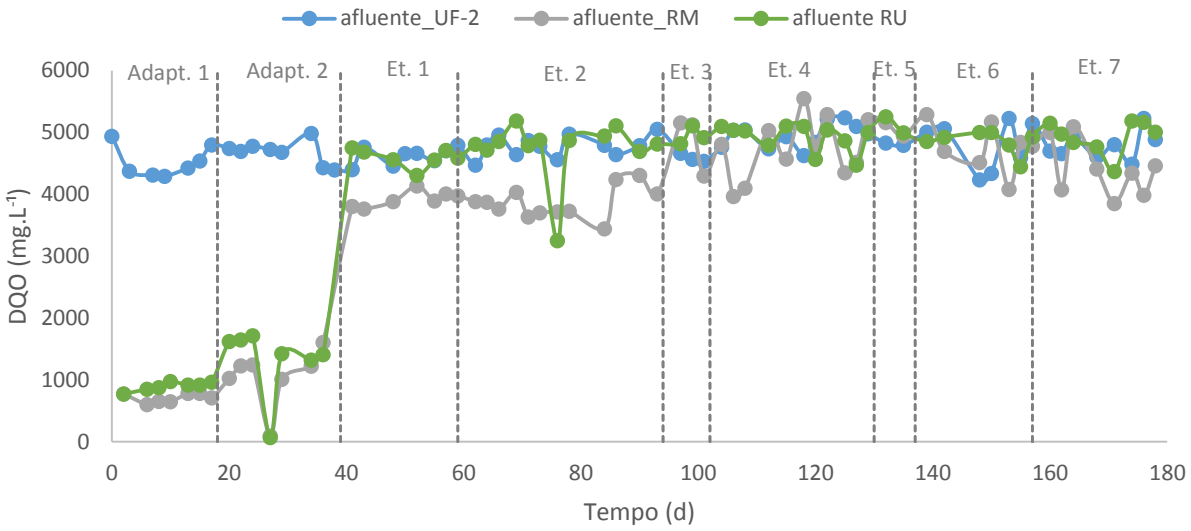


Figura 5.36 - DQO efluente do RM e do RU

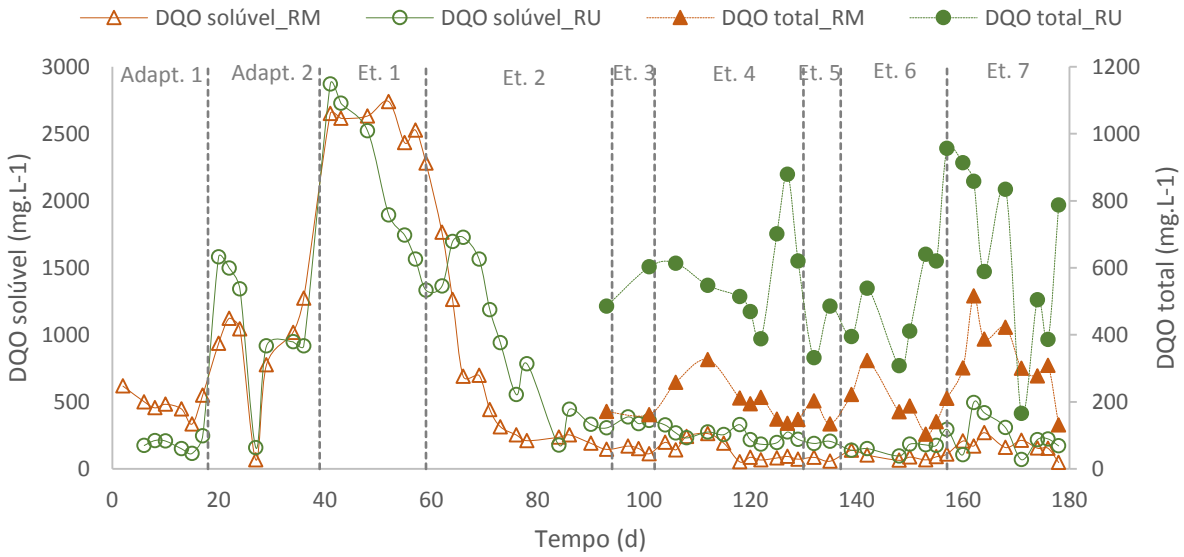
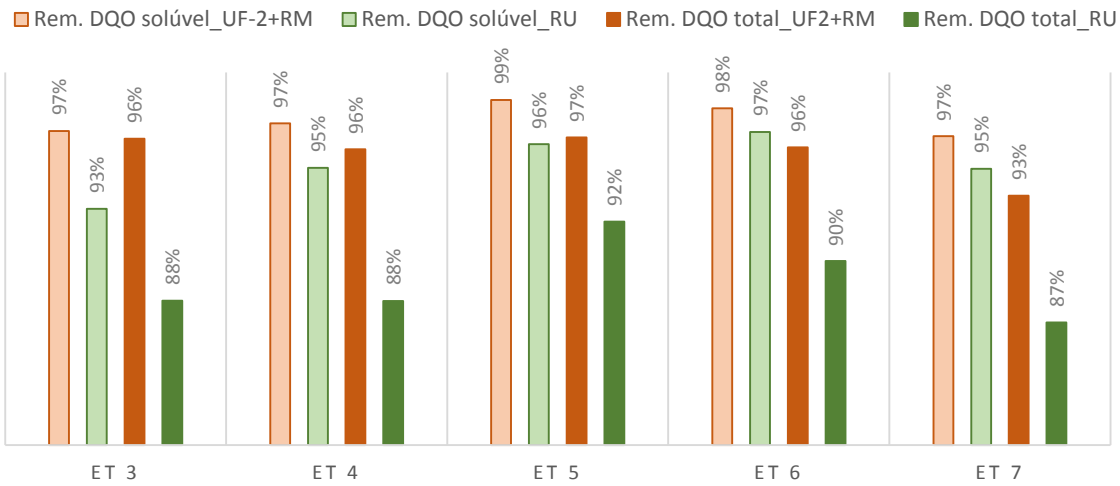


Figura 5.37 - Remoção de DQO solúvel e total dos sistemas de um e dois estágios



No período de estabilidade dos reatores, ou seja, da Etapa 3 a Etapa 7, é notável que os valores de DQO solúvel e sobretudo de DQO total, que passou a ser monitorada desde o final da Etapa 2, se mantiveram menor no efluente do RM do que no efluente do RU, apesar das maiores cargas aplicadas no sistema de dois estágios. Neste período, a maior eficiência de remoção de DQO do sistema UF-2+RM em relação ao RU foi estatisticamente significativa, conforme o teste de Kruskall-Wallis ($p < 0,000$). Estes resultados demonstram que o sistema de dois estágios, quando adequadamente dimensionado, podem resultar em redução de volume e área de reatores requeridos em estações de tratamento de efluentes, bem como podem gerar efluentes com uma qualidade superior do que os de sistemas de estágio único.

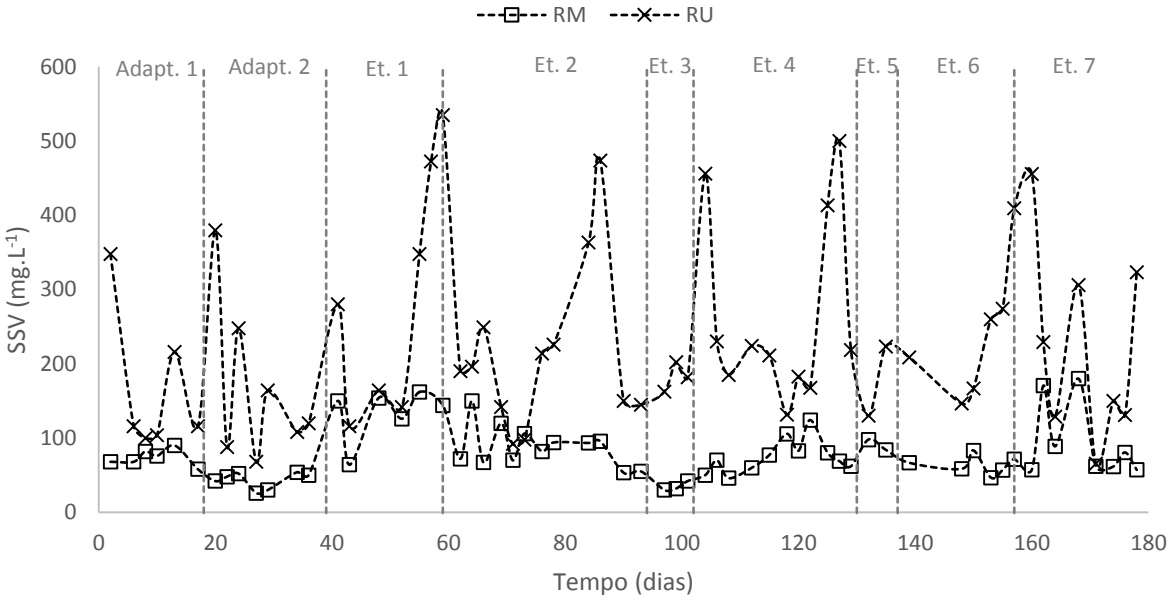
Entre as Etapas 3 e 7, os valores de DQO solúvel não correspondentes à DQO dos ácidos e de glicose/ frutose, identificados por cromatografia, foram equivalentes em média a 30 $mg.L^{-1}$ no efluente do RM e de 71 $mg.L^{-1}$ no efluente do RU. Estes resultados indicam que os maiores valores de DQO solúvel não acidificada no efluente do RU em relação ao RM possivelmente se devem a uma maior liberação de SMP e EPS. Isso pode ser em decorrência do maior crescimento microbiano, como indicado nas análises de SSV comentadas a seguir, o qual está diretamente relacionado a maiores velocidades de reações metabólicas e, por conseguinte, maior liberação de produtos microbianos no meio.

Os maiores valores de DQO total no efluente do RU em relação ao efluente do RM resultaram não somente da maior DQO solúvel, mas principalmente pela maior DQO particulada (calculada pela diferença entre a DQO total e a DQO solúvel). Isto é corroborado pelas maiores concentrações de SSV no efluente do RU (Figura 5.38). A razão $gDQO_{particulada}/gSSV$ foi em média equivalente a 1,30 no RM e a 1,46 no RU, próximo ao valor teórico de $1,42gO_2/gSólidos_{biodegradáveis}$ (von Sperling & Chernicharo, 2005). A menor razão DQO/SSV no RM pode ser um indicativo de que a biomassa já se encontrava mais estabilizada. Parker et al. (2008) observaram redução da razão DQO/SSV de 1,45 para 1,2 após 33 dias de ensaio de digestão anaeróbia mesofílica de lodo.

As maiores concentrações de SSV no RU (223 ± 119 mg L^{-1}) provavelmente teve como algumas das causas as maiores velocidades de crescimento de bactérias acidogênicas e maiores concentrações de EPS, que em parte ficam aderidas nos flocos microbianos. No RM, apesar das elevadas concentrações de SSV no afluente, ou seja, no efluente do reator UF-2 (257 ± 167 mg L^{-1}), as concentrações de SSV no efluente foram bem inferiores (80 ± 36 mg L^{-1}). Uma hipótese para explicar tal fato é que as bactérias acidogênicas do reator UF-2, ao entrarem no RM, onde havia baixa disponibilidade de substrato não acidificado, sofriam decaimento e estabilização, assim como as substâncias excretadas por elas. No RU, como havia constante entrada de substrato não

acidificado, as bactérias acidogênicas estavam continuamente se multiplicando e, juntamente com os SMP e EPS produzidos, saíam no efluente final, resultando em maiores valores de DQO e de concentrações de SSV.

Figura 5.38 - Sólidos suspensos voláteis no efluente do RM e do RU



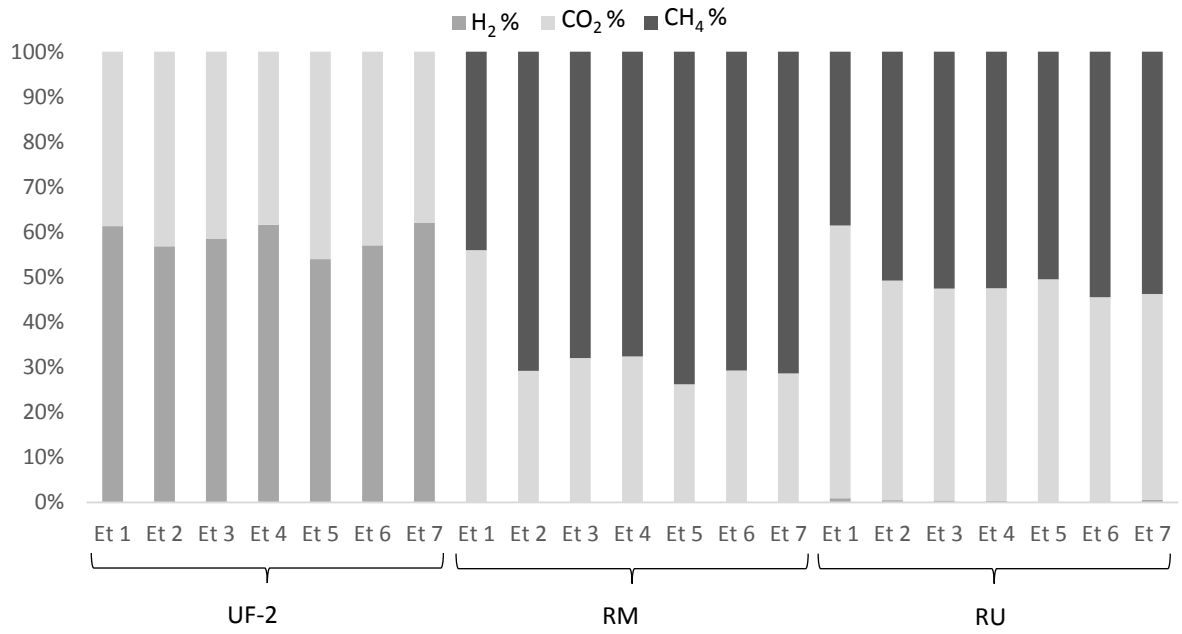
5.2.5 Composição do biogás e produção de metano

O biogás do RM e do RU era constituído por CH_4 e CO_2 e, nos períodos de instabilidade, traços de H_2. Para fins de comparação, a Figura 5.39 também apresenta a composição do biogás do reator UF-2. Durante a Adaptação 1, o biogás do RU apresentou maior percentual de CH_4 (71,6%) e menor percentual de H_2 (0,3%) em relação ao biogás do RM (62,2% de CH_4 e 3,3% de H_2), provavelmente em consequência de sua menor COV. Na Adaptação 2, o aumento da concentração de DQO impactou fortemente na composição do biogás do RU, que inicialmente apresentou 58,5% de CO_2, 31,7% de H_2, e apenas 9,8% de CH_4. Contudo, ao longo do tempo, o RU foi se recuperando e, no final do período de adaptação, a concentração de H_2 reduziu para 0,3% e a de CH_4 aumentou para 41,1%. Já a composição do biogás do RM não sofreu grandes perturbações, apenas uma ligeira redução no percentual de CH_4 para aproximadamente 56,4%. O percentual de H_2 reduziu até que no final da adaptação sua concentração era nula.

A alimentação com afluente mais concentrado na Etapa 1 levou à redução no percentual de CH_4 no biogás do RM, com média de 44,0%, mas as concentrações de H_2 se mantiveram ínfimas (máx. de 0,2%). No RU, o percentual de CH_4 inicialmente reduziu para 32,6%, mas foi aumentando ao longo da operação, apresentando média neste período de 38,5%. A partir da Etapa 2, as concentrações de CH_4 no biogás do RM se mantiveram bem superiores às do RU (Figura 5.40),

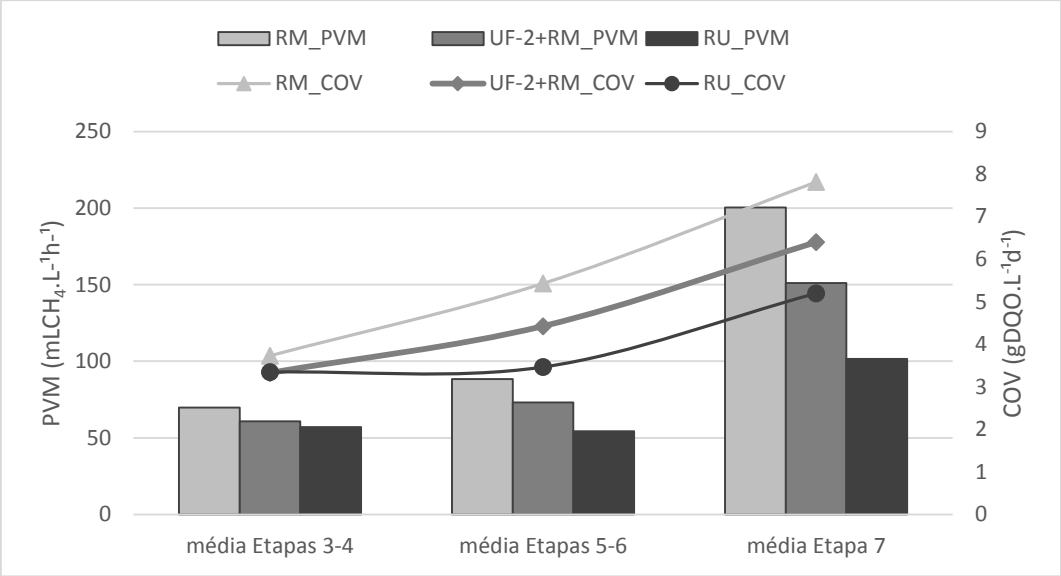
indicando um maior poder calorífico do biogás. Em ambos os reatores, a composição do biogás não apresentou grandes variações desde então; o biogás do RM sendo formado por 70 ± 4% de CH_4 e 30 ± 4% de CO_2, e o biogás do RU por 53 ± 4% de CH_4 e 47 ± 4% de CO_2. Estes resultados corroboram com outros estudos comparando reatores de dois estágios a reatores de estágio único, em que foram constatadas maiores concentrações de CH_4 no reator metanogênico alimentado com efluente de reator acidogênico (Ghosh et al. 1985; Yeoh, 1997). A predominância da acidogênese em etapa prévia, no reator UF-2, provavelmente acarretou em menor geração de CO_2 por fermentação no RM, levando a maiores percentuais de CH_4 no biogás, uma vez que este era composto praticamente por CH_4 e CO_2.

Figura 5.39 - Composição do biogás nos sistemas de um e dois estágios



Em relação à produção volumétrica de metano (PVM), não foram observadas grandes diferenças entre os dois sistemas quando submetidos a cargas orgânicas equivalentes. Na Figura 5.40 são apresentados os dados de quando o RM e o RU já haviam atingido estabilidade. Foram agrupados os dados das Etapas 3 e 4, em que os dois sistemas receberam a mesma carga orgânica, das Etapas 5 e 6, em que a carga do RM foi aumentada e a do RU foi mantida, e da Etapa 7, em que a carga de ambos os reatores foi aumentada. Para o cálculo da PVM no sistema de dois estágios considerou-se dois cenários: um em relação à produção volumétrica de metano no RM especificamente, e o outro em relação à produção volumétrica de metano no sistema como um todo, contabilizando o volume do reator UF-2 também. Nesse último caso, o volume contabilizado do reator UF-2 foi proporcional à vazão no RM.

Figura 5.40 - Produção volumétrica de metano nos sistemas de um e dois estágios



Verifica-se que a PVM foi bem próxima entre os dois sistemas nas Etapas 3 e 4 – equivalente em média a 61 e 57 $mLCH_4.L^{-1}h^{-1}$ nos sistemas de dois e um estágio, respectivamente. Portanto, nestas condições, o sistema de dois estágios não ofereceu uma vantagem substancial quanto a este parâmetro. De fato, o rendimento de metano foi muito próximo na Etapa 4, como apresentado a seguir, no item 5.2.6. Naturalmente, o aumento da carga resultou em aumento da PVM, sendo que, na Etapa 7, ambos os sistemas de dois e de um estágio apresentaram as maiores PVM, com médias de 151 e 102 $mLCH_4.L^{-1}h^{-1}$, respectivamente. Como o percentual de metano no biogás do RM era maior do que no biogás do RU, a produção volumétrica de biogás não foi maior na mesma proporção que a PVM. A maior PVM no sistema de dois estágios ao final da operação não ocorreu somente devido às maiores COV aplicadas, mas também pelos maiores rendimentos no final da operação (item 5.2.6).

5.2.6 Comparação do desempenho do tratamento e rendimento energético nos sistemas de um (RU) e de dois (UF-2+RM) estágios

Para a comparação dos sistemas de um e de dois estágios, foram considerados os dados da Etapa 4, em que a mesma COV, de cerca de 3,5 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$, foi aplicada nos dois sistemas, e os dados da Etapa 7, quando operaram com suas cargas máximas, equivalentes a 6,4 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$ no sistema UF-2+RM (7,8 no RM), e a 5,2 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$ no RU.

Na Tabela 5.7 são apresentados os dados referentes ao desempenho do tratamento. Constata-se que a qualidade do efluente do sistema UF-2+RM foi superior para todos os parâmetros avaliados, sobretudo DQO total e SSV. Estes resultados reforçam a possibilidade de atingir maiores

eficiências de remoção de DQO e/ou maiores COV em sistemas combinados, conforme reportado em outros estudos (Cho, 1983; Azbar & Speece, 2001; Nasr et al., 2012; Ferraz-Júnior, 2016).

Tabela 5.7 - Desempenho do tratamento nos sistemas UF-2+RM e RU

	Etapa 4*		Etapa 7**	
Efluente	**2 estágios**	**1 estágio**	**2 estágios**	**1 estágio**
pH efluente	7,4	7,3	7,4	7,3
AVT (mg/L)	205,7	340,7	249,6	293,5
SSV (mg/L)	75,2	265,5	92,1	244,4
DQO total (mg/L)	203,9	591,5	316,9	665,8
DQO solúvel (mg/L)	134,9	252,1	164,7	255,6
Rem. DQO total (%)	95,9%	87,7%	93,4%	86,6%
Rem. DQO solúvel (%)	97,3%	94,9%	96,6%	94,8%

*COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$): reator UF-2 = 25.8, RM = 3.9, UF-2+RM = 3.5, RU = 3.5
**COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$): reator UF-2 = 26.0, RM = 7.8, UF-2+RM = 6.4, RU = 5.2

Considerando-se que no RM e no RU foram mantidas as condições ambientais adequadas para os microrganismos metanogênicos (pH neutro, alcalinidade bicarbonato elevada, baixas concentrações de AVT, temperatura de 30°C, não afluência de compostos tóxicos), acredita-se que os principais fatores que contribuíram para o melhor desempenho do sistema UF-2+RM em relação ao RU foram: (i) Baixo crescimento de bactérias acidogênicas, resultando em menores valores de DQO e de SSV no efluente; (ii) Remoção da maior parte do H_2 produzido na etapa acidogênica pela recuperação do biogás do reator UF-2, contribuindo para a minimização das limitações termodinâmicas sobre as reações acetogênicas inibidas por baixas concentrações de H_2; e (iii) Produção proporcionalmente alta de ácido acético no reator UF-2, reduzindo a dependência da atividade das bactérias sintróficas no RM para a conversão da matéria orgânica em biogás.

Por fim, foram estimados os rendimentos energéticos nos sistemas (Tabela 5.8). A fim de se normalizar os parâmetros de entrada, a quantidade de cada gás gerado foi calculada em função da DQO adicionada, considerando-se a DQO afluente. Para conversão em unidades de energia, considerou-se os potenciais caloríficos equivalentes a 142 kJ por grama de H_2 e 50 kJ por grama de CH_4 (Nasr et al., 2012). No RU, o rendimento energético total foi estimado em 12,78 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$ na Etapa 4 e em 15,49 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$ na Etapa 7, sendo o rendimento pela produção de H_2 insignificante. No sistema UF-2+RM, o rendimento energético total foi estimado em 16,02 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$ na Etapa 4 e em 20,69 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$ na Etapa 7, em que cerca de 2,2 $kJ.g^{-1}DQO_{adicionada}$ foram provenientes do H_2 produzido no reator acidogênico. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Luo et al. (2011), com rendimento energético estimado equivalente a 11,8 kJ por g adicionado de sólidos voláteis (SV) no sistema de estágio único, e equivalente a 13,1 $kJ.g^{-1}SV_{adicionado}$ no sistema de dois estágios (12,4 kJ proveniente do CH_4 e 0,7

kJ do H_2). Verifica-se que, nas condições avaliadas, a substituição do sistema único pelo sistema de dois estágios resultou em aumento do potencial de rendimento energético de 25,3% (Etapa 4) a 33,6% (Etapa 7). Mesmo desconsiderando-se o potencial calorífico do H_2, o rendimento energético do sistema UF-2+RM foi maior que do RU nas Etapas 4 e 7 em 7,7% e 20,7%, respectivamente. Maior vantagem em termos de rendimento é relatada por Mamimin et al. (2015), que obtiveram em um reator UASB tratando efluente de óleo de palma acidificado um rendimento de metano 34% maior do que o obtido em um reator UASB tratando o efluente bruto.

Tabela 5.8 - Potencial de rendimento energético nos sistemas UF-2+RM e RU

	Etapa 4*		Etapa 7**	
Rendimento energético	**2 estágios**	**1 estágio**	**2 estágios**	**1 estágio**
HY ($kJH_2/gDQO_{adic.}$)	2,29	0.03	2,14	0,12
MH ($kJCH_4/gDQO_{adic.}$)	13,73	12,75	18,55	15,36
EY ($kJH_2+kJCH_4/gDQO_{adic.}$)	16,02	12,78	20,69	15,49
HY/EY (%)	14,3	0,3	10,3	0,8
MY/EY (%)	85,7	99,7	89,7	99,2

HY: rendimento energético pelo H_2, MY: rendimento energético pelo CH_4, EY: rendimento energético total
*COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$): reator UF-2 = 25.8, RM = 3.9, UF-2+RM = 3.5, RU = 3.5
**COV ($gDQO.L^{-1}d^{-1}$): reator UF-2 = 26.0, RM = 7.8, UF-2+RM = 6.4, RU = 5.2

Apesar de o rendimento energético advindo do H_2 ser relativamente baixo no sistema UF-2+RM, de 10,3 a 14,3% do rendimento energético total, atenta-se para o uso do H_2 como um catalisador de combustão, ao invés de carreador de energia. Para isso, uma possibilidade é de se misturar o biogás do reator acidogênico ao biogás do reator metanogênico, produzindo-se uma mistura de CH_4, CO_2 e H_2. Esta mistura, por vezes chamada de biohitano (do inglês *biohythane*), pode oferecer vantagens em relação ao biogás convencional, composto por apenas CH_4 e CO_2, como a melhoria das propriedades de combustão e redução das emissões de CO_2 e NO_X (Ortenzi et al., 2008; Ghoniem, 2011; Cavinato et al., 2012).

5.2.7 Composição microbiana do RM e do RU

Um total de 35665, 31617 e 32400 sequências foram obtidas a partir do lodo do inóculo, do RM e do RU, respectivamente. A proporção de microrganismos do domínio Archaea sobre a população total de bactérias e arqueias caiu de 9,7% no inóculo para 2,3% e 1,2% no RM e no RU, respectivamente. A sobrecarga orgânica dos sistemas durante a partida, indicada pelas altas concentrações de ácidos orgânicos no efluente neste período, provavelmente afetou a sobrevivência das arqueias.

A composição microbiana das principais sequências encontradas é mostrada na Tabela 5.9. Em relação à composição do domínio Archaea, diferenças marcantes ocorreram entre o RM e o RU. Das arqueias totais, as arqueias hidrogenotróficas dos gêneros *Methanospirillum*, *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter* corresponderam, no total, a 39% no RM e a 71% no RU, enquanto as arqueias acetoclásticas dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* corresponderam, no total, a 54% no RM e a 22% no RU. As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas do gênero *Methanospirillum* estavam relativamente abundantes apenas no RU, correspondendo a 37%, sendo que no RM a sua abundância foi de apenas 4%. Esta é uma indicação de uma maior disponibilidade de hidrogênio no RU, proveniente da atividade fermentativa. Como a sacarose é um substrato muito facilmente biodegradável, é provável que o hidrogênio fosse produzido no fundo do RU, favorecendo o crescimento de microrganismos hidrogenotróficos. Já a abundância relativa de *Methanobacterium*, também um gênero de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (Chernicharo, 2007), foi muito semelhante entre o RM e o RU, correspondendo a 31 e 34% das arqueias, respectivamente. Por outro lado, o gênero *Methanosaeta*, que produz metano exclusivamente a partir de acetato (Chernicharo, 2007), apresentou maior abundância relativa no RM, de 49%, enquanto que no RU a sua abundância foi de 19%. Isto sugere que a alimentação do RM com o substrato rico em acetato, proveniente do reator UF-2, favoreceu a manutenção de microrganismos metanogênicos acetoclásticos.

Não foram observadas grandes diferenças quanto à composição bacteriana. Em ambos os reatores, RM e RU, as bactérias da família Veillonellaceae foram o grupo mais abundante. O gênero *Veillonella* tem habilidade reconhecida de fermentar o lactato (Madigan et al., 2015). Assim, a presença dessas bactérias pode ser devido às altas concentrações de lactato, que é um produto comum da fermentação de sacarose e, de fato, foi encontrado em grande abundância no efluente dos reatores acidogênicos.

Tabela 5.9 - Sequências do 16S rDNA (região V4-5) com abundância > 5% para cada domínio no RM e no RU, classificadas usando o SINA (v1.2.11)

Domínio	Otu	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Inóculo	RM	RU
Archaea	Otu002	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	*Methanosaeta*	49%	49%	19%
	Otu019	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	*Methanospirillum*	0%	0%	22%
	Otu004	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	*Methanobacterium*	13%	14%	10%
	Otu007	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanospirillaceae	*Methanospirillum*	0%	3%	13%
	Otu001	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	*Methanobacterium*	7%	12%	13%
	Otu003	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	*Methanobacterium*	0%	6%	11%
	Otu010	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	*Methanosarcina*	0%	5%	4%
Bacteria	Otu0021	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	*Veillonella*	0%	14%	1%
	Otu0012	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	0%	7%	17%
	Otu0018	Firmicutes	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	unclassified	0%	1%	17%
	Otu0033	unclassified	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	0%	0%	8%
	Otu0042	Chlorobi	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	unclassified	unclassified	0%	7%	0%
	Otu0028	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	*Lactococcus*	0%	6%	2%
	Otu0020	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae_1	*Clostridium_sensu_stricto*	1%	6%	3%
	Otu0045	SHA-109	Unclassified	unclassified	unclassified	unclassified	0%	0%	6%

5.3 AnMBR: impacto da acidificação em etapa prévia sobre o desempenho e a filtração

Nesta seção, são apresentados os resultados da operação dos biorreatores com membrana anaeróbios (AnMBR), avaliando-se os efeitos da alimentação previamente acidificada sobre o desempenho geral e sobre a filtração, ao comparar o AnMBR alimentado com efluente acidificado biologicamente (2-AnMBR) ao AnMBR alimentado com efluente bruto (1-AnMBR).

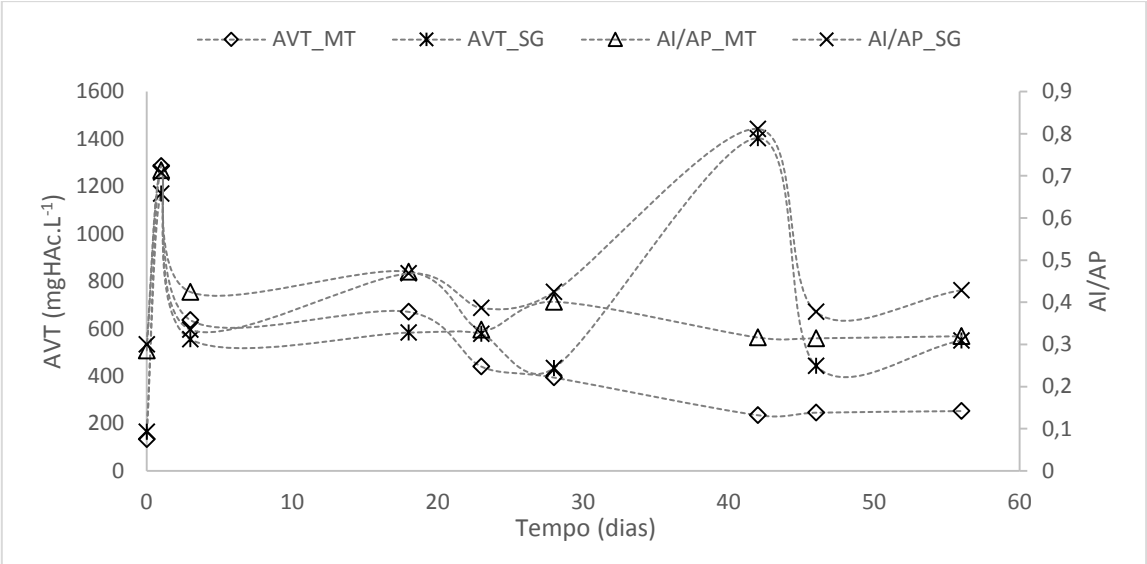
5.3.1 Adaptação dos reatores

Durante a adaptação, no reator acidogênico (AC), foi verificado se níveis adequados de acidificação do afluente estavam sendo alcançados, por meio das análises de pH, ácidos voláteis totais (AVT), sacarose, glicose e frutose, e das espécies de ácidos orgânicos. No final do primeiro mês de operação, a eficiência de remoção da sacarose estava em aproximadamente 68% e o lactato foi o produto na fase líquida mais abundante (cerca de 1600 $mg.L^{-1}$). Assim, aumentou-se o TDH do reator AC de 5 para 7,2 h com o intuito de aumentar a remoção de sacarose e obter outros ácidos. Com isso, a eficiência da remoção de sacarose aumentou para cerca de 90%, e também aumentou a produção de ácidos acético (40-390 $mg.L^{-1}$) e butírico (380-570 $mg.L^{-1}$). Entretanto, o ácido láctico ainda era o ácido mais abundante (900-1600 $mg.L^{-1}$). Embora os valores do pH do efluente estivessem entre 2,6 e 3,6, com média de 3,0, e, portanto, próximos aos valores do efluente dos reatores acidogênicos das Etapas 1 e 2, outras rotas metabólicas se estabeleceram, como indicado pelas concentrações de butirato muito mais elevadas. É provável que essas diferenças obtidas no reator AC em relação aos demais reatores acidogênicos foi em decorrência principalmente do pH inicial do substrato e do inóculo diferente. Embora o substrato tenha sido muito semelhante ao utilizado para a alimentação dos reatores acidogênicos FB, UG, UF-1 e UF-2, a água de torneira usada para preparar o afluente do reator AC era mais alcalina, resultando em um afluente com pH inicial em torno de 7,4 (enquanto que o pH do afluente dos demais reatores acidogênicos era de 6,5). Assim, buscando-se melhorar o processo de acidificação do efluente, reduzindo a fermentação láctica, o lodo do reator AC foi retirado e se deu início ao processo de autofermentação. A biomassa cresceu rapidamente e, a partir de então, a composição dos ácidos alterou substancialmente, sendo que inicialmente a concentração de lactato foi reduzida para 144 $mg.L^{-1}$, a de acetato aumentou para 699 $mg.L^{-1}$, a de butirato diminuiu para 235 $mg.L^{-1}$, e o propionato também passou a ser produzido (280 $mg.L^{-1}$).

Nos reatores metanogênicos alimentados com efluente acidificado (MT) e efluente bruto (SG), os principais parâmetros de monitoramento durante a adaptação foram o pH, AVT, alcalinidade bicarbonato (AB) e relação AI/AP, pois, com a análise destes parâmetros é possível inferir o grau

de estabilidade dos reatores. Observa-se que, na maior parte do tempo, a concentração de AVT foi mantida abaixo dos níveis críticos, ou seja, <1000 mg L^{-1} e a razão AI/AP se manteve em aproximadamente 0,3 e 0,4 nos reatores MT e SG, respectivamente (Figura 5.41). Embora um pico na concentração de AVT tenha sido observado no reator SG, isso não afetou gravemente a operação do reator, uma vez que os valores de pH foram mantidos acima de 6,9. Em poucos dias, a concentração de AVT diminuiu novamente.

Figura 5.41 - Relação AI/AP e níveis de AVT no efluente durante a adaptação dos AnMBR



5.3.2 Desempenho do tratamento

A Tabela 5.10 apresenta os dados das principais análises do afluente e a Tabela 5.11 apresenta os parâmetros médios de operação registrados durante o monitoramento, conforme os valores de vazão e de DQO afluente. Embora a DQO do afluente dos reatores AC e 1-AnMBR tenha sido estabelecida em 5 g.L^{-1}, ocorreram algumas variações de diluição. No caso do 1-AnMBR foi necessário reduzir a DQO afluente, no 44º dia de operação, para 4 g.L^{-1}, devido aos sinais de sobrecarga que foram observados neste reator. As características da alimentação do 2-AnMBR naturalmente não foram constantes devido às variações do grau de acidificação e da eficiência de retenção de sólidos no reator AC.

Tabela 5.10 - Características do afluente: mínimo - máximo (média ± desvio padrão)

	Reator AC	MT, 2-AnMBR	1-AnMBR
DQO (g L^{-1})	4,7 - 7,1 (5,4 ± 0,7)	3,2 - 4,8 (3,9 ± 0,5)	4,2 - 5,7 (5,1 ± 0,5)[1] 3,9 - 4,3 (4,0 ± 0,1)[2]
Carboidratos[3] (g L^{-1})	3,5 - 5,4 (4,9 ± 0,7)	0,06 - 0,35 (0,13 ± 0,11)	3,4 - 6,7 (4,4 ± 1,0)
DQO acidificada[4] (%)	-[5]	52 - 72 (65 ± 5)	-[5]
pH	6,7 - 7,8 (7,4 ± 0,4)	6,3 - 6,7 (6,5 ± 0,2)	7,6 - 9,0 (8,5 ± 0,4)

1. Até o 44º dia de operação
2. A partir do 44º dia de operação
3. Quantificado por método colorimétrico (Dubois et al., 1956)
4. Calculada a partir da DQO de cada um dos ácidos identificados por HPLC
5. A concentração de ácidos no afluente bruto era virtualmente igual a 0

Tabela 5.11 - TDH e COV no reator AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR (média ± desvio padrão)

	AC+2-AnMBR	Reator AC	2-AnMBR	1-AnMBR
TDH (h)	28.8 - 38.5 (32.2 ± 2.8)	7.2 - 7.5 (7.5 ± 0.1)	20.7 - 31.0 (24.5 ± 2.7)	25.8 - 37.2 (29.7 ± 3.3)
COV (gDQO.$L^{-1}d^{-1}$)	2.9 - 4.3 (3.7 ± 0.3)	15.0 - 22.9 (17.5 ± 2.4)	3.0 - 5.1 (3.9 ± 0.5)	3.4 - 4.8 (4.1 ± 0.5)[1] 2.5 - 4.0 (3.2 ± 0.5)[2]

1. Até o 44º dia de operação
2. A partir do 44º dia de operação

Após a conjugação dos reatores MT e SG aos módulos de membrana, estes foram operados continuamente por 18 dias, até que o 1-AnMBR apresentou sinais de acidificação e a alimentação teve que ser interrompida. Neste período inicial, a COV média foi de 4,33 gCOD.$L^{-1}d^{-1}$ no 1-AnMBR e de 4,53 gCOD.$L^{-1}d^{-1}$ no 2-AnMBR. As concentrações de AVT no 1-AnMBR atingiram abruptamente valores de até 2600 mgHAc.L^{-1} e o pH caiu para valores em torno de 5,3. O 2-AnMBR apresentou um melhor desempenho, com níveis de AVT abaixo de 500 mgHAc.L^{-1} e os valores de pH mantiveram-se próximos da neutralidade, entre 7,4 e 7,9.

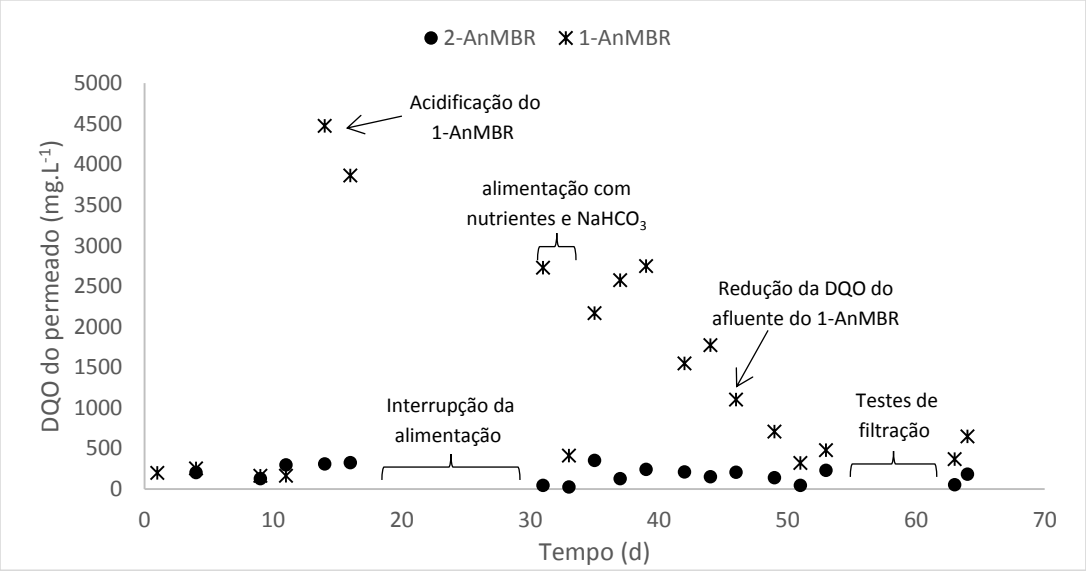
No período em que a alimentação foi interrompida, o 1-AnMBR não se recuperou completamente. Embora o pH tenha aumentado de cerca de 5,6 para 6,2 e a concentração de AB aumentou de 191 para 412 mg$CaCO_3$.L^{-1}, as concentrações de AVT permaneceram bastante elevadas, com valores acima de 2500 mgHAc.L^{-1}. A filtração foi reiniciada, mas por quatro dias a alimentação foi com solução contendo apenas bicarbonato de sódio e nutrientes, de forma que os ácidos fossem "lavados" do 1-AnMBR e a inibição sobre a biomassa metanogênica cessasse. O mesmo procedimento foi aplicado ao 2-AnMBR, embora as concentrações de AVT estivessem abaixo de 100 mgHAc.L^{-1}, para que condições iguais fossem dadas a ambos os AnMBR. No 1-AnMBR este procedimento foi eficaz para reduzir as concentrações de AVT, que no efluente passou para cerca

de 351 mgHAc L^{-1} e, concomitantemente, as concentrações de AB e o pH aumentaram para 2255 $mgCaCO_3.L^{-1}$ e 7,3, respectivamente.

Assim, a alimentação com o afluente original do 1-AnMBR e do 2-AnMBR foi restabelecida. Para evitar uma posterior queda no pH do 1-AnMBR, a concentração de $NaHCO_3$ no afluente passou de 3,32 para 4,16 $g.L^{-1}$. Na alimentação do 2-AnMBR, esta permaneceu em 3,32 $g.L^{-1}$. O aumento do bicarbonato afluente foi eficiente para manter os valores de pH no permeado do 1-AnMBR em uma faixa neutra (7,1-7,3); no entanto, uma tendência ao acúmulo de AVT foi novamente observada, excedendo os limites inibitórios, ou seja, valores acima de 1000 $mgHa.L^{-1}$. Por causa disso, a DQO do afluente do 1-AnMBR foi reduzida de 5 para 4 $g.L^{-1}$. Ressalta-se que, para reduzir a COV no 1-AnMBR, não foi tomada a medida de se aumentar o TDH, pelo fato de que não seria possível aumentar o volume útil do reator e não seria adequando reduzir a vazão. Pois, a redução da vazão implicaria em redução do fluxo transmembrana (J), que deveria ser igual ao fluxo aplicado no 2-AnMBR, para que as condições de filtração entre os dois AnMBR fossem equivalentes, permitindo a comparação entre eles nesse quesito, que era o foco do experimento.

A variação temporal da DQO do permeado é apresentada na Figura 5.42. Quando as concentrações de AVT no 1-AnMBR atingiram níveis muito elevados, a remoção de DQO foi drasticamente reduzida. A concentração de DQO no permeado do 1-AnMBR passou de 251 $mg.L^{-1}$ no 11º dia para 4585 $mg.L^{-1}$ no 14º dia de operação. A redução da concentração de DQO do afluente do 1-AnMBR foi a única maneira de alcançar uma remoção satisfatória e evitar o crescente aumento das concentrações de AVT. Já os valores de DQO no permeado do 2-AnMBR foram relativamente estáveis, em torno de 200 $mg.L^{-1}$.

Figura 5.42 - Variação temporal da DQO do permeado do 1-AnMBR e do 2-AnMBR



Portanto, em termos de estabilidade e eficiência do processo, o 2-AnMBR apresentou um desempenho muito superior. Entretanto, vale ressaltar que até o 44º dia de operação, a COV considerando o volume do reator AC e do 2-AnMBR (3,7 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ em média) foi ligeiramente inferior em relação à COV do 1-AnMBR (4,1 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ em média), conforme mostrado na Tabela 5.11. Porém, mesmo com a redução da concentração do afluente e da COV do 1-AnMBR para aproximadamente 3,2 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$, os valores de DQO no permeado ainda eram um pouco maiores que do permeado do 2-AnMBR, ressaltando que a pré-acidificação do afluente pode resultar em maior eficiência do tratamento.

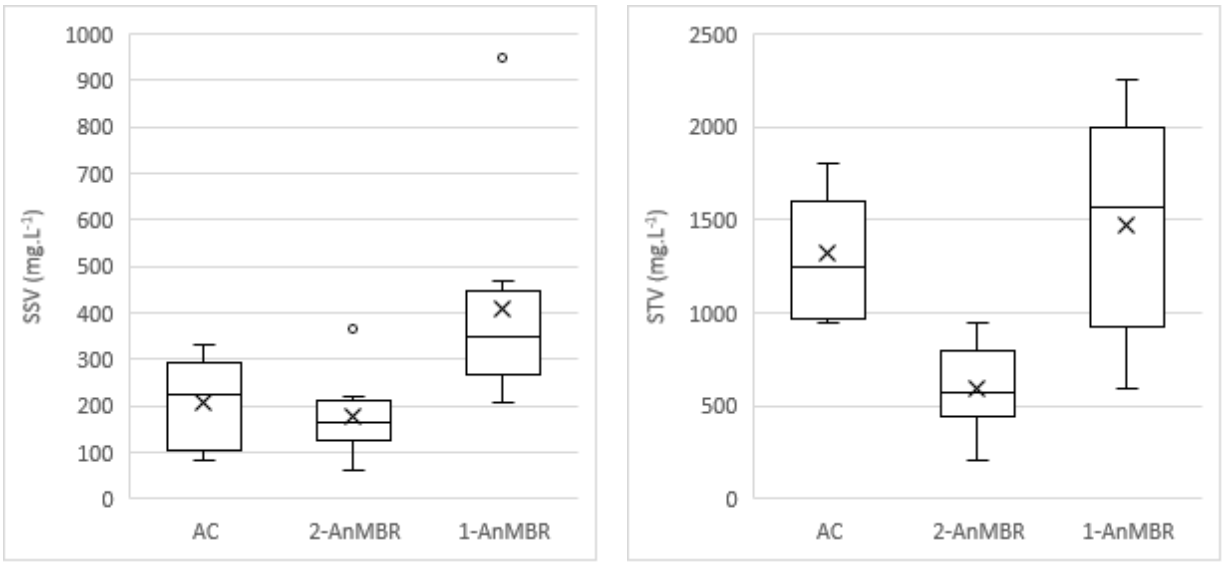
Em relação à produção de biogás e ao teor de metano, o 2-AnMBR também apresentou desempenho superior ao 1-AnMBR. Sendo formado por praticamente CH_4 e CO_2, o conteúdo de CH_4 no biogás do 2-AnMBR foi de aproximadamente 68%, enquanto que no biogás do 1-AnMBR o conteúdo de CH_4 foi de apenas 39%, em média. Não houve produção de CH_4 no reator AC e a produção de H_2 foi mínima, sendo o biogás do reator AC composto por mais de 95% de CO_2. O rendimento de CH_4 foi de aproximadamente 117 $mLCH_4.g^{-1}DQO_{adicionada}$ no 1-AnMBR. No 2-AnMBR, este foi de 229 $mLCH_4.g^{-1}DQO_{adicionada}$ considerando a DQO afluente ao 2-AnMBR, ou de 175 $mLCH_4.g^{-1}DQO_{adicionada}$ considerando a DQO afluente ao reator AC. Apesar das elevadas eficiências de remoção de DQO, sobretudo no 2-AnMBR, a produção de metano foi baixa, provavelmente devido à perda de biogás no efluente, que pode ter sido favorecida pelas altas taxas de recirculação do biogás.

5.3.3 Sólidos e produtos microbianos solúveis

São apresentadas as concentrações de SSV e de STV e dos SMP quantificados como proteínas e carboidratos do líquido reacional proveniente da parte do decantador do separador trifásico de cada um dos reatores (conforme explicado no item 4.3.3) nas Figuras 5.43 e 5.44, respectivamente. Devido à elevada heterogeneidade dos dados, considerou-se mais adequado avaliar os valores em termos de mediana do que de média aritmética. Assim, na Tabela 5.12 é apresentado o balanço de DQO da fração solúvel dos reatores (<0,45 µm) considerando os valores das medianas para os parâmetros analisados. Para a conversão dos valores em $mgDQO.L^{-1}$, obteve-se os fatores de conversão por estequiometria, calculando-se a quantidade de O_2 necessária para completa oxidação de cada um dos ácidos analisados e dos carboidratos (considerando a glicose) e, no caso das proteínas, o fator de conversão adotado foi de 1,20, proposto por Henze et al. (2002). A diferenciação entre os carboidratos do afluente e secretado pelos microrganismos poderia ser obtida pela diferença entre os carboidratos totais (método colorimétrico) e a soma da sacarose, glicose e frutose (analisada por cromatografia). Entretanto, as concentrações de sacarose, glicose

e frutose foram geralmente muito baixas, estando em uma faixa mais sujeita a erros de quantificação conforme a curva utilizada no equipamento, não tendo sido então contabilizadas.

Figura 5.43 - Perfil de sólidos no sobrenadante dos reatores AC, 1-AnMBR e 2-AnMBR

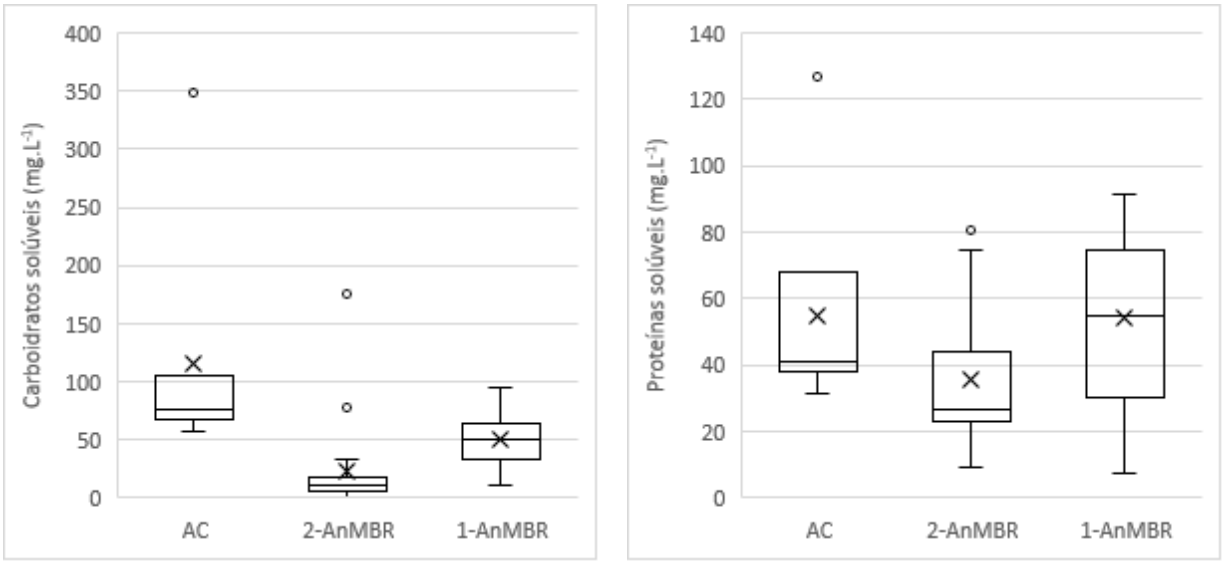


(a) (b)

Sólidos suspensos voláteis (a) e sólidos totais voláteis (b)

As menores concentrações de SSV e STV foram observadas no 2-AnMBR. Este fato corrobora com a argumentação que, em um reator anaeróbio de dois estágios, a redução da atividade de fermentação no reator metanogênico, por meio da alimentação com afluente acidificado, resulta na redução do crescimento de biomassa. Em relação ao reator AC, não é possível fazer uma comparação direta, pois a retenção de sólidos não era completa como nos AnMBR.

Figura 5.44 - SMP nos reatores AC, 1-AnMBR e 2-AnMBR



(a) (b)

SMP-carboidratos (a) e SMP-proteínas (b)

Tabela 5.12 - Medianas dos parâmetros analisados na fração solúvel (< 0,45 µm) dos reatores

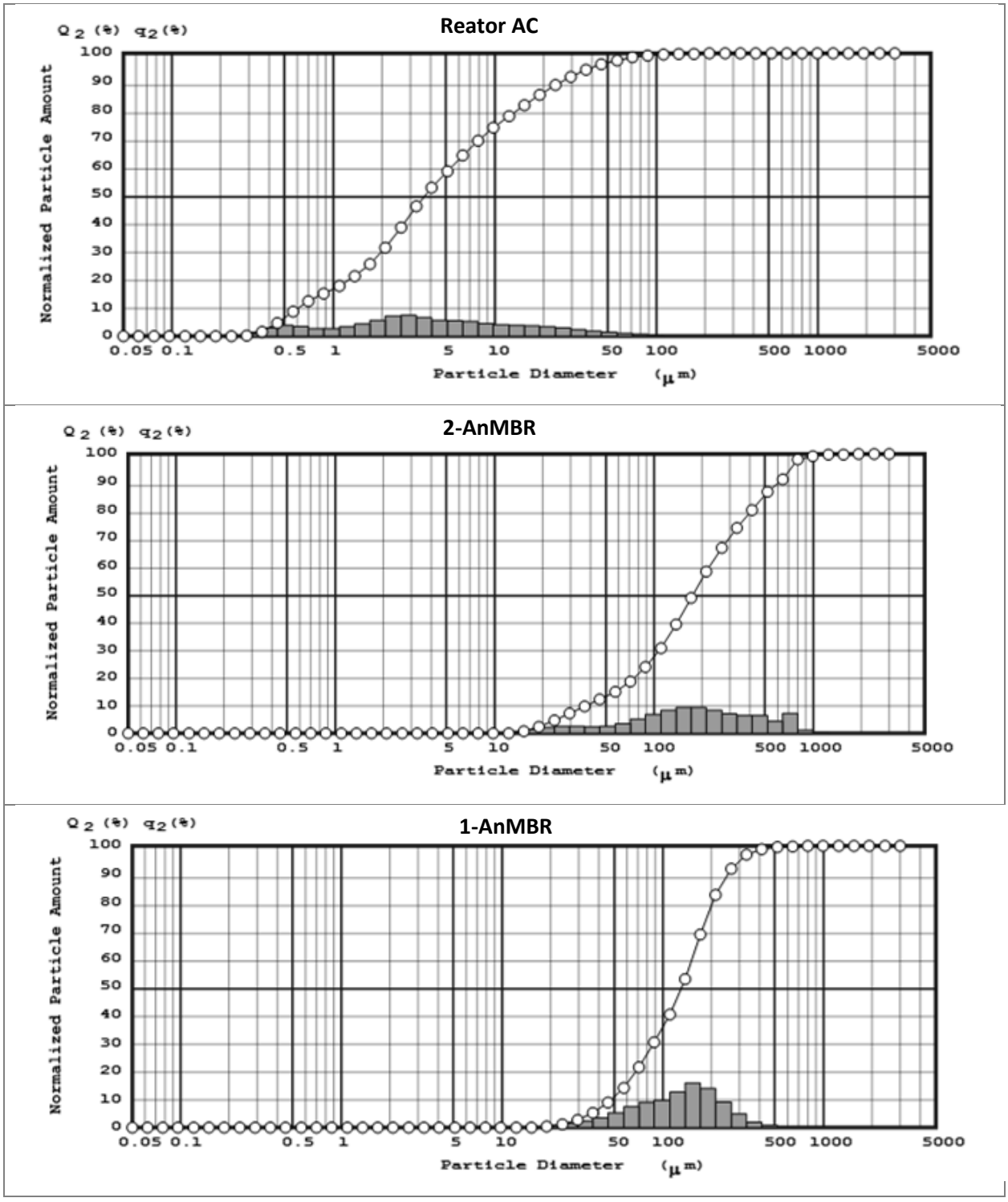
DQO solúvel	reator AC	2-AnMBR	1-AnMBR
DQO ($mg.L^{-1}$)	3825,0	287,0	1122,0
DQO-carboidratos[1] ($mg.L^{-1}$)	81,2	13,1	53,2
DQO-proteínas[2] ($mg.L^{-1}$)	49,6	31,8	65,6
DQO-ácidos orgânicos[3] ($mg.L^{-1}$)	2463,2	218,0	1239,4
DQO-SMP[4] ($mg.L^{-1}$)	1413,6	58,1	291,8
DQO não identificada[5] ($mg.L^{-1}$)	1212,5	0,0	146,2

1. Considerando a glicose como representativa dos carboidratos e o fator de conversão de 1,07 gO_2/g.
2. Considerando o fator de conversão de 1,20 gO_2/g (Henze et al., 2002).
3. Considerando o fator de conversão obtidos pelas reações de oxirredução.
4. Calculada pela diferença entre a DQO solúvel total e a DQO dos ácidos orgânicos.
5. Calculada pela diferença entre a DQO solúvel total e a soma da DQO dos ácidos orgânicos, dos carboidratos e das proteínas.

Nota-se que as concentrações de SMP nos AnMBR foram muito baixas, sendo ainda menores no 2-AnMBR do que no 1-AnMBR (Figura 5.44, Tabela 5.12). No reator AC, por outro lado, as concentrações de SMP-DQO foram mais elevadas, sobretudo de DQO não identificada. Estes resultados indicam a maior secreção de SMP pelas bactérias acidogênicas, conforme já relatado em estudos anteriores (Jeison, 2007; Wu & Zhou, 2010; Mota et al., 2013). Devido ao alto teor de DQO não identificada no reator AC, atenta-se para a necessidade de inclusão de outros parâmetros para melhor caracterização dos SMP. Como no 1-AnMBR as concentrações de SMP foram muito menores do que no reator AC, supõe-se que parte dos SMP liberados pelas bactérias acidogênicas no 1-AnMBR tenha sido consumida e/ou utilizada para a aglutinação das partículas em flocos e grânulos.

No final da operação, a distribuição do tamanho de partículas do lodo revelou que o lodo do reator AC apresentou as menores partículas de menores diâmetros, com valores de média e mediana de 10,8 e 3,7 µm, respectivamente. O lodo dos AnMBR apresentou partículas muito maiores, com diâmetros cujos valores de médias e medianas foram, respectivamente, de 281,0 e 177,8 µm no 2-AnMBR e de 160,0 e 131,7 µm. no 1-AnMBR. Apesar dos valores de medianas próximos, o perfil de distribuição do tamanho das partículas foi muito diferente entre o 2-AnMBR e o 1-AnMBR (Figura 5.45).

Figura 5.45 - Distribuição do tamanho das partículas nos reatores AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR



No 1-AnMBR, a distribuição do tamanho das partículas se apresentou mais concentrada em relação ao 2-AnMBR. Apesar do menor valor médio de diâmetro considerando o total das partículas, no 1-AnMBR as partículas de menores dimensões foram relativamente menos abundantes. Segundo Fukuzaki et al. (1995), as bactérias acidogênicas são responsáveis pela maior liberação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), contribuindo para a formação e estabilidade estrutural dos grânulos metanogênicos. Assim, a redução do crescimento de bactérias

acidogênicas no 2-AnMBR pode ter contribuído para a maior amplitude do tamanho das partículas, com relativa maior proporção de partículas de menores dimensões, comparado ao 1-AnMBR. As partículas com até 36,8 µm de diâmetro representaram apenas 5,3% da amostra do 1-AnMBR, enquanto que no 2-AnMBR esse valor foi de 9,8%. Principalmente na faixa de diâmetro compreendida entre 71,2 e 214,0 µm, observa-se uma maior concentração no 1-AnMBR, correspondendo a 62,3% das partículas. Já no 2-AnMBR, as partículas nesta faixa de diâmetro foram 39,3%. Por outro lado, as partículas com diâmetro maior que 214 µm foram 17% e 43% no 1-AnMBR e no 2-AnMBR, respectivamente. No reator AC, 91,8% das partículas apresentaram diâmetro menor que 29,5 µm e 52,6% menor que 4,1 µm.

As menores dimensões de partículas no reator AC corroboram com os estudos de Jeison e van Lier (2007) e Jeison et al. (2009) que afirmam que as bactérias acidogênicas crescem em grande parte suspensas, em partículas de menores dimensões. Estudando AnMBR externos, de mistura promovida pela recirculação do biogás no interior do reator, a 55°C, Jeison et al. (2009) observaram que no reator alimentado com efluente não acidificado houve maior abundância de partículas de menores dimensões na porção sobrenadante do que no reator alimentado com AGV, sobretudo devido ao crescimento de bactérias acidogênicas. No presente estudo, ao contrário, observou-se uma baixa concentração de partículas de menores diâmetros no 1-AnMBR (apenas 2,9% eram menores que 29,5 µm). É provável que, devido à configuração de reator UASB usada no 1-AnMBR, as bactérias acidogênicas tenham se aglutinado com os demais microrganismos, formando flocos maiores e grânulos e, em parte, permaneceram na manta de lodo na parte inferior do reator (conforme descrito no item 4.3.3, para esta análise foram retiradas amostras de lodo da parte superior dos reatores).

No estudo de Dereli et al. (2015), observou-se um padrão bimodal de distribuição de partículas no reator acidogênico e no reator metanogênico alimentado com efluente acidificado livre de sólidos, enquanto que no reator metanogênico de estágio único (alimentado com efluente bruto) observou-se um padrão de distribuição unimodal. No caso, os autores inferem que o padrão bimodal no reator acidogênico, ao invés de somente partículas menores, foi devido à seleção de flocos maiores no reator em batelada sequencial. Os reatores metanogênicos, por outro lado, eram contínuos e de mistura completa. As maiores partículas no reator metanogênico alimentado com efluente acidificado, segundo os autores, se deve às condições metanogênicas que promovem a formação de flocos entre microrganismos acetogênicos e metanogênicos para possibilitar a transferência interespécie de hidrogênio. Além disso, uma parcela das partículas maiores provavelmente era proveniente do inóculo, uma vez que neste reator foi observado baixo crescimento de

microrganismos. Embora no presente estudo os perfis de distribuição do tamanho de partículas não foram tão evidentes quanto no estudo de Dereli et al. (2015), também se observou uma tendência para um padrão bimodal no 2-AnMBR e unimodal no 1-AnMBR. Portanto, levanta-se a hipótese de que a presença das bactérias acidogências em reatores metanogênicos contribui para a formação de flocos de tamanho intermediário, enquanto que reatores metanogênicos com reduzido crescimento de bactérias acidogênicas apresentam flocos maiores pelos motivos acima mencionados, mas também flocos menores devido à dispersão das bactérias acidogências remanescentes, talvez pelo fato de as bactérias acidogênicas terem menor funcionalidade para a comunidade microbiana neste caso. Contudo, análises da comunidade microbiana para cada faixa de tamanho de partículas seriam necessárias para inferir quais grupos de microrganismos foram responsáveis pelos padrões observados.

Pelas observações macroscópicas do lodo retido em filtro de membrana de poro nominal de 0,60 µm, nota-se que o lodo do 2-AnMBR parecia conter flocos e grânulos maiores que o lodo do 1-AnMBR. Não era possível visualizar com nitidez as partículas do reator AC devido aos reduzidos tamanhos, apesar de mais de 90% possuírem diâmetro > 0,60 µm (Figura 5.46). Por estas imagens, observa-se maior abundância de flocos metanogênicos no 1-AnMBR, enquanto que os flocos acidogênicos são de difícil visualização.

Figura 5.46 - Observação macroscópica do lodo dos reatores AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR

(a) reator AC (b) 2-AnMBR (c) 1-AnMBR

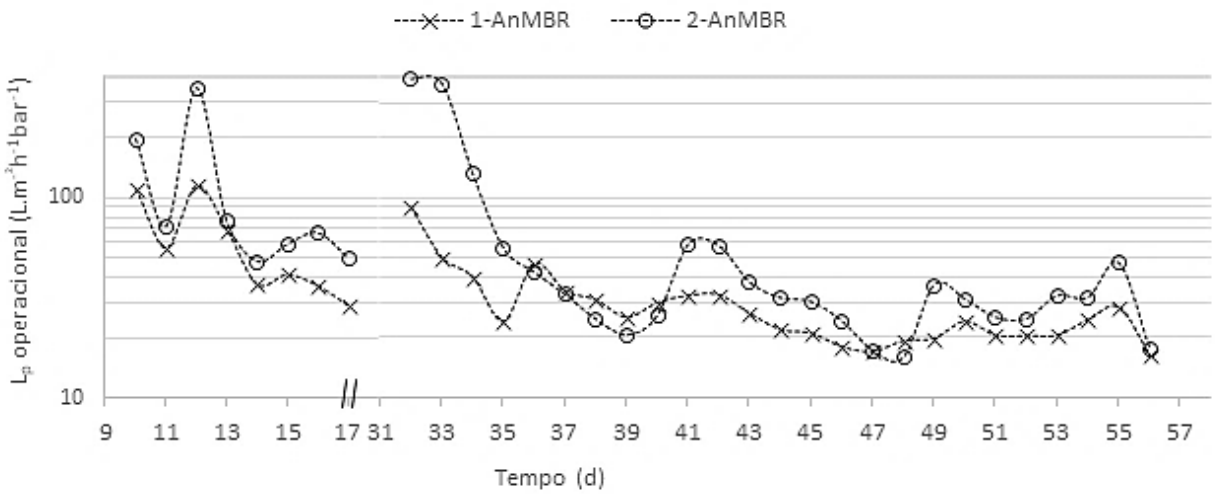
5.3.4 Desempenho da filtração

No início da operação, a permeabilidade operacional diminuiu de aproximadamente 357 para 50 $L.m^{-2}h^{-1}bar^{-1}$ no 2-AnMBR e de 113 para 29 $L.m^{-2}h^{-1}bar^{-1}$ no 1-AnMBR. Após a interrupção da alimentação, os sistemas recuperaram sua permeabilidade original. No entanto, após alguns dias, uma queda acentuada na permeabilidade foi observada. No período seguinte, o 2-AnMBR apresentou uma permeabilidade oscilando em torno de 58 e 25 $L.m^{-2}h^{-1}bar^{-1}$, enquanto a

permeabilidade no 1-AnMBR ficou em torno de 43 e 21 $L.m^{-2}h^{-1}bar^{-1}$ (Figura 5.47). Verifica-se que, no início da operação, quando o 1-AnMBR apresentou problemas de acidificação, as diferenças nos valores de permeabilidade foram mais acentuadas. Provavelmente, as condições de estresse neste reator levaram ao maior decaimento microbiano e desagregação dos grânulos, aumentando o grau de formação de torta sobre a superfície da membrana.

Como constatou-se pelo teste de Shapiro-Wilk que a distribuição dos dados de permeabilidade operacional não foi normal nos AnMBR, aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para verificar se as diferenças encontradas eram estatisticamente significantes (α = 0,05). Conforme o teste, a permeabilidade no 1-AnMBR foi menor que no 2-AnMBR (p = 0,014). Estes resultados indicam que, de fato, a pré-acidificação do afluente pode contribuir para a redução da incrustação nas membranas.

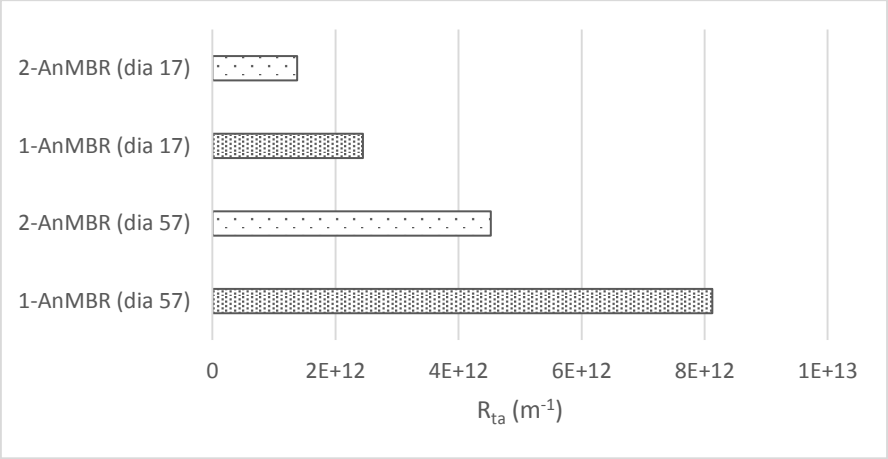
Figura 5.47 - Permeabilidade da membrana durante a operação contínua



*Eixo y em escala logarítmica

No período inicial de operação, logo antes da interrupção da alimentação no 17º dia, e no final da operação, no 57º dia, a resistência total aparente da membrana (R_{ta}) foi avaliada. Como o aparato experimental do sistema de filtração (mangueiras e módulo de membrana) foi delicadamente lavado com água antes dos testes, a resistência medida pela filtração com água destilada representava a soma da resistência intrínseca da membrana e a resistência causada pela incrustação, sendo esta causada por bloqueio de poros e adsorção e, principalmente, pela formação de torta firmemente aderida à superfície da membrana (não desprendida com a passagem de água no módulo).

Figura 5.48 - Resistência total aparente da membrana

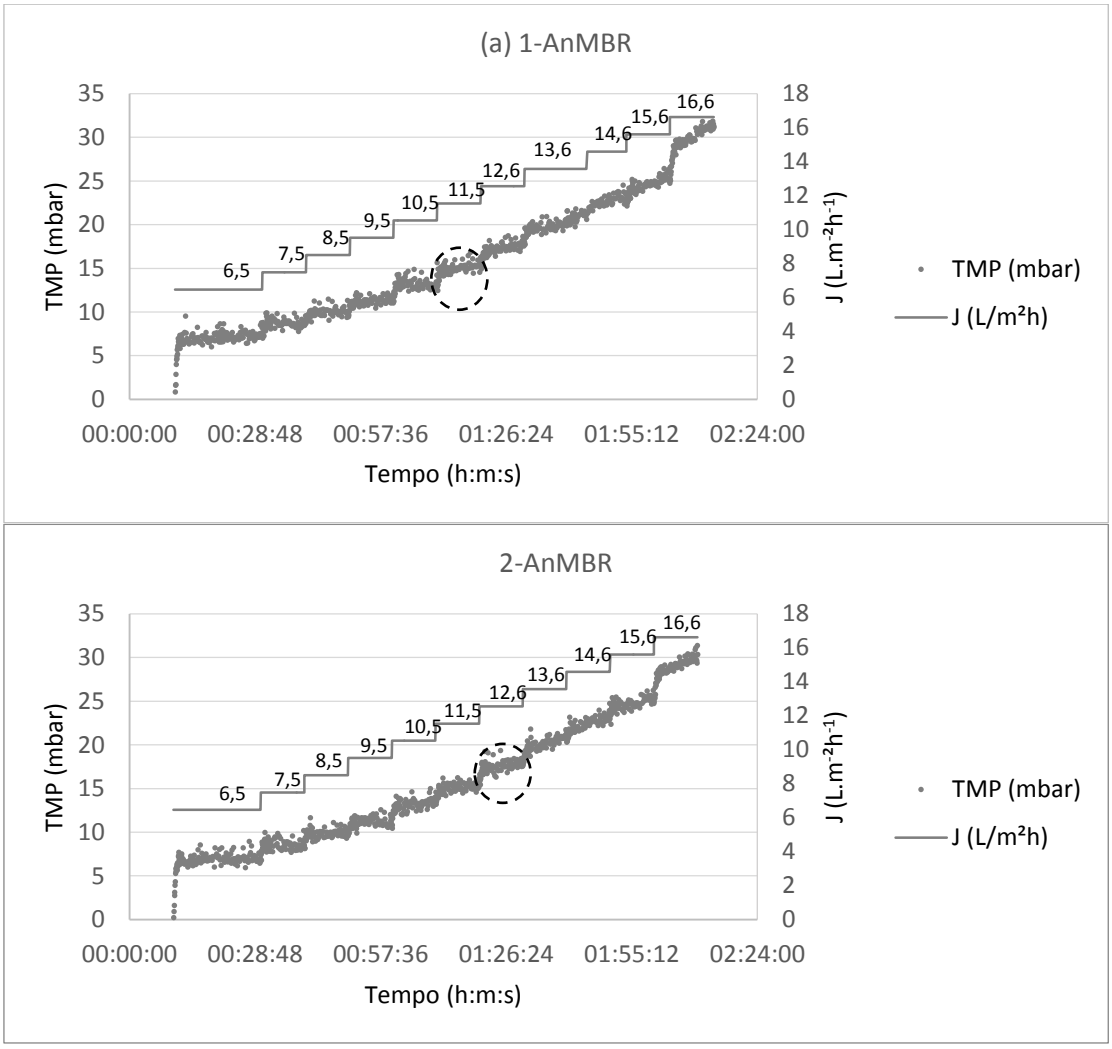


É notória que a R_{ta} aumentou de forma substancial em ambos os AnMBR ao final da operação em relação ao período inicial (Figura 5.48). Previamente, com a membrana nova, a resistência intrínseca da membrana (R_m) havia sido calculada em 7,3x10^{11} m^{-1}. Logo, a resistência causada pela incrustação das membranas (R_f) foi de aproximadamente 1,7 x 10^{12} m^{-1} no 1-AnMBR e 6,5 x 10^{11} m^{-1} no 2-AnMBR no 17º dia, e 7,4 x 10^{12} m^{-1} no 1-AnMBR e 3,8 x 10^{12} m^{-1} no 2-AnMBR no 57º dia.

A razão R_{ta}1-AnMBR/R_{ta}2-AnMBR foi de 1,8 nos dois testes. Essa mesma razão foi obtida avaliando-se a resistência total da membrana durante a operação no dia anterior aos testes, embora os valores da resistência operacional fossem maiores. Isso era esperado devido à resistência adicional causada pela polarização da concentração durante a operação. Estes resultados confirmam que houve maior incrustação da membrana no 1-AnMBR em relação ao 2-AnMBR.

Para avaliação do fluxo crítico, no final da operação, se utilizou um tanque em separado para a alimentação do sistema de filtração. Com o objetivo de avaliar as propriedades do lodo, independentes de sua concentração, os sobrenadantes (não centrifugados) dos AnMBR foram ajustados para uma mesma concentração de SSV. No caso, o lodo do 2-AnMBR possuía uma menor concentração original, equivalente a 171 mgSSV.L^{-1}. Assim, o lodo do 1-AnMBR, que possuía concentração original de 356 mgSSV.L^{-1}, foi diluído 2,08 vezes. O perfil TMP vs. J neste ensaio é apresentado na Figura 5.49.

Figura 5.49 - Ensaios de fluxo crítico com concentração de SSV ajustada para 171 mg.L^{-1}



*Assinalou-se o fluxo a partir do qual a TMP vs. tempo passou a aumentar (α = 0,10)

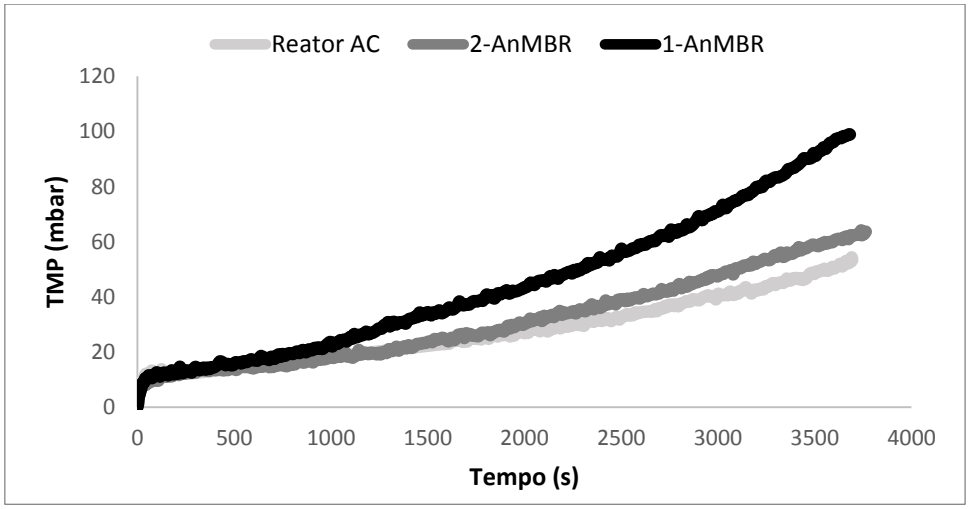
Seguindo o conceito de que o fluxo crítico é o fluxo abaixo do qual a TMP não aumenta significativamente com o passar do tempo, aplicou-se o teste de regressão para verificar quando o aumento da TMP vs. tempo para cada fluxo era significativo. Neste caso, adotou-se um nível de significância de 90%, pois um nível de significância de 95% levaria a resultados conflituosos, já que, em alguns casos, a TMP apresentou tendência de subir e no valor de fluxo seguinte voltava a se estabilizar. Assim, adotando-se um nível de significância maior, os resultados foram mais consistentes, sendo que, a partir de determinado valor de fluxo, a TMP vs. tempo passou a subir significativamente, assim como para os fluxos subsequentes.

Os valores de fluxo crítico foram 11,5 L.m^{-2}h^{-1} para o 1-AnMBR e 12,6 L.m^{-2}h^{-1} para o 2- AnMBR. Verifica-se, portanto, que ambos os AnMBR apresentaram comportamento de filtração muito similar quando a concentração de SSV foi a mesma. Este resultado indica que o melhor desempenho da filtração no 2-AnMBR também foi devido à menor concentração de sólidos neste

reator, e não somente pelas propriedades físicas do lodo. No estudo de Jeison et al. (2009), também utilizando AnMBR de módulo externo pressurizado, o AnMBR alimentado com solução de AGV apresentou um valor de fluxo crítico de duas vezes o valor do fluxo crítico do AnMBR alimentado com efluente não acidificado. Provavelmente o fator de maior relevância para esta diferença entre os resultados esteja na distribuição do tamanho das partículas, uma vez que Jeison et al. (2009) observaram abundância de partículas de menores dimensões no AnMBR alimentado com efluente não acidificado, o que não foi observado no 1-AnMBR, como discutido no item 5.3.3.

A Figura 5.50 mostra o gráfico TMP em função do tempo a um fluxo constante de 9,5 $L.m^{-2}h^{-1}$ (filtração *dead-end*). Estes dados foram utilizados para avaliação da resistência específica da torta (R_{sc}). A concentração de SST foi ajustada para aproximadamente 185 $mg.L^{-1}$, que era a concentração original do lodo do 2-AnMBR. Neste caso, os lodos do reator AC e do 1-AnMBR foram diluídos 1,1 e 1,2 vezes, respectivamente.

Figura 5.50 - TMP vs. tempo durante filtração *dead-end* do lodo



Os valores da R_{sc} foram equivalentes a 7,44 x 10^{11}, 1,03 x 10^{12} e 1,02 x 10^{13} $m.kg^{-1}$TSS para os lodos dos reatores AC, 2-AnMBR e 1-AnMBR, respectivamente. Contradizendo o esperado de que o lodo acidogênico teria o maior potencial de incrustação da membrana (Jeison et al. 2009), devido ao menor tamanho de suas partículas (item 5.3.3), a R_{sc} do lodo do reator AC foi a menor. Segundo Jeison e van Lier (2007), as partículas de menores dimensões têm menor intensidade de fluxo reverso para o meio líquido, devido a mecanismos físicos, apresentando maior tendência de se depositarem na superfície da membrana. Porém, no caso da filtração tipo *dead-end*, como não há emprego de mecanismos para proporcionar o fluxo reverso (aeração, relaxação ou retrolavagem), o mesmo não pôde ser observado. No entanto, até mesmo nos ensaios de resistência específica da torta por filtração *dead-end*, Jeison e van Lier (2007) relatam maior R_{sc} do lodo sobrenadante contendo elevada abundância de bactérias acidogênicas, em relação ao lodo total.

Isto indica que outras propriedades do lodo, além da distribuição do tamanho das partículas, tiveram influência sobre a tendência de formação da torta sobre a superfície da membrana no presente estudo.

Constata-se que a diferença a resistência específica da torta do lodo proveniente do 1-AnMBR foi maior em relação ao lodo proveniente do 2-AnMBR e do reator AC. Estes resultados indicam que a associação microbiana ocorrida no 1-AnMBR, assim como os produtos microbianos liberados no meio, conferiram propriedades do lodo de maior tendência de formação de torta sobre a superfície da membrana do que cada grupo microbiano separadamente. Porém, mais estudos são necessários para verificar o que determina este comportamento.

6 CONCLUSÕES

Na presente pesquisa verificou-se que o tratamento anaeróbio em dois estágios possibilitou a recuperação do hidrogênio produzido na etapa acidogênica com mínimos requerimentos operacionais, a melhoria do desempenho do tratamento e o aumento do rendimento de bioenergia em reatores de leito fixo estruturado, e a melhoria da filtração em biorreatores com membrana. Com relação a cada uma das hipóteses levantadas, conclui-se mais especificamente:

- *Hipótese 1: A forma de retenção da biomassa (biofilme, grânulos e flocos) pode influenciar na produção de hidrogênio, porém, por mecanismos ainda não completamente elucidados.*

- Sim, as configurações e formas de inoculação da biomassa nos reatores acidogênicos tiveram um efeito sobre a produção de H_2, sendo que o crescimento da biomassa de forma suspensa indicou ser mais vantajoso. O reator UASB inoculado com lodo granular (UG) apresentou tendência de se assemelhar ao reator UASB inoculado com grânulos triturados (UF-1). No reator de leito fixo estruturado (FB) houve crescimento de biomassa suspensa e, embora tenha apresentado maior produção de H_2 no início da operação, esta apresentou tendência de redução ao longo do tempo, ao mesmo tempo em que se observou redução nas concentrações de sólidos suspensos no efluente. O reator UF-1, por outro lado, apresentou relativa melhor estabilidade. O reator UASB floculento usado na segunda etapa de operação (UF-2) apresentou PVH e rendimentos de H_2 maiores e também concentrações de SSV muito mais elevadas no efluente em relação aos demais reatores acidogênicos.

- *Hipótese 2: É possível produzir hidrogênio sem a adição de agentes controladores de pH durante a fermentação, controlando-se as condições operacionais para o favorecimento das rotas metabólicas desejadas.*

- Sim, o abaixamento natural do pH devido à produção dos ácidos orgânicos e CO_2, juntamente com o baixo TDH (e alta COV) foram suficientes para a predominância da acidogênese e inibição da metanogênese nos reatores acidogênicos. Sem nenhum pré-tratamento do lodo, houve seleção de bactérias acidogênicas hidrogenogênicas. Entretanto, surpreendentemente, os valores de pH nos reatores acidogênicos mantiveram-se abaixo de 3,0 e, apesar das condições ambientais extremamente ácidas, a produção de H_2 foi contínua e por longa duração. Ressalta-se que a não adição de agentes controladores de pH implica em menores custos, facilidade operacional, maior sustentabilidade ambiental e evita a salinização do efluente.

- *Hipótese 3: A separação da acidogênese contribui para a maior eficiência da metanogênese, por possibilitar um maior controle sobre o processo e reduzir as limitações termodinâmicas*

associadas às concentrações de H_2 no meio, sobrepondo às limitações de transferência de massa causadas pelo maior distanciamento entre os microrganismos produtores e consumidores dos produtos intermediários.

- Sim, mas pode ser irrelevante em determinadas condições. Comparando-se o reator de leito estruturado de estágio único (RU) e o sistema de dois estágios compreendido por um reator UASB acidogênico e um reator de leito fixo estruturado metanogênico (UF-2+RM), verificou-se que com uma DQO afluente de, aproximadamente, 1,0 $g.L^{-1}$, não foi possível inferir se a separação das etapas poderia contribuir para a maior eficiência do sistema, pois o sistema em estágio único apresentou estabilidade e elevada remoção de DQO solúvel (80%) nesta condição. Entretanto, com o aumento da DQO afluente para 1,5 $g.L^{-1}$, aproximadamente, o sistema em estágio único apresentou um aumento mais acentuado nas concentrações de ácidos orgânicos no efluente. Com DQO afluente de aproximadamente 5,0 $g.L^{-1}$, o sistema em dois estágios foi mais eficiente, conforme as análises de DQO e de ácidos orgânicos no efluente. Sob COV equivalentes, o efluente do sistema de dois estágios apresentou concentrações dos ácidos propiônico, acético e butírico muito menores. Em relação aos biorreatores com membrana alimentados com efluente acidificado (2-AnMBR) e com efluente bruto (1-AnMBR) com uma DQO de cerca de 4,0 a 5,0 $g.L^{-1}$, também se verificou maiores concentrações de ácidos propiônico e acético no 1-AnMBR. Esses resultados indicam que a maior eficiência de reatores metanogênicos alimentados com efluente acidificado não é somente pelo favorecimento da acetogênese, mas também da metanogênese acetotrófica.

- *Hipótese 4: A recuperação do H_2 produzido na etapa acidogênica e os maiores rendimentos de CH_4 resultam em maior potencial de produção de bioenergia no sistema de dois estágios.*

- Sim, o aumento do rendimento de bioenergia no sistema UF-2+RM foi de aproximadamente 25 a 34%, considerando-se a soma da produção de hidrogênio e de metano, e de aproximadamente 8 a 21%, considerando-se apenas a produção de metano. A contribuição do H_2 em relação ao rendimento energético total no sistema de dois estágios foi de 10% a 14%.

- *Hipótese 5: A ocorrência da acidogênese em etapa prévia contribui para a redução do crescimento da biomassa acidogênica em reatores metanogênicos, contribuindo para a melhoria da qualidade do efluente final em reatores de leito fixo estruturado.*

- Sim, comparado ao efluente do RU, houve redução em torno de 64% da concentração de SSV no efluente do RM, contribuindo para a sua menor DQO total sobretudo pela redução da DQO particulada. No efluente do RM a concentração média de SSV foi de 80 ± 36 $mg.L^{-1}$, enquanto que no efluente do RU esta foi de 223 ± 119 $mg.L^{-1}$.

- *Hipótese 6: A redução do crescimento de bactérias acidogênicas nos reatores metanogênicos alimentados com efluente acidificado altera as propriedades do lodo, levando à redução das concentrações de sólidos suspensos, de partículas de menores dimensões e de produtos microbianos solúveis, o que, por sua vez, implica na redução do potencial de incrustação em membranas aplicadas em sistemas de BRM.*

- Em parte. No 2-AnMBR houve uma redução de aproximadamente 56% de SSV na porção sobrenadante do líquido reacional em relação ao 1-AnMBR. Entretanto, a análise de distribuição do tamanho das partículas revelou que no 1-AnMBR não havia abundância de partículas de pequenas dimensões tais como presentes no reator acidogênico (AC), apresentando uma distribuição de partículas semelhante à do 2-AnMBR. Provavelmente a configuração de reator UASB empregada nos AnMBR favoreceu a aglutinação da biomassa em flocos e grânulos, bem como a manutenção dos grânulos metanogênicos do inóculo. O crescimento da biomassa acidogênica suspensa e em partículas de pequenas dimensões ficou evidenciada no reator AC. Entretanto, a resistência específica da torta foi menor no lodo do reator AC em comparação ao lodo do 2-AnMBR e 1-AnMBR, sugerindo que o crescimento suspenso de bactérias acidogênicas por si só não seria o principal fator de formação de torta, nessas condições. As concentrações de SMP, em termos de DQO, carboidratos e proteínas foi menor no 2-AnMBR do que no 1-AnMBR. Em relação ao desempenho da filtração, a incrustação da membrana foi menor no 2-AnMBR do que no 1-AnMBR, conforme indicado pela maior permeabilidade operacional, durante a maior parte do tempo experimental, e pela menor resistência total aparente da membrana, que no final da operação era de $4{,}5 \times 10^{-12}$ no 2-AnMBR e de $8{,}1 \times 10^{-12}$ no 1-AnMBR. Porém, quando o lodo do 1-AnMBR foi diluído para concentrações de SSV idênticas às do lodo do 2-AnMBR, os valores de fluxo crítico foram muito semelhantes. Portanto, a redução da concentração de sólidos voláteis totais e suspensos e a menor liberação de SMP no 2-AnMBR possivelmente foram os fatores que resultaram no melhor desempenho da filtração durante a operação.

Além dessas, os resultados obtidos levaram a outras conclusões:

- A produção biológica de H_2 em pH < 3,0 não somente é possível, mas também muito promissora. No reator UF-2 alcançou-se uma produção contínua e satisfatória, de 175 ± 44 $mL.H_2.L^{-1}h^{-1}$ (= 4,2 $LH_2.L^{-1}d^{-1}$), com rendimento elevado em relação à maioria dos estudos semelhantes publicados na literatura, equivalente a 3,4 $molH_2.mol^{-1}sacarose_{removida}$. As condições extremamente ácidas naturalmente inibem a homoacetogênese e a metanogênese, dispensando o pré-tratamento do lodo e permitindo a produção de hidrogênio por longa duração.

- O TDH teve uma importância fundamental para o desempenho da produção de hidrogênio nas condições avaliadas. O aumento do TDH de 3,3 h para 4,6 h, no reator UF-2 levou a uma melhoria significativa do rendimento de H_2, acompanhado de uma maior eficiência de remoção de sacarose, da redução da produção de ácido láctico e do aumento da produção de ácido acético e de etanol.

- A redução da produção de ácido láctico no reator UF-2 provavelmente ocorreu pela mudança das rotas devido à menor COV e pela redução de *Lactobacillus*, que, conforme as análises de sequenciamento do 16S, estavam em abundância < 1,0% no reator UF-2, e entre 20-27% nos reatores FB, UG e UF-1 .

- Conforme as análises de biologia molecular, *Ethanoligenens harbinense* foi a bactéria altamente predominante no reator UF-2, condizendo com os principais produtos formados: H_2, ácido acético e etanol. Portanto, esses resultados indicam que essa bactéria foi a principal responsável pela produção de H_2.

- As análises de metagenômica *shotgun* do reator UF-2 indicaram que a rota mais provável de produção de H_2 foi pela via do piruvato a acetil-CoA, mediada por enzimas do tipo piruvato oxidorredutase e FeFe-hidrogenase; porém, análises adicionais são necessárias para completa elucidação das enzimas e rotas estabelecidas. Verificou-se, pelas sequências das enzimas encontradas, que as vias de produção de H_2 pela oxidação do NADH e de produção de ácido láctico pela fermentação homo ou heteroláctica (de bactérias do ácido láctico) não foram relevantes nesse reator.

- A alimentação com efluente acidificado favoreceu as arqueias metanogênicas acetotróficas no RM, enquanto a alimentação com sacarose bruta favoreceu as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas no RU. Em relação às arqueias totais, os principais gêneros de metanogênicas acetotróficas e hidrogenotróficas estavam em abundância, respectivamente, de 54% e 39% no RM, e de 22% e 71% no RU.

- O biogás proveniente dos reatores metanogênicos precedidos de reatores acidogênicos (RM e 2-AnMBR) apresentou maior percentual de CH_4 e, portanto, maior potencial calorífico em relação ao biogás proveniente dos reatores metanogênicos de estágio único (RU e 1-AnMBR). Após atingirem relativa estabilidade, os percentuais médios de CH_4 no biogás do RM e do RU foram de 70% e 53%, respectivamente. No 2-AnMBR, esse percentual foi de 68%, enquanto que no 1-AnMBR foi de apenas 39%.

7 RECOMENDAÇÕES

A seguir são apresentadas recomendações para pesquisas futuras com base nos resultados obtidos e em hipóteses surgidas a partir desses.

- Comparar o desempenho de diferentes reatores acidogênicos para produção de hidrogênio determinando-se o TDH ótimo para cada um, de forma a avaliar o efeito da variação do TDH em todas as configurações estudadas.

- Avaliar a composição microbiana dos reatores acidogênicos separadamente nas diferentes frações: biomassa suspensa em flocos não sedimentáveis, biomassa em flocos e grânulos sedimentáveis, biomassa em biofilme aderido ao material suporte (no caso do reator de leito fixo estruturado). Essa avaliação teria como objetivo inferir a ocorrência de relações sintróficas entre as aglomerações de microrganismos em flocos, grânulos e biofilme.

- Isolar e caracterizar a bactéria predominante do reator acidogênico que apresentou melhor desempenho, que foi identificada como sendo do gênero *Ethanoligenens*. Um estudo dos requerimentos metabólicos, bem como das possíveis rotas de produção de hidrogênio e a avaliação da expressão das enzimas, por meio de técnicas de metagenômica e metatranscriptoma, podem ser de grande valia para a otimização das condições ambientais nos reatores hidrogenogênicos.

- Como os resultados obtidos indicam que a redução das bactérias lácticas contribuiu para maiores rendimentos de H_2, seria interessante avaliar quais fatores ambientais que inibem essas bactérias nas condições estudadas.

- Avaliar em quais situações é vantajosa a operação de reatores acidogênicos sem a adição de agentes reguladores de pH, tendo em vista que isso contribui consideravelmente para a economia de insumos e facilidade operacional do processo.

- Obter os perfis espaciais de DQO e metabólitos nos reatores acidogênicos, metanogênicos e de estágio único, ou seja, retirar amostras ao longo das diferentes alturas dos reatores (topo, médio e fundo) e analisar os produtos formados, de forma a contribuir para o entendimento das rotas metabólicas estabelecidas.

- De forma a possibilitar a aplicação prática dos resultados da presente pesquisa, para todas as configurações de reatores estudadas, bem como de suas variantes, alimentar com diversos tipos de efluentes reais, especialmente efluentes concentrados em matéria orgânica biodegradável. Igualmente é importante avaliar a robustez dos sistemas às flutuações de carga e de vazão, que normalmente ocorrem em sistemas em escala real.

- Considerando a possibilidade de melhoramento do biogás, composto por metano e dióxido de carbono, pela adição de hidrogênio, estudar as melhores proporções da mistura dos gases provenientes dos reatores acidogênico e metanogênico para a produção de “biohitano”, a fim de se otimizar o potencial energético e de minimizar a poluição ambiental, além de reduzir a necessidade do tratamento e purificação dos gases.

- Avaliar o desempenho de reatores de leito fixo estruturado em escala piloto e em escala real, tendo como referência os resultados obtidos em escala de laboratório.

- Com o intuito de empregar biorreatores com membrana anaeróbios com menor requerimento energético, recomenda-se avaliar os impactos da acidogênese em etapa prévia em AnMBR com módulos submersos.

REFERÊNCIAS

Adams, M. W., Mortenson, L. E., & Chen, J. S. (1981). Hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta, 594*, pp. 105-116.

Alberty, R. A. (1993). Thermodynamics of the nitrogenase reaction. *The Journal of Biological Chemistry, 269*(10), pp. 7099-7102.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology, 215*(3), pp. 403-10.

Anzola-Rojas, M. D., & Zaiat, M. (2016). A novel anaerobic down- flow structured- bed reactor for long- term stable H_2 energy production from wastewater. *Chemical Technology and Biotechnology, 91*(5), pp. 1551-1561.

APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (21 ed.). Washington: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation.

Aquino, S. F., & Chernicharo, C. A. (2005). Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Engenharia Sanitária e Ambiental, 10*(2), pp. 152-161.

Azbar, N., & Speece, R. E. (2001). Two-Phase, Two-Stage, and Single-Stage Anaerobic Process Comparison. *Journal of Environmental Engineering, 127*, pp. 240-248.

Bahl, A. S., & Dhagat, N. N. (2001). Upflow anaerobic sludge blanket reactor - a review. *Indian Journal of Environmental Health, 43*(2), pp. 1-82.

Bahl, H., Andersch, W., & Gottschalk, G. (1982). Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum in a two-stage phosphate limited chemostat. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15(4), pp. 201-205.

Beccari, M., Bonemazzi , F., Majone, M., & Riccardi, C. (1996). Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Water Research, 30*(1), pp. 183-189.

Buchauer , K. A. (1998). A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in effluents to wastewater and sludge treatment processes. *Water SA, 1*(24), pp. 49-56.

Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology, 101,* pp. 9071-9077.

Buitrón, G., Kumar, G., Martinez-Arce, A., & Moreno, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H_2-SBR + CH_4-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy, 39*(33), pp. 19249-19255.

Bull, M. A., Sterritt, R. M., & Lester, J. N. (1984). An evaluation of single- and separated-phase anaerobic industrial wastewater treatment in fluidized bed reactors. *Biotechnology and Bioengineering, 26*(9), pp. 1054-1065.

Cai, G., Jin, B., Monis, P., & Saint, C. (2011). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances, 29*(4), pp. 375-387.

Carlone, G. M., & Lascelles, J. (1982). Aerobic and anaerobic respiratory systems in *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* grown in atmospheres containing hydrogen. *Journal of Bacteriology, 152*(1), pp. 306-14.

Carosia, M. F., Reis, C. M., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B., & Silva, E. L. (2017). Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 42*(15), pp. 9600-9610.

Castelló, E., Santos, C. G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconia, L., & Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy, 34*(14), pp. 5674–5682.

Castro, J. F., Razmilic, V., & Gerdtzen, Z. P. (2013). Genome based metabolic flux analysis of *Ethanoligenens harbinense* for enhanced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy, 38,* pp. 1297-1306.

Cavinato, C., Giuliano, A., Bolzonella, D., Pavan, P., & Cecchi, F. (2012). Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: A long-term pilot scale experience. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*(15), pp. 11549-11555.

Chang, F., & Lin, C. (2004). Biohydrogen Production Using an Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 29*, pp. 33-39.

Chang, F., & Lin, C. (2007). Fermentative Hydrogen Production Using Granulated Sewage Sludge Microflora. *Journal of Environmental Engineering Management, 17*, pp. 57-62.

Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S., & Chang, J. S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy, 30*(10), pp. 1063-1070.

Chen, Z., Hu, D., Zhang, Z., Ren, N., & Zhu, H. (2009). Modeling of two-phase anaerobic process treating traditional Chinese medicine wastewater with the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1. *Bioresource Technology, 100*(20), pp. 4623-31.

Chernicharo, C. A. (2007a). *Anaerobic reactors: Biological wastewater treatment Series Volume 4* (1 ed.). IWA Publishing.

Chernicharo, C. A. (2007b). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias* – (2 ed., Vol. 5). Belo Horizonte, MG, Brasil: Departamento de engenharia sanitária e ambiental – DESA/UFMG.

Chihib, N. E., & Tholozan, J. L. (1999). Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *International Journal of Food Microbiology, 48*(3), pp. 191-202.

Cho, Y. K. (1983). Performance of a two-stage methane digestor for alcohol stillage derived from sugarcane molasses. *Biotechnology Letters, 5*(8), pp. 555-60.

Chojnacka, A., Błaszczyk, M. K., Szczęsny, P., Latoszek, K., Sumińska, M., Tomczyk, K., . . . Sikora, A. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresource Technology, 102*(21), pp. 10057-10064.

Cohen, A., Breure, A. M., van Andel , J. G., & van Deursen, A. (1982). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose, 2. Stability and kinetic responses to shock loadings. *Water Research, 14*, pp. 449-455.

Cohen, A., Breure, A. M., van Andel, J. G., & van Deursen, A. (1980). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose, 1. Maximum COD turnover rate during continuous operation. *Water Research, 14*, pp. 1439-1448.

Cohen, A., van Gemert, A. M., Zoetemeyer, R. J., & Breure, A. M. (1984). Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewater. *Process Biochemistry, 19*, pp. 228-232.

Dabrock, B., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1992). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and Environmental Microbiology, 58*(4), pp. 1233-1239.

Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64*(4), pp. 847-67.

De Lille, M. V., Forstner, J., Groß, F., Benning, R., & Delgado, A. (2016). Modeling the two-stage anaerobic digestion of domestic wastewater with the development of a monitoring application. *Brazilian Journal of Chemical Engineering, 33*(4), pp. 801-815.

Dereli, R. K., Loverdou, L., van der Zee, F. P., & B, v. L. (2015). A systematic study on the effect of substrate acidification degree and acidogenic biomass on sludge filterability. *Water Research, 82*, pp. 94-103.

Dinamarca, C., Gañán, M., Liu, J., & Bakke, R. (2011). H2 consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Science and Technology, 63*(8), pp. 1582-9.

Dong, F., Li, W., Sheng , G., Tang, Y., Yu, H., & Harada, H. (2011). An Online-Monitored Thermophilic Hydrogen Production UASB Reactor for Long-Term Stable Operation. *International Journal of Hydrogen Energy, 36*(21), pp. 13559-13565.

Drapcho, C. M., Nhuan, N. P., & Walker, T. H. (2008). *Biofuels Engineering Process Technology.* Mc Graw Hill Companies, Inc.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, P. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry, 28*, pp. 350-356.

Edwards, C. G., Collins, M. D., Lawson, P. A., & Rodriguez, A. V. (2000). *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50*, pp. 699-702.

Fang, H. H., Liu, H., & Zhang, T. (2002). Characterization of a hydrogen- producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering, 78*(1), pp. 44-52.

Felchner-Zwirello, M., Winter, J., & Gallert, C. (2013). Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer. *Applied Microbiology and Biotechnology, 97*(20), pp. 9193–9205.

Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. M., Varesche, M. B., & Zaiat, M. (2013). The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 170*, pp. 1348-1366.

Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., & Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology, 65*, pp. 3697-3704.

Ferraz Júnior, A. D., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). Mesophilic Hydrogen Production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. *Anaerobe, 34*, pp. 94-105.

Ferraz Júnior, A. D., Koyama, M. H., Araújo Júnior, M. M., & Zaiat, M. (2016). Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renewable Energy, 89*, pp. 245-252.

Foresti, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. *Anais III Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamento Anaeróbio de Aguas Residuales*, (pp. 97-110). Montevideo, Uruguay.

Foresti, E. (2002). Anaerobic treatment of domestic sewage: established technologies and perspectives. *Water Science and Technology, 45*(10), pp. 181-186.

Fuess, L. T., Kiyuna, L. S., Ferraz Júnior, A. D., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy, 189*, pp. 480-491.

Fukuzaki, S., Nish, N., & Naga, S. (1995). High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 79*, pp. 354-359.

Gerardi, M. H. (2006). *Wastewater Bacteria.* Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc.

Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances, 27*(6), pp. 764-781.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy, 144*, pp. 73-95.

Ghoniem, A. F. (2011). Needs, resources and climate change: clean and efficient conversion technologies. *Progress in Energy and Combustion Science, 37*(1), pp. 15-51.

Ghosh, S., Ombregt, J. P., & Pipyn, P. (1985). Methane production from industrial wastes by two-phase anaerobic digestion. *Water Research, 19*(9), pp. 1083-1088.

Giménez, J. B., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M. V., Gatti, M. N., . . . Seco, A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fiber membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology, 102*(19), pp. 8799-8806.

Göblös, S., Portörő, P., Bordás, D., & KálmánI, I. K. (2008). Comparison of the effectivities of two-phase and single-phase anaerobic sequencing batch reactors during dairy wastewater treatment. *Renewable Energy, 33*(5), pp. 960-965.

Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(12), pp. 5488–5491.

Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., . . . Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research, 21*, pp. 494-504.

Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in Fermentative Biohydrogen Production: The Way Forward? *Trends in Biotechnology, 27*, pp. 287-297.

Hallenbeck, P. C., & Liu, Y. (2016). Recent advances in hydrogen production by photosynthetic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy, 41*(7), pp. 4446-4454.

Henze, M., Harremoes, P., Jansen, J. L., & Arvin, E. (2002). *Wastewater Treatment* (3ª edição ed.). Berlim: Springer.

Huang, G. H., Hsu, S. F., Liang, T. M., & Huang, Y. H. (2004). Study on hydrogen production with hysteresis in UASB. *Chemosphere, 54*(7), pp. 815-21.

Hulshoff Pol, L. W., Castro Lopes, S. I., Lettinga, G., & Lens, P. N. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research, 38*(6), pp. 1376-1389.

Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., & Kim, I. S. (2004). Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology, 111*(3), pp. 297-309.

Intanoo, P., Rangsanvigit, P., Malakul, P., & Chavadej, S. (2014). Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresource Technology, 173*, pp. 256-65.

Jeison, D. (2007). *Anaerobic Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment: Feasibility and Potential Applications.* Phd Thesis (Educational Program of Sense), Netherlands Research School for The Socio-Economic and Natural Sciences of the Environment, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Jeison, D., & van Lier, J. B. (2007). Thermophilic treatment of acidified and partially acidified wastewater using an anaerobic submerged MBR: Factors affecting long-term operational flux. *Water Research, 41*(17), pp. 3868-79.

Jeison, D., Plugge, C. M., Pereira, A., & van Lier, J. B. (2009). Effects of the acidogenic biomass on the performance of an anaerobic membrane bioreactor for wastewater treatment. *Bioresource Technology, 100*(6), pp. 1951-6.

Jeong, E., Kim, H., Nama, J., & Shin, H. (2010). Enhancement of bioenergy production and effluent quality by integrating optimized acidification with submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology, 101*(1), pp. S7-S12.

Judd, S. (2006). *The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment* (1 Ed. ed.). Oxford: Elsevier.

Jung, K., Kim, D., & Shin, H. (2013). Application of a simple method to reduce the start-up period in a H_2-producing UASB reactor using xylose. *International Journal of Hydrogen Energy, 38*(18), pp. 7253–7258.

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research, 28*, pp. 27-30.

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research, 45*, pp. D353-D361.

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research, 44*, pp. D457-D462.

Kapp, H. (1984). *Schlammfaulung mit hohem Feststoffgehalt.* Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft. München: Oldenbourg.

Ke, S., Shi, Z., & Fang, H. H. (2005). Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment. *International Journal of Environment and Pollution, 23*, pp. 65–80.

Kim, I. S., Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., & Lee, S. T. (2004a). Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy, 29*(11), pp. 1133-1140.

Kim, M., Ahn, Y., & Speece, R. E. (2002). Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs thermophilic. *Water Research, 36*(17), pp. 4369-4385.

Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2004b). Two- phase anaerobic treatment system for fat-containing wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79*(1), pp. 63-71.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution, 16*(2), pp. 111-20.

Kongjan, P., Jariyaboon, R., & Sompong, O. (2014). Anaerobic digestion of skim latex serum (SLS) for hydrogen and methane production using a two-stage process in a series of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 39*(33), pp. 19343-19348.

Kotsopoulos, T. A., Zeng, R. J., & Angelidaki, I. (2006). Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C). *Biotechnology and Bioengineering, 94*(2), pp. 296-302.

Kozich, J. J., Westcott , S. L., Baxter, N. T., Highlander , S. K., & Schloss , P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology, 79*(17), pp. 5112-20.

Kuhner, C. H., Matthies, C., Acker , G., Schmittroth, M., Gössner, A. S., & Drake, H. L. (2000). *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov.: acid-tolerant, N_2-fixing clostridia isolated from acidic forest soil and litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50*, pp. 873-881.

Kumar, S., Stecher , G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution, 33*(7), pp. 1870-4.

Kyazze, G., Martinez-Perez, N., Dinsdale, R., Premier, G. C., Hawkes, F. R., Guwy, A. J., & Hawkes, D. L. (2006). Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering, 93*(5), pp. 971-979.

Lay, J. J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering, 68*(3), pp. 269-278.

Le Clech, P., Jefferson, B., Chang, I. S., & Judd, S. J. (2003). Critical flux determination by the flux-step method in a submerged membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science, 227*(1-2), pp. 81-93.

Lee, H. -S., Krajmalinik-Brown, R., Zhang, H., & Rittmann, B. E. (2009). An electron-flow model can predict complex redox reactions in mixed-culture fermentative $BioH_2$: Microbial ecology evidence. *Biotechnology and Bioengineering, 104*(4), pp. 687-697.

Lee, Y. H., Miyahara, T., & Noike, T. (2002). Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77*, pp. 694-698.

Leitão, R. C., van Haandel, A. C., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2006). The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresource Technology, 97*, pp. 1105–1118.

Lettinga, G., Hulshof, P. L., & Zeeman, G. (1996). *Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment.* Lecture Notes, Wageningen Agricultural University.

Lettinga, G., Vanvelsen, A. F., Hobma, S. W., Dezzeuw, W., & Klapwijk, A. (1980). Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater. *Biotechnology and Bioengineering, 22*(4), pp. 699-734.

Levenspiel, O. (1999). *Chemical Reaction Engineering.* 3rd edition, N.Y., John Wiley & Sons.

Liang, J., & Burris, R. H. (1988). Hydrogen burst associated with nitrogenase-catalyzed reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 85*, pp. 9446-9450.

Lima, D. M., & Zaiat, M. (2012). The Influence of the Degree of Back-Mixing on Hydrogen Production in an Anaerobic Fixed-Bed Reactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*, pp. 9630-9635.

Lin, H., Peng, W., Zhang, M., Chen, J., Hong, H., & Zhang, Y. (2013). A review on anaerobic membrane bioreactors: Applications, membrane fouling and future perspectives. *Desalination, 314*, pp. 169-188.

Lin, P. J., Chang, J. S., Yang, L. H., Lin, C. Y., Wu, S. Y., & Lee, K. S. (2011). Enhancing The Performance of Pilot-Scale Fermentative Hydrogen Production by Proper Combinations of HRT and Substrate Concentration. *International Journal of Hydrogen Energy, 36*, pp. 14289–14294.

Lindgreen, S., Adair, K. L., & Gardner, P. P. (2016). An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Scientific Reports, 6*.

Liu, D., Liu, D., Zeng, R. J., & Angelidaki, I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research, 40*(11), pp. 2230-2236.

Liu, G., & Shen, J. (2004). Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 98*(4), pp. 251-6.

Liu, Z., Lv, F., Zheng, H., Zhang, C., Wei, F., & Xing, X. H. (2012). Enhanced Hydrogen Production in a UASB Reactor by Retaining Microbial Consortium onto Carbon Nanotubes (CNTS). *International Journal of Hydrogen Energy, 37*(14), pp. 10619-10626.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, R. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry, 193*, pp. 265–275.

Lullio, T. G., Souza, L. P., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A., & Zaiat, M. (2014). Biomethane Production in an AnSBBR Treating Wastewater from Biohydrogen Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 174*, pp. 1873-1896.

Lun, S. Y., Wu, J., & Chen, J. (1995). Anaerobic Waste Treatment: Efficient Separation of the Acid and Methane Forming Phases Using Two UASB Reactors. *Process Biochemistry, 30*, pp. 523-529.

Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology, 102*(18), pp. 8700-8706.

Ma, H., Ye, L., Hu, H., Zhang, L., Ding, L., & Ren, H. (2017). Determination and Variation of Core Bacterial Community in a Two-Stage Full-Scale Anaerobic Reactor Treating High-Strength Pharmaceutical Wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 27*(10), pp. 1808-1819.

MacLeod, F. A., Guiot , S. R., & Costerton, J. W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *56*(6), pp. 1598-1607.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (Fourteenth ed.). Boston: Pearson.

Mamimin, C., Singkhala, A., Kongjan, P., Suraraksa, B., Prasertsan, P., Imai, T., & O-Thong, S. (2015). Two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogen process for biohythane production from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy, 40*(19), pp. 6319-6328.

Martin-Garcia, I., Monsalvo, V., Pidou, M., Le-Clech, P., Judd, S. J., Mcadama, E. J., & Jefferson, B. (2011). Impact of membrane configuration on fouling in anaerobic membrane bioreactors. *Impact of membrane configuration on fouling in anaerobic membrane bioreactors, 382*, pp. 41-49.

McCarty, P. (1964). *Anaerobic waste treatment fundamentals. Parts 1, 2, 3 and 4.* Public Works.

Mendonza, C. E., & Buitrón, G. (2013). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 89*, pp. 143-149.

Meng, F., Chae, S. R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H. S., & Yang, F. (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research, 43*(6), pp. 1489-1512.

Meng, F., Zhang, S., Oh, Y., Zhou, Z., Shin, H. S., & Chae, S. R. (2017). Fouling in membrane bioreactors: An updated review. *Water Research, 114*, pp. 151-180.

Metcalf, & Eddy. (2003). *Wastewater engineering: treatment, and reuse.* New York, NY: George Tchobanoglous.

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., & Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics, 9*(1), pp. 1-8.

Mizuno, O., Shinia, M., Suzuki, K., Yaguguchi, J., & Noike, T. (2000). Effect of pH on hydrogen production from noodle manufacturing wastewater. *Environmental Engineering Research, 37*, pp. 97-106.

Mockaitis, G., Pantoja, J. L., Rodrigues, J. A., Foresti, E., & Zaiat, M. (2014). Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(7), pp. 1361-8.

Mohammadi, P., Ibrahim, S., & Mohamad, S. M. (2014). High-rate fermentative hydrogen production from palm oil effluent in an up-flow anaerobic sludge blanket-fixed film reactor. *Chemical Engineering Research and Design*, *92*(10), pp. 1811–1817.

Mosey, F. E. (1983). Mathematical modelling of the anaerobic digestion: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science and Technology, 15*, pp. 209-232.

Mota, V. T. (2012). *Biorreator com membranas anaeróbio de duplo estágio para o tratamento do vinhoto.* Dissertação (Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais.

Mota, V. T., Ferraz Júnior, A. D., Trably, E., & Zaiat, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Research, 128*, pp. 350-361.

Mota, V. T., Santos, F. S., & Amaral, M. C. (2013). Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: Assessment on biological activity and filtration performance. *Bioresource Technology, 146*, pp. 494-503.

Mota, V. T., Santos, F. S., Araújo, T. A., & Amaral, M. C. (2015). Evaluation of titration methods for volatile fatty acids measurement: effect of the bicarbonate interference and feasibility for the monitoring of anaerobic reactors. *Water Practice and Technology, 10*(3), pp. 486-495.

Mu, Y., & Yu, H. Q. (2006). Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnology and Bioengineering, 94*(5), pp. 980-7.

Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., & Nishio, N. (2002). Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox state. *International Journal of Hydrogen Energy, 27*(11-12), pp. 1399-1405.

Nasr, N., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G., & El Naggar, M. H. (2012). Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. *Bioresource Technology, 111*, pp. 122-126.

Ning, Y., Wang, S., Jin, D., Harada, H., & Shi, X. (2013). Formation of hydrogen-producing granules and microbial community analysis in a UASB reactor. *Renewable Energy, 53*, pp. 12–17.

Noguchi, K., Riggins, D., Eldahan, K. C., Kitko, R. D., & Slonczewski, J. L. (2010). Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*. *Plus One, 5*(4).

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics, 12*(1).

Ortenzi, F., Chiesa, M., Scarcelli, R., & Pede, G. (2008). Experimental tests of blends of hydrogen and natural gas in light-duty vehicles. *International Journal of Hydrogen Energy, 33*(12), pp. 3225-3229.

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress

physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80*(3), pp. 837-890.

Parker, W., Jones, R., & Murthy, S. (2008). Characterization of the COD/VSS ratio during anaerobic digestion of waste activated sludge: Experimental and modeling studies. *Proceedings of the Water Environment Federation, WEFTEC*, (pp. 524-533(10)).

Pauss, A., Andre, G., Perrier, M., & Guiot, S. R. (1990). Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(6), pp. 1636-1644.

Penteado, E. D., Lazaro , C. Z., Sakamoto, I. K., & Zaiat, M. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy, 38*, pp. 6137-6145.

Pi, J., Jawed, M., Wang, J., Xu, L., & Yan, Y. (2016). Mutational analysis of the hyc-operon determining the relationship between hydrogenase-3 and NADH pathway in *Enterobacter aerogenes*. *Enzyme and Microbial Technology, 82*, pp. 1-7.

Picanço, A. P., Vallero, M. V., Gianotti, E. P., Zaiat, M., & Blundi, C. E. (2001). Influence of porosity and composition of supports on the methanogenic biofilm characteristics developed in a fixed bed anaerobic reactor. *Water Science and Technology, 44*(4), pp. 197-204.

Pohland, F. G., & Ghosh, S. (1971). Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. *Environmental Letters, 1*(4), pp. 255-66.

Pruesse, E., Peplies, J., & Glöckner , F. O. (2012). SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics, 28*(14), pp. 1823-9.

Radjaram , B., & Saravanane, R. (2011). Start up study of UASB reactor treating press mud for biohydrogen production. *Biomass and Bioenergy, 35*(7), pp. 2721–2728.

Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Orticoni, M-T., & Steyer, J. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy, 38*(12), pp. 4975-4985.

Randle-Boggis, R. J., Helgason, T., Sapp, M., & Ashton, P. D. (2016). Evaluating techniques for metagenome annotation using simulated sequence data. *FEMS Microbiology Ecology, 92*(7).

Rao, G., & Mutharasan, R. (1989). NADH levels and solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*: New insights through culture fluorescence. *Applied Microbiology and Biotechnology, 30*, pp. 59-66.

Rapport, J., Zhang , R., Jenkins, B. M., & Williams, R. B. (2008). *Current Anaerobic Digestion Technologies Used for Treatment of Municipal Organic Solid Waste.* California Environmental Protection Agency, California.

Reith, J. H., Wijffels, R. H., & Barten, H. (2003). *Bio-Methane and Bio-Hydrogen: Status and Perspectives of Biological Methane and Hydrogen Production.* The Netherlands: Dutch Biological Hydrogen Foundation.

Rey, F. E., Heiniger, E. K., & Harwood, C. S. (2007). Redirection of metabolism for biological hydrogen production. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(5), pp. 1665-1671.

Reyes, J., Celis, L. B., Alatriste-Mondragón, F., & Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*(7), pp. 5591-5601.

Reyes, J., Celis, L. B., Alatriste-Mondragón, F., & Montoya , L. (2014). Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *International Journal of Hydrogen Energy, 39*(22), pp. 11423-11432.

Riley, T. V. (2012). 22 – *Clostridium*: Gas gangrene; tetanus; food poisoning; pseudomembranous colitis. Em D. Greenwood, R. C. Slack, M. R. Barer, & W. L. Irving, *Medical Microbiology (Eighteenth Edition)* (pp. 245–255). Churchill Livingstone.

Ripley, L. E., Boyle, W. C., & Converse, J. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water pollution Control Federation, 58*(5), pp. 406-411.

Roy, S., & Das, D. (2016). Biohythane production from organic wastes: Present state of art. *Environmental Science and Pollution Research International, 23*(10), pp. 9391-410.

Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sanfilippo, S. (2015). *BioH_2 & BioCH_4 through Anaerobic Digestion: from Research to Full-scale Applications.* Springer-Verlag.

Saddoud, A., & Sayadi, S. (2007). Application of acidogenic fixed-bed reactor prior to anaerobic membrane bioreactor for sustainable slaughterhouse wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials, 149*(3), pp. 700-706.

Saddoud, A., Hassaïri, I., & Sayadi, S. (2007). Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource Technology, 98*(11), pp. 2102-8.

Santos, F. S., Ricci, B. C., França, L. N., & Amaral, M. C. (2017). Sugarcane vinasse treatment by two-stage anaerobic membrane bioreactor: Effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, biogas production and membrane fouling. *Bioresource Technology, 245*, pp. 342-350.

Sawers, R. G. (2005). Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions, 33*(1), pp. 42-46.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., Weber, C. F. (2009). Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(23), pp. 7537-41.

Scott, D. J., Dean, D. R., & Newton, W. E. (1992). Nitrogenase-catalyzed ethane production and CO-sensitive hydrogen evolution from MoFe proteins having amino acid substitutions in an alpha-subunit FeMo cofactor-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry, 257*(28), pp. 20002-20010.

Shen, L. H. (2011). *Hydrogen (H2) production and membrane fouling in fermentative H2-producing membrane bioreactors.* PhD thesis (Doctor of Philosophy), University of Toronto.

Shin, C., & Bae, J. (2018). Current status of the pilot-scale anaerobic membrane bioreactor treatments of domestic wastewaters: A critical review. *Bioresource Technology, 247*, pp. 1038-1046.

Sikora, A., Błaszczyk, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz. (2013). Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? Em M. Kongo, *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock* (p. Chapter 21). Intech.

Silva, A. J., Hirasawa, J. S., Varesche, M. B., Foresti, E., Zaiat, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe, 12*(2), pp. 93-98.

Singh, L., Siddiqui, M. F., Ahmad, A., Rahim, M. H., Sakinah, M., & Wahid, Z. A. (2013). Application of polyethylene glycol immobilized *Clostridium* sp. LS2 for continuous hydrogen production from palm oil mill effluent in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biochemical Engineering Journal*, *70*, pp. 158-165.

Tähti, H., Kaparaju, P., & Rintala, J. (2013). Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*, pp. 4997–5002.

van Groenestijn, J. W., Hazewinkel, J. H., & Bakker, R. R. (2006). Pre-treatment of ligno-cellulose with biological acid recycling (the Biosulfurol process). *International Sugar Journal/Zuckerindustrie , 131*, pp. 639-641.

von Sperling, M., & Chernicharo, C. A. (2005). *Biological wastewater treatment in warm climate regions.* IWA Publishing.

Wang, L., & Li, Y. (2010). Biohydrogen production and wastewater treatment by anaerobic fermentation with UASB. *International Conference on Mechanic Automation and Control Engineering (MACE)*, (pp. 1683-1686). Wuhan, China.

Wang, L., Zhou, Q., & Li, F. T. (2006). Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass and Bioenergy*, *30*(2), pp. 177-182.

Wever, H., & Brannock, M. (2008). *Implementation of submerged module inside or outside of reactor.* Project AMEDEUS, AMEDEUS.

Wijekoon, K. C., Visvanathan, C., & Abeynayaka, A. (2011). Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology, 102*(9), pp. 5353-5360.

Wisniewski, C. (2007). Membrane bioreactor for water reuse. *Desalination, 203*(1-3), pp. 15-19.

Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, *15*.

Wu, B., & Zhou, W. (2010). Investigation of soluble microbial products in anaerobic wastewater treatment effluents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 85*, pp. 1597-1603.

Wu, B., Li, Y., Lim, W., Lee, S. L., Guo, Q., Fane, A. G., & Liu, Y. (2017). Single-stage versus two-stage anaerobic fluidized bed bioreactors in treating municipal wastewater: Performance, foulant characteristics, and microbial community. *Chemosphere, 171*, pp. 158-167.

Xing, D. F., Ren, N. Q., Li, Q. B., Lin, M., & Wang, A. (2006). *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56*, pp. 755-760.

Xing, D., Ren, N., & Rittmann, B. E. (2008). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H_2-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology, 74*, pp. 1232-1239.

Xu, L., Ren, N., Wang, X., & Jia, Y. (2008). Biohydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49: Nutrient optimization. *International Journal of Hydrogen Energy, 33*(23), pp. 6962-6967.

Yeoh, B. G. (1997). Two-phase anaerobic treatment of cane-molasses alcohol stillage. Anaerobic Digestion VIII. *Water Science and Technology, 36*(6-7), pp. 441-448.

Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (1995). Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 80*(6), pp. 571-574.

Young, J. C., Kim, I. S., Page, I. C., Wilson, D. R., Brown, G. J., & Cocci, A. A. (2000). Two-stage anaerobic treatment of purified terephthalic acid production wastewaters. *Water Science and Technology, 42*(5-6), pp. 277-282.

Yu, H. Q., & Mu, Y. (2006). Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II: Reactor performance in 3-year operation. *Biotechnology Bioengineering, 94*, pp. 988-995.

Zhang, C., Ma, K., & Xing, X. (2009). Regulation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD^+. *International Journal of Hydrogen Energy, 34*(3), pp. 1226–1232.

Zhang, T. C., Noike, T. (1991). Comparison of one-phase and two-phase anaerobic digestion processes in characteristics of substrate degradation and bacterial population levels. *Water Science and Technology*, *23*(7-9), pp. 1157-1166.

Zhao, B. H., Yue, Z. B., Zhao, Q. B., Mu, Y., Yu, H. Q., Harada, H., & Li, Y. Y. (2008). Optimization of hydrogen production in a granule-based UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*(10), pp. 2454-2461.

Zhao, X., Xing, D., Qi, N., Zhao, Y., Hu, X., & Ren, N. (2017). Deeply mechanism analysis of hydrogen production enhancement of *Ethanoligenens harbinense* by Fe^{2+} and Mg^{2+}: Monitoring at growth and transcription levels. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(31), pp. 19695-19700.

Zhao, X., Xing, D., Zhang, L., & Ren, N. (2010). Characterization and overexpression of a [FeFe]-hydrogenase gene of a novel hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(18), pp. 9598-9602.