

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

ALANA GANDRA LIMA DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE
NANOPARTÍCULAS DE FERRO E NÍQUEL
NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE
HIDROGÊNIO EM REATORES EM
BATELADA E CONTÍNUO**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2021

ALANA GANDRA LIMA DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE
NANOPARTÍCULAS DE FERRO E NÍQUEL
NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE
HIDROGÊNIO EM REATORES EM
BATELADA E CONTÍNUO**

Tese apresentada ao Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

Co-orientador: Dr. Edson Luiz Silva

SÃO CARLOS

2021

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).

G929a GANDRA LIMA DE MOURA, ALANA
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO E NÍQUEL NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO EM REATORES EM BATELADA E CONTÍNUO / ALANA GANDRA LIMA DE MOURA; orientadora MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE; coorientador EDSON LUIZ SILVA. São Carlos, 2021.

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, 2021.

1. ácido valérico. 2. qPCR. 3. Lactobacillus. 4. Delineamento Composto Central Rotacional. 5. Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. 6. Vinhaça. 7. Clostridium butyricum. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ALANA GANDRA LIMA DE MOURA**.

Título da tese: "Avaliação da Influência de Nanopartículas de Ferro e Níquel na Produção Fermentativa de Hidrogênio em Reatores em Batelada e Contínuo".

Data da defesa: 16/08/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Associada **Maria Bernadete Varesche Silva**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada

Dr. **Tiago Palladino Delforno**
(Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial/SENAI)

Aprovada

Profa. Dra. **Sávia Gavazza dos Santos Pessoa**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovada

Profa. Dra. **Claudia Etchebehere Arenas**
(Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable/IIBCE)

Aprovada

Profa. Associada **Valéria Reginatto Spiller**
(Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/FFCLRP-USP)

Aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

“Tem quem fica a ver navios,
e tem quem chega longe de jangada.”

Djonga

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria da Cruz e ao meu pai Emanuel Moura, por serem minha inspiração como pesquisadores e acadêmicos, e por me apoiarem com tanto amor e carinho.

À professora Dra. Maria Bernadete pela orientação, oportunidade, apoio e disposição. Obrigada por agregar em minha formação desde a graduação, com sua experiência e preocupação.

Ao professor Tininho pela coorientação e acompanhamento de ideias e sugestões incorporadas ao projeto.

À pós-doutoranda Camila Rabelo pela parceria tanto no laboratório e nas atividades acadêmicas, como fora dele. Muito obrigada por ser um ponto de apoio em São Carlos.

Ao pós-doutorando Tiago Palladino, pela parceria, por todos os ensinamentos, e pelo acréscimo essencial a minha motivação como pesquisadora desde a iniciação científica.

Aos parceiros que me ajudaram na primeira experiência trabalhando com metais: Sandra Maintinguer, Mateus Boscaro e Adriana Maluf.

Aos companheiros de laboratório pelas discussões e ajuda constante, e pela amizade: Natália Silveira, Carla Diniz, Jean Oliveira, Henrique Dornelles, Alejandra Villa, Raíssa Mazarelli, Tiago Duarte, Inaê Alves, Vanessa Silva, Luana Granjeiro e Camila Menezes.

A técnica Maria Diva Landgraf, que me auxiliou e acompanhou no processo de digestão das amostras de metais com muita disposição.

Ao corpo técnico: Carol, Janja, Isabel, Elô, Julio e Fernando, pelo auxílio.

As secretárias: Silvana, Rose, Priscila e Sá, pela assessoria burocrática.

Aos professores que convivi, pelo conhecimento repassado, que contribuiu para elaboração deste trabalho: Valéria Del Nery, Eugenio Foresti e Marcelo Zaiat.

Às companheiras da república Disfarça, por serem minha família em São Carlos, por todo carinho, e por tornarem minha rotina mais saudável: Barbara Fraiha, Tais Bronca, Dandara Sousa, Luiza Chaves, Maiara Uliana, Mayumi Quinto, Maysa Albertini, Thaissa Santos, Flora Ribeiro, Luisa Ribeiro, Gabriella Pratti, Ana Luiza, Manoela Simões, Cleiton Almeida e Weverson Batalha.

Ao meu irmão Vítor Emanuel, pela certeza da companhia que sempre terei ao meu lado.

À minha madrinha Iris Gomes pelos valores, exemplo de disposição e todo amor.

Às minhas amigas de infância Guéls Reino, que apesar da distância, sempre estiveram presentes em minha vida: Agnes Carvalho, Bruna Rocha, Camila Alhadeff, Carolina Arouche, Giulia Buonocore, Nicole Alcântara, Luísa Vale e Rayssa Cantanhede.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP (processo 2017/23008-8 e 2015/06246-7) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, direta, ou indiretamente.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

MOURA, A. G. L. **Avaliação da influência de nanopartículas de ferro e níquel na produção fermentativa de hidrogênio em reatores em batelada e contínuo.** Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Neste estudo as propriedades químicas de nanomateriais, incluindo sua maior área superficial e atividade reacional, foram utilizadas na suplementação de metais em reatores em batelada e contínuos (Reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado – RALF operados em TDH de 3 h), e desta forma, a comparação entre reatores com nanopartículas (NPs) de ferro e níquel e reatores controle sem a adição das NPs foi realizada para avaliar sua influência em **três** configurações de processo fermentativo: **(1)** Nos reatores batelada alimentados com meio RCM e inoculados com a cultura pura *C. butyricum* foi aplicado planejamento experimental estatístico (Plackett-Burman e Delineamento Composto Central Rotacional). Sob tais condições, a adição de NPs de ferro ($30 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$) e níquel ($20 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$) foi favorável para otimização da produção de H_2 . Todavia, a adição de NPs de níquel acima de 50 mg L^{-1} foi desfavorável para a produção de H_2 . Além disso, a rota de produção de ácido valérico (ácido de alto valor agregado no mercado) foi favorecida em detrimento a de ácido acético e butírico quando NPs foram adicionadas ao meio. No reator em batelada com NPs foi observada maior quantidade e menor expressão da enzima hidrogenase quando comparado ao reator controle; **(2)** Nos reatores contínuos alimentados com glicose e inoculados por autofermentação e bioaugmentação com *C. butyricum*, a imobilização de metais no material suporte (argila expandida) e consequente maior disponibilidade de ferro e níquel no meio reacional favoreceu a maior produção de Ácidos Orgânicos Voláteis (AOVs), quando comparado ao reator controle. Além disso, a adição de NPs influenciou nas rotas metabólicas, com maior concentração de ácidos acético e butírico no RALF - NP e ácido lático no RALF - Controle. Maior abundância relativa (48,8%) de bactérias semelhantes a *Lactobacillus* foi observada no biofilme do RALF-NP. **(3)** Nos reatores contínuos alimentados com vinhaça e inoculados com lodo anaeróbio bioaugmentado com *C. butyricum*, a composição de H_2 no biogás foi significativamente maior no RALF - NP quando comparado ao RALF - Controle. A diminuição da concentração de ácido lático no processo fermentativo da vinhaça foi observada em ambos os reatores e em todas as etapas operacionais. Durante a etapa II ($4 \text{ g}_{\text{carb}} \text{ L}^{-1}$), as NPs metálicas favoreceram genes relacionados às primeiras etapas da digestão da vinhaça, com maiores percentuais das enzimas beta-glicosidase, glucoquinase e piruvato-ferredoxina oxidoreductase que se relacionam com maior abundância relativa de *Bacteroides* e *Prevotella*. No entanto, quando alimentado com vinhaça ($7 \text{ g}_{\text{carb}} \text{ L}^{-1}$) (etapa III), L- e D-lactato desidrogenase, 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase, acetato quinase, piruvato quinase e flavoproteína fumarato reductase foram as enzimas favorecidas na presença de NPs. Estas enzimas estão relacionadas às etapas finais da remoção de compostos orgânicos da vinhaça. Além disso, sob tais condições foi observada maior abundância relativa de *Lactobacillus* (11,4%) e *Secundilactobacillus* (7,5%)

Palavras-chave: ácido valérico, qPCR, *Lactobacillus*, Delineamento Composto Central Rotacional, Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado, Vinhaça, *Clostridium butyricum*.

ABSTRACT

MOURA, A. G. L. Evaluation of the influence of iron and nickel nanoparticles on the fermentative production of hydrogen in batch and continuous reactors. Thesis (PhD) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

In this study, chemical properties of nanomaterials, including their large surface area and reaction activity, were used for metals supplementation in batch and continuous reactors (Anaerobic Fluidized Bed Reactors - AFBR operated in 3 h HRT). The comparison between reactors with iron and nickel nanoparticles (NPs) and control reactors without the addition of NPs was performed to evaluate their influence on **three** configuration of the fermentation process: **(1)** In batch reactors fed with RCM medium and inoculated with pure culture *C. butyricum* statistical design of experiments was applied (Plackett-Burman and Rotational Central Composite Design). Under such conditions, the addition of NPs of iron ($30 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$) and nickel ($20 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$) optimized the production of H_2 . However, the addition of nickel NPs above 50 mg L^{-1} reduced the production of H_2 . Furthermore, the production route of valeric acid (a high value-added acid in the market) was favored over acetic and butyric acid when NPs were added to the medium. In the batch reactor with NPs, a greater amount and lower expression of the hydrogenase enzyme was observed when compared to the control reactor; **(2)** In continuous reactors fed with glucose and inoculated with natural fermentation and *C. butyricum* bioaugmentation, the immobilization of metals in the support material (expanded clay) and its consequent greater availability favored the higher production of Volatile Fatty Acids (VFAs), when compared to the control reactor. Furthermore, the addition of NPs influenced the metabolic pathways, with a higher concentration of acetic and butyric acids in AFBR - NP and lactic acid in AFBR - Control. Higher relative abundance (48.8%) of *Lactobacillus* was observed in AFBR-NP biofilm. **(3)** In continuous reactors fed with vinasse and inoculated with anaerobic sludge bioaugmented with *C. butyricum*, the composition of H_2 in biogas was significantly higher in AFBR - NP when compared to AFBR - Control. The decrease in lactic acid concentration during vinasse fermentation process was observed in both reactors and in all operational stages. During stage II ($4 \text{ g}_{\text{carb}} \text{ L}^{-1}$), metallic NPs favored genes related to the first stages of vinasse digestion, with higher percentages of beta-glucosidase, glucokinase and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase enzymes that were related to greater relative abundance of *Bacteroides* and *Prevotella*. However, when fed with vinasse ($7 \text{ g}_{\text{carb}} \text{ L}^{-1}$, stage III), L- and D-lactate dehydrogenase, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, acetate kinase, pyruvate kinase and flavoprotein fumarate reductase were the favored enzymes in the presence of NPs. These enzymes are related to the final stages of removal of organic compounds from vinasse and greater relative abundance of *Lactobacillus* (11.4%) and *Secundilactobacillus* (7.5%).

Keywords: Valeric acid, qPCR, *Lactobacillus*, Central Rotational Composite Design, Anaerobic Fluidized Bed Reactor, Vinasse, *Clostridium butyricum*.

Lista de Figuras

Figura 3.1: Possíveis substratos e inóculos para a produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos	10
Figura 3.2: Resumo da atividade de NPs metálicas na fermentação	12
Figura 3.3: Fluxo metabólico da produção fermentativa de hidrogênio por <i>Clostridium butyricum</i> a partir da glicose	16
Figura 3.4: Principais parâmetros do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.....	17
Figura 3.5: Resumo do processo de produção do etanol/vinhaça.....	21
Figura 4.1: Ilustração do Planejamento Experimental.....	25
Figura 4.2: Esquema do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF).....	28
Figura 4.3: Esquema ilustrativo das etapas de inoculação dos reatores batelada nos ensaios do planejamento experimental	29
Figura 5.1: Composição de nanopartículas de Ferro (A) e Níquel (B) por espectroscopia de energia dispersiva.	40
Figura 5.2: Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de ferro (A) e níquel (B).....	41
Figura 5.3: Produção acumulada de hidrogênio no ensaio preliminar, seu ajuste ao modelo de Gompertz e desvio padrão da triplicata de ensaios.....	42
Figura 5.4: Ácidos Orgânicos Voláteis e Carboidratos dos ensaios em reatores em batelada.....	43
Figura 5.5: AOV no início e término do ensaio preliminar.....	43
Figura 5.6: Curva <i>Threshold</i> dos ciclos de PCR nas amostras processadas.....	45
Figura 5.7: Ensaios PB de otimização da produção de hidrogênio para diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	48
Figura 5.8: AOV e remoção de carboidratos dos ensaios PB de otimização da produção de hidrogênio para diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM...	50
Figura 5.9: Ácido cítrico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	52
Figura 5.10: Ácido láctico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	53
Figura 5.11: Ácido fórmico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	54

Figura 5.12: Ácido acético nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	55
Figura 5.13 Ácido (iso)butírico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	56
Figura 5.14 Ácido valérico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM.....	57
Figura 5.15: Rotas metabólicas de fermentação por <i>Clostridium butyricum</i> e a influência das condições estudadas nos produtos obtidos	58
Figura 5.16: Rotas metabólicas de acordo com a composição do meio nutricional.....	59
Figura 5.17: Gráfico de Pareto obtido no ensaio de otimização da produção de hidrogênio variando os componentes do meio de cultura RCM para nível de significância de 10% ($\alpha=0,1$).....	60
Figura 5.18: Ensaios de variação da concentração inicial de glicose para otimização da produção acumulada de hidrogênio.....	62
Figura 5.19: Gráfico de Pareto e curva de otimização da produção de H ₂ com variação da concentração de glicose.	64
Figura 5.20: AOV e eficiência de conversão de carboidratos dos ensaios de otimização da produção de hidrogênio com variação da concentração de glicose.....	65
Figura 5.21: Ácido cítrico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.	66
Figura 5.22: Ácido láctico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.	67
Figura 5.23 Ácido acético nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.	68
Figura 5.24: Ácido valérico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.	69
Figura 5.25 Ácido (iso)butírico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.....	70
Figura 5.26: Ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa ampla de nanopartículas	71
Figura 5.27: AOV e remoção de carboidratos nos ensaios de otimização da produção de hidrogênio para faixa ampla de NPs.....	72

Figura 5.28: Ácido lático nas condições do DCC para otimização da produção de hidrogênio variando a concentração de NPs em faixa ampla.....	73
Figura 5.29: Ácido (iso)butírico nas condições do DCC para otimização da produção de hidrogênio variando a concentração de NPs em faixa ampla.....	74
Figura 5.30 Ácido valérico nas condições do DCC para otimização da produção de hidrogênio variando a concentração de NPs em faixa ampla.....	75
Figura 5.31: Ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa adequada de nanopartículas.....	76
Figura 5.32: Gráfico de Pareto e curva de otimização da produção de hidrogênio com variação da concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada.....	78
Figura 5.33: AOV e remoção de carboidratos nos ensaios de otimização da produção de hidrogênio para faixa adequada de NPs.....	79
Figura 5.34: Ácido lático do ensaio de DCCR com a concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada como variáveis para otimização da produção de hidrogênio.....	80
Figura 5.35 Ácido (iso)butírico do ensaio de DCCR com a concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada como variáveis para otimização da produção de hidrogênio.....	81
Figura 5.36: Ácido valérico do ensaio de DCCR com a concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada como variáveis para otimização da produção de hidrogênio.....	82
Figura 5.37: Produção acumulada de hidrogênio nos ensaios de validação da otimização da concentração de nanopartículas.....	83
Figura 5.38: AOV e eficiência de remoção de carboidratos nos ensaios de validação do modelo de concentração de NPs para otimizar a produção de H ₂	84
Figura 5.39: AOV nos ensaios de validação da ANOVA com concentração de NPs para produção de hidrogênio otimizada e reator controle.....	85
Figura 5.40: Foto de aglomerado de células no reator em batelada (A) e bactérias e nanopartículas em MEV (B).....	86
Figura 5.41: EDS da amostra biológica com nanopartículas do reator no ensaio de validação da condição otimizada de produção de hidrogênio.....	87
Figura 5.42: Estabilidade dos candidatos a gene de referência da <i>Clostridium butyricum</i> de acordo com os algoritmos RefFinder, delta CT e Normfinder.....	88

Figura 5.43: Número de cópias de <i>hydA</i> durante as fases de produção de hidrogênio nos reatores com NPs e controle	89
Figura 5.44: Expressão relativa da <i>hydA</i> nos reatores NPs e controle.....	90
Figura 5.45: Concentração de metais no afluente e efluente dos RALFs alimentados com glicose.....	93
Figura 5.46:Variação temporal de matéria orgânica nos RALFs alimentados com glicose	96
Figura 5.47: Variação temporal de carboidratos nos RALFs alimentados com glicose.	98
Figura 5.48: Variação temporal da produção de hidrogênio dos RALFs alimentados com glicose.....	100
Figura 5.49: Variação temporal do pH nos RALFs.....	104
Figura 5.50: <i>Heatmap</i> dos gêneros mais abundantes no biofilme do RALF-NP	106
Figura 5.51: Filogenia bacteriana relacionada a biodisponibilidade de ferro e sua abundância relativa no biofilme do RALF - NP.....	107
Figura 5.52: Taxonomia bacteriana relacionada a biodisponibilidade de níquel e sua abundância relativa no biofilme do RALF - NP.....	110
Figura 5.53:Variação temporal de matéria orgânica nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	117
Figura 5.54: Variação temporal de carboidratos nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	119
Figura 5.55: Variação temporal da produção de hidrogênio dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	122
Figura 5.56: Variação temporal da produção de ácidos orgânicos voláteis nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	127
Figura 5.57: Variação temporal do pH nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	129
Figura 5.58: <i>Heatmap</i> da abundância relativa dos gêneros observados no biofilme dos RALFs NP e Controle ao final das etapas operacionais II e III	132
Figura 5.59: Abundância relativa de genes e gêneros associados relacionados a presença de ferro e níquel no meio.....	138
Figura 5.60:Rota metabólica de degradação da vinhaça, genes associados e gêneros relacionados.....	140

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Resumo de produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir de diversos substratos	8
Tabela 3.2: Diferentes estudos sobre a influência da adição de nanopartículas no rendimento da produção de hidrogênio em ensaios em batelada	13
Tabela 3.3: Produção de hidrogênio por <i>Clostridium butyricum</i> utilizando glicose como substrato.....	15
Tabela 3.4: Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado.....	18
Tabela 4.1: Composição do <i>Reinforced Clostridial Medium</i> (RCM).....	29
Tabela 4.2: Composição do <i>Reinforced Clostridial Medium</i> otimizado (RCM).....	30
Tabela 4.3: Concentração de sólidos na alimentação do período operacional de inoculação dos RALFs alimentados com glicose	30
Tabela 4.4: Concentração de sólidos no lodo anaeróbio	30
Tabela 4.5: Concentração de sólidos na alimentação do período operacional de inoculação dos RALFs alimentados com vinhaça	31
Tabela 4.6: Ensaio preliminar para avaliar a influência de nanopartículas na produção de hidrogênio em RCM	31
Tabela 4.7: Matriz de variáveis do PB16 para otimização do RCM	32
Tabela 4.8: Matriz de variáveis do DCCR de glicose em RCM otimizado.....	32
Tabela 4.9: Matriz de variáveis do DCC com ampla faixa de concentração de nanopartículas em RCM otimizado	32
Tabela 4.10: Matriz de variáveis do DCCR com faixa adequada da concentração de nanopartículas em RCM otimizado	33
Tabela 4.11: Validação experimental do modelo de concentração de nanopartículas para produção otimizada de hidrogênio	33
Tabela 4.12: Etapas de operação do RALF alimentado com substrato sintético	33
Tabela 4.13: Etapas de operação do RALF alimentado com vinhaça	34
Tabela 4.14: Metodologia das análises de caracterização da vinhaça.....	35
Tabela 5.1: Parâmetros do modelo de Gompertz ajustados aos dados de produção acumulada de hidrogênio no ensaio preliminar	42
Tabela 5.2: Médias de ciclos necessária para obter a curva Threshold no q-PCR do ensaio preliminar	45

Tabela 5.3: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio ao variar componentes do RCM e parâmetros de Gompertz.....	47
Tabela 5.4: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para diferentes concentrações de glicose e respectivos parâmetros de Gompertz	62
Tabela 5.5: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa ampla de nanopartículas e respectivos parâmetros de Gompertz relacionados.....	71
Tabela 5.6: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa adequada de nanopartículas e respectivos parâmetros de Gompertz	76
Tabela 5.7: Condições dos reatores nos ensaios de validação da otimização da concentração de nanopartículas e respectivos parâmetros de Gompertz relacionados aos dados de produção acumulada de hidrogênio.....	83
Tabela 5.8: Sequência de primers para genes alvo e genes referência	87
Tabela 5.9: Concentração de metais no material suporte dos RALFs alimentados com glicose.....	92
Tabela 5.10: Remoção de matéria orgânica dos RALFs NP e controle alimentados com glicose.....	95
Tabela 5.11: Remoção de carboidratos nos RALFs alimentados com glicose.....	97
Tabela 5.12: Produção de hidrogênio dos RALFs metais e controle alimentados com glicose.....	99
Tabela 5.13: Concentração de ácidos orgânicos no afluente e efluente do reator anaeróbio contínuo alimentado com glicose	101
Tabela 5.14: pH e alcalinidade nos RALFs NP e controle alimentados com glicose ..	104
Tabela 5.15: Sólidos nos RALFs NP e controle alimentados com glicose	105
Tabela 5.16: Concentração de metais no material suporte dos RALFs alimentados com vinhaça.....	113
Tabela 5.17: Concentração de metais nos RALFs NP e controle.....	113
Tabela 5.18: Remoção de matéria orgânica dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	115
Tabela 5.19: Remoção de carboidratos dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	118

Tabela 5.20: Produção de biogás dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça	120
Tabela 5.21: Produção de ácidos orgânicos nos reatores anaeróbios contínuos com e sem a adição de nanopartículas metálicas alimentados com vinhaça.....	123
Tabela 5.22: pH e alcalinidade nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça .	128
Tabela 5.23: Concentração de sólidos nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça.....	130

Lista de siglas

- ANOVA** - Análise de variância
- AOV** - Ácidos Orgânicos Voláteis
- CCM** – Células Combustíveis Microbianas
- CCT** - Coleção de Culturas Tropical
- COV** – Carga Orgânica Volumétrica
- CG** - Cromatografia Gasosa
- Cq** - Ciclo de quantificação
- DCC** - Delineamento Composto Central
- DCCR** - Delineamento Composto Central Rotacional
- DOE** – Delineamento Experimental (*Design of Experiments*)
- DQO** – Demanda Química de Oxigênio (matéria orgânica)
- EESC** - Escola de Engenharia de São Carlos
- EGSB** – Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (*Expanded Granular Sludge Bed*)
- ETE** - Estação de Tratamento de Esgoto
- H₂** - Hidrogênio
- HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Performance
- HydA** – Hidrogenase
- KEGG** - *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes*
- LCA** - *Lowest Common Ancestor*
- LPB** - Laboratório de Processos Biológicos
- MC** - reator de Mistura Completa
- MEG** - Monoetilenoglicol
- MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura
- NPs** – Nanopartículas
- ORF** – *Open Read Frames*
- P** - Produção acumulada de hidrogênio
- PB** - Plackett Burman
- PCR** - Reação em Cadeia de Polimerase
- pH** - Potencial Hidrogeniônico
- RALF** - Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
- RALE** - Reator Anaeróbio de Leito Empacotado
- RCM** - *Reinforced Clostridial Medium*
- ST** – Sólidos Totais
- SV** – Sólidos Voláteis
- TDH** - Tempo de Detenção Hidráulica
- UASB** – Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)
- USP** - -Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Hipótese.....	4
2.1	Objetivo geral.....	4
2.2	Objetivos específicos.....	5
3	Revisão Bibliográfica.....	6
3.1	Produção fermentativa de hidrogênio e ácidos orgânicos.....	6
3.2	Nanopartículas metálicas.....	11
3.3	<i>Clostridium butyricum</i>	14
3.4	Reator anaeróbio de leito fluidificado.....	16
3.5	Água residuária da indústria de cana-de-açúcar.....	19
4	Material e Métodos.....	24
4.1	Planejamento experimental.....	24
4.2	Síntese de nanopartículas para os ensaios em batelada.....	25
4.3	Imobilização de nanopartículas na cinasita dos reatores contínuos.....	26
4.4	Reatores em batelada.....	27
4.5	Reator anaeróbio de leito fluidificado.....	27
4.6	Inóculo.....	28
4.6.1	Reatores em batelada.....	28
4.6.2	Reatores contínuos alimentados com glicose.....	29
4.6.3	Reatores contínuos alimentados com vinhaça.....	30
4.7	Etapas do procedimento experimental.....	31
4.7.1	Reatores em batelada.....	31
4.7.1.1	Etapa 1: Ensaio preliminar em Reatores em Batelada.....	31
4.7.1.2	Etapa 2: Avaliação da composição do RCM.....	31
4.7.1.3	Etapa 3: Avaliação da concentração de glicose.....	32
4.7.1.4	Etapa 4: Otimização da concentração de nanopartículas.....	32
4.7.2	Reatores contínuos alimentados com glicose.....	33
4.7.3	Reatores contínuos alimentados com vinhaça.....	33
4.8	Análises de monitoramento.....	34
4.9	Caracterização da vinhaça.....	35
4.10	Biologia molecular.....	35
4.10.1	Reação de polimerase em cadeia em tempo real.....	35
4.10.1.1	Seleção dos iniciadores.....	36
4.10.1.2	Quantificação absoluta de cópias de DNA de <i>hydA</i> (qPCR).....	36

4.10.1.3	Quantificação relativa da expressão gênica do DNA	37
4.10.2	Metagenoma	37
5	Resultados e Discussão.....	39
5.1	Fermentação da glicose na presença de nanopartículas metálicas em reatores em batelada.....	39
5.1.1	Caracterização das nanopartículas.....	39
5.1.2	Etapa 1: Ensaio preliminar	42
5.1.3	Etapa 2: Avaliação da composição do meio de cultura RCM.....	45
5.1.4	Etapa 3: Avaliação da concentração de glicose.....	61
5.1.5	Etapa 4: Otimização da concentração de nanopartículas.....	70
A.	Faixa ampla de nanopartículas.....	70
B.	Faixa adequada de nanopartículas	75
C.	Validação experimental do modelo para produção otimizada de hidrogênio	82
5.1.6	Quantidade e expressão da hidrogenase na presença de nanopartículas metálicas	87
5.1.6.1	Quantidade de hidrogenases (qPCR).....	88
5.1.6.2	Expressão da hidrogenase (RT-qPCR).....	90
5.2	Fermentação da glicose na presença de nanopartículas metálicas em reator contínuo	91
5.2.1	Metais	91
5.2.2	Degradação de matéria orgânica.....	94
5.2.3	Remoção de carboidratos.....	96
5.2.4	Biogás	98
5.2.5	Produção de ácidos orgânicos.....	101
5.2.6	pH e alcalinidade	103
5.2.7	Sólidos Suspensos.....	104
5.2.8	Metagenoma do biofilme do reator contínuo	105
5.2.8.1	Taxonomia	105
5.2.8.2	Genes relacionados ao ferro	107
5.2.8.3	Genes relacionados ao níquel	109
5.2.8.4	Genes relacionados a sinergia entre ferro e níquel	110
5.3	Fermentação da vinhaça na presença de nanopartículas metálicas em reator contínuo	112
5.3.1	Metais	112

5.3.2	Degradação de matéria orgânica.....	114
5.3.3	Remoção de carboidratos.....	117
5.3.4	Biogás	119
5.3.5	Produção de ácidos orgânicos.....	122
5.3.6	pH e alcalinidade	127
5.3.7	Sólidos Suspensos.....	129
5.3.8	Metagenoma do biofilme.....	130
5.3.8.1	Taxonomia	130
5.3.8.2	Genes relacionados ao ferro e ao níquel.....	136
5.4	Comparação da influência das nanopartículas metálicas nas diferentes configurações reacionais.....	140
6	Conclusões.....	142
7	Referências Bibliográficas.....	144

1 INTRODUÇÃO

Em nanotecnologia, uma partícula é definida como um pequeno objeto que se comporta como uma unidade inteira em termos de seu transporte e propriedades. Nanopartículas (NP) são partículas cujo tamanho situa-se entre 1 e 100 nanômetros. NP metálicas vem sendo utilizadas em processos fermentativos para favorecer maior produção de biogás e ácidos orgânicos. Por exemplo, algumas NPs metálicas alteram a velocidade de transferência de elétrons e aumentam a atividade do complexo ferredoxina-oxireductase. Gadhe et al. (2015) obtiveram 27% de aumento da produção de hidrogênio (H_2) a partir da coadição de NPs de níquel e hematita utilizando água residuária da produção de leite como substrato. Além disso, Zhang et al. (2015) reportaram aumento de 50% no rendimento de H_2 com a adição de NPs de Fe^0 ao meio, a qual favoreceu o predomínio de *Clostridium* sp. no consórcio microbiano.

Além de otimizar a produção de biogás, NPs podem ser utilizadas para aumentar a produção de ácidos orgânicos voláteis (AOV). Zhang et al. (2020) operaram reator anaeróbio para digestão de lodo e observaram produção de AOV 2,5 vezes maior no reator com 100 mg L^{-1} de NPs de óxido de ferro (Fe_3O_4), quando comparado ao reator controle (sem NPs). O aumento da concentração de NPs de Fe^0 ($0\text{-}800\text{ mg L}^{-1}$) foi reportado como diretamente proporcional ao aumento da produção de AOV em reator inoculado com lodo anaeróbio, utilizando algas (*Saccharina japonica*) como substrato (Yin e Wang, 2019).

Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB-EESC-USP), por meio da avaliação da produção de H_2 em reatores em batelada e contínuos, a partir da fermentação de diferentes resíduos, como bagaço de cana, restos de alimento, papel, vinhaça etc. A abordagem da produção fermentativa de H_2 tem grande atratividade por abranger simultaneamente a destinação final de resíduos e a produção de energia. Conciliar estas duas vertentes é o desafio mais importante no desenvolvimento desta tecnologia. Principalmente, porque a vazão de H_2 produzida no processo, ainda é reduzida, o que justifica os esforços direcionados para a otimização do sistema.

A indústria de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar está entre as 17 que mais poluem o mundo, e os resíduos gerados (bagaço, melaço e vinhaça) a partir dessa biorrefinaria têm grande potencial energético (produção de biogás) e de reuso (fertilizante do solo), quando aplicada a fermentação como forma de tratamento seguida da disposição ambientalmente

correta no solo (Barros et al., 2020). Barros et al. (2020) demonstraram a viabilidade de recuperação do potássio presente na vinhaça por eletrodialise. Os autores utilizaram membranas íon seletivas e estudaram quatro diferentes soluções eletrolíticas (Na_2SO_4 , MgSO_4 , K_2SO_4 e NH_4NO_3). Os melhores resultados, com precipitação de 7,3 kg de estruvita kg^{-1} de vinhaça tratada foram obtidos com a solução de NH_4NO_3 . Em 16/10/2020, a biorrefinaria Raízen inaugurou a primeira planta no mundo, em escala comercial, a utilizar a tecnologia de conversão da torta de filtro e da vinhaça (subprodutos do processo produtivo do etanol e do açúcar) em biogás. A nova unidade em Guariba-SP poderá produzir 138 MWh ano^{-1} , o suficiente para abastecer a demanda de energia elétrica, por exemplo, da cidade de Araraquara-SP.

A avaliação da produção de H_2 em Reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado (RALFs) com diferentes concentrações de substrato, diferentes tempos de detenção hidráulica (TDHs) e a avaliação dos possíveis metabolitos produzidos no processo fermentativo estão reportadas na literatura (Amorim et al., 2012; Lin et al., 2009; Shida et al., 2009). No entanto, faltam ainda estudos utilizando estratégias alternativas aos parâmetros operacionais para otimização da produção de H_2 em reatores contínuos, como por exemplo, a suplementação com NPs metálicas.

A compreensão aprofundada da composição microbiana, diversidade/similaridade, redes metabólicas, padrões funcionais de genes e relação entre a biodiversidade e as funções do sistema em nível do genoma podem ajudar na caracterização taxonômica e funcional, e consequentemente contribuir para o aprimoramento do processo de fermentação. Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR), foram descritas por Kumar et al. (2020). Ademais, muitos pesquisadores aplicaram com sucesso a análise de bioinformática na metagenômica microbiana da digestão anaeróbia para identificar bactérias dominantes e arqueias metanogênicas, monitorar a mudança da comunidade microbiana, e elucidar correlações entre o desempenho do reator, estruturas da comunidade microbiana e variáveis ambientais pertinentes (Zhang et al., 2019).

Desta forma, por meio da realização desta pesquisa, buscou-se o favorecimento da produção fermentativa de H_2 , ao adicionar NPs de ferro e níquel em reatores em batelada e em reatores de fluxo contínuo (RALF) inicialmente usando água residuária sintética a base de glicose, e posteriormente, vinhaça. Além disso, técnicas de biologia molecular foram aplicadas para avaliar a influência da adição de NPs metálicas: (a) na quantidade e expressão

da hidrogenase (hydA) em reatores em batelada por q-PCR e RT-qPCR e (b) na caracterização taxonômica e funcional do biofilme de reatores contínuos por metagenoma.

2 HIPÓTESE

Hipótese A: Por meio da combinação de parâmetros operacionais (concentração de substrato), e a adição de NPs de ferro e níquel tem-se a otimização da produção de H₂ e ácidos orgânicos por *Clostridium butyricum* em reatores em batelada.

Hipótese B: A condição ótima para produção fermentativa de H₂ e ácidos orgânicos obtida em reatores em batelada se mantém, quando os parâmetros operacionais e as NPs de ferro e níquel são aplicados em reator anaeróbio de leito fluidificado.

Hipótese C: A adição de NPs de ferro e níquel favorece a produção de H₂ e ácidos orgânicos em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com água residuária real (vinhaça).

Hipótese D: Quando adicionadas em reatores batelada, NPs de ferro e níquel influenciam no número de cópias de hidrogenase e na sua expressão.

Hipótese E: No contexto de produção de H₂ e ácidos orgânicos, é possível observar diferença taxonômica e funcional entre reatores contínuos em que NPs de ferro e níquel foram adicionadas, e aqueles sem a adição de NPs.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da suplementação com metais no formato de NPs de ferro e níquel no processo fermentativo de substrato sintético (glicose) por *C. butyricum* em reator em batelada, e comparar com a influência da adição de metais em configuração reacional contínua (RALF) alimentada com mesmo substrato sintético (glicose), como também, com água residuária real (vinhaça).

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência de NPs metálicas no processo de digestão anaeróbia de reatores em batelada e contínuos;
- b) Avaliar a remoção de carboidratos em reator com NPs e reator controle;
- c) Avaliar a produção de AOV em reator com NPs e reator controle;
- d) Avaliar a produção de H₂ em reator com NPs e reator controle;
- e) Avaliar a influência da adição de NPs metálicas na quantidade e expressão de enzimas hidrogenase participantes da fermentação nos reatores batelada;
- f) Comparar a diversidade de bactérias do biofilme dos reatores contínuos com e sem NPs;
- g) Avaliar a abundância relativa de enzimas relacionadas ao ferro e ao níquel dos reatores contínuos com e sem adição de NPs;
- h) Descrever a influência de NPs metálicas no perfil taxonômico e no potencial funcional do biofilme desenvolvido na manta de lodo de reatores contínuos quando alimentados com glicose e quando alimentados com vinhaça.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção fermentativa de hidrogênio e ácidos orgânicos

A produção de H₂ e ácidos orgânicos a partir de biomassa contendo carboidratos é a perspectiva futura para atingir economia circular com emissão nula de gás carbônico e redução do aquecimento global (Sharma, 2019). São vantagens econômicas da fermentação, a produção de energia de forma contínua, e não dependência da luz solar, além de maior estabilidade e eficiência. É o processo mais indicado em escala industrial, devido a sua simplicidade operacional. Além disso, no processo fermentativo pode-se utilizar variedade de resíduos orgânicos como substrato, para simultaneamente obter redução destes resíduos e produção de energia (Azwar et al., 2014). O processo de fermentação para produção de H₂ e ácidos orgânicos exige águas residuárias com elevada carga orgânica, baixo requerimento de nutrientes e resultado positivo no fluxo de energia.

Acar e Dincer (2019) avaliaram o aspecto econômico, ambiental, social e diferentes possibilidades de obtenção de H₂. Ao comparar a produção biológica, térmica, fotônica e elétrica, os autores reportaram que a obtenção por processo biológico é inferior apenas em relação a fotônica, cujos custos para produção não são viáveis atualmente. Os autores também reportaram que o maior desafio para a produção biológica de H₂ refere-se as velocidades de obtenção, uma vez que trata-se de processo lento sob condição anaeróbia, além da necessidade de mais pesquisas na busca de condições favoráveis de obtenção de populações microbianas para otimizar a produção e fundamentalmente a aplicação em larga escala.

O estudo da otimização da produção de H₂ e ácidos orgânicos e de seu rendimento é direcionado, principalmente, na redução da pressão parcial de H₂, otimização das condições operacionais do processo e isolamento de culturas puras ou mistas. É importante ressaltar que o baixo rendimento da produção de H₂ em processos fermentativos é um dos principais obstáculos da comercialização desta tecnologia. Isto ocorre porque apenas 1/3 do substrato é convertido em H₂, enquanto 2/3 são convertidos em outros produtos da fermentação, como ácido acético, ácido butírico, butanol, acetona, etc (Hallenbeck e Ghosh, 2009). Na prática, maior rendimento de obtenção de H₂ está associado a mistura de ácido butírico e acético como produtos da fermentação, enquanto menor valor está associado ao ácido lático e outros solventes (Cai et al., 2010).

Sharma (2019) reportou como efetiva a combinação entre a catálise química e biológica para produção de H_2 . O autor descreveu a operação de uma célula de biotransformação e metabolismo sintético como produtora de 12 H_2 por glicose equivalente e afirmou ser uma possível solução para o baixo rendimento do H_2 via processo fermentativo. El-Emam e Özcan (2019) avaliaram a perspectiva técnica e econômica da produção de H_2 em larga escala. Os autores consideraram que utilizar a bioenergia contida em biomassa por processos enzimáticos, metabólicos e fermentativos ainda está no estágio de pesquisa e desenvolvimento e distantes da aplicação em larga-escala no curto prazo.

Castelló et al. (2020) descreveram os possíveis entraves da produção fermentativa de H_2 . Os autores reportaram a utilização de cultura mista como crucial para o aumento de escala do processo, no entanto está diretamente ligada aos problemas com estabilidade operacional e produtividade. A homoacetogênese e o aparecimento de bactérias produtoras de ácido lático foram observadas, independente da configuração dos reatores. Todavia, estratégias operacionais favoráveis à produção estável de H_2 foram descritas, como o pré-tratamento térmico do lodo de inóculo e a adequação de parâmetros como TDH e Carga Orgânica Volumétrica (COV). A inibição da produção de H_2 também pode ocorrer pelo excesso de substrato, micronutrientes, macronutrientes, íons metálicos, pH ácido, ácidos orgânicos não dissociados e substâncias tóxicas derivadas do substrato. Todavia, existem alternativas como estudar os fundamentos dos mecanismos de inibição e intervalo ótimo de parâmetros para operar os reatores e evitar a inibição (Elbeshbishy et al., 2017).

A produção fermentativa de H_2 e ácidos orgânicos é especialmente atrativa pela flexibilidade no uso de diferentes fontes de carbono, desde substratos sólidos até águas residuárias industriais. Dentre tais substratos podem ser mencionados, xilose, soro de queijo, silagem de grama, grama seca, resíduos de alimento, água residuária de usina de álcool, extrato de carne, extrato do sorgo de açúcar, celulose, glicerol, bagaço de cana-de-açúcar, vinhaça, melaço, glicose, manipueira, soro de queijo (Antonopoulou et al., 2010; Bao et al., 2013; Cui e Shen, 2012; Gadow et al., 2013; Im et al., 2012; Kargi et al., 2012; Li et al., 2012; Lo et al., 2013; Mäkinen et al., 2012) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Resumo de produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir de diversos substratos

Inóculo	Substrato	Operação	H ₂	Principais metabólitos	Referência
<i>Clostridium perfringens</i>	Glicose	pH 6, 37°C	5 mol mol _{glicose} ⁻¹	Acético e butírico	[A]
Autóctone	Resíduos de melão/melancia	pH 6, 36°C	391 mL	-	[B]
Autóctone	Resíduos de café	pH 7, 30°C	82 mL	Acético e láctico	[C]
<i>Bacillus</i> sp.	Resíduos de banana	pH 7, 37°C	32 mmol L ⁻¹	Acético e butírico	[D]
Autóctone	Sorgo doce	pH 5,3, 35°C	0,9 mol mol _{glicose} ⁻¹	Butírico	[E]
<i>Bacillus</i> sp. e <i>Brevundimonas</i> sp.	Amido	pH 5, 35°C	1,2 mol mol _{glicose} ⁻¹	Butírico	[F]
Autóctone	Gramma	pH 7, 35°C	72 mL g _{gramma} ⁻¹	Acético	[G]
Lodo de ETE	Celulose	pH 5,5, 55°C	12 mmol g _{celulose} ⁻¹	Acético	[H]
Lodo de ETE	Resíduos de alimentos	pH 4,3, 35°C	2,3 mol mol _{glicose} ⁻¹	Butírico	[I]
Lodo de ETE	Soro de queijo em pó	pH 7, 55°C	257 mL	-	[J]
Autóctone	Silagem	pH 7, 37°C	38 mL g _{silagem} ⁻¹	Acético e butírico	[K]
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Glicerol	pH 7, 35°C	0,5 mol mol _{glicerol} ⁻¹	Butírico e etanol	[L]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> e <i>Citrobacter freundii</i>	Xilose	pH 6,8, 45°C	0,5 mol mol _{xilose} ⁻¹	Butírico e acético	[M]

ETE: Estação de tratamento de Esgoto; A: Wong et al. (2018); B: Turhal et al. (2019); C: Montoya et al. (2019); D: Mazareli et al., (2019); E: Antonopoulou et al. (2010); F: Bao et al. (2013); G: Cui e Shen, (2012); H: Gadow et al. (2013); I: Im et al. (2012); J: Kargi et al. (2012); K: Li et al. (2012); L: Lo et al. (2013); M: Mäkinen et al. (2012).

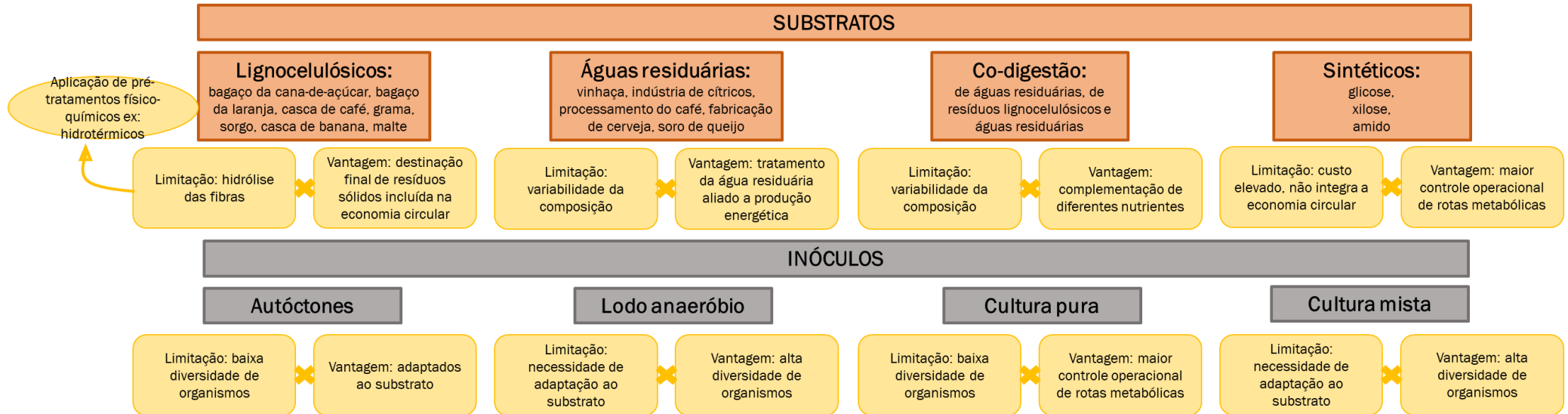
Wong et al. (2018) reportaram rendimento da produção de H₂ por *Clostridium perfringens* em pH 6, 37°C e com 5 g L⁻¹ de glicose como substrato de 4,68 mol de H₂ mol⁻¹ de glicose (Tabela 3.1). Este valor está acima do teórico convencional de 4 mol de H₂ mol⁻¹ de glicose e foi obtido tendo como principal rota metabólica a produção dos ácidos acético e butírico, com a razão entre a concentração de ácido acético e butírico de 0,77.

Turhal et al. (2019) estudaram a produção fermentativa de H₂ a partir de resíduos de melão e melancia. Os autores concluíram que o resíduo pode ser usado, tanto como inóculo, quanto como substrato, e a respectiva maior produção de H₂ e ácidos orgânicos obtida foi de

391 mL e 11 g L^{-1} , para resíduos com 37 g L^{-1} (Tabela 3.1). Montoya et al. (2019) estudaram a produção de H_2 a partir da co-digestão da polpa, casca e água residuária do café utilizando organismos autóctones como inóculo. Os autores obtiveram máxima produção de H_2 de 82 mL de H_2 nas condições de: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm, 50% *headspace*, 2 g L^{-1} de polpa e casca, 30 g de matéria orgânica L^{-1} de águas residuária do café e 2 g L^{-1} de extrato de levedura, os principais ácidos orgânicos observados nesta condição foram o acético (1956 mg L^{-1}) e láctico (786 mg L^{-1}) (Tabela 3.1). Mazareli et al. (2019) usaram a fermentação de resíduos de banana com cultura autóctone de *Bacillus* sp. e obtiveram máxima produção de H_2 de $31,7 \text{ mmol L}^{-1}$ para 5 g L^{-1} de substrato, além dos ácidos acético (488 mg L^{-1}) e butírico (536 mg L^{-1}) como principais metabólitos (Tabela 3.1).

Na Figura 3.1 é possível observar um fluxograma das características da produção fermentativa de H_2 descritas acima.

Figura 3.1: Possíveis substratos e inóculos para a produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos

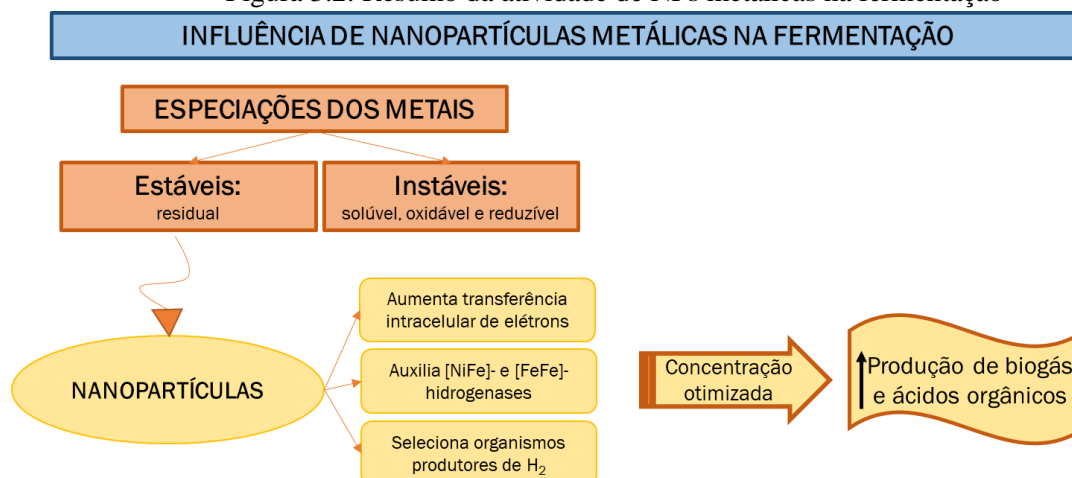


3.2 Nanopartículas metálicas

Em nanotecnologia, uma partícula é definida como um pequeno objeto que se comporta como uma unidade inteira em termos de seu transporte e propriedades. Nanopartículas (NP) são partículas cujo tamanho situa-se entre 1 e 100 nanômetros. O crescente acesso a nanotecnologia, devido à redução de seu custo, possibilita a utilização de NPs metálicas na engenharia ambiental. A elevada área superficial das NPs lhes confere específicas propriedades químicas e físicas, como por exemplo, na fabricação de células combustíveis microbianas (CCM). NPs de molibdênio de ferro foram utilizadas como anodos de CCM, sendo reportada densidade energética 1,4 vezes maior, quando comparado ao eletrodo controle (Mohamed et al., 2020). Resultados similares foram obtidos por Muthukumar et al. (2019) ao utilizar NPs de Fe-ZnO, os quais reportaram vantagens na hidrofiliabilidade e aumento (21%) na performance da CCM.

Além da utilidade das NPs no tratamento sustentável de efluentes, como por exemplo, nas áreas de nano-fotocatálise, desinfecção, nano-filtração e nano-adsorção. A suplementação com elementos traço de meios usando NPs para melhorar a digestão anaeróbia é atualmente uma dessas áreas de interesse científico e tecnológico. A ideia principal é fornecer formas metálicas mais estáveis aos microrganismos, conseqüentemente potencializando a produção de ácidos orgânicos e biogás (hidrogênio - H_2 e/ou metano - CH_4) (Figura 3.2). No contexto da digestão anaeróbia, as NPs metálicas propiciam maior transferência intracelular de elétrons, auxiliam a produção de H_2 por [FeFe]- e [NiFe]-hidrogenases, e favorecerem a seleção de culturas produtoras de H_2 no meio (Patel et al., 2018). Na Figura 3.2 é possível observar um resumo da atividade de NPs metálicas na fermentação.

Figura 3.2: Resumo da atividade de NPs metálicas na fermentação



Taherdanak et al. (2016) estudaram a influência dos íons Fe^{+2} e Ni^{+2} *versus* a influência de NPs de Fe^0 e Ni^0 na produção fermentativa de H_2 mesofílica a partir de glicose, utilizando lodo anaeróbico como inóculo (Tabela 3.2). Os autores reportaram que a ordem de efeitos nos parâmetros cinéticos foi a seguinte: $\text{Ni}^{+2} > \text{Fe}^0 > \text{Fe}^{+2} > \text{Ni}^0$. A partir da análise de metabólitos solúveis, os autores concluíram que a produção de etanol e ácido propiônico afetaram de forma negativa a produção de H_2 , enquanto a produção de ácido butírico foi favorecida.

O aumento no valor de rendimento da produção de H_2 com a adição de NPs em experimentos que utilizaram glicose como substrato e lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) como inóculo variou de 2% com a adição de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NPs de níquel (Taherdanak et al. 2016) a 100% com a adição de 200 mg L^{-1} de NPs de ferro (Zhang et al. 2015) (Tabela 3.2).

O aumento de apenas 7% na produção de H_2 a partir da fermentação de glicose ao adicionar NPs de paládio (5 mg L^{-1}) foi observado em reator em batelada, inoculado com *Enterobacter cloacae* (Mohanraj et al., 2014). Todavia, ao inocular a mesma cultura em reator em batelada com glicose, mas com 100 mg L^{-1} de NPs de ferro, o aumento na produção de H_2 foi de 101% quando comparado ao reator controle (Nath et al., 2015) (Tabela 3.2). Ou seja, o íon que compõe a NP influencia de forma significativa na produção de H_2 que será obtida a partir do processo fermentativo.

Tabela 3.2: Diferentes estudos sobre a influência da adição de nanopartículas no rendimento da produção de hidrogênio em ensaios em batelada

NPs	Concentração	Inóculo	Substrato	λ		Aumento do λ (%)	Referência
				Controle	NPs		
Co	10^{-6} mol L ⁻¹	<i>C. butyricum</i>	Glicose	109	118	9	[A]
Ag	20 nM	Lodo de ETE	Glicose	173	284	64	[B]
Au	5 nM	Consórcio presente em cereais	Sacarose	157	269	71	[C]
Pd	5 mg L ⁻¹	<i>Enterobacter cloacae</i>	Glicose	273	292	7	[D]
Fe ₂ O ₃	175 mg L ⁻¹	<i>C. acetobutylicum</i>	Glicose	213	284	33	[E]
Fe	5 mg L ⁻¹	Lodo de ETE	Glicose	326	450	38	[F]
Fe	400 mg L ⁻¹	Lodo de ETE	Glicose	80	161	100	[G]
Fe	100 mg L ⁻¹	<i>Enterobacter cloacae</i>	Glicose	111	223	101	[H]
Ni	2,5 mg L ⁻¹	Lodo de ETE	Glicose	326	332	2	[I]
Ni	5,7 mg L ⁻¹	Lodo de ETE	Glicose	237	307	30	[J]
Ni	60 mg L ⁻¹	Lodo de ETE	MEG	18	25	39	[K]
Fe-Ni	37,5 mg L ⁻¹	Lodo de ETE	Amido	72	142	97	[L]

λ : rendimento da produção de H₂ (mLH₂ gDQO⁻¹); MEG: Monoetilenoglicol; ETE: Estação de Tratamento de Esgoto; A: Beckers et al. (2013); B: Zhao et al. (2013); C: Zhang e Shen (2007); D: Mohanraj et al. (2014a); E: Mohanraj et al. (2014b); F: Taherdanak et al. (2016); G: Zhang et al. (2015); H: Nath et al. (2015); I: Taherdanak et al. (2016); J: Mullai et al. (2013); K: Elreedy et al. (2017); L: Taherdanak et al. (2015).

Kreuzer et al. (2017) avaliaram a expressão dos genes da [Ni-Fe]-hidrogenase e [Fe-Fe]-hidrogenase (genes *hydB* e *hydAB*) durante a produção de H₂ em reatores em batelada a partir da reação da transcriptase reversa seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR). Os autores observaram que ambas as enzimas estavam ativas, simultaneamente, após 14 h de experimento, e novamente após 80 h de experimento, e em ambos os casos estavam relacionadas ao aumento de H₂ no *headspace*. Os reatores foram inoculados com *Shewanella oneidensis*. Desta forma, a disponibilidade de íons níquel e ferro no meio está diretamente ligada a produção de H₂, já que estes metais são parte constituinte das enzimas hidrogenase (*hydA*).

Zhang et al. (2019) estudaram a biodisponibilidade do ferro em ambiente acidificado e a possível ação de ácidos orgânicos voláteis (AOV) ou radicais de ácidos inorgânicos como reguladores das especiações deste metal. Reatores em batelada com diferentes relações alimento/microrganismo (5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 e 0:1) foram operados em condição mesofílica, inoculados com lodo anaeróbio e alimentados com resíduo sólido orgânico. Os

autores reportaram que os AOV e os radicais de ácidos inorgânicos não regularam a especiação do ferro. Além disso, na presença de AOV, a conversão de ferro para sua fração solúvel foi observada, diminuindo a fração residual, a qual tem papel fundamental na manutenção do ferro em estados biodisponíveis. Desta forma, um fator externo para regular as especiações seria necessário, como por exemplo, o uso de NPs.

Zhong et al. (2020) avaliaram a influência de NPs de magnetita (Fe_3O_4) na produção de H_2 em reator de manta de lodo granular e expandida (EGSB) alimentado com glicose, operado em condição mesofílica e TDH de 6h. Os autores analisaram as especiações do ferro nas amostras afluentes de dois reatores: EGSB_t – NPs de magnetita foram adicionadas e EGSB_c – sem a suplementação com metais. Foi possível observar fração estável de metais (ferro residual) significativamente maior no EGSB_t (68%) quando comparado ao EGSB_c (1%), com maior porcentagem de frações instáveis (ferro oxidável, reduzível e solúvel). Além disso, foi reportada maior produção de H_2 em EGSB_t (13 mL de H_2 g⁻¹ de SSV), quando comparado ao EGSB_c (9 mL de H_2 g⁻¹ de SSV). Provavelmente, devido as cadeias de condução elétrica formadas, pelo ferro estável, na superfície das células microbianas do lodo do EGSB_t.

3.3 *Clostridium butyricum*

A engenharia genética aplicada ao aumento da produção fermentativa de H_2 tem utilizado cepas de *Clostridium* spp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. (Goyal et al., 2013; Hallenbeck et al., 2012). Bactérias semelhantes à *Clostridium* têm sido descritas como uma das mais eficazes para a produção de H_2 dentre aquelas pertencentes ao Filo Firmicutes. Algumas espécies já citadas como produtoras de H_2 são as seguintes: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium puniceum* e *Clostridium thermocellum* (Barca et al., 2016; Pachapur et al., 2017; Seelert et al., 2015; Yin and Wang, 2017)

Mesmo utilizando diferentes fontes de inóculo como lodo de estação de tratamento de esgoto (Zhao et al., 2013) e consórcio de bactérias em cereais (Zhang and Shen, 2007), a presença dominante de *C. butyricum* no processo fermentativo de produção de H_2 é frequentemente reportada na literatura (Tabela 3.3). Alguns ensaios em batelada realizados com a cultura pura *C. butyricum* para produção de H_2 estão resumidos na Tabela 3.3. É

possível observar que o rendimento variou entre 162 e 253 mLH₂ gDQO⁻¹, e em alguns ensaios foram utilizados também resíduos sólidos como substrato, sendo reportada esta espécie como bactéria celulolítica predominante.

Kataoka et al. (1997), Lin et al. (2007) e Cai et al. (2010) obtiveram rendimentos de produção de H₂ de 164, 211 e 162 mL de H₂ g⁻¹ de matéria orgânica, respectivamente, em reator em batelada, inoculado com cultura pura de *Clostridium butyricum* fermentando glicose em condição mesofílica (Tabela 3.2). Nos três estudos foram obtidos rendimentos menores que 50% da produção teórica de H₂ e ácidos acético e butírico como principais metabólitos.

Mahmood et al. (2013) estudaram a fermentação de aguapé por cultura mista e *C. butyricum*. Os autores obtiveram 38% de aumento no rendimento da produção de H₂ ao adicionar NPs de ferro ao processo. O rendimento máximo obtido foi de 57 ml de H₂ g⁻¹ de peso seco da planta quando 250 mg Fe⁰ L⁻¹ foram adicionados. Pachapur et al. (2017) utilizaram bactérias semelhantes a *C. butyricum* para produção de H₂ a partir de resíduos da indústria de biodiesel. Os reatores em batelada foram operados a 30°C, pH 6,5 e 150 rpm, cuja produção máxima observada foi de 17,44 ± 0,38 mmol de H₂ L⁻¹.

Jiang et al. (2016) utilizaram bagaço de cana de açúcar (242 mLH₂ gDQO⁻¹) e folhas de *Jatropha hulls* (228 mLH₂ gDQO⁻¹) e obtiveram rendimento da produção de H₂ similar aquele com glicose (253 mLH₂ gDQO⁻¹). São poucos os exemplos de aplicação de cultura pura de *C. butyricum* como inóculo de reatores contínuos não estéreis. Fritsch et al. (2008) utilizaram um reator de coluna com estruturas cerâmicas quadradas e operado a 37 °C e TDH de 5,5 h. Os autores obtiveram rendimento de 0,92 molH₂ mol_{hexose}⁻¹ e reportaram os ácidos butírico (2,4 g L⁻¹) e fórmico (1 g L⁻¹) como principais metabólitos solúveis. Pattra et al. (2010) utilizaram cultura pura de *C. butyricum* como inóculo em reator de mistura completa e obtiveram o máximo rendimento de 1 molH₂ mol_{hexose}⁻¹ em TDH de 4h. Nesta condição os ácidos láctico (3,4 gDQO L⁻¹) e etanol (2,9 gDQO L⁻¹) foram os principais metabólitos solúveis.

Tabela 3.3: Produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum* utilizando glicose como substrato

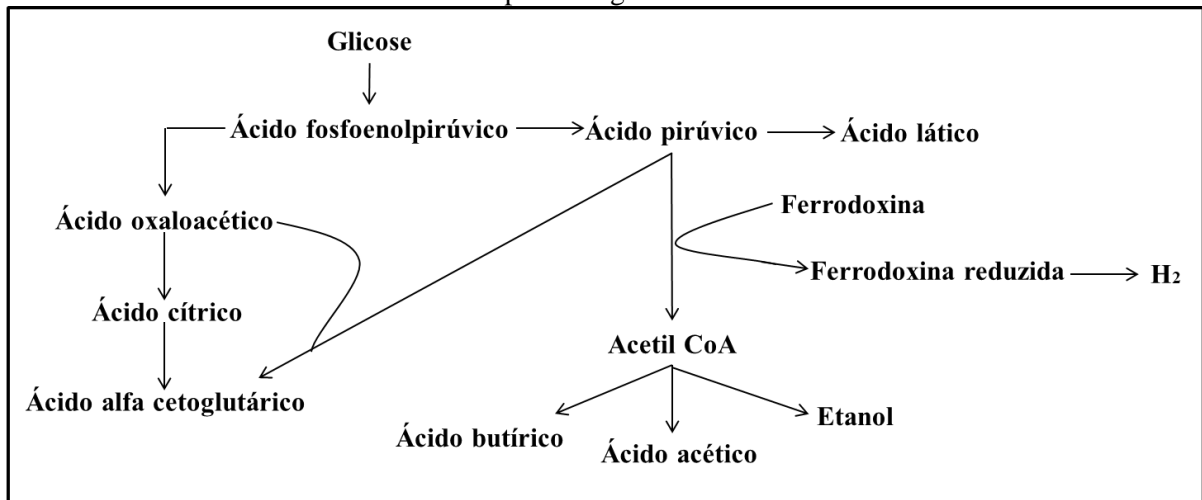
Substrato	Temperatura (°C)	λ	Referência
Glicose		253	
Glicose e bagaço	35	242	Jiang et al. (2016)
Glicose e <i>Jatropha hulls</i>		228	
Glicose	35	162	Cai et al. (2010)
Glicose	35	211	Lin et al. (2007)
Glicose	30	164	Kataoka et al. (1997)

λ: Rendimento (mLH₂ gDQO⁻¹)

Calusinska et al. (2010) evidenciaram a importância de caracterizar os organismos de interesse de acordo com suas diferentes hidrogenases. Por exemplo, a partir deste estudo poderia modificar uma cultura a ponto de retirar a hidrogenase que utiliza o H_2 , e então retirar a sua capacidade de reciclá-lo. Outra abordagem é a de identificar novas enzimas com velocidades maiores, além da obtenção de maior flexibilidade na utilização de redutores. Ainda, com a possibilidade de selecionar enzimas com menor sensibilidade ao oxigênio. *Clostridium* spp. possui uma diversidade de enzimas que poderiam atender a estas exigências da engenharia genética.

As possíveis rotas de fermentação da glicose e a porcentagem de reagente que é destinada a cada produto ao utilizar a cultura pura de *C. butyricum* está ilustrada na Figura 3.3 (Cai et al., 2010). Provavelmente, 10% do ácido pirúvico formado pode ser usado para a formação de ácido láctico, enquanto 4% vai para a rota que envolve ácido cítrico. Os 85% restantes vão para a rota de produção de H_2 que também tem o ácido butírico, ácido acético e etanol como subprodutos (Figura 3.3).

Figura 3.3: Fluxo metabólico da produção fermentativa de hidrogênio por *Clostridium butyricum* a partir da glicose



(Fonte: Cai et al., 2010)

3.4 Reator anaeróbico de leito fluidificado

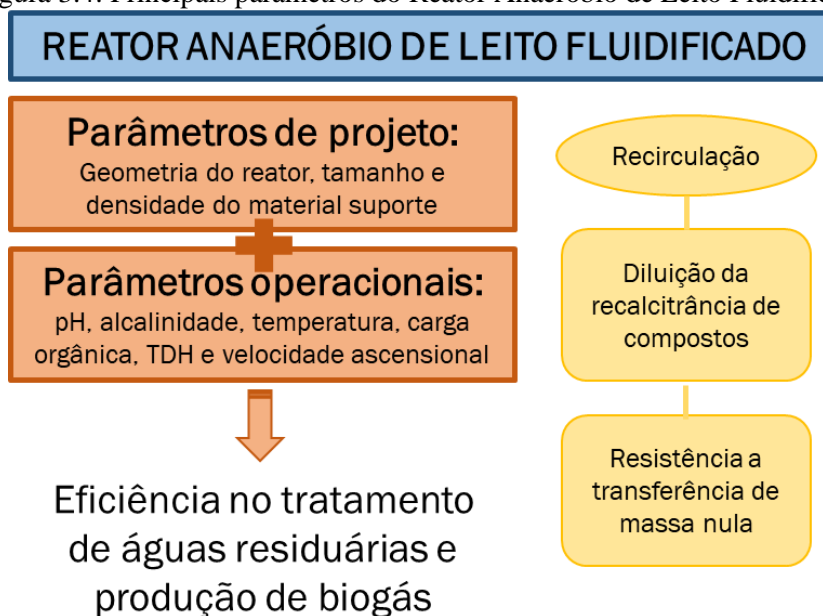
O RALF é caracterizado pela elevada relação altura/diâmetro e aplicação de vazão de recirculação no sistema de modo a fluidificar o leito de lodo. A manutenção da biomassa no sistema é garantida por sua adesão em um material suporte. Essa configuração hidráulica garante a melhora no contato biomassa-água residual; evita a formação de canais preferenciais, empacotamento e retenção de gás; permite o controle e otimização da espessura

do biofilme; requer menor área; e pode-se obter melhor estabilidade e melhor eficiência de remoção de matéria orgânica (Shah et al., 2017).

Desta forma, a configuração do RALF surgiu como alternativa para o tratamento de águas residuárias recalcitrantes, cujos compostos geralmente são hidrofóbicos e de alto peso molecular. As vantagens do RALF abrangem: resiliência frente a variações das características afluentes, alta velocidade de transferência de massa, e mistura uniforme. Apesar de relativamente nova, verifica-se ampla aplicação desta configuração em larga escala. O *design* e a operação do RALF influenciam na eficiência de tratamento, e os principais parâmetros são relacionados com a geometria do reator, tamanho e densidade do material suporte, velocidade ascensional, pH, TDH e COV (Bello et al., 2017).

Apesar dos diversos estudos relacionados à produção biológica de H_2 , o estudo deste processo em reatores contínuos como o RALF ainda é necessário. Alguns aspectos que influenciaram a produção deste gás já foram avaliados, tais como, adaptação do inóculo a fonte de carbono no próprio reator, concentração de substrato ótima e metabólitos (Cavalcante de Amorim et al., 2009; Koskinen et al., 2007; Z. Zhang et al., 2008). Na Figura 3.4 estão descritos os principais parâmetros relacionados ao projeto e operação de RALF.

Figura 3.4: Principais parâmetros do Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado



Outros estudos da produção de H_2 utilizando RALF estão resumidos na Tabela 3.4. É possível observar que rendimentos entre 1,0 e 15,2 mmol H_2 gDQO⁻¹ foram reportados, porém utilizando água residuária real, o rendimento não foi maior que 5,2 mmol H_2 g⁻¹ de

matéria orgânica (menor que 40% do máximo teórico), reforçando a necessidade de novos estudos para otimizar esta produção de H₂.

Tabela 3.4: Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado

Inóculo	Substrato	TDH (h)	Temperatura (°C)	λ	Referência
Esgoto	Sacarose	6	40	11,1	[A]
Vinhaça	Vinhaça	6	55	2,9	[B]
Água residuária de suinocultura	Vinhaça e glicose	6	55	3,1	[C]
Vinhaça	Soro de queijo	4	55	5,2	[D]
Cerveja	Galactose	6	37	15,2	[E]
Esgoto	Xilose	6	55	7,5	[F]
Vinhaça	Vinhaça e soro de queijo	6	55	1,0	[G]

λ : Rendimento (mmolH₂ gDQO⁻¹); A: (Lin et al., 2009); B: (Santos et al., 2014); C: (Reis et al., 2015); D: (Ottaviano et al., 2017); E: (Anburajan et al., 2018); F: (Dessì et al., 2018); G: (Ramos e Silva, 2018).

Zhang et al., (2008) utilizaram dois RALF para produção biológica de H₂, sendo um deles com biofilme em material suporte e outro com lodo granular, ambos com glicose como fonte de carbono, pH 5,5 e mantidos em 30°C. Os autores estudaram a influência do tempo de detenção hidráulico (TDH) (0,125 a 3 h) e da concentração de glicose (5 a 120 g L⁻¹) na produção de H₂. Em ambos os reatores, o rendimento máximo de H₂ foi de 188 mL de H₂ g⁻¹ de matéria orgânica, em TDH de 0,25 h e 10 g L⁻¹ de glicose.

Shida et al. (2009) estudaram a produção biológica de H₂ em RALF alimentado com água residuária sintética (2 g de glicose L⁻¹). Os autores reportaram aumento da produção volumétrica de H₂ de 1,84 para 2,29 L h⁻¹ L⁻¹, com a redução do TDH de 8 para 2 h. O conteúdo do biogás foi de H₂ e CO₂, livre de CH₄, sendo o conteúdo máximo de H₂ de 37%, em TDH de 2 h.

Santos et al. (2014) e Reis et al. (2015) operaram RALF em condição termofílica (55°C) e submetidos ao mesmo TDH (6h). Os autores obtiveram rendimento de 2,9 e 3,1 mmol de H₂ g⁻¹ de matéria orgânica, respectivamente, ao alimentar o reator com vinhaça e co-digestão de vinhaça e glicose. Desta forma, a co-digestão com substrato de fácil assimilação não favoreceu de forma significativa o rendimento da produção de H₂, em relação ao aumento de custo que significaria no processo de tratamento.

Ao comparar o rendimento de RALFs operados em condição termofílica (55°C) e TDH de 6h, com aquele alimentado apenas com vinhaça (2,9 mmolH₂ gDQO⁻¹ (Santos et al., 2014)) ou apenas com soro de queijo (5,2 mmolH₂ gDQO⁻¹ (Ottaviano et al., 2017) foi observado maior produção em relação aquele alimentado em co-digestão com vinhaça e soro de queijo (1,0 mmolH₂ gDQO⁻¹ (Ramos and Silva, 2018b)).

Ao comparar os RALFs submetidos a TDH de 6h e alimentados com substrato sintético (sacarose, galactose e xilose) foram observados maiores rendimentos da produção de H₂ naqueles operados em condição mesofílica; ou seja de 11,1 mmolH₂ gDQO⁻¹ a 40°C (Lin et al., 2009) e 15,2 mmolH₂ gDQO⁻¹ a 37°C (Anburajan et al., 2018), em relação a condição termofílica de 7,5 mmolH₂ gDQO⁻¹ a 55°C (Dessi et al., 2018).

Peñas et al. (2019) modelaram o choque de cargas orgânicas de fenol em RALF com partículas adsorventes, para avaliar a robustez e estabilidade desta configuração de reator. Os autores reportaram sistema contínuo de mistura completa sem resistência a transferência de massa por difusão. Jamali et al. (2019) estudaram a eficiência de tratamento de efluente de moinho de óleo de palma em reator RALF utilizando carvão ativado como material suporte do biofilme. Diferentes pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) e TDH (12, 20 e 25h) foram testados, sendo a máxima produção de H₂ (5,2 mmol de H₂ L⁻¹ h⁻¹) obtida na condição de pH 6 e TDH de 12 h.

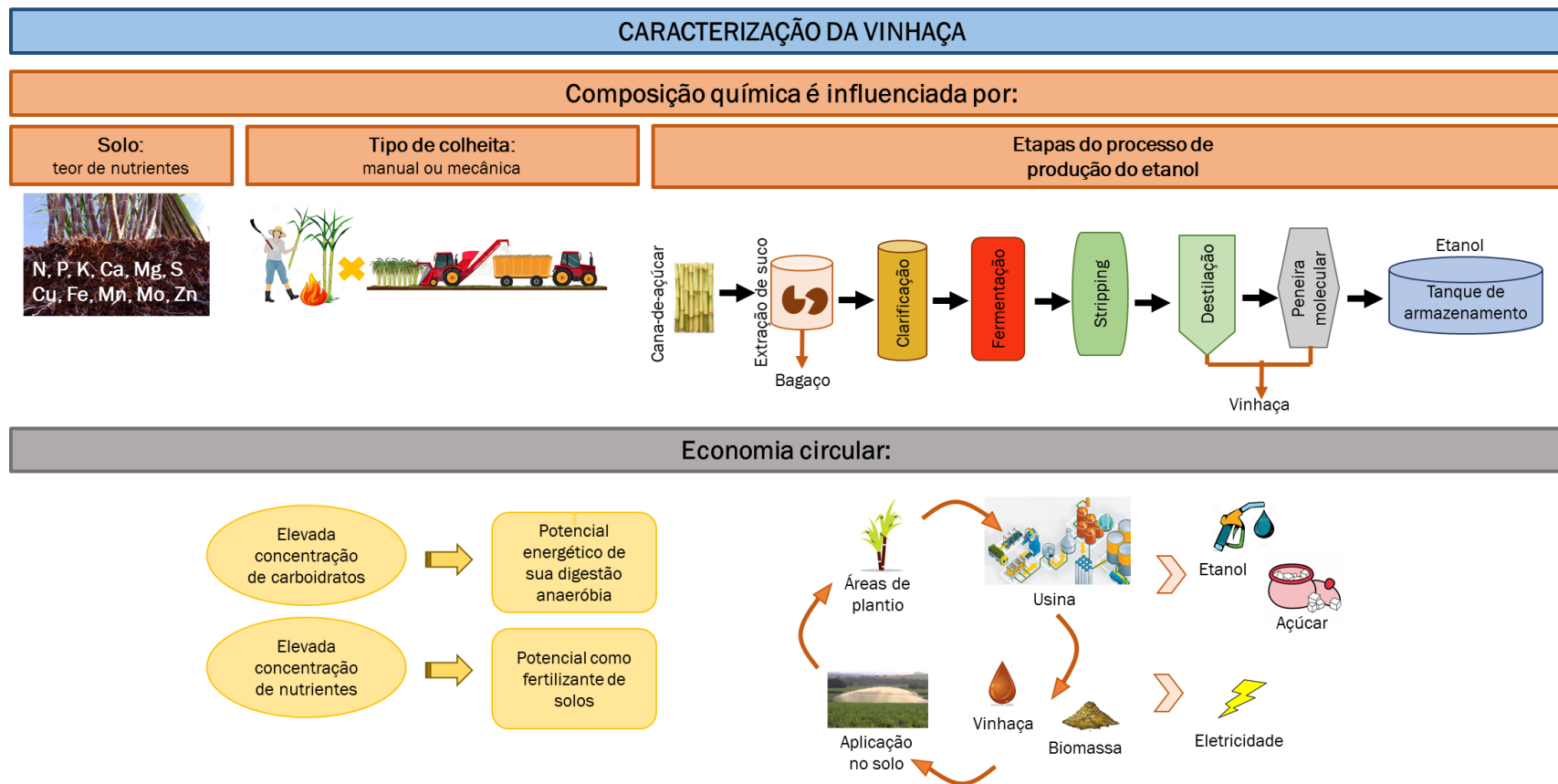
Barca et al. (2015) reportaram que o RALF é uma alternativa de sistema contínuo interessante para produção de H₂ a partir de soluções ricas em carboidratos. No entanto, ao revisarem a literatura, os autores enfatizaram que são poucos os estudos que utilizam água residuária real. Além disso, de forma geral, destacaram também que obtiveram em RALF melhor desempenho em relação ao Reator Anaeróbio de Leito Empacotado (RALE), apesar de sua operação ser mais complexa.

3.5 Água residuária da indústria de cana-de-açúcar

A indústria canavieira está entre as 17 que mais poluem o meio ambiente. Atualmente, 22,4*10⁹ L de vinhaça são produzidos no mundo, com potencial para gerar 40,77*10¹⁰ L de biogás. O tratamento da vinhaça é um dos problemas significativos e desafiantes para o processo de produção industrial de etanol. Dentre as opções, a remoção biológica é reconhecidamente uma possibilidade efetiva de degradação dos compostos orgânicos da água residuária com alto potencial poluente proveniente da agroindústria, incluindo as destilarias.

Além disso, por meio do processo anaeróbio tem-se a possibilidade de converter porção significativa da matéria orgânica em biogás, que pode ser usado como fonte de energia na própria destilaria (Pant e Adholeya, 2007). A vinhaça é a mais efetiva fonte de matéria orgânica para produção de H_2 de alta eficiência e a fermentação é o mais promissor processo de produção de H_2 a partir desta água residuária. Na Figura 3.5 estão descritos os fatores que influenciam a composição química da vinhaça e o seu processo de produção.

Figura 3.5: Resumo do processo de produção do etanol/vinhaça



[Fonte: Parsae et al., 2019; Junior et al., 2019; Narueworanon et al., 2020; Buller et al., 2020; Madaleno et al., 2020]

Moraes et al. (2014) indicaram a viabilidade de remoção e degradação de compostos orgânicos da vinhaça em reatores anaeróbios, a partir do conceito de biorrefinarias incluindo a produção de energia e controle ambiental (emissão de gases de efeito estufa, impactos no solo e em lençóis freáticos). Enquanto a composição química da vinhaça depende do solo, da variedade da cana-de-açúcar, do método de colheita (manual ou mecânica), e das etapas industriais de produção do etanol (Goyal et al., 2019).

Lin et al. (2012) avaliaram o potencial de produção fermentativa de H_2 de diversas águas residuárias. Os autores reportaram que com a vinhaça obtiveram a maior energia líquida, seguida de água residuária com glicerina e esgoto doméstico, respectivamente de 140, 69 e 52 kJ $gDQO^{-1}$. Os autores obtiveram rendimento máximo de 224 $mLH_2 gDQO^{-1}$ a partir da vinhaça. Christine et al. (2014) estudaram o efeito da diluição desta água residuária no rendimento da produção de H_2 em RALF termofílico ($55^\circ C$) em TDH de 6 h e reportaram valores de 18 e 64 $mLH_2 gDQO^{-1}$ ao utilizar a água residuária *in natura* e três vezes diluída, respectivamente.

Malik et al. (2014) reportaram a cinética da produção de H_2 catalisada por NPs de ferro utilizando vinhaça como substrato. Os autores realizaram ensaios variando a concentração de substrato (25-125 $gDQO L^{-1}$) e concentração de NPs de ferro adicionadas ao processo (sem NPs – até 200 $mgFe^0 L^{-1}$). Nas condições com 50 $mg L^{-1}$ de NPs de ferro, 110 $g L^{-1}$ de concentração inicial de matéria orgânica e pH 6, obtiveram a máxima produção acumulada de H_2 de 275 mL, o que corresponde ao rendimento de 26 $mL H_2 gDQO^{-1}$. Todavia, no ensaio controle (sem a adição de NPs) a produção máxima de H_2 foi de 140 mL, o que correspondeu ao rendimento de 13 $mLH_2 gDQO^{-1}$. Ou seja, a adição de NPs de ferro resultou em aumento de 100% na produção fermentativa de H_2 a partir da vinhaça.

Godoi et al. (2019) estudaram a influência da variação sazonal nas características desta água residuária e concluíram que a composição química da vinhaça é influenciada principalmente pelo manejo da cultura de cana-de-açúcar e pelas etapas de processamento da cana ao etanol, em comparação as características climáticas. Os autores também ressaltaram a importância do processo anaeróbio anterior à sua disposição no solo, para minimizar os impactos ambientais causados por sua elevada concentração de matéria orgânica. Por meio do processo anaeróbio tem-se a remoção de matéria orgânica excessiva e produção de biogás.

Parsaee et al. (2019) descreveram a vinhaça como uma água residuária com baixa razão carbono:nitrogênio. Os autores sugerem a co-digestão com substâncias complementares

como esterco e fertilizantes para aumentar a produção de biogás. Reportou-se que a co-digestão da vinhaça com esterco pode aumentar em até 15% a produção de biogás. O impacto de maior disponibilidade de nutrientes na atividade microbiana foi reportado por Narueworanon et al. (2020). Os autores observaram que a suplementação da fermentação de vinhaça com açúcar, carbonato de cálcio e nitrogênio aumentou em 21% a produção de butanol em reatores em batelada inoculados com *Clostridium beijerinckii*.

Buller et al. (2020) avaliaram os benefícios de fertilização mineral da vinhaça biodigerida, a qual pode substituir 30% de nitrogênio mineral e 46% de fósforo da adubação. A aplicação desta água residuária, pós-aplicação de processo de degradação, no solo geralmente é limitada por leis ambientais locais. A partir disso, a modelagem por Sistema de Informação Geográfica é uma ótima estratégia para aplicar vinhaça em níveis ambientalmente seguros. Estes autores ilustraram como a produção de energia e a reciclagem de nutrientes a partir da vinhaça contribuem para a descarbonização. No estudo foi considerado que a produção média de $23,8 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ de vinhaça por ano pode gerar $66.585 \text{ MWh ano}^{-1}$ de energia elétrica, a partir da queima do biogás, na região metropolitana de Campinas. Esta quantidade de energia pode abastecer 103.000 habitantes e evitar a emissão de $35.892 \text{ tCO}_2 \text{ ano}^{-1}$ (a partir da substituição da fonte de energia elétrica).

A produção de biogás a partir da digestão anaeróbia em reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) de dois estágios alimentados com vinhaça e melaço tem o potencial de melhorar o balanço energético da indústria do etanol. Junior et al. (2019) utilizaram o melaço como substrato para a continuidade da operação dos reatores na entressafra e obtiveram rendimento médio de $0,275 \text{ m}^3$ de $\text{CH}_4 \text{ kg}^{-1}$ de matéria orgânica removida. Os autores obtiveram por meio do sistema de dois estágios 58% mais energia ($5,1 \text{ kWh d}^{-1} \text{ m}^{-3}$ de vinhaça) em relação ao estágio único, quantidade equivalente a 17% da energia necessária para processar uma tonelada de cana-de-açúcar.

Madaleno et al. (2020) propuseram uma alternativa para diminuir o consumo de água de abastecimento na indústria de etanol. Os autores avaliaram a reciclagem de vinhaça biodigerida em reator UASB e concluíram que a integração da geração de biogás e produção de etanol, assim como o uso da vinhaça efluente de reator UASB de dois estágios para diluir o melaço são alternativas viáveis. A produção de etanol a partir do melaço e eficiência de seu tratamento quando diluído com vinhaça (5,7% e 89,3%, respectivamente) foi similar aos resultados obtidos quando diluído em água potável (5,6% e 85,9%, respectivamente).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Planejamento experimental

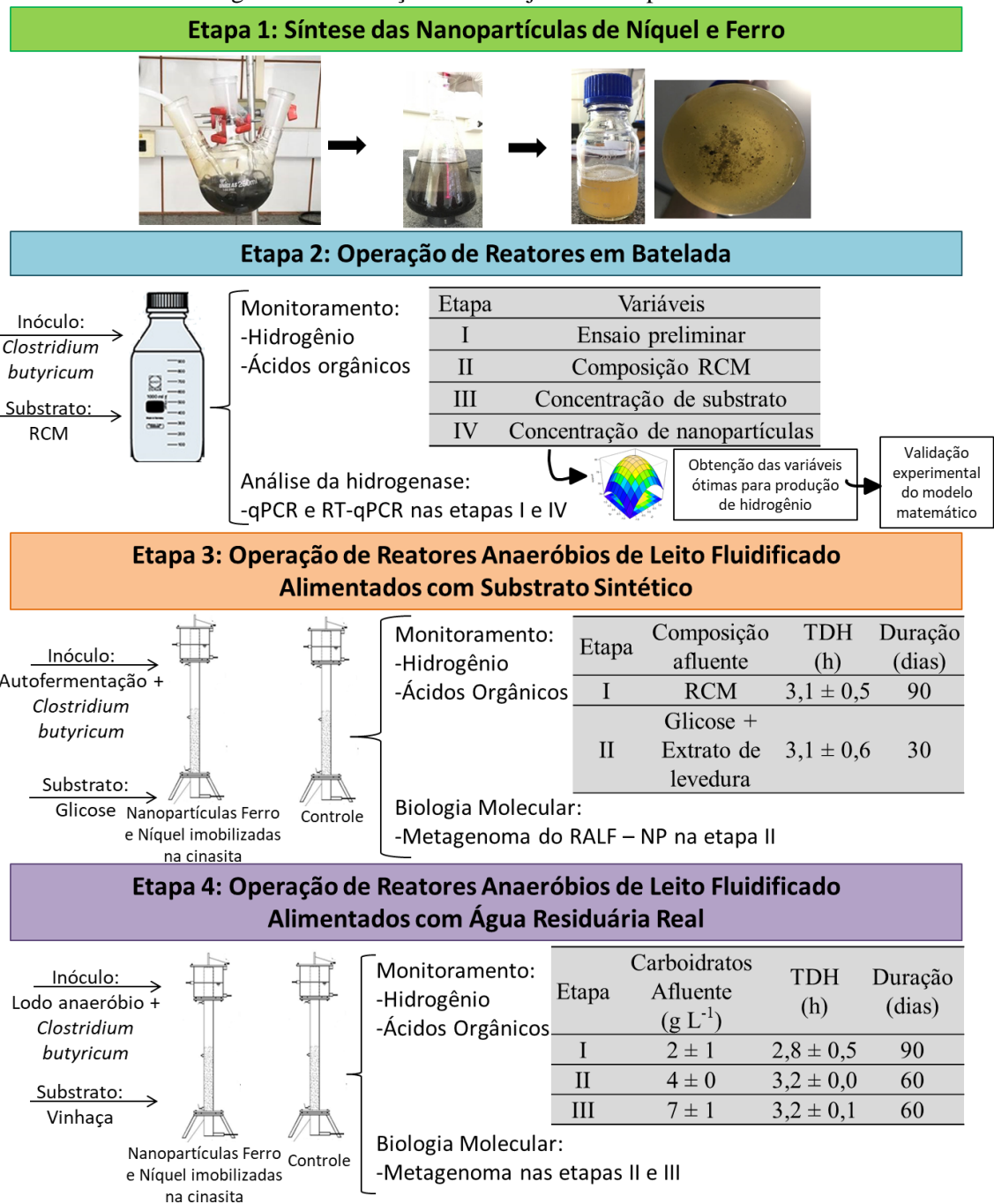
Os procedimentos experimentais deste projeto foram divididos em 4 etapas (Figura 4.1). A primeira etapa consistiu em testes para a síntese de NPs de Ferro e Níquel. Na segunda etapa foram realizados os testes em reator em batelada com cultura pura (*C. butyricum*) e água residuária sintética a base de glicose (*Reinforced Clostridial Medium* - RCM). A partir destes testes e da sua organização utilizando Delineamento Experimental (DOE) foi obtido modelo matemático referente a condição ótima de produção de H₂. Nos ensaios de validação experimental desta condição ótima foi realizado o qPCR e o RT-qPCR, a fim de verificar a influência de NPs metálicas no número e na expressão da enzima hidrogenase.

Durante a terceira etapa foram operados dois RALFs, em escala de bancada, inoculados por autofermentação e bioaumentação com *C. butyricum*. As seguintes condições foram analisadas: adição de NPs de ferro e níquel (RALF - NP) e sem a adição de NPs (RALF - Controle). Os reatores foram alimentados com água residuária sintética, e operados nas condições ótimas obtidas do teste em reator em batelada. Ademais, suas duas fases operacionais foram divididas de acordo com a composição da alimentação dos reatores.

Durante a quarta etapa foram operados dois RALFs, em escala de bancada, inoculados com lodo da estação de tratamento de água residuária de abatedouro de aves bioaumentado com *C. butyricum*. As seguintes condições foram analisadas: adição de NPs de ferro e níquel (RALF - NP) e sem a adição de NPs (RALF - Controle). Os reatores foram alimentados com vinhaça. Ademais, três fases operacionais foram divididas de acordo com a concentração de carboidratos no afluente (diluição da vinhaça na alimentação).

Ao final da terceira e quarta etapa experimental foram retiradas amostras do biofilme dos RALFs para realização de análise metagenômica, a fim de identificar populações microbianas (taxonomia) e avaliar a influência da presença de NPs nas enzimas relacionadas ao processo fermentativo.

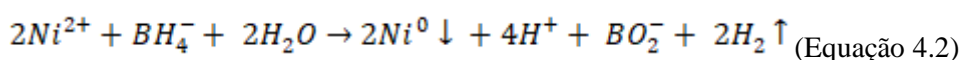
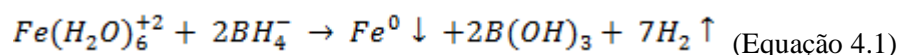
Figura 4.1: Ilustração do Planejamento Experimental



4.2 Síntese de nanopartículas para os ensaios em batelada

As NPs de Ferro e Níquel foram sintetizadas segundo a metodologia adaptada de Cheng et al. (2010) e Wu e Chen, (2003), respectivamente. As NPs de Ferro foram sintetizadas a partir do gotejamento de 100 mL de solução 0,04M de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de solução 0,2 M de KBH_4 . Esse procedimento foi realizado em balão com 3 bocas sob

atmosfera de argônio (99%) e temperatura ambiente. A precipitação das NPs ocorreu de acordo com a Equação (4.1) a seguir. As partículas foram então lavadas com água destilada. As NPs de Níquel foram sintetizadas a partir da precipitação de Níquel ao adicionar 0,18 g de borohidreto de potássio em 20 mL de solução $2 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ de cloreto de níquel (NiCl₂·6H₂O) em etileno glicol (Equação 4.2). Após duas horas sob agitação magnética a 70°C, as NPs foram lavadas em etanol, que evapora em temperatura ambiente, e então as partículas estavam prontas para o uso.



A caracterização das NPs sintetizadas foi realizada por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) em Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS em abertura de 60 μm. Além de fotos das NPs sintetizadas para avaliar seu tamanho médio, imagens das NPs em meio com *Clostridium butyricum* também foram capturadas.

4.3 Imobilização de nanopartículas na cinasita dos reatores contínuos

As NPs de Ferro e Níquel foram imobilizadas no material suporte dos reatores contínuos, formado por pequenos grãos de argila expandida, também denominados cinasita. Para isso, utilizou-se a metodologia de Delgado e Mendez (2012) modificada, a qual consistiu nas seguintes etapas: (1) mergulhar 500 mg de cinasita ($2,8 < D < 3,5$ mm) em 1 L de solução concentrada contendo FeCl₃ (50 g L⁻¹) e NiCl₃ (30 g L⁻¹); (2) a mistura foi transferida para sistema com agitação por 24 h a 25°C; (3) a mistura foi mantida sob agitação por 10 h a 120°C; (4) a mistura foi lavada com água destilada até a eliminação de todo o ferro e níquel solúveis, garantida com a análise da concentração de metais no sobrenadante; (5) As partículas de cinasita foram transferidas para estufa a 70°C por 24 h, e posteriormente, em temperatura ambiente, foram adicionadas no RALF - NP.

A imobilização de NPs no material suporte dos reatores contínuos é mais vantajosa, quando comparada a adição de NPs na alimentação durante a operação, pois ocorre apenas uma vez, antes do início da operação. Além de facilitar a manutenção das partículas no reator, submetido a alta velocidade ascensional (vazão de recirculação).

4.4 Reatores em batelada

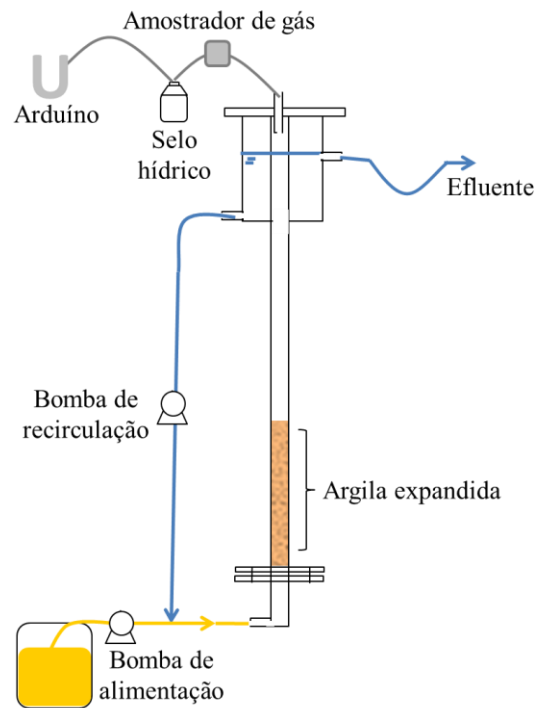
Os ensaios em batelada foram realizados em reatores com volume total de 250 mL (125 mL de meio reacional e 125 mL de *headspace*) e encubados na temperatura de 37°C, rotação de 130 rpm e pH inicial de 6,8. Cada condição foi preparada em triplicata para amostragem de biogás, porém a amostragem da fração líquida (para análise de ácidos e carboidratos) era realizada em apenas um dos reatores, pois influencia nos dados de produção de biogás.

4.5 Reator anaeróbio de leito fluidificado

Todos os reatores contínuos utilizados neste trabalho foram confeccionados em acrílico, com volume útil de 1,4 L, com um dispositivo na extremidade superior para garantir a separação entre as fases sólida, líquida e gasosa, e um distribuidor de vazão na base. Foram instalados pontos de amostragem no leito e no separador de fases (Figura 4.2). Os reatores foram mantidos em condição mesofílica, a 37°C, em câmara climatizada. A vazão de alimentação e de recirculação empregadas foram 0,7 L h⁻¹ e 50 L h⁻¹, respectivamente.

Cada reator foi operado com uma para alimentação e outra para a recirculação do efluente. A fluidificação do leito foi mantida através da bomba de recirculação. A cinasita de diâmetro entre 2,80 e 3,35 mm foi escolhida como material suporte dos reatores, por ser de fácil obtenção, inerte, e apresentar características físicas adequadas à boa deposição dos microrganismos tal como rugosidade e porosidade.

Figura 4.2: Esquema do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF)



4.6 Inóculo

4.6.1 Reatores em batelada

A cultura pura de *Clostridium butyricum* (N° 7470), obtida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, foi utilizada como inóculo dos reatores biológicos. O inóculo obtido foi reativado em *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) cuja composição está descrita na Tabela 4.1, com pH inicial de 6,8. Após crescimento da cultura a 37°C por 24 h, amostras foram obtidas da suspensão celular, submetidas a centrifugação (9.000 rpm), sendo o *pellet* recoberto em glicerol e congelado a -80°C em frascos de plástico. Antes de cada batelada de ensaios, as amostras do inóculo eram novamente reativadas em meio RCM por 24 h. Desta reativação, 25 mL (correspondente a 20% do volume reacional dos ensaios) foram centrifugados a 9.000 rpm por 5 minutos e a biomassa precipitada era então utilizada como inóculo (Figura 4.3). As concentrações de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis na solução de inóculo foram $1,23 \pm 0,15$ e $1,14 \pm 0,15$ g L⁻¹, respectivamente.

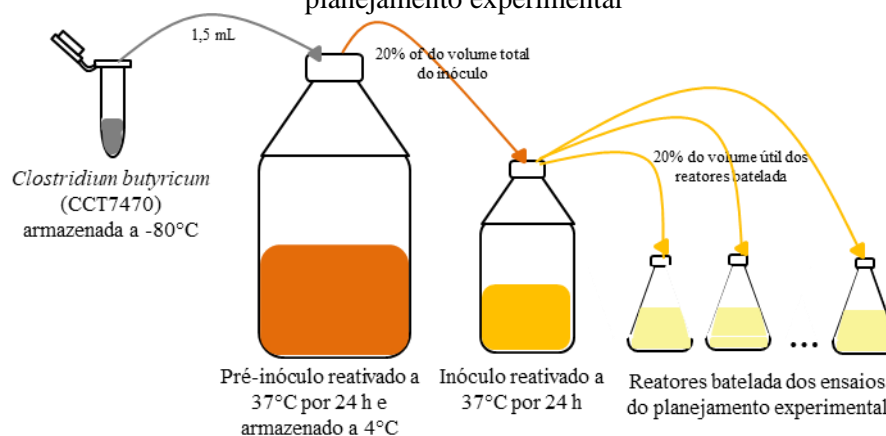
A fim de garantir a manutenção da cultura pura, foram utilizados nos ensaios apenas materiais esterilizados, enquanto as soluções e frascos Duran foram autoclavados a 130°C e

1,7 bar por 15 minutos. A inoculação e montagem dos ensaios foi realizada a menos de 30 cm de Bico de Bunsen. As condições de anaerobiose foram mantidas durante o preparo dos meios de cultura e inoculação, a fração líquida e o headspace dos reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) por 15 min. Os reatores foram fechados com tampa de butila e parafuso plástico e incubados a 37 ° C até a estabilização da produção de H₂.

Tabela 4.1: Composição do *Reinforced Clostridial Medium* (RCM)

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de carne	10
Peptona	10
Glicose	5
Extrato de levedura	3
Amido	1
Cloreto de sódio	5
Acetato de sódio	3
L-cisteína	0,5

Figura 4.3: Esquema ilustrativo das etapas de inoculação dos reatores batelada nos ensaios do planejamento experimental



4.6.2 Reatores contínuos alimentados com glicose

A cultura pura de *Clostridium butyricum* (N^o 7470), obtida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, foi utilizada na bioaugmentação dos RALFs. O inóculo obtido foi reativado em meio RCM otimizado nos ensaios em batelada (Tabela 4.2), em pH inicial de 6,8. Após ser incubado a 37°C por 24 h, amostras do inóculo foram centrifugadas a 9.000 rpm por 5 minutos e a biomassa precipitada foi adicionada a alimentação dos reatores contínuos.

Tabela 4.2: Composição do *Reinforced Clostridial Medium* otimizado (RCM)

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de carne	5
Peptona	5
Glicose	5
Extrato de levedura	1,5
Amido	1

Além da cultura pura, a alimentação recirculada nos reatores contínuos durante a etapa de inoculação (30 dias), em condições não estéreis, permitiu crescimento de outros organismos e consequente formação do biofilme pelo processo denominado autofermentação. A concentração de sólidos no inóculo está descrita na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Concentração de sólidos na alimentação do período operacional de inoculação dos RALFs alimentados com glicose

Biomassa Inicial	RALF NP	RALF controle
Sólidos Totais (g L ⁻¹)	31 ± 15	30 ± 13
Sólidos Totais Voláteis (g L ⁻¹)	27 ± 13	25 ± 12

4.6.3 Reatores contínuos alimentados com vinhaça

A cultura pura de *Clostridium butyricum* (N^o 7470), obtida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello foi utilizada na bioaugmentação dos RALF. O inóculo obtido foi reativado em RCM otimizado nos ensaios em batelada (Tabela 4.2), em pH inicial de 6,8. Após ser incubado a 37°C por 24 h, amostras do inóculo foram centrifugadas a 9.000 rpm por 5 minutos. A biomassa precipitada foi ressuspensa em vinhaça diluída e adicionada na alimentação dos reatores.

Além da cultura pura, lodo de estação de tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Céu Azul S/A, Sorocaba-SP) também foi utilizado como inóculo dos reatores RALF. O pH inicial do lodo foi ajustado para próximo de 5 e, em seguida, procedeu-se ao tratamento térmico (aquecido até 90°C por 10 minutos e resfriado em banho de gelo até sua temperatura atingir 25°C) (Iglesias et al., 2019). A concentração de metais observada no lodo foi de 174 mg L⁻¹ de ferro e 1,6 mg L⁻¹ de níquel (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Concentração de sólidos no lodo anaeróbio

Metais (mg L ⁻¹)	Lodo anaeróbio
Ferro	174
Níquel	1,6

O reator foi mantido em recirculação com o inóculo [cultura pura de *C. butyricum* (5% do volume da alimentação) + lodo (7% do volume da alimentação)] e vinhaça diluída ($\sim 1 \text{ g L}^{-1}$ de carboidrato) por 30 dias para permitir a formação de biofilme no material suporte dos reatores. A concentração de sólidos no inóculo está descrita na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Concentração de sólidos na alimentação do período operacional de inoculação dos RALFs alimentados com vinhaça

Biomassa Inicial (g L^{-1})	RALF NP	RALF controle
Sólidos Totais	12 ± 2	12 ± 2
Sólidos Totais Voláteis	7 ± 2	7 ± 2

4.7 Etapas do procedimento experimental

4.7.1 Reatores em batelada

4.7.1.1 Etapa 1: Ensaio preliminar em Reatores em Batelada

Ensaio preliminar foi realizado para avaliar a influência das NPs na produção de H_2 (Tabela 4.6), em meio RCM, cuja composição está descrita na Tabela 4.1.

Tabela 4.6: Ensaio preliminar para avaliar a influência de nanopartículas na produção de hidrogênio em RCM

	Ensaio preliminar	Controle
NPs de Fe^0 (mg L^{-1})	10	-
NPs de Ni^0 (mg L^{-1})	10	-

4.7.1.2 Etapa 2: Avaliação da composição do RCM

Percebeu-se que apesar de adequado para otimizar a produção de H_2 , a composição do RCM era muito dispendiosa e economicamente inviável em termos de aplicação biotecnológica. Para tanto, realizou-se ensaios para otimizar sua composição original (Tabela 4.7). O RCM possui 8 ingredientes em sua composição, cujas concentrações originais foram utilizadas como máximo (+1) em um ensaio de Plackett Burman (PB). A concentração mínima dos ingredientes foi nula, para que fosse possível excluí-los da composição, caso o resultado de seu efeito fosse negativo. Além da concentração dos compostos, foram variadas também a concentração de NPs de Ferro e Níquel ($0\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$), sendo assim necessária a realização de um PB16 (para que o número mínimo de 4 graus de liberdade fosse satisfeito).

Tabela 4.7: Matriz de variáveis do PB16 para otimização do RCM

Variáveis (g L ⁻¹)	-1	0	+1
Extrato de carne	0	5*	10
Peptona	0	5*	10
Glicose	0	2,5	5
Extrato de levedura	0	1,5*	3
Amido	0	0,5	1*
Cloreto de sódio	0*	2,5	5
Acetato de sódio	0*	1,5	3
L-cisteína	0*	0,25	0,5
NPs de Fe ⁰	0	0,05	0,1
NPs de Ni ⁰	0	0,05	0,1

*concentração escolhida para cada componente do meio após este ensaio, para ser utilizada na etapa 3.

4.7.1.3 Etapa 3: Avaliação da concentração de glicose

A concentração de glicose para obter o máximo rendimento da produção de H₂ foi obtida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) nas condições descritas na Tabela 4.8 em ensaios em reatores em batelada. A concentração de 5 g L⁻¹ foi então a escolhida para realizar os ensaios de otimização da concentração de NPs (Etapa 4).

Tabela 4.8: Matriz de variáveis do DCCR de glicose em RCM otimizado

Variável (g L ⁻¹)	-1	0	+1
Glicose	2	5*	8

*concentração de glicose escolhida para realizar o DCCR de nanopartículas

4.7.1.4 Etapa 4: Otimização da concentração de nanopartículas

Os ensaios a fim de otimizar a concentração de NPs começaram com um Delineamento Composto Central (DCC), utilizando faixa ampla de concentração (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Matriz de variáveis do DCC com ampla faixa de concentração de nanopartículas em RCM otimizado

Variáveis (mg L ⁻¹)	-1	0	+1
NPs de Fe ⁰	10	180	350
NPs de Ni ⁰	10	180	350

Em seguida, a partir dos resultados do DCC anterior, outro DCCR com faixa de NPs mais adequada para o processo foi realizado (Tabela 4.10).

Tabela 4.10: Matriz de variáveis do DCCR com faixa adequada da concentração de nanopartículas em RCM otimizado

Variáveis (mg L ⁻¹)	-1	0	+1
NPs de Fe ⁰	10	30	50
NPs de Ni ⁰	10	30	50

Além disso, realizou-se um ensaio para validação da concentração ótima de NPs para máxima produção de H₂ obtida a partir do modelo matemático no DCCR (Tabela 4.11), durante o qual também obteve-se amostras para análise de q-PCR e MEV.

Tabela 4.11: Validação experimental do modelo de concentração de nanopartículas para produção otimizada de hidrogênio

	Batelada com NPs	Controle
NPs de Fe ⁰ (mg L ⁻¹)	30	-
NPs de Ni ⁰ (mg L ⁻¹)	20	-

4.7.2 Reatores contínuos alimentados com glicose

Os RALFs alimentados com substrato sintético (mesma alimentação era preparada e dividida entre os dois reatores) foram submetidos a duas etapas de operação (Tabela 4.12). Os reatores foram alimentados com RCM otimizado (Tabela 4.2) por 90 dias (Etapa I). No entanto, durante o preparo da alimentação, percebeu-se que este meio era muito dispendioso e resolveu-se testar a operação simplificando a alimentação, a qual passou a ter apenas glicose e extrato de levedura na alimentação, na mesma concentração utilizada na Etapa I, por 30 dias (Etapa II).

Tabela 4.12: Etapas de operação do RALF alimentado com substrato sintético

Etapa	Composição afluyente	TDH (h)	Duração (dias)
I	RCM otimizado	3,1 ± 0,5	90
II	Glicose + Extrato de levedura	3,1 ± 0,6	30

4.7.3 Reatores contínuos alimentados com vinhaça

A operação dos RALFs foi dividida em três etapas de acordo com a concentração afluyente de carboidratos, controlada a partir do fator de diluição da vinhaça bruta: Etapa I (2 ± 1 g L⁻¹), Etapa II (4 ± 0 g L⁻¹) e Etapa III (7 ± 1 g L⁻¹) (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Etapas de operação do RALF alimentado com vinhaça

Etapa	Carboidratos Afluente (g L ⁻¹)	TDH (h)	Duração (dias)
I	2 ± 1	2,8 ± 0,5	90
II	4 ± 0	3,2 ± 0,0	60
III	7 ± 1	3,2 ± 0,1	60

4.8 Análises de monitoramento

A determinação de carboidratos foi realizada por meio do método colorimétrico proposto por Dubois et al. (1956). As análises de pH, alcalinidade, sólidos suspensos, e medição indireta da concentração de matéria orgânica (Demanda Química de Oxigênio – DQO) foram realizadas segundo métodos descritos por (APHA, 2012). A determinação de ácidos orgânicos voláteis (AOV) foi realizada por cromatografia gasosa (Adorno et al., 2014). O volume de biogás produzido foi quantificado por meio de medidor, no topo do reator, o qual utiliza o princípio do Arduíno (Yang et al., 2019). A composição dos gases resultantes da fermentação foram determinados por cromatografia gasosa usando um GC 2010 Shimadzu de acordo com Rabelo et al. (2018). Para modelar a produção acumulada de H₂ ao longo do tempo e obter parâmetros que serviriam de resposta na análise estatística, utilizou-se a equação de Gompertz (Equação 4.3):

$$Y = A * \exp\left(-\exp\left(\left(xc * \frac{2,7183}{A}\right) * (k - x) + 1\right)\right)$$

(Equação 4.3)

Sendo:

Y = produção acumulada de H₂;

x = tempo (h);

A = produção máxima (mL);

xc = velocidade (mL h⁻¹);

k = fase inicial para produção de biogás (h).

Em relação as análises de metais, as amostras foram digeridas utilizando micro-ondas Berghof speedwave. Na preparação da cinasita para a análise de metais, 1 g foi mergulhado em solução contendo H₂SO₄ (99%) e HNO₃ (70%) na proporção 5:1. Na preparação de amostras líquidas para análise de metais, acrescentou-se 5 mL de solução de HNO₃ 3M em 10 mL de amostra. Tanto amostras de cinasita, quanto amostras líquidas, foram transferidas para

tubos de PFTE teflon e submetidas a 160°C por 15 minutos e 200°C por 25 minutos, sob pressão de 40 bar. A concentração de metais Ferro e Níquel foi então avaliada por espectroscopia de absorção atômica, seguindo a metodologia 3111B (APHA, 2012).

4.9 Caracterização da vinhaça

A coleta da vinhaça foi realizada na Usina São Martinho transferida para o Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e armazenada a -20°C. No preparo da alimentação, a vinhaça era apenas descongelada, diluída e homogeneizada (não era realizada sua esterilização). A caracterização da vinhaça foi realizada de acordo com as metodologias descritas na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Metodologia das análises de caracterização da vinhaça

Parâmetro	Referência
pH, sólidos, DQO, DBO, COT, cálcio, NTK, sulfato, fosfato e fósforo	(APHA, 2012)
Proteína	(Lowry et al., 1951)
Carboidratos	(Dubois et al., 1956)
Glicerol	(Valdez et al., 2012)
Fenol	(Buchanan e Nicell, 1997)
Ácido láctico	(Taylor, 1996)

4.10 Biologia molecular

4.10.1 Reação de polimerase em cadeia em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado nas amostras dos reatores em batelada, a fim de verificar a presença da enzima hidrogenase. As amostras para extração de ácidos nucleicos foram coletadas dos reatores em batelada dos experimentos de validação com NPs (30 mgFe⁰ L⁻¹ e 20 mgNi⁰ L⁻¹) e sem NPs (controle). As amostras foram coletadas no início do experimento (Inicial, t = 0), no estágio inicial de produção de H₂ (λ , t = 2,5h), duas amostras durante a fase exponencial de produção de H₂ (Exp., T = 8 e 12h), e na fase estacionária de produção de H₂ (Stat., t = 26h).

As reações foram conduzidas em microplacas MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction (Thermofisher) usando 7,5 µL do kit QuantiNova SYBR® Green PCR, 0,075 µL de Rox Reference Dye (Invitrogen™), 0,3 µL de cada primer 10 µM (direto e reverso), 2,0 µL de DNA ou cDNA template e 4,15 µL de UltraPure™ DNase / Água destilada sem RNase

(Invitrogen™). As placas foram seladas com MicroAmp™ Clear Adhesive Film (ThermoFisher). As amplificações foram realizadas em um 7500 Real-time PCR System® (Applied Biosystems™).

As condições de ciclagem começaram com uma etapa de pré-incubação a 95 ° C por 5 min, seguida por 40 ciclos a 95 ° C por 15 se 60 ° C por 30 s. No final dos ciclos, os produtos amplificados foram dissociados aumentando a temperatura de 65 para 95 ° C em incrementos de 0,5 ° C para avaliar a temperatura de fusão. Todas as amostras foram testadas em duplicata e, para cada execução de gene e qPCR, um controle sem modelo (NTC) foi incluído. Todos os resultados foram expressos em ciclo de quantificação (Cq).

4.10.1.1 Seleção dos iniciadores

As sequências de nucleotídeos do gene alvo *hydA* e os genes de referência (GyrA, Buk, Pfo e RecA) de *C. butyricum* foram desenhadas de acordo com as sequências de genes depositadas no GenBank, utilizando o programa computacional Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Os valores de eficiência de todos os ensaios qPCR foram calculados usando o software LinRegPCR. A estabilidade dos candidatos a genes de referência (Buk, Pfo, GyrA e RecA) foi analisada comparando os resultados obtidos por BestKeeper, RefFinder (<http://leontx.ie.es/RefFinder/>), Delta CT Algoritmos e Normfinder (Andersen et al., 2004; Pfaffl, 2001; Silver et al., 2006; Xie et al., 2012).

4.10.1.2 Quantificação absoluta de cópias de DNA de *hydA* (qPCR)

Amostras (2,0 mL) para quantificação de DNA foram coletadas com seringas diretamente dos reatores e imediatamente armazenadas a -20 ° C. A extração de DNA total foi realizada usando o PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen), de acordo com a recomendação do fabricante. Para a quantificação do DNA, uma curva padrão foi construída usando DNA sintético (fragmentos do gene GBlock®, IDT). Os valores Cq obtidos do qPCR foram usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear registrando o número de cópia do modelo (NC) e o valor Cq correspondente. A eficiência da reação qPCR (E) foi calculada de acordo com a Equação 4.4, usando a inclinação da linha derivada da curva padrão.

$$E = \left[10^{\left(\frac{1}{\text{slope}} \right)} \right] - 1$$

(Equação 4.4)

4.10.1.3 Quantificação relativa da expressão gênica do DNA

Amostras (0,5 mL) para quantificação de RNA foram coletadas com seringas diretamente dos reatores e imediatamente adicionadas em microtubos de 2,0 mL contendo 1,0 mL do reagente de bactérias RNA Protect (Qiagen®) e armazenadas a -20 ° C. A extração do RNA foi realizada por meio de uma etapa de lise bacteriana com Proteinase K e Lisozima seguida de purificação com RNeasy Mini Kit de acordo com o protocolo do fabricante (Qiagen®). A pureza e quantificação do RNA extraído foram estimadas por absorvância ultravioleta de 260nm e leituras de 260/280nm, respectivamente. A qualidade do RNA foi verificada por análise de RNA em eletroforese em gel de 1%. As amostras de RNA foram tratadas com a enzima DNase RNase-free (Promega®), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio do GoScript™ Reverse Transcription System (Promega®) e Random Primers, de acordo com o protocolo do fabricante.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada de acordo com o modelo matemático proposto por Pfaffl, (2001), baseado na eficiência da qPCR e no desvio de cross-point dos transcritos investigados (Equação 4.5). A quantificação foi normalizada com o gene de referência Pfo, e foi calibrada de acordo com as amostras iniciais (t = 0). Onde, E_{hyd} é a eficiência da reação qPCR com o gene hyd e E_{Pfo} é a eficiência da reação qPCR com o gene Pfo.

$$\text{Relative quantification} = \frac{(E_{hyd})^{\Delta Cq_{hyd}(\text{initial} - \text{sample})}}{(E_{Pfo})^{\Delta Cq_{Pfo}(\text{initial} - \text{sample})}}$$

(Equação 4.5)

4.10.2 Metagenoma

Amostras para análise metagenômica do biofilme formado na cinasita foram retiradas no final da operação do RALF-NP alimentado com glicose e ao final das etapas II e III de operação dos RALF-NP e – Controle alimentados com vinhaça (Figura 4.1). A extração de DNA foi realizada por meio de kit comercial de extração por membrana filtrante “Power Soil DNA Isolation Kit” da MO BIO®.

As sequências obtidas foram analisadas no programa fastqc para avaliação da qualidade do sequenciamento. Leituras de baixa qualidade (pontuação de Phred \leq 20) e

adaptadores foram filtrados pela ferramenta Trimmomatic. A ferramenta SqueezeMeta foi usada no modo "co-montagem" com a ferramenta MegaHit para montar os contigs com comprimento mínimo de 150pb e K-mers 21, 29, 39, 59, 79, 99 e 119. As leituras foram mapeadas em contigs usando o programa Bowtie2, e Bedtools foi usado para contagem e cobertura de leituras em contigs para fins estatísticos. Prodigal foi utilizado para prever os ORFs (*Open Read Frames*) de procariotos. A ferramenta de alinhamento Diamond foi usada para alinhar as leituras ao banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes*, (Kanehisa et al., 2016)) para anotação funcional. O banco de dados GenBank foi utilizado para anotação taxonômica usando o parâmetro LCA (*Lowest Common Ancestor*) (Benson et al., 2013). No ambiente R Statistical, um fluxo de trabalho completo foi desenvolvido para exploração de dados, usando especialmente o pacote phyloseq. As leituras de sequenciamento foram depositadas no Arquivo Europeu de Nucleotídeos sob o número de projeto PRJEB42427 e número de amostra ERS5547523, ERS5547524, ERS5547525, ERS5547526 e ERS5547527.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

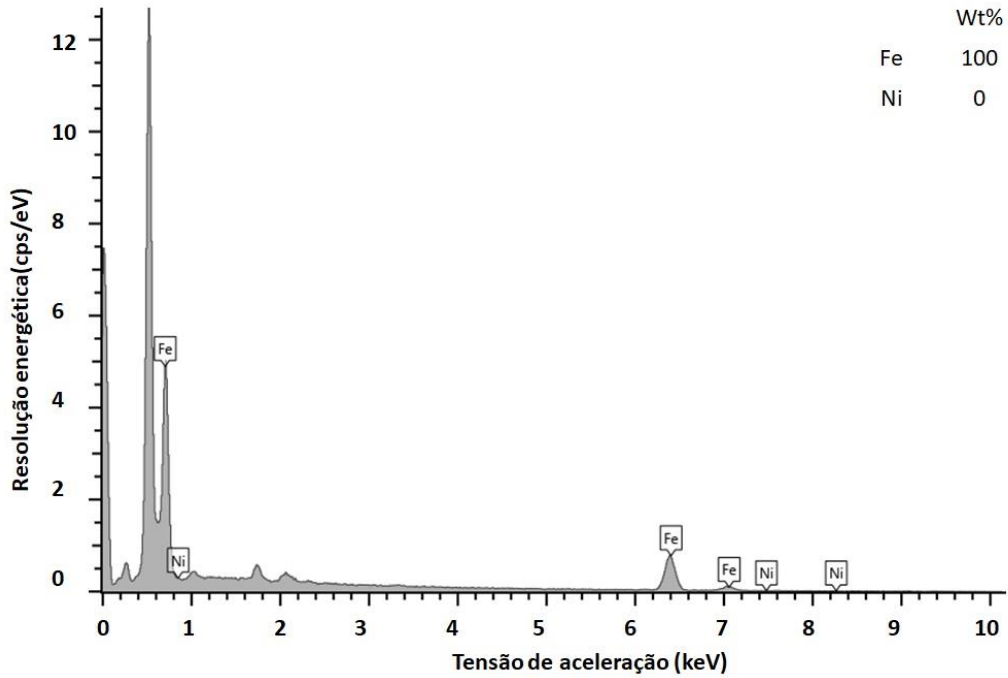
5.1 Fermentação da glicose na presença de nanopartículas metálicas em reatores em batelada

5.1.1 Caracterização das nanopartículas

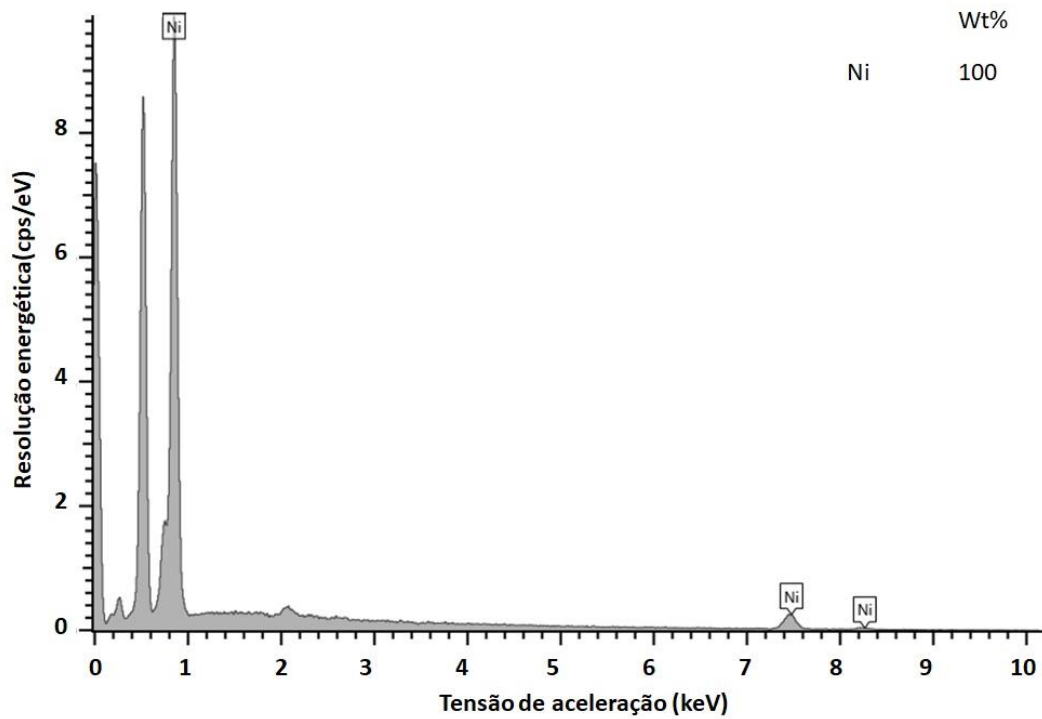
A caracterização das NPs de ferro e níquel foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). A partir dos resultados obtidos por meio de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi evidenciada a presença de átomos de Ferro e Níquel nas NPs (Figura 5.1). Nas imagens obtidas foi possível observar para as NPs de ferro formato arredondado e diâmetro médio de 60 nm, e aglomerados maiores (350 nm), enquanto para as NPs de níquel a organização ocorreu em planos, formando uma rede de partículas (Figura 5.2).

Sun et al. (2006) caracterizaram NPs de ferro e também observaram diâmetro médio de 60 nm e estruturas similares as que foram obtidas neste estudo (Figura 5.2). Nessa pesquisa foi usado o mesmo método de síntese de NPs realizado por Sun et al. (2006). Wu e Chen, (2003) caracterizaram NPs de níquel e observaram diâmetros (12 nm) bem menores em relação ao presente estudo (350 nm) e estrutura também diferente; ou seja, no formato pontiagudo e não em rede. Porém, no processo de síntese das NPs, os autores utilizaram a redução com hidrazina, enquanto neste estudo a redução foi realizada com borohidreto de potássio, devido principalmente ao menor custo de aquisição. É possível então afirmar que o método de síntese da NP pode influenciar na sua estrutura, e também na sua capacidade de fornecer os íons metálicos de forma mais eficiente ao meio (Couto, 2006).

Figura 5.1: Composição de nanopartículas de Ferro (A) e Níquel (B) por espectroscopia de energia dispersiva.



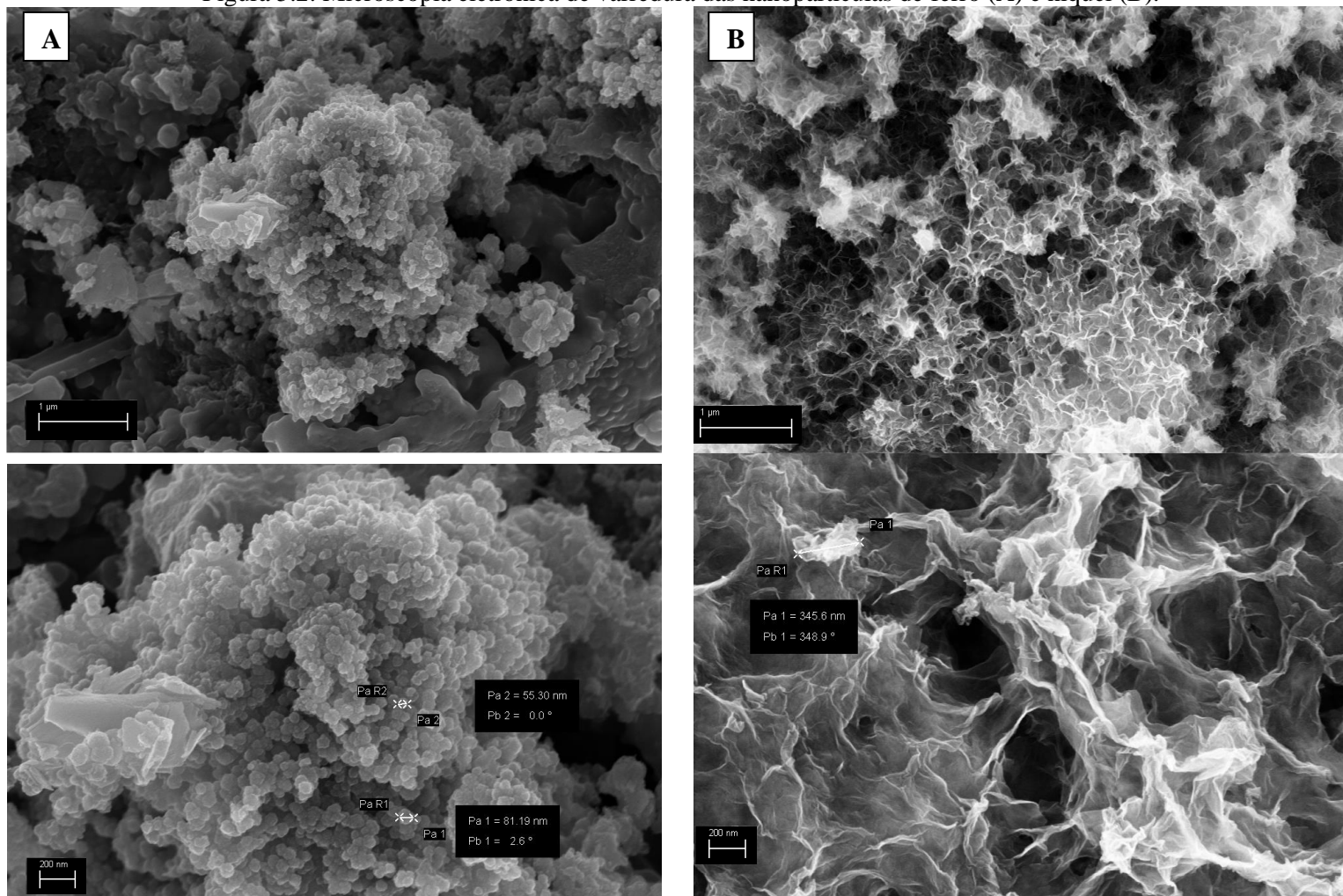
(A)



(B)

cps = contagem por segundo; eV = eletro volt; keV = quilo eletro volt; wt% = porcentagem em peso molecular.

Figura 5.2: Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de ferro (A) e níquel (B).



5.1.2 Etapa 1: Ensaio preliminar

A produção acumulada de H_2 foi avaliada em reatores com NPs e sem a adição de NPs (controle) (Figura 5.3). Observou-se aumento de 54% na produção máxima de H_2 , de 287 ± 7 mL (controle) para 392 ± 6 mL quando as NPs foram adicionadas aos reatores em batelada. A fase inicial de produção de H_2 (FIPH) foi ligeiramente menor na presença de NPs e durou $4,0 \pm 0,2$ h, enquanto em condição controle foi de $5,5 \pm 0,2$ h (Tabela 5.1).

Figura 5.3: Produção acumulada de hidrogênio no ensaio preliminar, seu ajuste ao modelo de Gompertz e desvio padrão da triplicata de ensaios

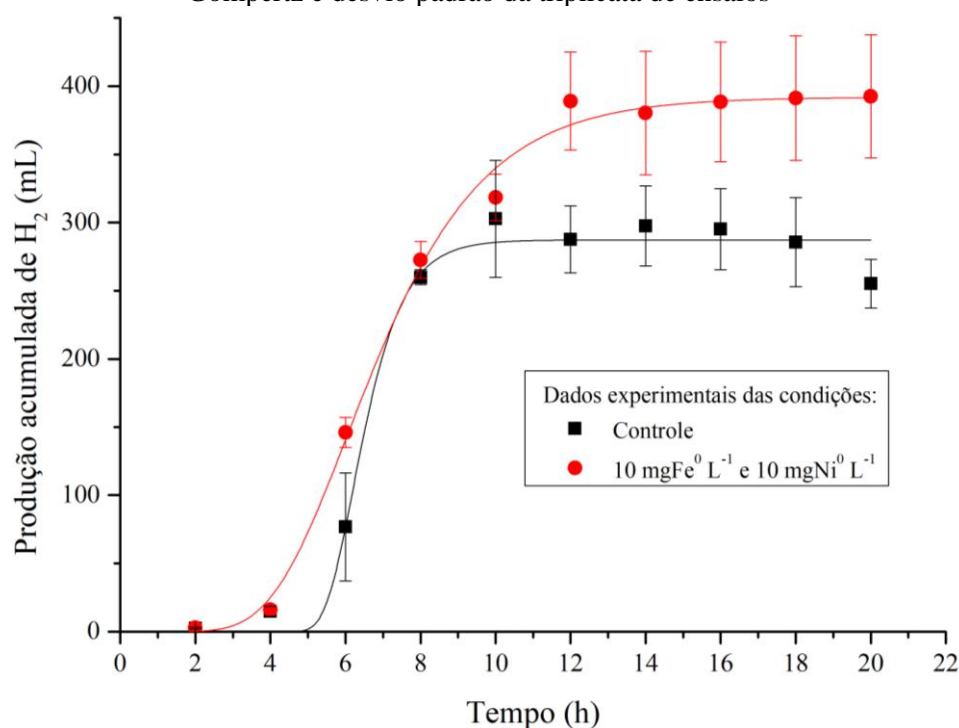


Tabela 5.1: Parâmetros do modelo de Gompertz ajustados aos dados de produção acumulada de hidrogênio no ensaio preliminar

Reator	Controle	NPs
Produção máxima (mL)	287±7	392±6
Velocidade de produção de H_2 (mL.h ⁻¹)	142±38	71±6
FIPH (h)	5,5±0,2	4,0±0,2
R ²	0,984	0,995
Rendimento (mLH ₂ gDQO ⁻¹)	59	81

FIPH = Fase Inicial de Produção de Hidrogênio.

AOV e carboidratos foram observados nos reatores controle e com NPs (Figura 5.4). Ácidos butírico, acético, isobutírico, fórmico e láctico foram observados em ambas as condições, cuja concentração total de AOV ao final dos experimentos, após 27 horas, foi de 5

g L^{-1} e 6 g L^{-1} no reator controle e com NPs, respectivamente. A única diferença significativa no processo acidogênico foi a maior concentração de ácido butírico no ensaio em que as NPs foram adicionadas (Figura 5.5).

Figura 5.4: Ácidos Orgânicos Voláteis e Carboidratos dos ensaios em reatores em batelada

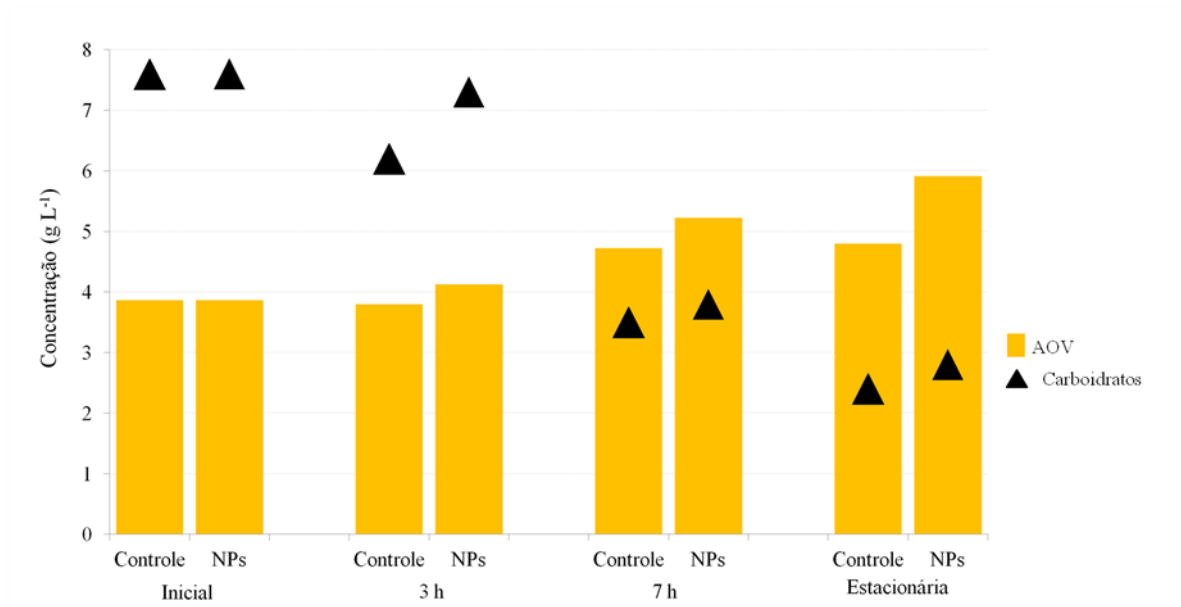
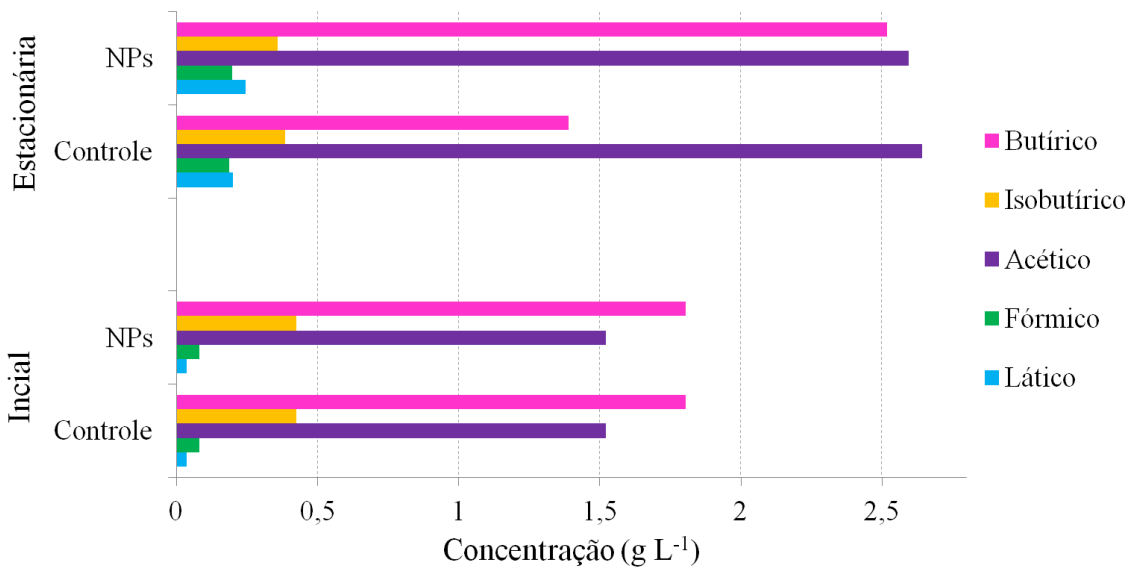


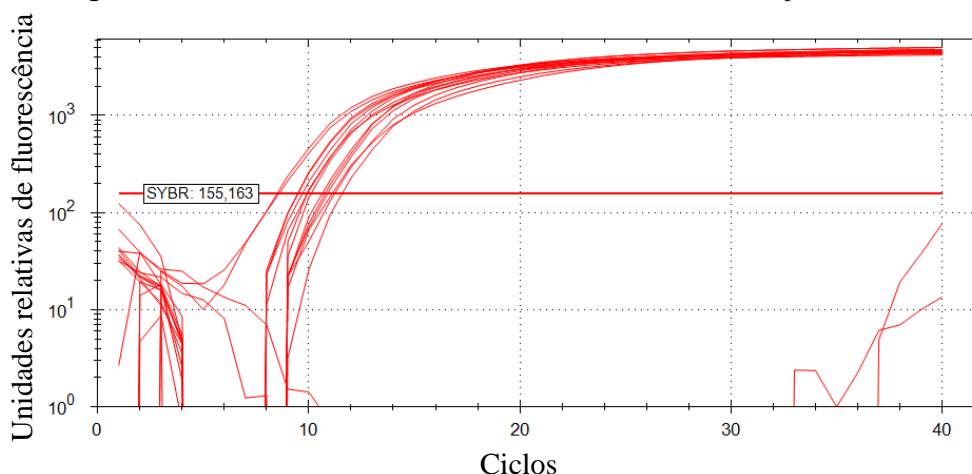
Figura 5.5: AOV no início e término do ensaio preliminar



A atividade da hidrogenase também foi avaliada durante o ensaio, por meio do q-PCR. Quanto menor o número de ciclos necessários para obter a curva Threshold (Figura 5.6), maior a quantidade de genes relacionados a enzima hidrogenase presentes na amostra. Sendo assim, ao comparar o ensaio com NPs em relação ao controle verificou-se que os genes da

hidrogenase estavam em maior quantidade apenas na fase exponencial de produção de H₂ (após 7h de ensaio). Ou seja, 10,7 ciclos foram necessários para obter a curva Threshold na amostra do reator com NPs, enquanto para a amostra controle foram necessários 11,4 ciclos (Tabela 5.2). Desta forma, a maior atividade da enzima hidrogenase na fase exponencial foi crucial para maior produção de H₂ no processo fermentativo, e é nesta fase que a presença de íons fornecidos pelas NPs foram diferenciais. Em todas as outras amostras do processo fermentativo, o número de ciclos necessário para obter a curva, ao comparar o reator controle com aquele com NPs foi estatisticamente o mesmo ($p>0,05$) (Tabela 5.2).

Calusinska et al. (2010) estudaram a diversidade de hidrogenases de *Clostridium* spp. e reportaram que estas enzimas compõem um grupo de diferentes estruturas, e que muito pouco se sabe sobre suas propriedades bioquímicas e fisiológicas. Este conhecimento seria essencial na área de bioengenharia metabólica, para auxiliar na otimização da produção de H₂. Wang e Wan, (2008), a partir de RT-PCR, estudaram a correlação entre a expressão do gene funcional *hydA* (que codifica a hidrogenase em *Clostridium butyricum*) com a bioprodução de H₂ em testes em batelada utilizando cultura pura. Os autores relataram que a produção específica de H₂ de *C. butyricum* foi linearmente proporcional ao nível de expressão do gene *hydA*. Neste estudo, maior concentração de hidrogenases na fase exponencial, também esteve associada a maior produção de H₂. A produção acumulada de H₂ foi de 392±6 mL e 287±7 mL de H₂ nos reatores com maior e menor concentração de hidrogenase, respectivamente (Tabela 5.1 e Tabela 5.2).

Figura 5.6: Curva *Threshold* dos ciclos de PCR nas amostras processadasTabela 5.2: Médias de ciclos necessária para obter a curva *Threshold* no q-PCR do ensaio preliminar

Tempo (h)	Controle	NPs
0	13,3	13,3
3	13,1	13,2
7	11,4	10,7
19	11,8	11,9

5.1.3 Etapa 2: Avaliação da composição do meio de cultura RCM

O meio de cultura utilizado como base foi o *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) com 8 compostos (Tabela 4.1), cujas concentrações avaliadas em um ensaio de Plackett Burman (PB), conforme as condições nutricionais fornecidas para cada reator refletissem em produção acumulada de H_2 (Tabela 5.3). A produção acumulada de H_2 temporal de cada condição está ilustrada na Figura 5.7. É possível observar que na condição 12 foi obtida a maior produção acumulada de H_2 (P), a qual foi de 267 ± 4 mL e resultou em rendimento (R_m) de 110 mL de H_2 g^{-1} de DQO. Para as condições 9 e 7 observou-se 245 ± 6 e 225 ± 8 mL de H_2 , para P e de 76 e 87 mL de H_2 g^{-1} de DQO para R_m , respectivamente. Estas 3 condições têm em comum na composição: 5 g L^{-1} de glicose e 1 g L^{-1} de amido, além de ter pelo menos duas das três possíveis fontes de outros substratos orgânicos (extrato de carne, extrato de levedura e peptona). Em relação as condições do ponto central (PC) 1, 2 e 3 obteve-se 155 ± 2 , 148 ± 3 e 120 ± 3 mL de H_2 para P , respectivamente, e R_m de 84, 80 e 65 mL de H_2 g^{-1} de DQO (Tabela 5.3).

A condição 3 (10 g L^{-1} de peptona, 10 g L^{-1} de extrato de carne e 1 g L^{-1} de amido) resultou na produção de H_2 similar ao PC3 (5 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de extrato de carne, 5 g L^{-1} de glicose, 1,5 g L^{-1} de extrato de levedura e 0,5 g L^{-1} de amido) de 119 ± 1 e 120 ± 3 mL de H_2 , respectivamente. No entanto, seu rendimento de 47 mL de H_2 g^{-1} de DQO foi bem

menor quando comparado ao ensaio nas condições centrais com R_m de 65 mL de H_2 g^{-1} de DQO (Tabela 5.3 e Figura 5.7). Desse modo, verificou-se a importância de considerar a quantidade e diversidade de substrato fornecida ao avaliar a eficiência de produção de H_2 do processo biológico. Ou seja, caso menor quantidade de substrato seja necessária para obter a mesma produção acumulada de H_2 , esta condição é considerada mais eficiente.

Em relação as condições nutricionais dos ensaios 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 e 13 observou-se produção acumulada de H_2 e rendimento inferiores a 100 mL e 55 mL de H_2 g^{-1} de DQO. Nos ensaios 1, 2, 8, 10 e 13 não foi adicionado glicose, o que explica a baixa produção de H_2 . Enquanto nos ensaios 4, 5 e 6 adicionou-se 5 g L^{-1} de glicose e pelo menos duas das três fontes adicionais de substrato (peptona, extrato de levedura ou extrato de carne). Todavia, amido não foi adicionado em nenhuma destas condições, por conseguinte observou-se valores inferiores de produção de H_2 evidenciando a influência de sua ausência no processo fermentativo de *C. butyricum*. Para as condições 11, 14, 15 e 16 não foi observado H_2 . Estes 4 ensaios tinham em comum a ausência de outros substratos (extrato de levedura, extrato de carne e peptona), evidenciando a importância da presença destes componentes para o processo fermentativo (Jiang et al., 2016) (Tabela 5.3 e Figura 5.7).

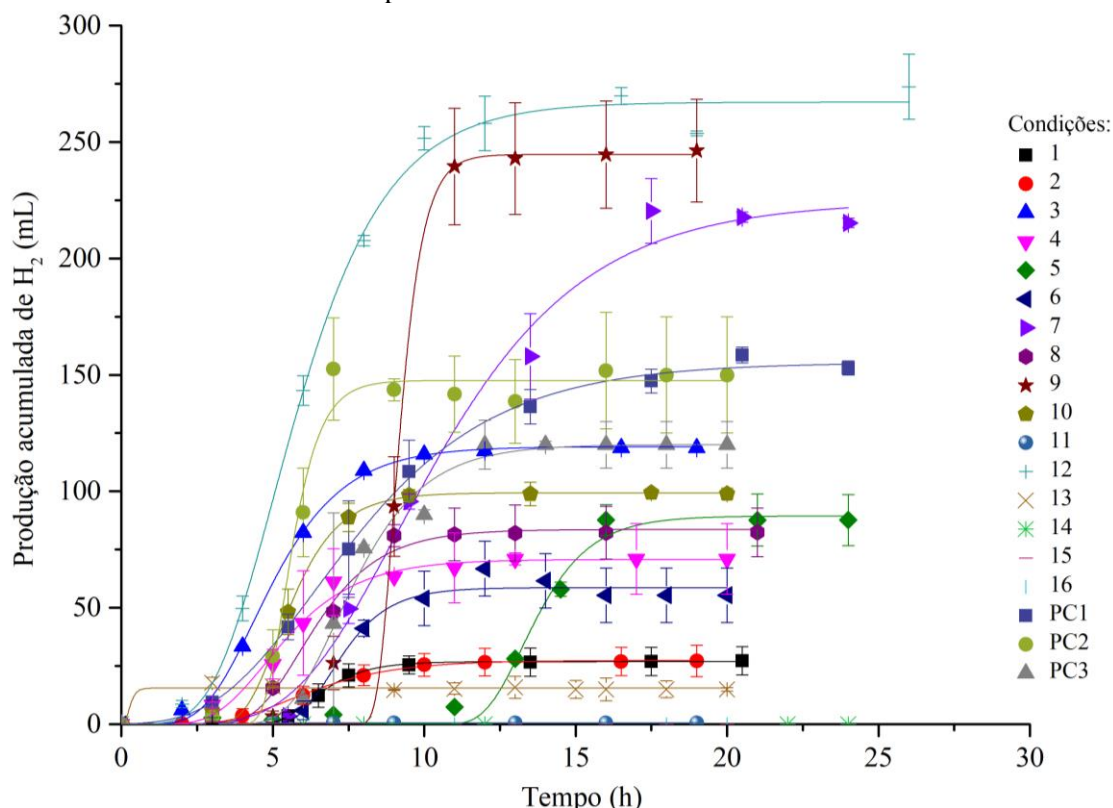
Tabela 5.3: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio ao variar componentes do RCM e parâmetros de Gompertz

Condição	Extrato de carne	Peptona	Cloreto de sódio	Glicose	Extrato de levedura	Acetato de sódio	Amido solúvel	L-cisteína	NPs Fe ⁰	NPs Ni ⁰	Produção máxima (mL)	Velocidade de produção de H ₂ (mL.h ⁻¹)	FIPH (h)	R ²	Rendimento (mL de H ₂ g ⁻¹ de DQO)
1	10	-	-	-	3	-	-	0,5	0,1	-	27 ± 0	10 ± 0	5 ± 1	0,999	17
2	10	10	-	-	-	3	-	-	0,1	0,1	28 ± 0	5 ± 0	3 ± 0	0,999	12
3	10	10	5	-	-	-	1	-	-	0,1	119 ± 1	27 ± 1	3 ± 0	0,998	47
4	10	10	5	5	-	-	-	0,5	-	-	71 ± 2	16 ± 2	3 ± 0	0,983	23
5	-	10	5	5	3	-	-	-	0,1	-	89 ± 3	27 ± 5	12 ± 0	0,985	36
6	10	-	5	5	3	3	-	-	-	0,1	59 ± 2	20 ± 4	6 ± 0	0,976	26
7	-	10	-	5	3	3	1	-	-	-	225 ± 8	24 ± 3	6 ± 0	0,991	87
8	10	-	5	-	3	3	1	0,5	-	-	84 ± 2	21 ± 3	4 ± 0	0,987	48
9	10	10	-	5	-	3	1	0,5	0,1	-	245 ± 6	171 ± 110	8 ± 0	0,992	76
10	-	10	5	0	3	-	1	0,5	0,1	0,1	99 ± 1	34 ± 5	4 ± 0	0,996	52
11	-	0	5	5	-	3	-	0,5	0,1	0,1	0 ± 0	0 ± 0	-*	0,950	0
12	10	0	-	5	3	0	1	0	0,1	0,1	267 ± 4	48 ± 3	3 ± 0	0,996	110
13	-	10	-	-	3	3	-	0,5	-	0,1	16 ± 0	0 ± 0	-*	0,956	9
14	-	-	5	-	-	3	1	0	0,1	-	0 ± 0	0 ± 0	-**	-**	0
15	-	-	-	5	-	-	1	0,5	0	0,1	0 ± 0	0 ± 0	-**	-**	0
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ± 0	0 ± 0	-**	-**	0
PC1	5	5	2,5	2,5	1,5	1,5	0,5	0,25	0,05	0,05	155 ± 2	17 ± 1	3 ± 0	0,998	84
PC2	5	5	2,5	2,5	1,5	1,5	0,5	0,25	0,05	0,05	148 ± 3	83 ± 14	5 ± 0	0,983	80
PC3	5	5	2,5	2,5	1,5	1,5	0,5	0,25	0,05	0,05	120 ± 3	28 ± 4	6 ± 0	0,987	65

*ensaio não ultrapassou a FIPH (Fase inicial para Produção de Hidrogênio); **não houve ajuste; (-) sem adição do composto químico ou NP; PC: Ponto

Central

Figura 5.7: Ensaio PB de otimização da produção de hidrogênio para diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM

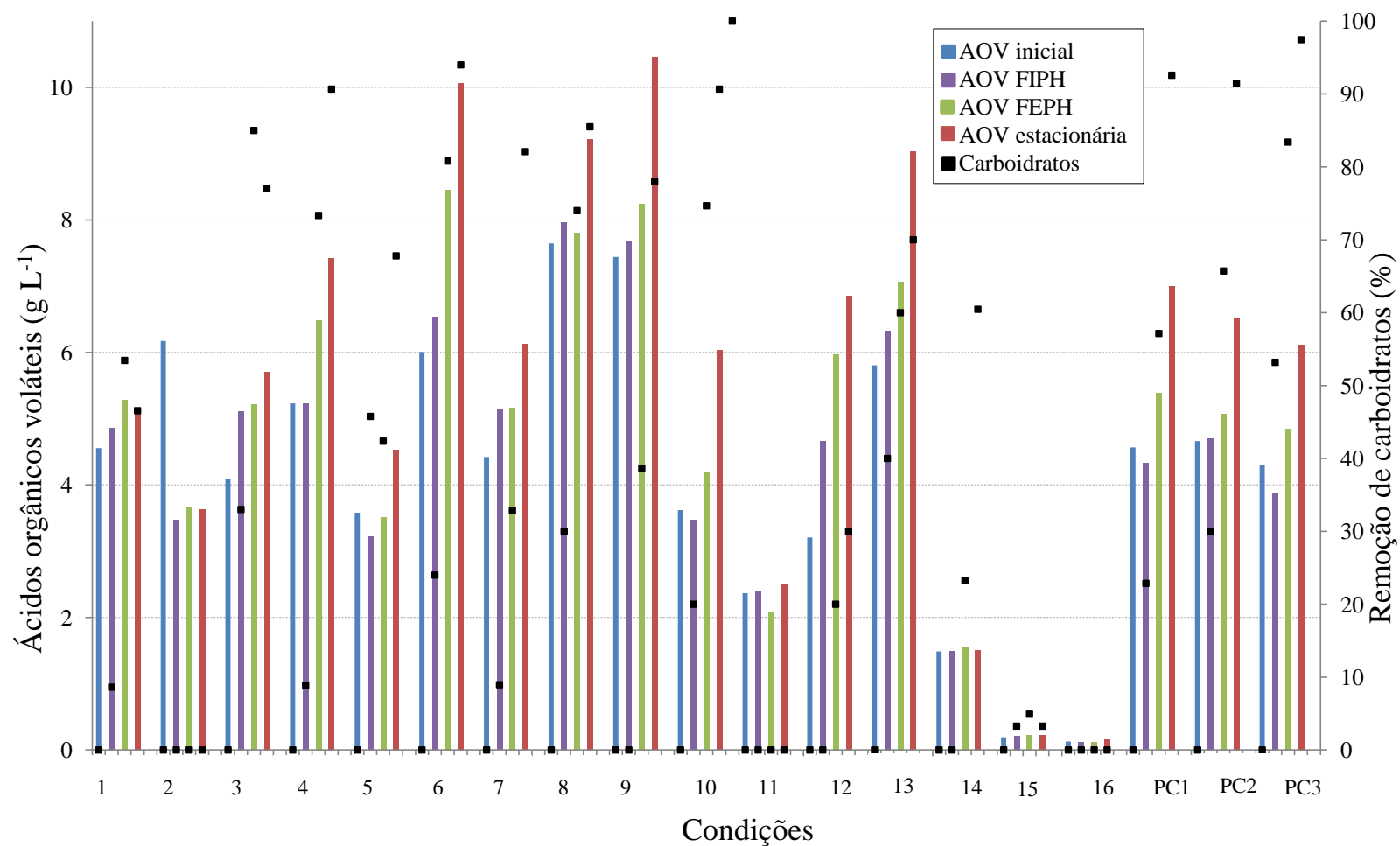


Na Figura 5.8 é possível observar a produção de AOV e a eficiência de remoção de carboidratos nos ensaios de otimização do RCM. A maior concentração final de AOV de 10, 9, 10 e 9 g L⁻¹ foi obtida nos ensaios 6, 8, 9 e 13, respectivamente. A produção acumulada de H₂ observada foi de 59 ± 2, 84 ± 2, 245 ± 6 e 16 ± 0 mL, respectivamente. Ou seja, nem sempre maior concentração de AOV está associada a maior produção de H₂; isso porque para avaliar esta relação é preciso analisar a concentração de ácidos orgânicos específicos, como acético, butírico e valérico e interpretar qual rota foi favorecida em função da condição nutricional. Em todos os outros ensaios (1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16, PC1, PC2, PC3), a concentração de AOV foi menor que 8 g L⁻¹.

Em relação a eficiência de conversão de carboidratos ao final dos ensaios foram observados valores acima de 90% nas condições 4, 6, 10, PC1, PC2 e PC3 com produção acumulada de H₂ de 71 ± 2, 59 ± 2, 99 ± 1, 155 ± 2, 148 ± 3 e 120 ± 3 mL, respectivamente. Todavia, conversão inferior a 10% foi observada nos ensaios 2 (sem glicose e amido), 11, 15 e 16 (sem extrato de levedura, extrato de carne e peptona) e com reduzida produção de H₂ de 28 ± 0, 0 ± 0, 0 ± 0 e 0 ± 0 mL, respectivamente. Nos últimos casos a determinação de H₂ foi inferior ao limite de detecção do método cromatográfico (≤LD). Desta forma, a conversão de

carboidratos esteve diretamente relacionada à composição do substrato e a produção de H_2 durante o processo fermentativo (Figura 5.7 e Figura 5.8).

Figura 5.8: AOV e remoção de carboidratos dos ensaios PB de otimização da produção de hidrogênio para diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM

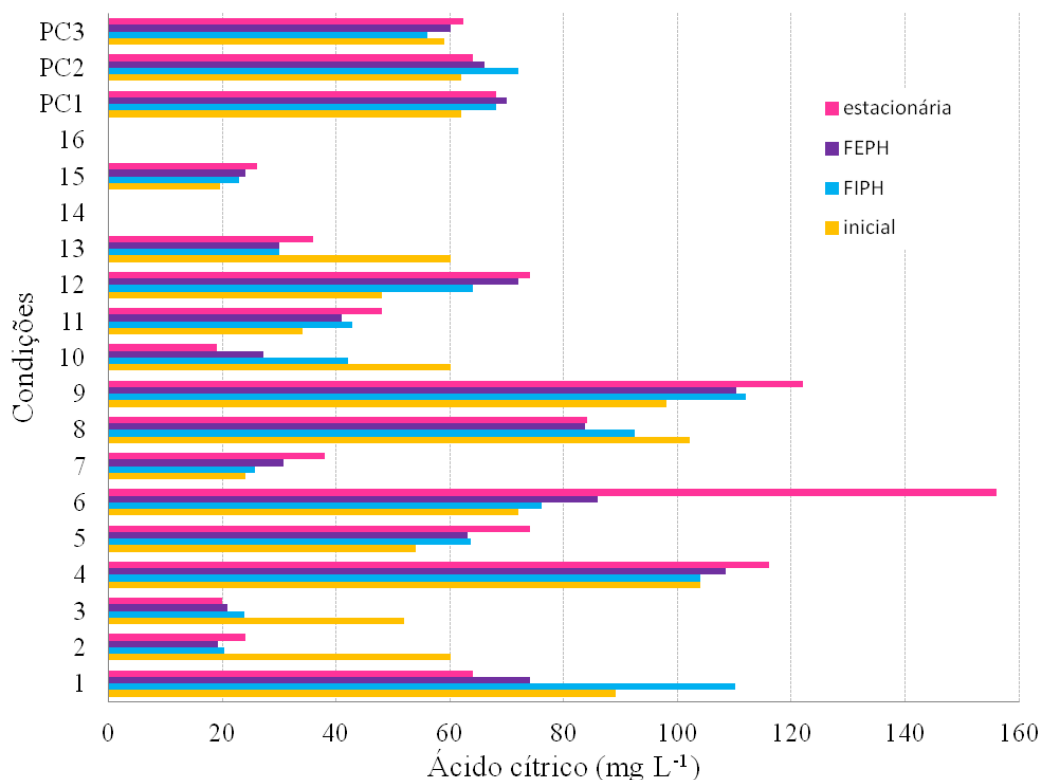


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio

Ao analisar a concentração de cada AOV (Figura 5.9 a Figura 5.14) foi possível observar maior concentração de ácido acético e ácido butírico, cujos valores em alguns ensaios foram acima de $3,5 \text{ g L}^{-1}$ ao final do processo. Todavia, para os ácidos, propiônico e isovalérico observou-se valores acima de $1,1 \text{ g L}^{-1}$. Em relação aos ácidos láctico, valérico, fórmico e cítrico observou-se valor máximo de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$, $0,35 \text{ g L}^{-1}$ e $0,12 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Estes ácidos observados estão relacionados com a rota de produção de H_2 por *Clostridium butyricum* (Figura 5.15). As proporções observadas nos ensaios PB no processo fermentativo foram similares aquelas reportadas por Cai et al. (2010) e Lin et al. (2012).

Em relação ao ácido cítrico verificou-se pouca variação em função das condições nutricionais de cada ensaio. Todavia, em relação a concentração inicial da condição 6 (10 g L^{-1} de extrato de carne, 5 g L^{-1} de glicose e 3 g L^{-1} de extrato de levedura) observou-se produção de 84 mg.L^{-1} de ácido cítrico. Nas condições 2, 3 e 13 foi observado consumo (em relação a concentração na amostra inicial) de 36, 32 e 24 mg L^{-1} , respectivamente (Figura 5.9). Em tais condições (2, 3 e 13) não foi feita adição de glicose ao meio reacional. A formação de ácido cítrico é uma das rotas possíveis da fermentação da glicose por *Clostridium butyricum* (Figura 5.15).

Figura 5.9: Ácido cítrico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM

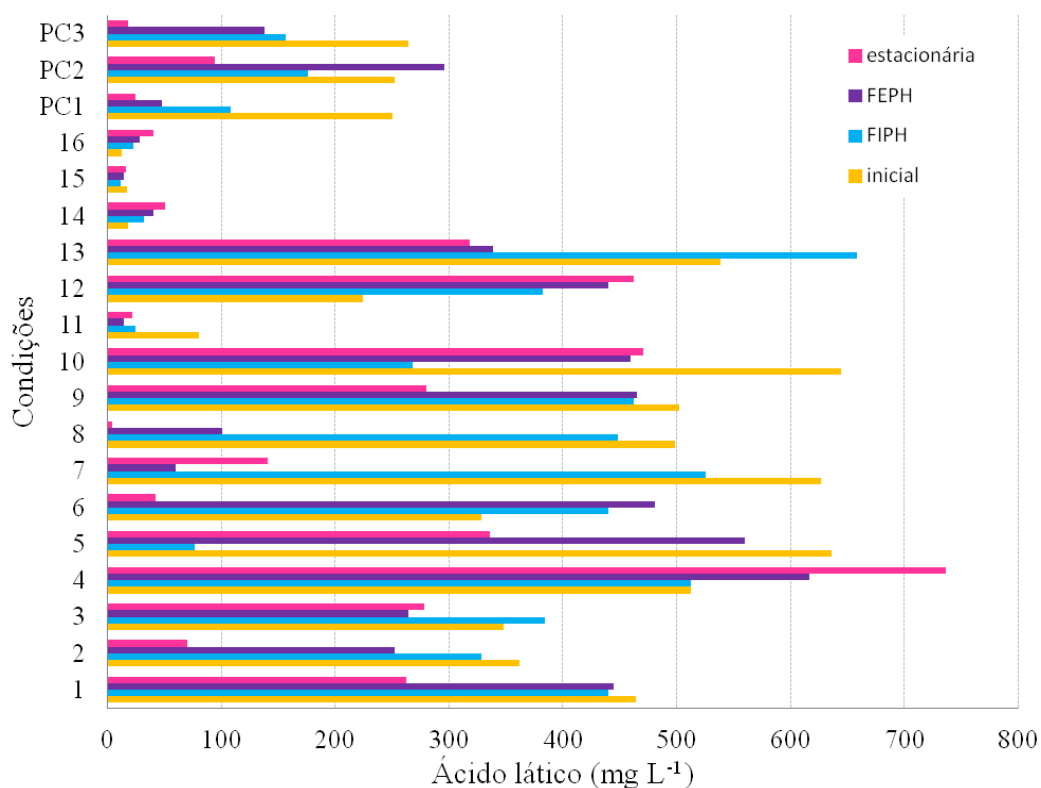


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

O consumo de ácido lático durante a fermentação é interessante pois indica que após sua formação (que não inclui a produção de H₂ em suas rotas) ele está sendo reutilizado e pode ser direcionado a rotas que produzem H₂. Gonzalez et al. (1995) reportaram que a enzima lactato desidrogenase (iLDH) é a responsável pela utilização deste ácido em pH < 5,5. Cai et al. (2013) reportaram o papel fundamental do ácido acético na utilização de ácido lático para pH > 5.5. Os autores estudaram o fluxo metabólico da degradação de glicose por *C. butyricum* e ao adicionarem fontes externas de ácido acético ao meio durante o processo fermentativo, reportaram o consumo completo de ácido lático concomitante a produção de ácido butírico e H₂. Neste estudo, a maior concentração de ácido lático na amostra final (736 mg.L⁻¹) e baixa concentração de ácido acético foi observada na condição 4 (10 g L⁻¹ de extrato de carne, 10 g L⁻¹ de peptona e 5 g L⁻¹ de glicose). Para as demais condições (1 a 3; 5 a 16 e PC1, PC2 e PC3) os valores finais de ácido lático foram de 3,46 a 470 mg.L⁻¹ (Figura 5.10). Em relação ao ácido acético observou-se valores menores (498-1.232 mg L⁻¹) na condição 4 e de 2.620 mg L⁻¹ e 3.688 mg L⁻¹ no início e final, respectivamente, da condição 9 (10 g L⁻¹ de extrato de carne; 10 g L⁻¹ de peptona; 5 g L⁻¹ de glicose e 1 g L⁻¹ de amido). Desta

forma, o amido é um substrato que, quando adicionado ao meio, favorece a rota de produção do ácido acético.

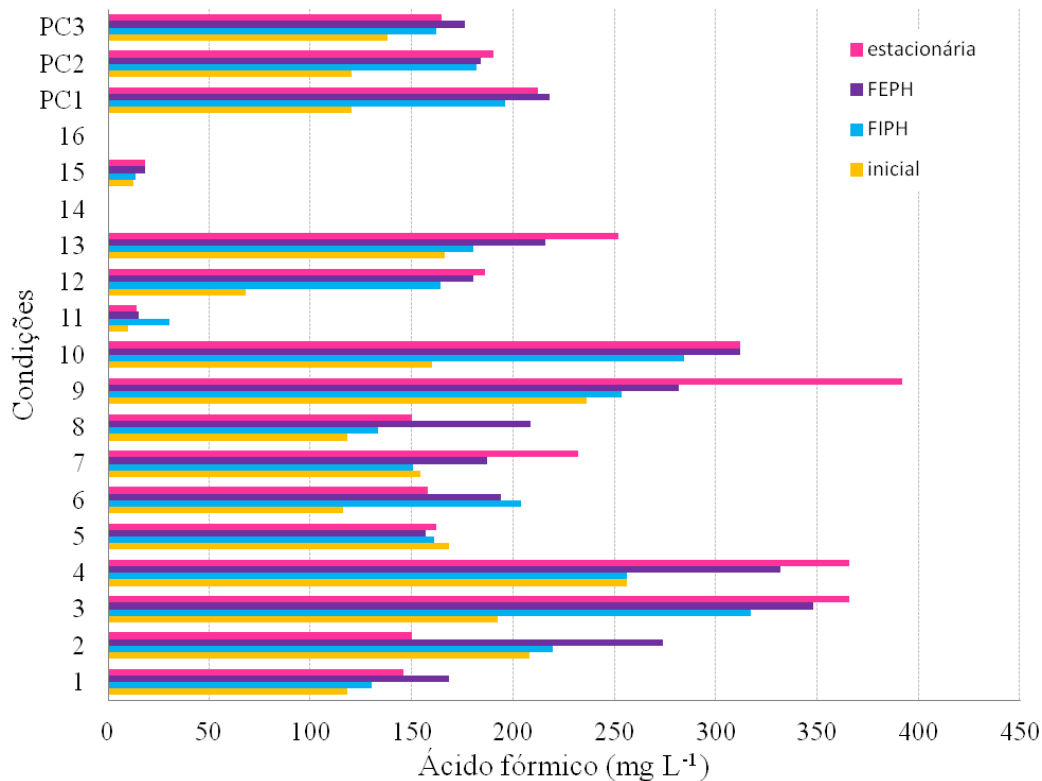
Figura 5.10: Ácido láctico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

Verificou-se pouca variação do ácido fórmico para a maioria dos ensaios, com a produção em relação a amostra inicial variando entre menor ou igual ao limite de detecção do método até 92 mg L⁻¹, com exceção das condições 3, 4, 9 e 10, cuja produção foi de 110 a 174 mg L⁻¹ em relação a amostra inicial, até na faixa de 312-392 mg L⁻¹ ao final do processo. Estas últimas condições tinham em comum, a adição de 10 g L⁻¹ de peptona ao meio, desta forma, a adição deste substrato na concentração máxima (+1) pode ter favorecido a rota de produção de ácido fórmico (Figura 5.11).

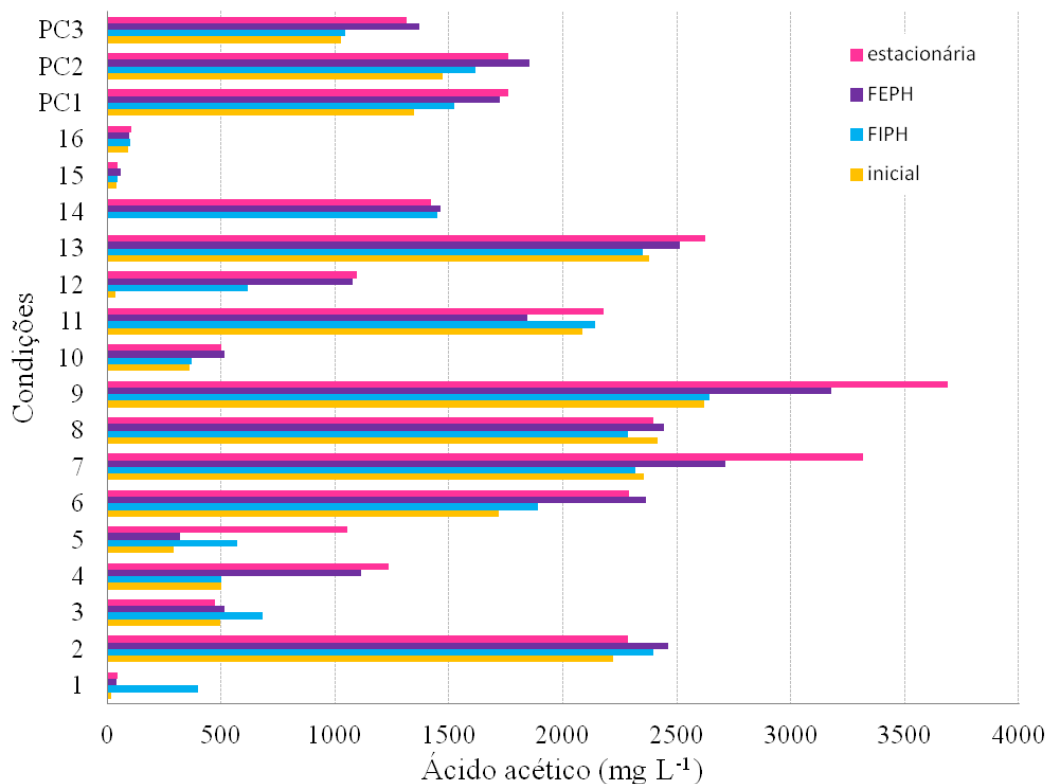
Figura 5.11: Ácido fórmico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

As maiores concentrações de ácido acético na amostra final foram 3.314 e 3.688 mg L⁻¹, nas condições 7 e 9, respectivamente (Figura 5.12). Estas foram também as condições nas quais obteve-se a segunda e terceira maior produção acumulada de hidrogênio (225 ± 8 e 245 ± 6 mL, respectivamente), dentre as 17 condições estudadas. Estas condições tinham em sua composição 10 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de glicose e 1 g L⁻¹ de amido solúvel. Desta forma, é possível inferir que, neste estudo, a elevada concentração de ácido acético nos ensaios do PB16 esteve relacionada com valores elevados de produção acumulada de H₂.

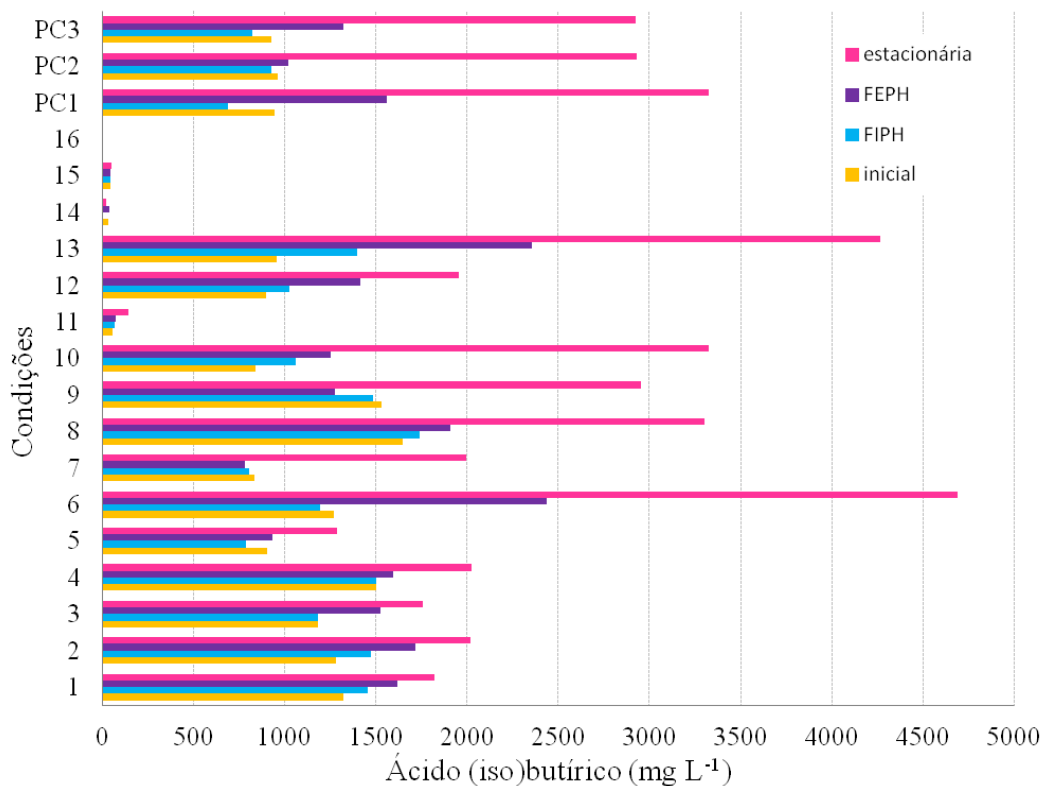
Figura 5.12: Ácido acético nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

As bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. tem a capacidade de simultânea conversão entre os ácidos butírico e isobutírico pela migração de grupamentos carboxil adjacentes (Wang et al., 1999). Desta forma, a concentração dos mesmos nas amostras foi somada e analisada em conjunto (Figura 5.13). Na amostra obtida da fase estacionária das condições 14, 15 e 16 a concentração de ácido butírico somada a de isobutírico foi de apenas 16, 50 mg L⁻¹ e inferior ao limite de detecção do método cromatográfico, respectivamente. Nestas condições a produção de H₂ foi nula e não foi adicionado extrato de carne, peptona e extrato de levedura ao meio. Portanto, evidenciou-se a importância destas fontes alternativas de substrato, para a produção de H₂.

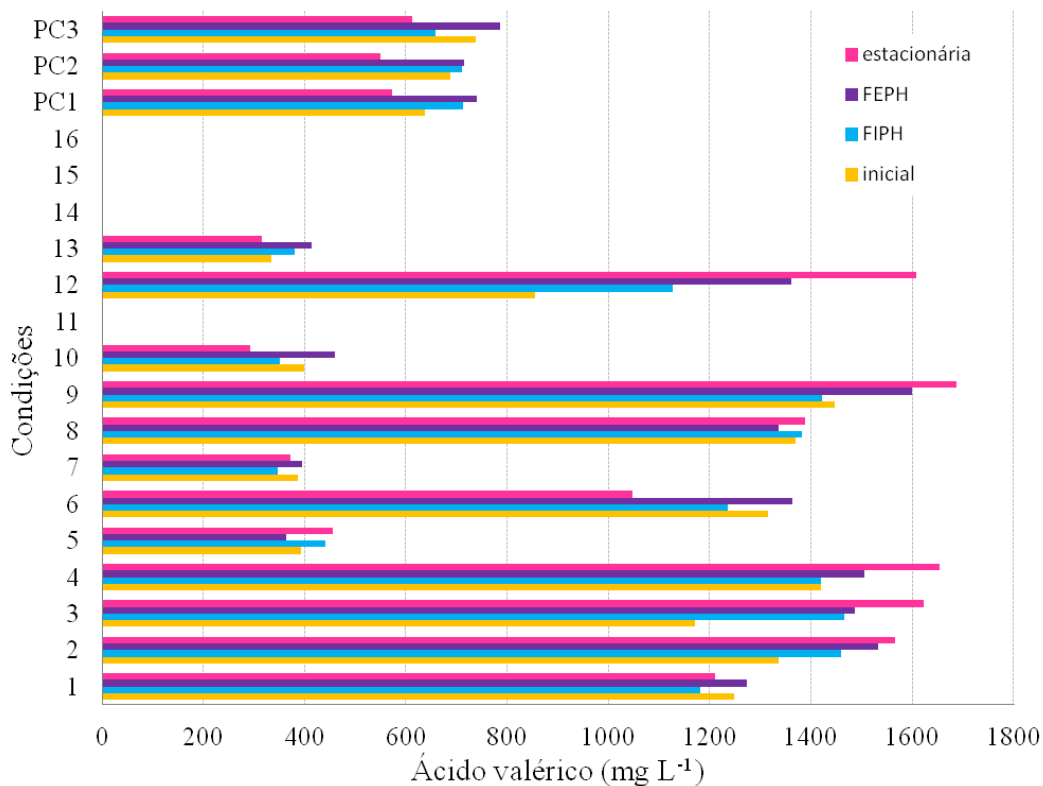
Figura 5.13 Ácido (iso)butírico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

Em exceção da condição 12 cuja produção foi de 752 mg L⁻¹ de ácido valérico, em todas as outras condições a produção deste ácido foi menor que 450 mg L⁻¹ (Figura 5.14). Dentre as 17 condições estudadas, verificou-se para a condição 12 a maior produção acumulada de H₂ (267 ± 4 mL de H₂). Desta forma, a produção deste ácido esteve relacionada a otimização da produção de H₂ no ensaios do PB 16. É importante ressaltar que, na condição 12, além de 10 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de glicose, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura e 1 g L⁻¹ de amido foram adicionadas também ao meio 100 mgFe⁰ L⁻¹ e 100 mgNi⁰ L⁻¹, os quais podem ter favorecido a rota metabólica de produção deste ácido (Figura 5.15). O ácido valérico é produzido no processo fermentativo por alongamento de cadeia a partir dos ácidos acético e propiônico (Spirito et al., 2014).

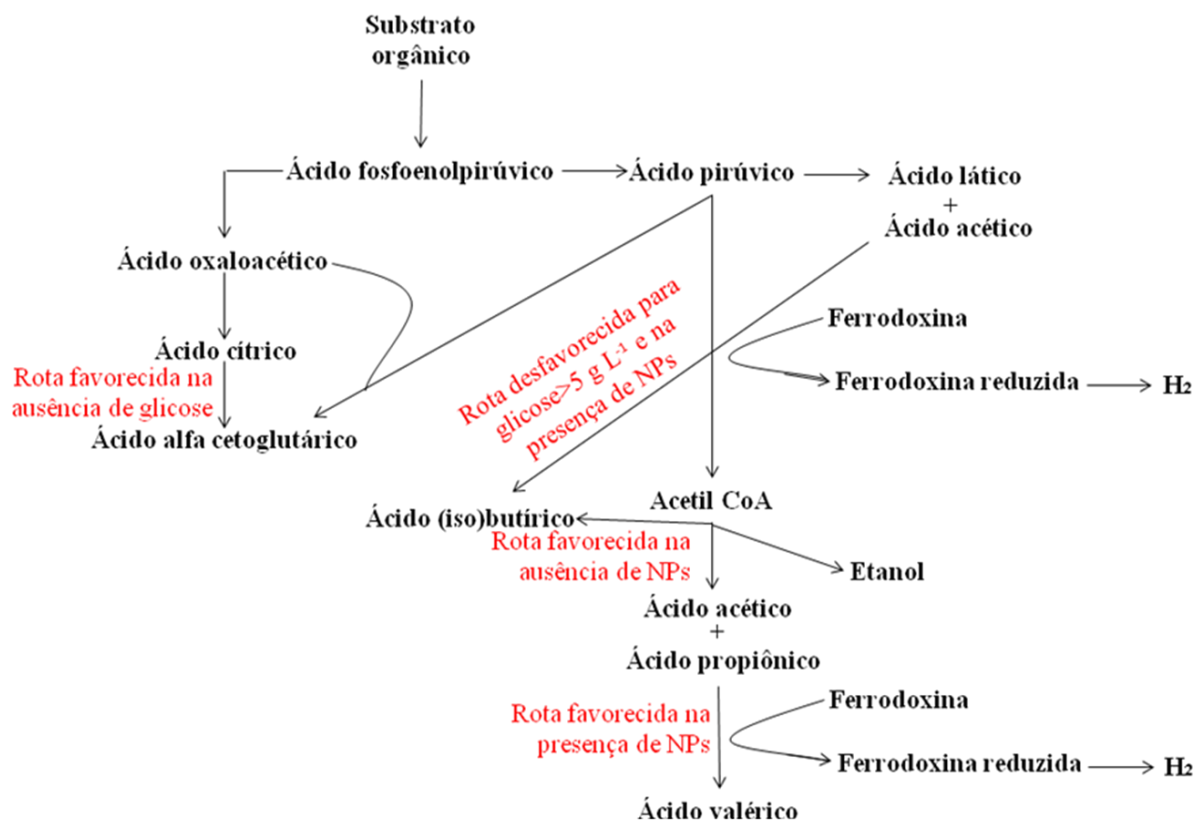
Figura 5.14 Ácido valérico nas condições de otimização da produção de hidrogênio para as diferentes condições dos componentes do meio de cultura RCM



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

Nas condições 7, 9 e 12 foram observadas as maiores produções máxima de H₂ de 225 ± 8, 245 ± 6 e 267 ± 4 mL, respectivamente. Todas estas condições tinham em sua composição 5 g L⁻¹ de glicose e 1 g L⁻¹ de amido, o que demonstra a importância destas fontes de substrato na produção otimizada de H₂. Cai et al. (2010) relataram a importância da relação entre a produção de ácido butírico e acético (B:A) na produção otimizada de H₂. Neste estudo, observou-se para a condição de maior produção acumulada de H₂ (ensaio 12), elevada relação ácido butírico/ácido acético (1,78), enquanto nas condições 7 e 9 esta relação foi 0,6 e 0,8, respectivamente.

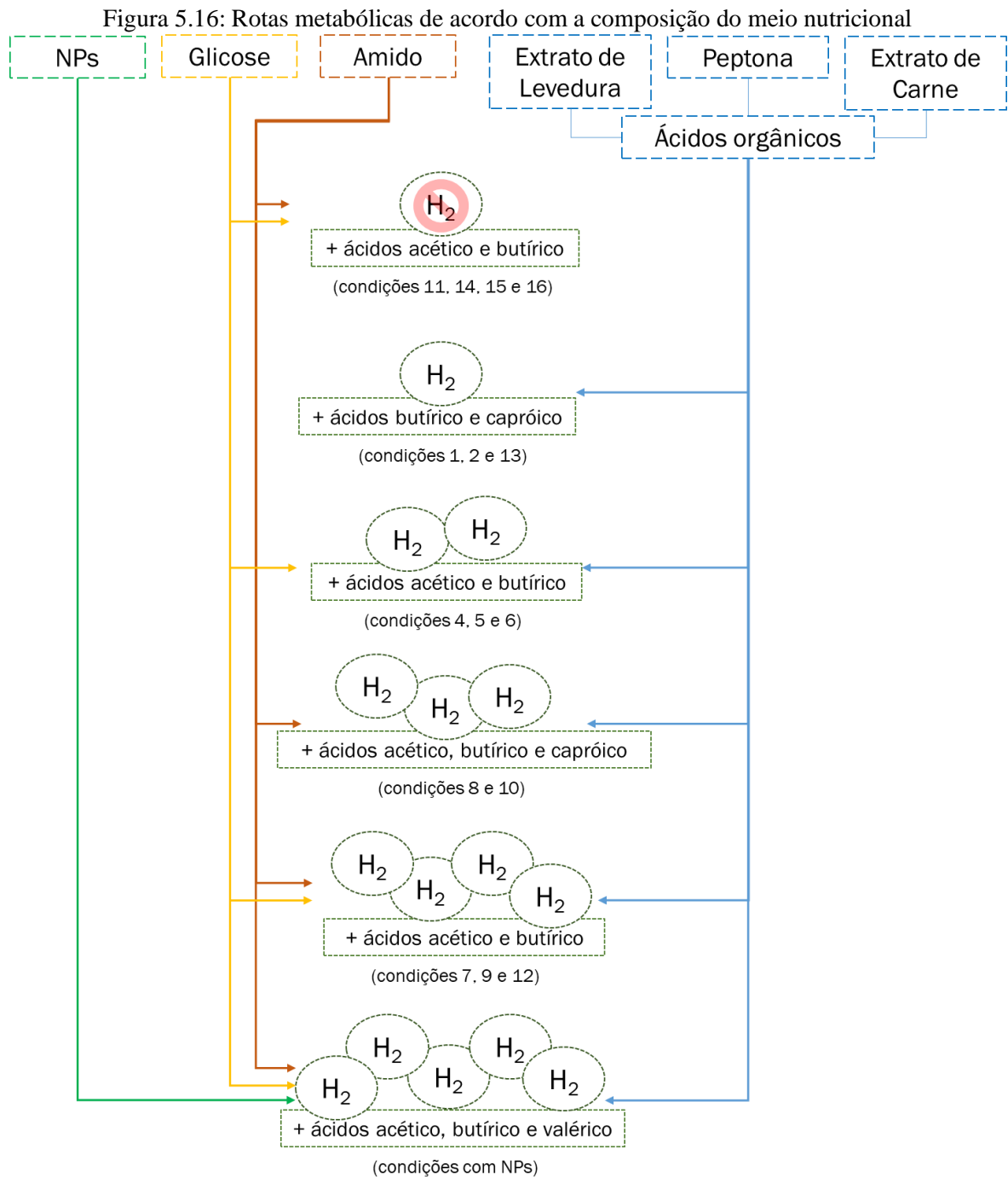
Figura 5.15: Rotas metabólicas de fermentação por *Clostridium butyricum* e a influência das condições estudadas nos produtos obtidos



Fonte: Cai et al. (2010); Cai et al. (2013); Spirito et al. (2014).

Em resumo, a composição do meio influenciou as rotas metabólicas, uma vez que a produção de ácidos variou de acordo com a presença de macro e micronutrientes. O meio composto apenas por fontes de carbono (glicose e/ou amido) resultou em ácidos acético e butírico como principais produtos e produção nula de H₂. Quando avaliado o meio constituído apenas por co-substratos (extrato de levedura e/ou extrato de carne e/ou peptona), observou-se baixa produção de H₂ e os ácidos capríico e butírico foram obtidos como principais produtos. O meio completo composto por todas as fontes e co-substratos de carbono (glicose, amido, extrato de levedura, extrato de carne e peptona) resultou em alta produção de H₂ e os ácidos acético e butírico como principais metabólitos. O meio completo com NPs [glicose (5 g L⁻¹); amido (1g L⁻¹); extrato de carne (5 g L⁻¹); peptona (5 g L⁻¹); extrato de levedura (1,5 g L⁻¹); NPs (30 mg Fe⁰ L⁻¹ e 20 mg Ni⁰ L⁻¹)] resultaram em uma produção ainda maior de H₂ e ácido valérico como produto principal. Assim, a composição do meio proposta neste estudo (fonte de carbono, amido, três fontes de nitrogênio e vitaminas e NPs) é uma nova proposta de

exigências nutricionais para cultivar *C. butyricum* e atingir a produção máxima de H_2 simultaneamente (Figura 5.16).

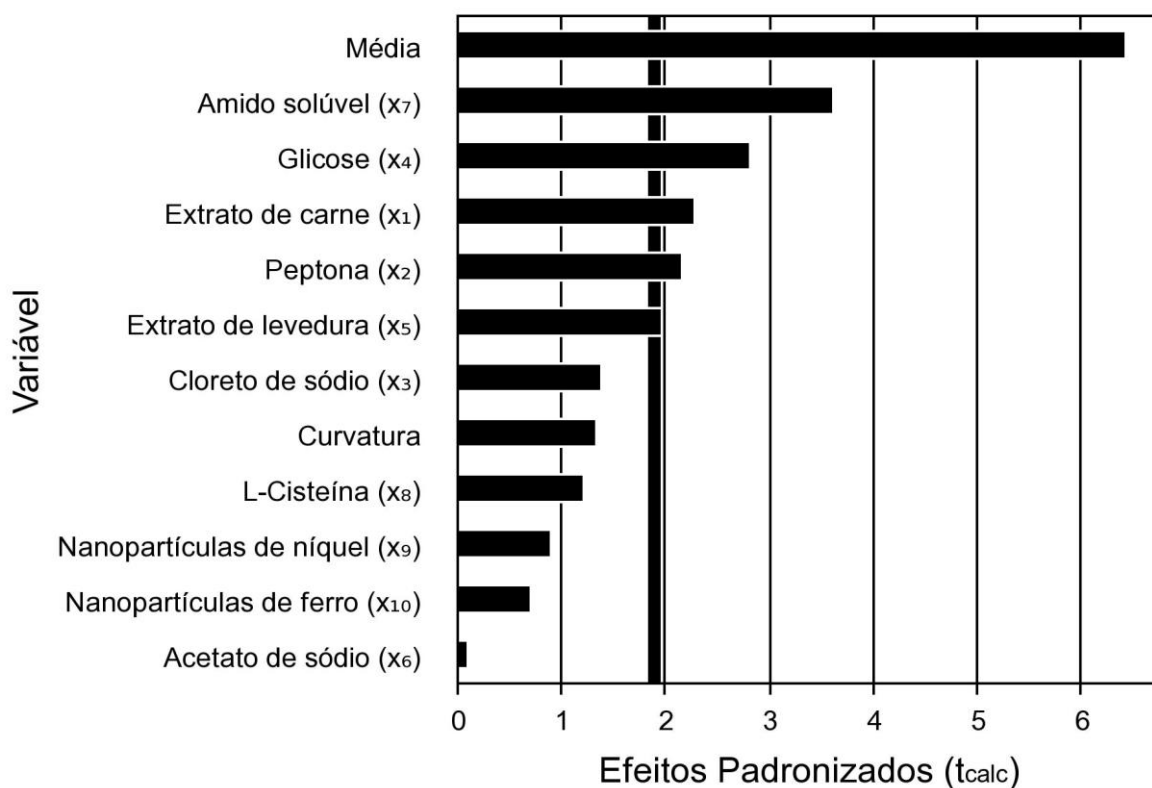


A partir da avaliação do gráfico de Pareto do PB16 (Figura 5.17) observou-se que a variação de diferentes substratos e de NPs em um mesmo ensaio não foi adequada para análise final. O substrato é essencial para o processo fermentativo, enquanto as NPs de ferro e

níquel são algo a mais para potencializar a produção de H_2 . Desse modo, no caso específico desses ensaios, a influência das NPs na produção de H_2 foi mascarada.

Para os ensaios seguintes é interessante retirar do meio os componentes que tiveram efeito negativo (cloreto de sódio, acetato de sódio e L-cisteína); fixar as fontes de nutrientes na concentração do ponto central (5 g L^{-1} de extrato de carne; 5 g L^{-1} de peptona e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura); fixar o substrato amido na concentração máxima (1 g L^{-1}) por ter sido o de maior influência. Além disso, fazer um ensaio para otimizar, inicialmente, apenas a concentração de glicose (principal fonte de substrato). Após essas possibilidades é fundamental realizar ensaio com diferentes concentrações de NPs com concentração de glicose otimizada. Tais possibilidades foram realizadas nas Etapas 3 e 4, cujos resultados estão descritos a seguir.

Figura 5.17: Gráfico de Pareto obtido no ensaio de otimização da produção de hidrogênio variando os componentes do meio de cultura RCM para nível de significância de 10% ($\alpha=0,1$).



Jiang et al. (2016) também realizaram ensaio PB para otimizar a produção de H_2 por *C. butyricum* em meio com glicose ($15-25 \text{ g L}^{-1}$) como substrato, extrato de levedura ($3,5-6,5 \text{ g L}^{-1}$) e triptona ($3-5 \text{ g L}^{-1}$), além de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) ($2-4 \text{ g L}^{-1}$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) ($2-4 \text{ g L}^{-1}$), L-Cisteína ($0,05-0,15 \text{ g L}^{-1}$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) ($0-0,1 \text{ g L}^{-1}$) e sulfato de ferro ($FeSO_4$) ($0,2-0,4 \text{ g L}^{-1}$). Os autores

obtiveram rendimento máximo da produção de H₂ de 174 mL de H₂ g⁻¹ de DQO em ensaio PB12. Além disso, retiraram os componentes L-cisteína e K₂HPO₄ do meio para a realização dos ensaios posteriores de otimização com biomassa de *Jatropha hulls*, por terem apresentado efeito negativo. Na etapa 2 deste estudo, o rendimento máximo da produção de H₂ foi de 110 mL de H₂ g⁻¹ de DQO. Os componentes L-cisteína, acetato de sódio e cloreto de sódio foram retirados do meio para realização dos ensaios posteriores por terem efeito negativo. Em ambos os estudos, a concentração de glicose teve influência significativa na produção de H₂.

5.1.4 Etapa 3: Avaliação da concentração de glicose

A partir dos ensaios em que a influência da variação da concentração de glicose de 1,43 a 8,57 g L⁻¹ na produção de H₂ foi avaliada, foi possível inferir que a duração da fase inicial de produção de H₂ (FIPH) foi similar (2 ± 0 a 4 ± 0 h) em todas as condições deste ensaio. As velocidades de produção de H₂ também foram similares e variaram de 42 ± 4 a 55 ± 5 mL h⁻¹, com exceção da condição em que 8,57 g L⁻¹ de glicose foi adicionada, cuja velocidade foi de 73 ± 4 mL h⁻¹. Além disso, as condições com menor concentração de glicose no meio de 1,43 g L⁻¹ e 2 g L⁻¹ foram as que menor produção máxima acumulada de H₂ foi observada, de 190 ± 2 e 244 ± 5 mL, respectivamente. No entanto, ligeira inibição por excesso de substrato também foi observada para 8,57 g L⁻¹ resultou em produção e rendimento de 312 ± 3 mL de H₂ e 115 mL de H₂ g⁻¹ de DQO, respectivamente. Enquanto, para as condições do ensaio com 8 g de glicose L⁻¹ foi observada produção acumulada e rendimento de 379 ± 9 mL de H₂ e 143 mL de H₂ g⁻¹ de DQO, respectivamente. A produção acumulada de H₂ nas condições do ponto central (5 g de glicose L⁻¹) foi de 317 ± 6 , 322 ± 4 , 315 ± 4 mL de H₂ (Figura 5.18 e Tabela 5.4).

Figura 5.18: Ensaios de variação da concentração inicial de glicose para otimização da produção acumulada de hidrogênio

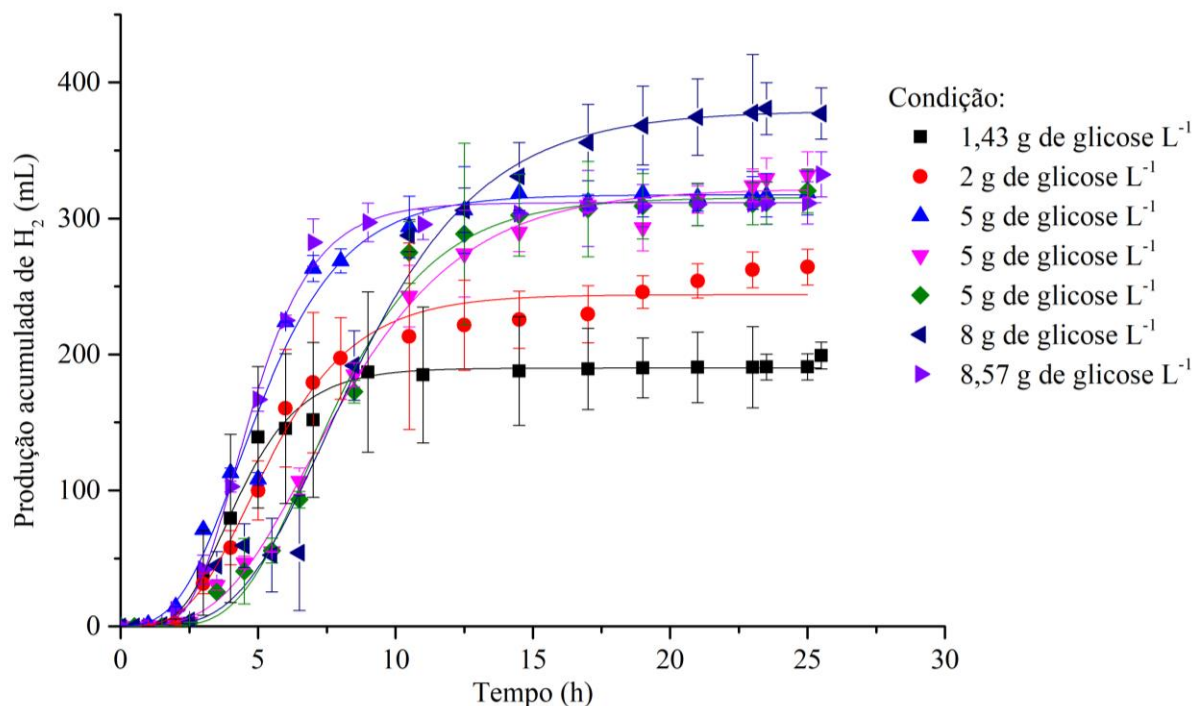


Tabela 5.4: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para diferentes concentrações de glicose e respectivos parâmetros de Gompertz

Concentração de glicose (g L ⁻¹)	Produção máxima (mL)	Velocidade de produção de H ₂ (mL h ⁻¹)	FIPH (h)	R ²	Rendimento (mL de H ₂ g ⁻¹ de DQO)
1,43	190 ± 2	45 ± 4	2 ± 0	0,990	107
2	244 ± 5	42 ± 4	2 ± 0	0,986	132
5	317 ± 6	55 ± 5	2 ± 0	0,983	141
5	322 ± 4	38 ± 2	4 ± 0	0,995	143
5	315 ± 4	46 ± 3	4 ± 0	0,994	140
8	379 ± 9	44 ± 4	4 ± 0	0,988	143
8,57	312 ± 3	73 ± 4	3 ± 0	0,995	115

FIPH = Fase inicial de produção de hidrogênio.

Os parâmetros de Gompertz da Tabela 5.4 foram organizados em software estatístico (Protimiza) e levaram a obtenção de uma regressão que resultou na equação 5.1:

$$Y = 323 + 58x - 38x^2 \text{ (Equação 5.1)}$$

Sendo,

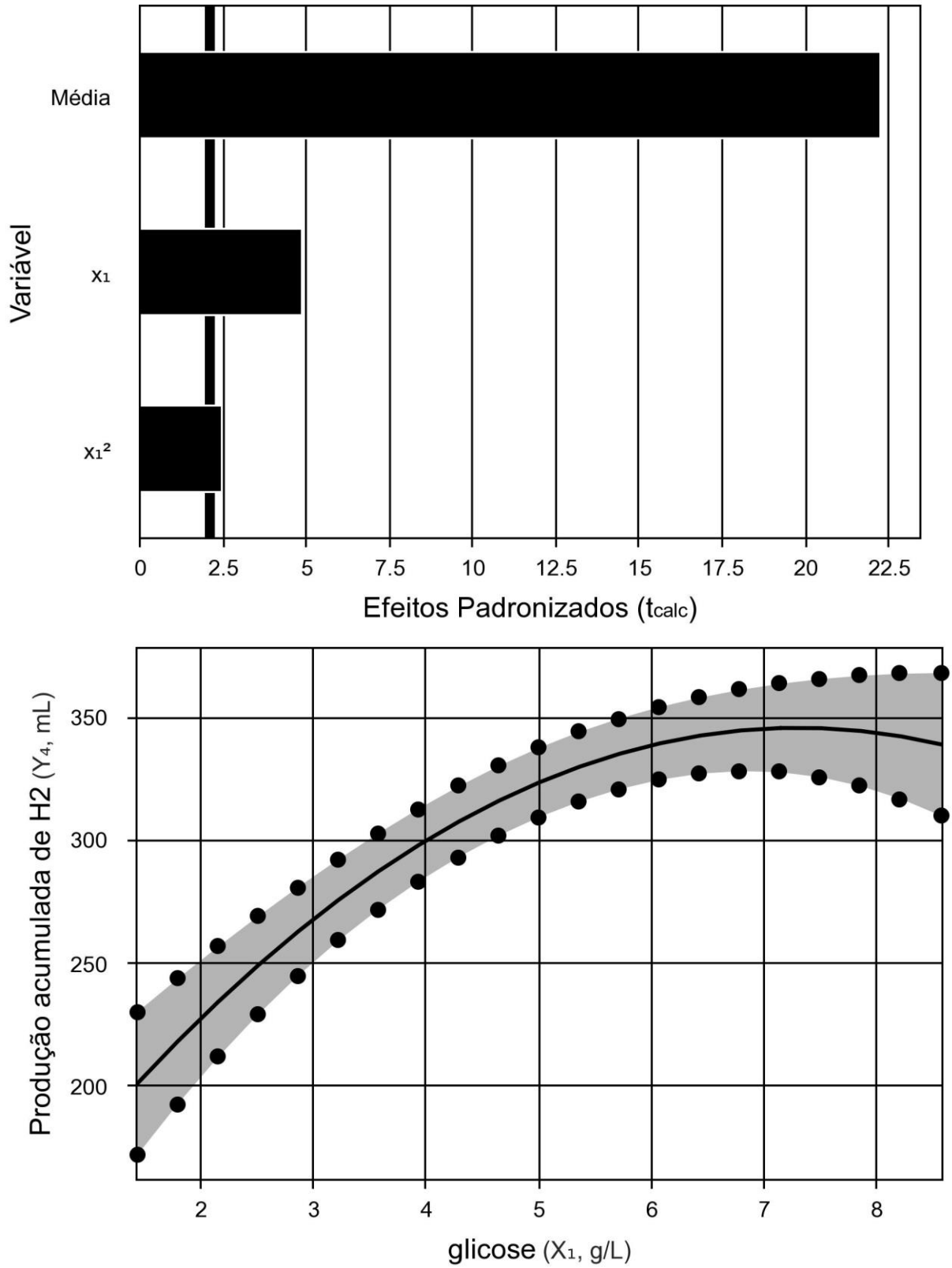
Y = produção acumulada de H₂ (mL);

x = concentração de glicose (g L⁻¹).

É importante ressaltar que o nível de significância de 10% ($\alpha=0,1$) é o indicado para ensaios biológicos. As premissas para construção do ANOVA foram atendidas, com R² =

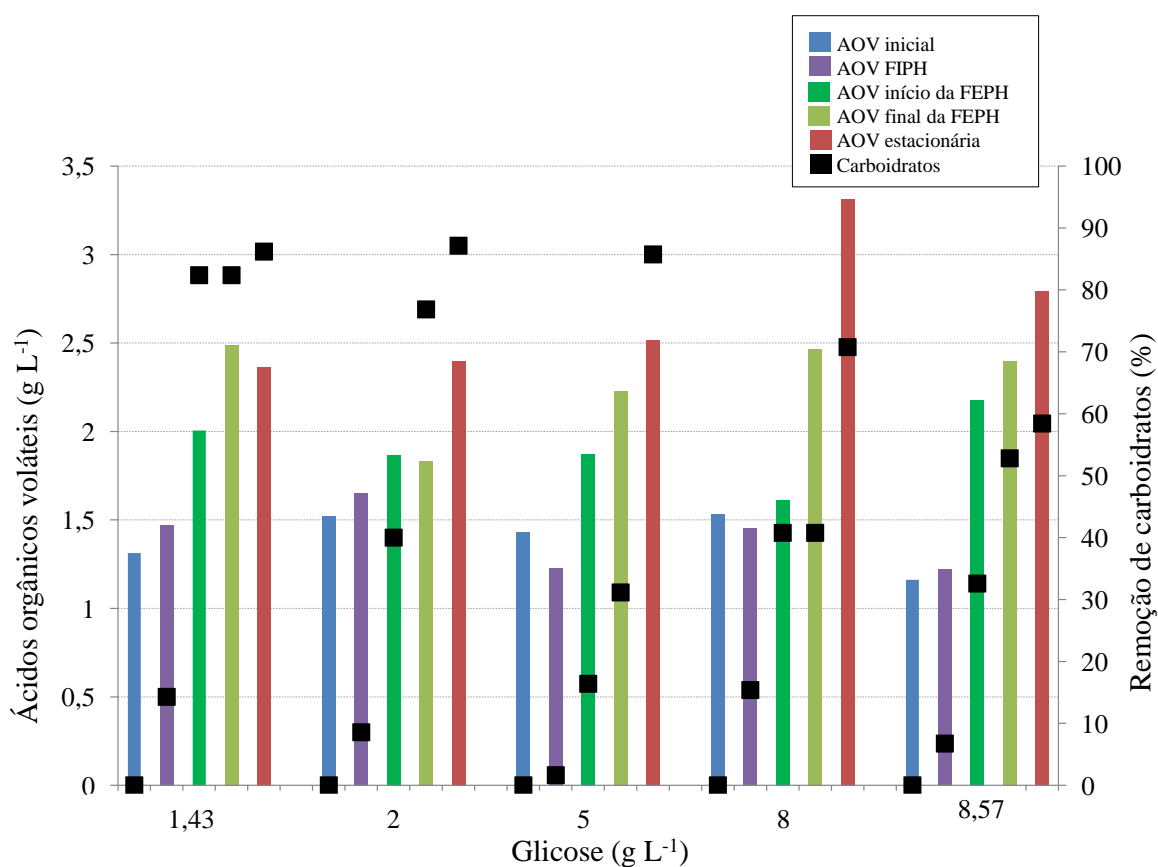
89%. A partir da interpretação do gráfico de Pareto e da curva obtida do ANOVA (Figura 5.19), a concentração de glicose foi significativa na produção de H_2 e seu máximo foi obtido para 7 g L^{-1} com a produção de $345 \pm 20 \text{ mL}$ de H_2 . Na condição do ponto central (5 g L^{-1} de glicose) obteve-se menor produção acumulada de H_2 ($322 \pm 4 \text{ mL}$), no entanto, esta condição resultou em mesmo rendimento do ponto de concentração otimizada ($8 \text{ g de glicose L}^{-1}$) de $143 \text{ mL de } H_2 \text{ g}^{-1}$ de DQO (Tabela 5.4). Ou seja, ao considerar a eficiência do processo na conversão de substrato em H_2 , e não apenas a produção acumulada obtida, $5 \text{ g de glicose L}^{-1}$ deve ser considerado e será utilizada nos ensaios com NPs.

Figura 5.19: Gráfico de Pareto e curva de otimização da produção de H₂ com variação da concentração de glicose.



A eficiência de conversão de carboidratos de 86% foi obtida nos ensaios com 1,43; 2 e 5 g de glicose L⁻¹, e a concentração de AOV ao final do experimento também foi similar e de 2,4; 2,4 e 2,5 g L⁻¹ nos respectivos ensaios. Enquanto nos ensaios com 8 e 8,57 g de glicose L⁻¹ as eficiências de conversão de carboidratos foram de 71% e 58%, respectivamente (Figura 5.19). Desta forma, a adição de maior concentração de carboidratos ao meio nem sempre pode ser relacionada com a maior produção de H₂, porque sua conversão é limitada pela capacidade metabólica dos microrganismos. A maior concentração de AOV (3,3 g L⁻¹) na condição com 8 g de glicose L⁻¹ (Figura 5.20) esteve relacionada a maior produção de H₂, diferentemente do ensaio de otimização do RCM, quando o número de variáveis era muito maior e tal correlação não ocorreu.

Figura 5.20: AOV e eficiência de conversão de carboidratos dos ensaios de otimização da produção de hidrogênio com variação da concentração de glicose.

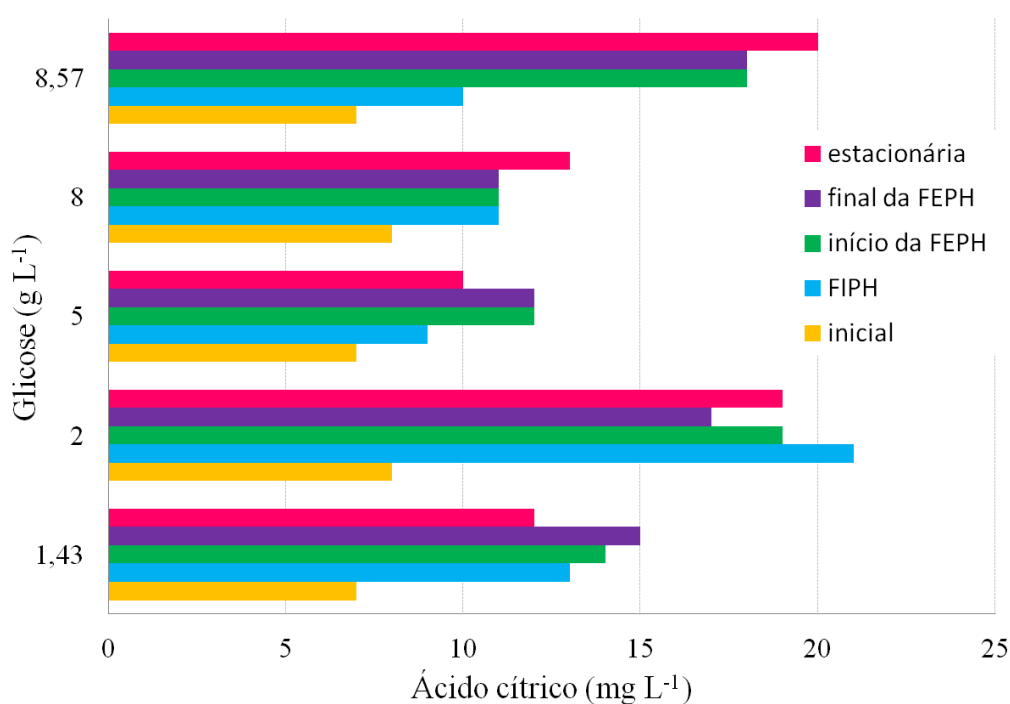


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

A produção de ácido cítrico foi observada em todos os ensaios desta etapa (Figura 5.21) e a concentração deste ácido nas amostras obtidas da fase estacionária da fermentação variaram de 10 mg L⁻¹ (no ensaio em que 5 g L⁻¹ de glicose foi adicionado ao meio) a 20 mg

L^{-1} (no ensaio em que $8,57 \text{ g L}^{-1}$ de glicose foi adicionado ao meio). Apesar de ter sido produzido em todas as condições desta etapa, sua rota foi menos favorecida quando comparado aos ensaios da etapa 2, em que a concentração deste ácido nas amostras da fase estacionária da fermentação foram maiores (156 mg L^{-1}). Nos ensaios de PC da etapa 2, em que 5 g L^{-1} de glicose foram adicionados ao meio, por exemplo, a produção média de ácido cítrico foi de 65 mg L^{-1} . Todavia, nos ensaios da etapa 2 foi observado que sem glicose rotas metabólicas que resultaram no consumo do ácido cítrico foram favorecidas (Figura 5.15). Este consumo não ocorreu nesta etapa do estudo, pois a glicose foi adicionada em todas as condições.

Figura 5.21: Ácido cítrico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.

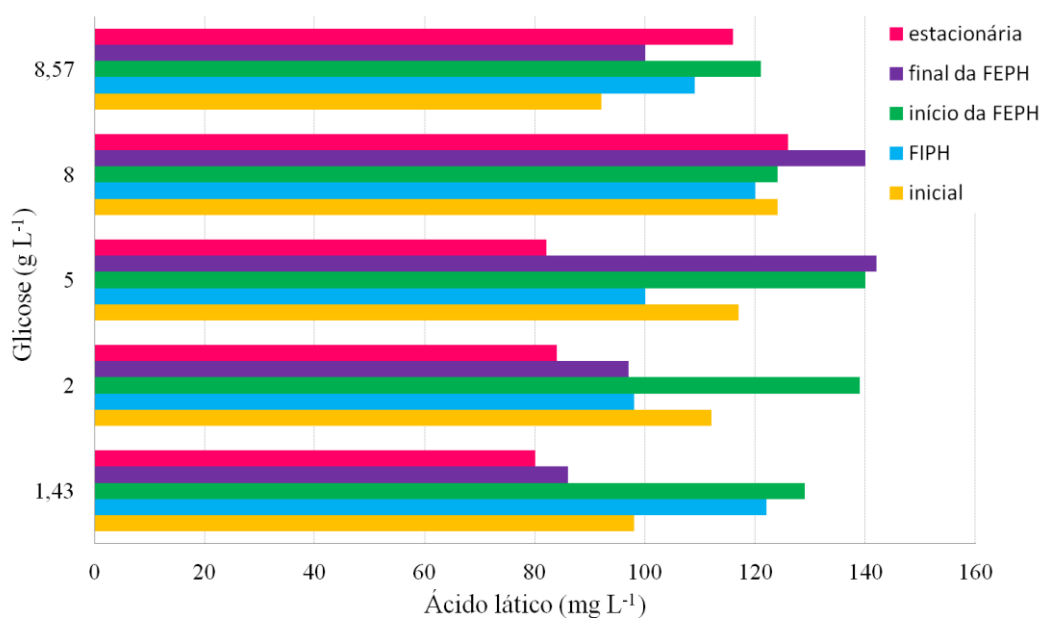


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

Quando $1,43 \text{ g L}^{-1}$, 2 g L^{-1} e 5 g L^{-1} de glicose foram adicionados ao meio, a concentração de ácido lático na fase estacionária do processo fermentativo foi de 80, 84 e 82 mg L^{-1} , respectivamente e menor do que aquelas obtidas na amostra inicial (98, 112 e 117 mg L^{-1} , respectivamente) (Figura 5.22). Cai et al. (2013) reportaram uma rota de consumo deste ácido por *C. butyricum* na presença de ácido acético (Figura 5.15), o que foi observado em tais condições. Enquanto, nos ensaios em que 8 e $8,57 \text{ g L}^{-1}$ de glicose foram adicionados, a concentração de ácido lático na fase estacionária do processo fermentativo foi maior do que a

inicial (124 e 93 mg L⁻¹) e de 126 e 116 mg L⁻¹, respectivamente, mesmo na presença de ácido acético. Ou seja, para os ensaios com valores acima de 5 g L⁻¹ de glicose, a rota de consumo do ácido láctico foi desfavorecida (Figura 5.15).

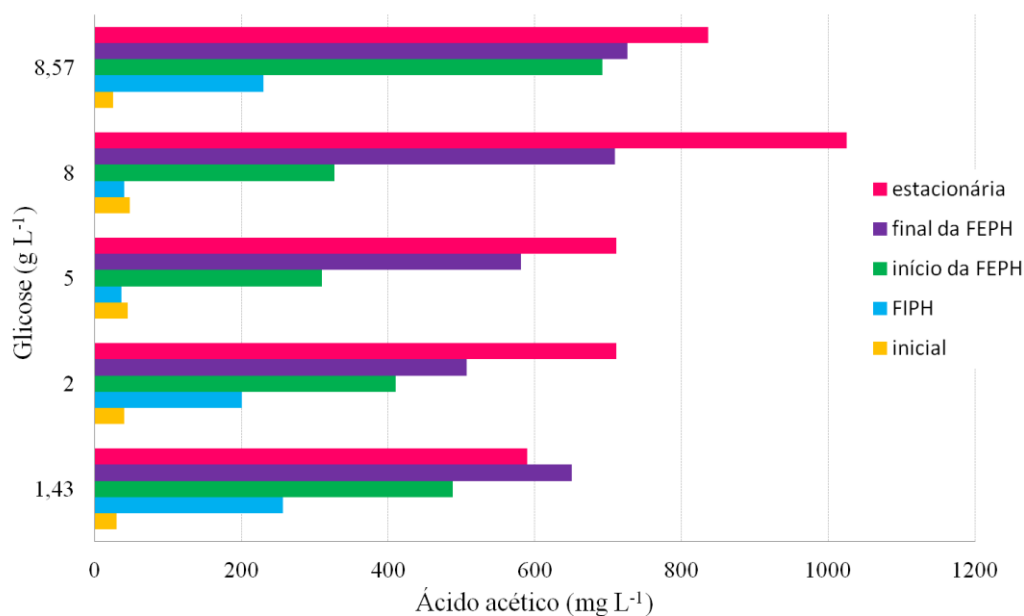
Figura 5.22: Ácido láctico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

A concentração de ácido acético na amostra líquida da fase estacionária do processo fermentativo da etapa 2 foi de 3688 mg L⁻¹ na condição 9 (10 g L⁻¹ de extrato de carne, 10 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de glicose e 1 g L⁻¹ de amido). Nesta etapa do estudo, a produção de ácido acético não chegou a atingir tal concentração. Todavia, sua produção foi observada em todas as condições, e sua concentração na fase estacionária do processo fermentativo foi de 590, 711, 711, 1025 e 836 mg L⁻¹ nas condições em que 1,43; 2; 5; 8 e 8,57 g L⁻¹ de glicose foram adicionados ao meio, respectivamente (Figura 5.23). Desta forma, é possível inferir que a rota de produção de ácido acético a partir da glicose por *C. butyricum* (Figura 5.15) foi favorecida nesta etapa do estudo.

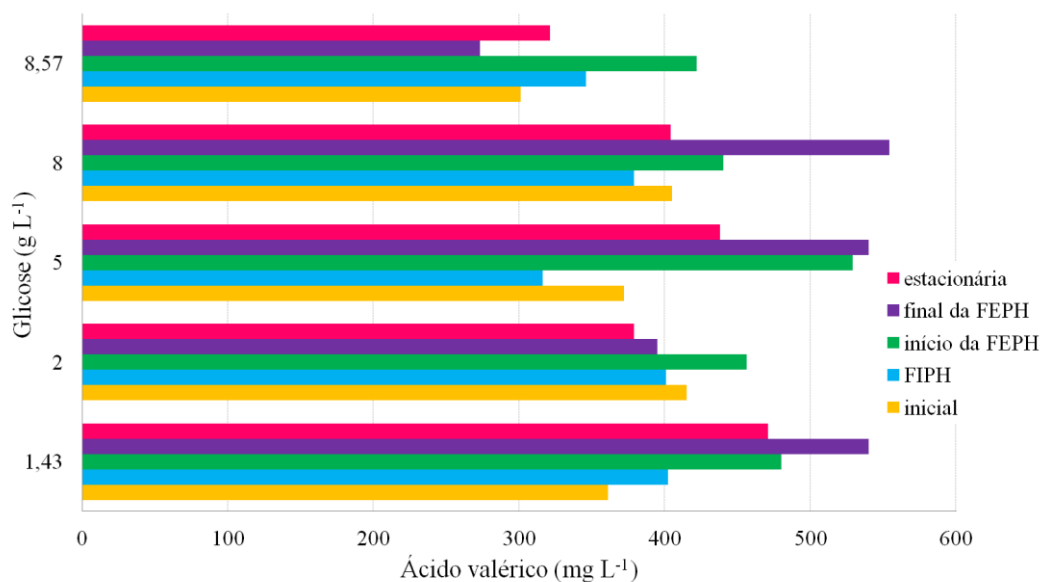
Figura 5.23 Ácido acético nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

A concentração de ácido valérico não variou muito durante as etapas do processo fermentativo com valores de 361, 415, 372, 405 e 301 mg L⁻¹ na amostra inicial e 471, 379, 438, 404 e 321 mg L⁻¹ na amostra da fase estacionária nas condições em que 1,43; 2; 5; 8; e 8,57 g L⁻¹ de glicose foram adicionadas ao meio, respectivamente (Figura 5.24). Nos ensaios da etapa 2, percebeu-se que a rota metabólica de produção deste ácido (Figura 5.15) foi favorecida com a adição de NPs ao meio, o que não ocorreu nesta etapa do estudo, em que NPs não foram adicionadas aos ensaios.

Figura 5.24: Ácido valérico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.

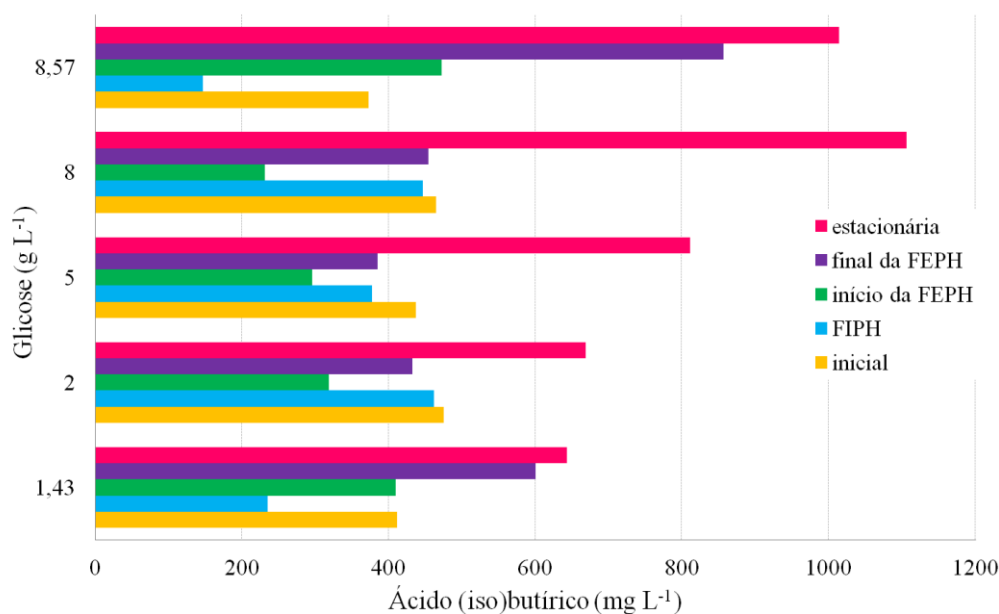


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

A concentração de ácido (iso)butírico o na amostra da fase estacionária do processo fermentativo foi de 643, 669, 811, 1106 e 1014 quando as concentrações 1,43; 2; 5; 8; e 8,57 g L⁻¹ de glicose foram adicionadas ao meio, respectivamente (Figura 5.25). Ou seja, a rota de produção deste ácido ilustrada na Figura 5.15 foi favorecida e sua concentração foi proporcional a concentração de substrato fornecida no meio.

Segundo White, (2000) a razão entre a produção de ácido butírico e acético (B:A) para *Clostridium butyricum* é 2. Porém, neste experimento, as razões foram 1,1; 0,9; 1,1; 1,1 e 1,2 para os ensaios com 1,43; 2; 5; 8 e 8,57 g L⁻¹ de glicose, respectivamente. Cai et al. (2010) também realizaram ensaios com *C. butyricum* com 4, 8 e 10 g L⁻¹ de glicose e reportaram razão B/A de 1,4; 1,3 e 1,6, respectivamente. É importante ressaltar que estes autores também afirmaram que quanto maior esta razão, maior a produção acumulada de H₂ por estes microrganismos.

Figura 5.25 Ácido (iso)butírico nas condições do DCCR para otimização da produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicose.



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial para Produção de Hidrogênio.

5.1.5 Etapa 4: Otimização da concentração de nanopartículas

A. Faixa ampla de nanopartículas

Os ensaios com variação de NPs de 10 a 350 mg L⁻¹ resultou em produção acumulada de H₂ ilustrada na Figura 5.26. É possível observar que para concentrações de níquel acima de 180 mg L⁻¹ a produção acumulada de H₂ foi abaixo de 30 mL (Tabela 5.5). Engliman et al. (2017) reportaram aumento de 5% na produção de H₂ quando utilizaram 200 mg L⁻¹ de NPs de níquel na degradação de glicose com lodo anaeróbio. Enquanto, Elreedy et al. (2017) reportaram concentração ótima de 60 mg Ni⁰ L⁻¹ para otimização da produção de H₂. Todavia, a produção foi inferior para valores acima de 100 mg L⁻¹.

Neste estudo, valores de até 350 mg L⁻¹ de NPs de ferro não foram suficientes para inibir a produção de H₂, que foi de 376 ± 10 mL. No entanto, sob tais condições observou-se produção de H₂ acumulada similar à condição com apenas 10 mgFe⁰ L⁻¹ de 369 ± 15 mL (Figura 5.25 e Tabela 5.5). Mahmood et al., (2013) reportaram que valores acima de 500 mg L⁻¹ de NPs de Fe⁰ não tiveram efeito negativo na produção de H₂.

Os parâmetros de Gompertz para produção de H₂ em cada condição estudada estão resumidos na Tabela 5.5. É importante ressaltar que essa faixa de concentração não foi apropriada para realizar o ANOVA no software estatístico, pois os parâmetros obtidos não

satisfizeram as premissas impostas por essa análise. Rodrigues e Iemma (2005) relataram que nestes casos, reduzir os experimentos em faixas menores de concentração é alternativa, e por isso, o experimento descrito a seguir foi realizado. Todavia, é possível relatar que mesmo em faixas de concentração de NPs inadequada para otimização da produção de H_2 , na condição de máxima produção acumulada obtida de 369 ± 15 mL de H_2 , o rendimento de 161 mL de H_2 g^{-1} de DQO foi 13% acima do maior valor obtido nos ensaios de otimização da concentração de glicose (quando NPs não foram adicionadas ao meio), cujo valor observado foi de 143 mL de H_2 g^{-1} de DQO.

Figura 5.26: Ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa ampla de nanopartículas

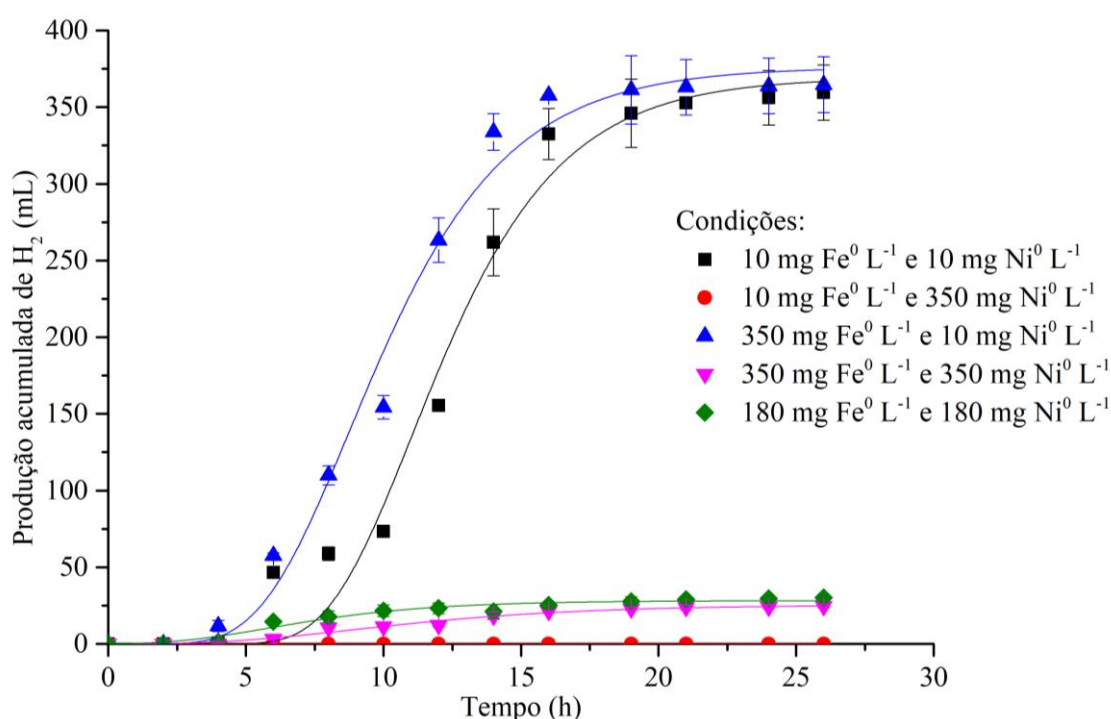


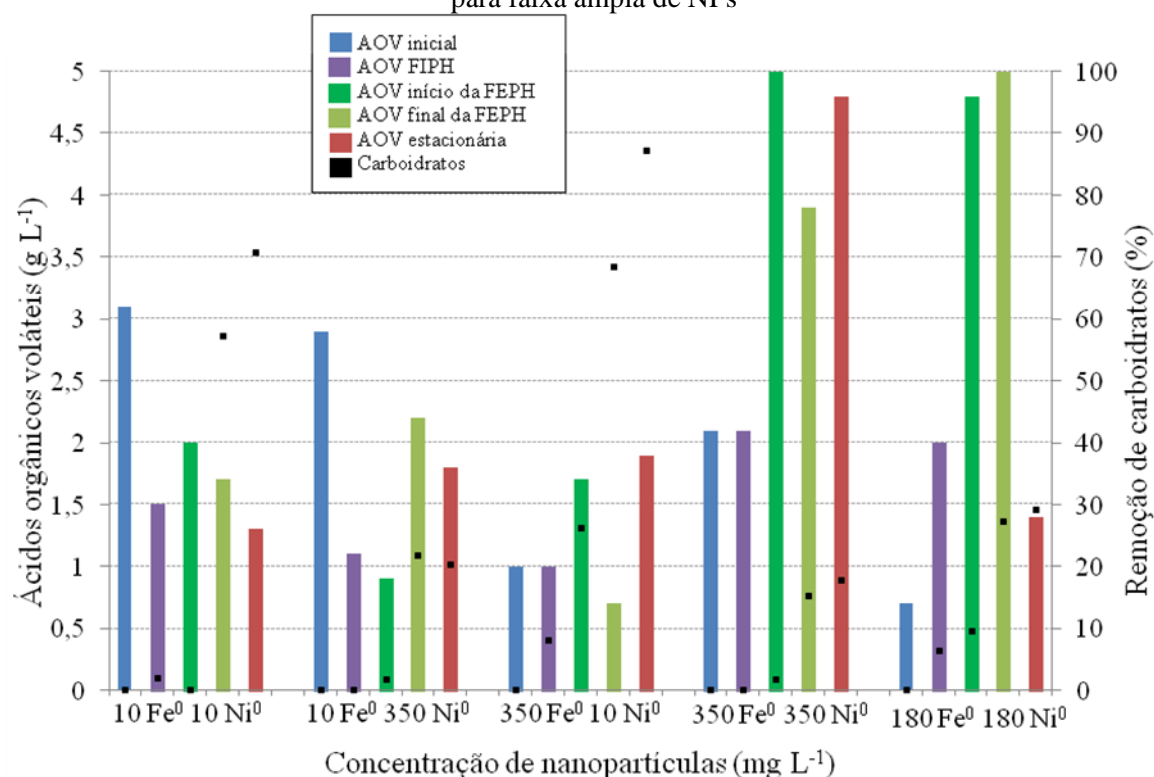
Tabela 5.5: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa ampla de nanopartículas e respectivos parâmetros de Gompertz relacionados

Fe^0 (mg L^{-1})	Ni^0 (mg L^{-1})	Produção máxima (mL)	Velocidade		R^2	Rendimento (mL de H_2 g^{-1} de DQO)
			de produção de H_2 (mL h^{-1})	FIPH (h)		
10	10	369 ± 15	45 ± 7	8 ± 1	0,979	161
10	350	0 ± 0	0 ± 0	-*	0,999	0
350	10	376 ± 10	43 ± 5	5 ± 0	0,988	164
350	350	25 ± 1	2 ± 0	-*	0,978	11
180	180	28 ± 1	3 ± 1	-*	0,952	12

*ensaio não ultrapassou a FIPH (Fase Inicial de Produção de Hidrogênio).

Assim como, o rendimento da produção de H_2 nos ensaios com adição de NPs de níquel acima de 180 mg L^{-1} não ultrapassou $15 \text{ mL de } H_2 \text{ g}^{-1}$ de DQO, a remoção de carboidratos não ultrapassou 30% (Tabela 5.5 e Figura 5.27). Enquanto, no ensaio em que $10 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $10 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$ foram adicionados, a remoção de carboidratos foi de 71% e a condição com $350 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $10 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$ resultou em 87% de remoção dos carboidratos. Neste ensaio, a remoção de carboidratos esteve diretamente relacionada a eficiência de produção do H_2 . A concentração de AOV ao final do processo não ultrapassou 2 g L^{-1} , com exceção do ensaio com $350 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $350 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$, em que a produção de AOV foi de $4,8 \text{ g L}^{-1}$ com produção máxima acumulada de $25 \pm 1 \text{ mL de } H_2$. Ou seja, neste caso, a maior produção de AOV não esteve relacionada com a maior produção de H_2 (Tabela 5.5 e Figura 5.27).

Figura 5.27: AOV e remoção de carboidratos nos ensaios de otimização da produção de hidrogênio para faixa ampla de NPs

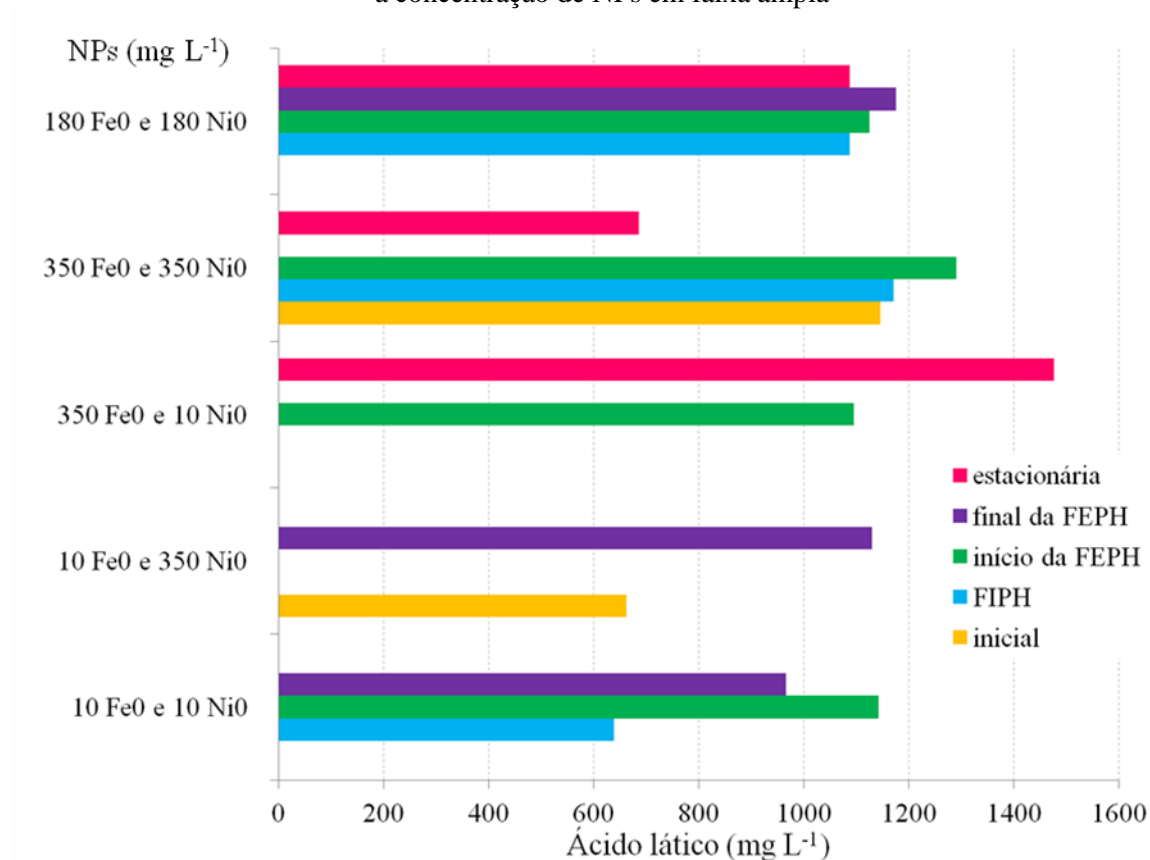


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio.

Os ácidos láctico, isobutírico e valérico foram observados no processo fermentativo das condições deste Delineamento Composto Central (DCC) com faixa ampla de NPs (Figura 5.28 a Figura 5.30). Ao analisar as amostras da fase estacionária do processo fermentativo, a concentração de ácido láctico foi de 685, 1.087 e 1.475 mg L^{-1} nas condições com 350 mg Fe^0

L^{-1} e $350 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$; $180 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $180 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$; $350 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $10 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$ respectivamente (Figura 5.28). Ou seja, este ácido só foi identificado nas amostras finais com concentração de NPs de Ferro acima de 180 mg L^{-1} .

Figura 5.28: Ácido láctico nas condições do DCC para otimização da produção de hidrogênio variando a concentração de NPs em faixa ampla

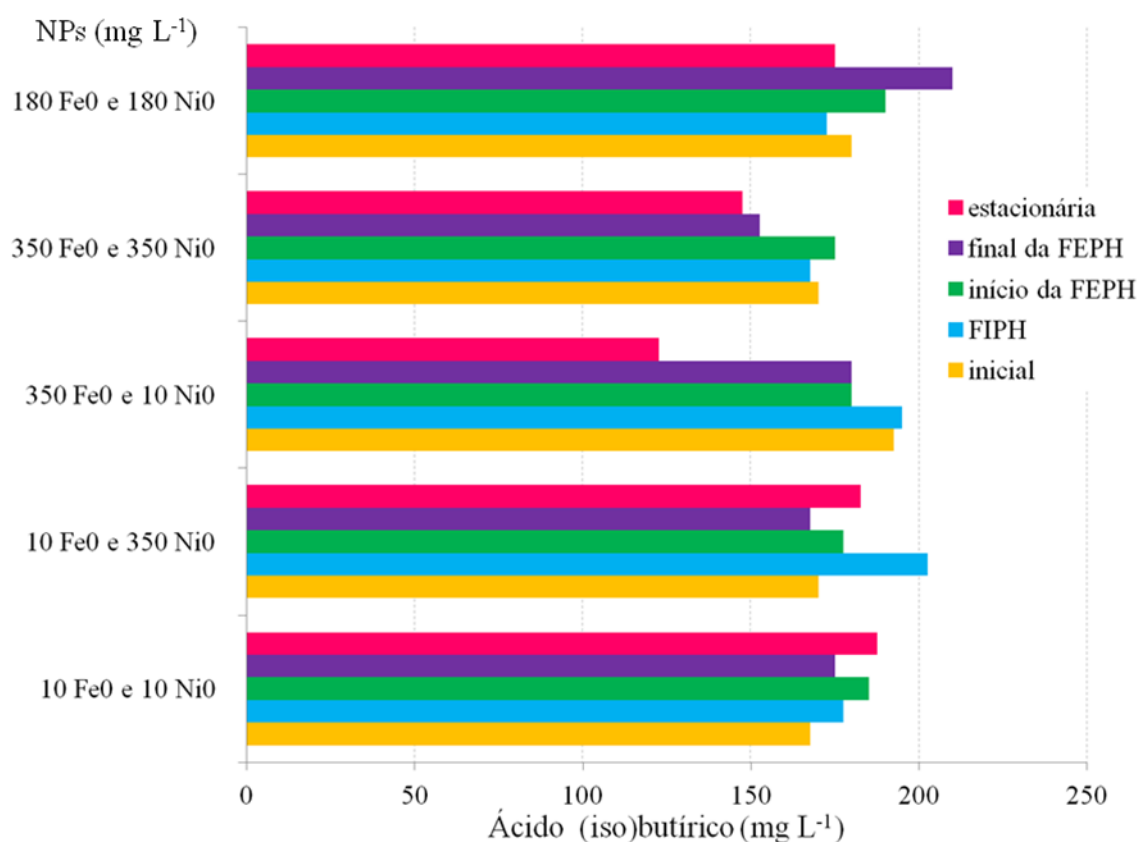


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio.

O ácido (iso)butírico foi observado em todos os ensaios em 188, 183, 123, 148 e 175 mg L^{-1} nas amostras da fase estacionária das condições em que NPs foram adicionadas em $10 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $10 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$; $10 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $350 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$; $350 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $10 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$; $350 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $350 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$; $180 \text{ mg Fe}^0 L^{-1}$ e $180 \text{ mg Ni}^0 L^{-1}$, respectivamente. As respectivas concentrações deste ácido na amostra do início da fermentação foram de 168, 170, 192, 170 e 180 mg L^{-1} (Figura 5.29). Desta forma, é possível inferir que nos ensaios da etapa 4, a variação da concentração de ácido butírico no início do processo fermentativo em relação ao final não foi maior que 70 mg L^{-1} . Valor muito inferior aqueles reportados na etapa 2 e etapa 3 de 3.422 mg L^{-1} e 641 mg L^{-1} , respectivamente. Desta forma, é possível afirmar que a

adição de NPs ao meio nas concentrações desta etapa, desfavoreceram as rotas de produção de butírico e acético (Figura 5.15).

Figura 5.29: Ácido (iso)butírico nas condições do DCC para otimização da produção de hidrogênio variando a concentração de NPs em faixa ampla

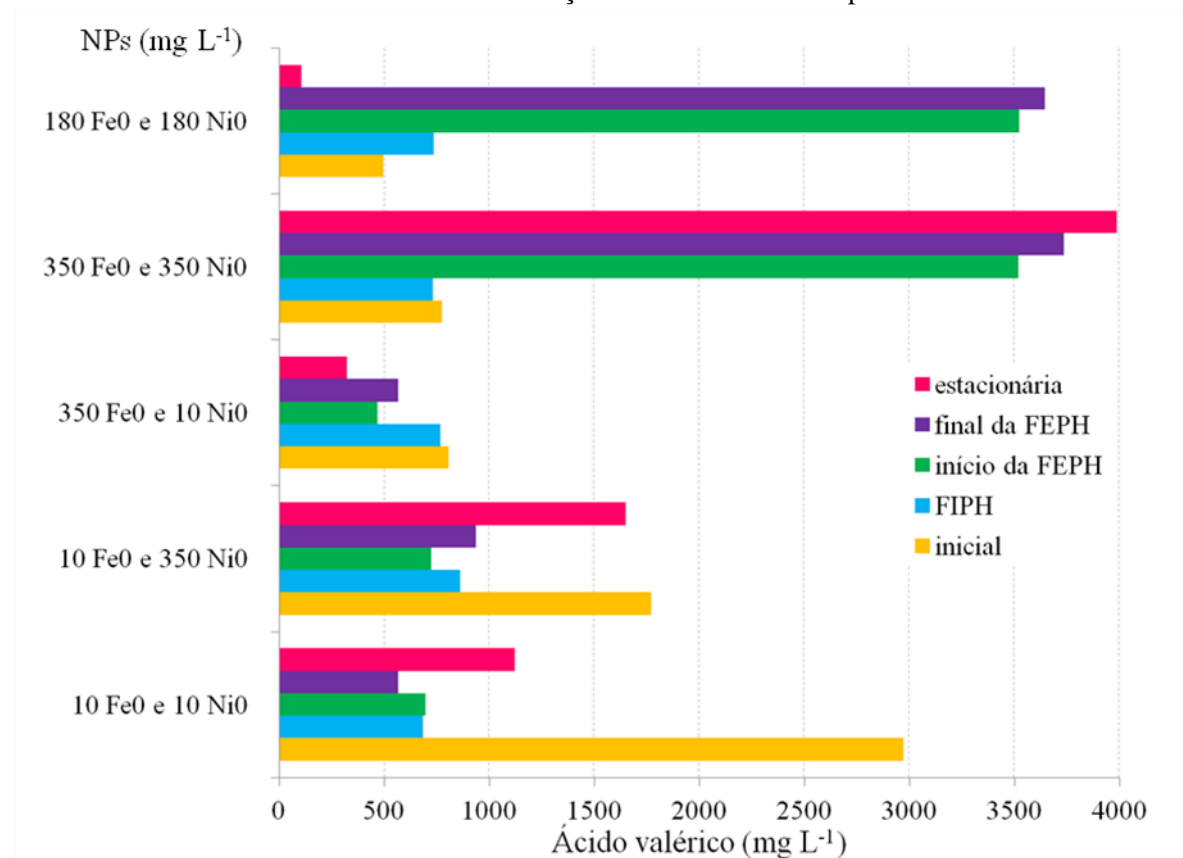


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio.

A concentração de ácido valérico nas amostras da fase estacionária do processo fermentativo foram de 1.120, 1.648, 322, 3.985 e 108 mg L⁻¹ nas condições com 10 mg Fe⁰ L⁻¹ e 10 mg Ni⁰ L⁻¹; 10 mg Fe⁰ L⁻¹ e 350 mg Ni⁰ L⁻¹; 350 mg Fe⁰ L⁻¹ e 10 mg Ni⁰ L⁻¹; 350 mg Fe⁰ L⁻¹ e 350 mg Ni⁰ L⁻¹; 180 mg Fe⁰ L⁻¹ e 180 mg Ni⁰ L⁻¹, respectivamente (Figura 5.30). A maior concentração de ácido valérico nesta etapa (3.985 mg L⁻¹) foi superior as maiores observadas nas etapas 2 (1686 mg L⁻¹) e 3 (471 mg L⁻¹) deste estudo. A rota de produção deste ácido a partir do acético e propiônico está ilustrada na Figura 5.15. Isso pode explicar a ausência de ácido acético e propiônico nas amostras e presença do ácido valérico em concentrações acima daquelas reportadas nas etapas anteriores. O favorecimento desta rota em detrimento daquela de produção de ácido butírico e acético (Figura 5.15) na presença de

NPs metálicas já havia sido reportado na condição 12 da etapa 2, e foi relacionada a otimização da produção de H₂.

Figura 5.30 Ácido valérico nas condições do DCC para otimização da produção de hidrogênio variando a concentração de NPs em faixa ampla



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio.

B. Faixa adequada de nanopartículas

Os ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) realizado para otimização da produção acumulada de H₂ com NPs de Fe⁰ e Ni⁰ estão ilustrados na Figura 5.31. A máxima produção acumulada de H₂ foi de 390 ± 24 mL no ensaio com 30 mgFe⁰ L⁻¹ e 30 mgNi⁰ L⁻¹. No ensaio com 58,28 mgFe⁰ L⁻¹ e 30 mgNi⁰ L⁻¹ a produção acumulada de H₂ foi similar e de 370 ± 14 mL. Produção de H₂ inferior (< 100 mL de H₂) foi observada nos ensaios com valores de NPs de níquel acima de 50 mg L⁻¹. Desta forma, sob tais condições pode-se afirmar que ocorreu inibição da produção de H₂ (<100 mL), a qual foi inferior aquela observada para o ensaio controle (sem NPs), cuja produção máxima acumulada foi de 285 ± 10 mL. Os parâmetros de Gompertz obtidos estão resumidos na Tabela 5.6.

É possível observar o menor ajuste ao modelo, nos ensaios em que a inibição ocorreu (concentração de NPs de níquel > 50 mg L⁻¹). Nestes casos, a FIPH não foi superada. Em todos os outros ensaios a duração da FIPH foi similar e variou de 7 ± 0 a 9 ± 0 h (Tabela 5.6).

Figura 5.31: Ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa adequada de nanopartículas

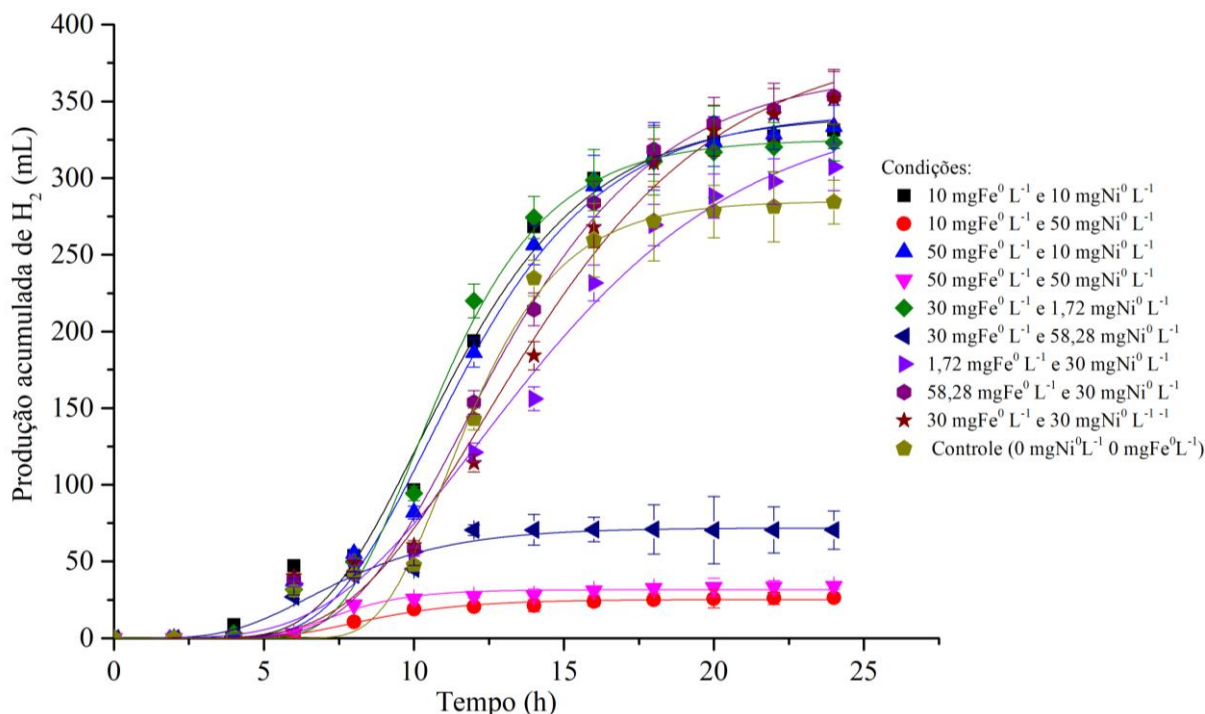


Tabela 5.6: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para faixa adequada de nanopartículas e respectivos parâmetros de Gompertz

Fe ⁰ (mg L ⁻¹)	Ni ⁰ (mg L ⁻¹)	Produção máxima (mL)	Velocidade de produção de H ₂ (mL h ⁻¹)	FIPH (h)	R ²	Rendimento (mL de H ₂ g ⁻¹ de DQO)
10	10	341 ± 12	39 ± 4	7 ± 0	0,987	149
10	50	25 ± 1	4 ± 1	-*	0,987	11
50	10	343 ± 11	39 ± 4	7 ± 0	0,990	150
50	50	31 ± 1	7 ± 1	-*	0,977	14
30	1,72	325 ± 8	48 ± 5	7 ± 0	0,990	142
30	58,28	72 ± 2	10 ± 2	-*	0,976	31
1,72	30	349 ± 23	25 ± 2	7 ± 1	0,987	153
58,28	30	370 ± 14	37 ± 4	8 ± 0	0,990	162
30	30	390 ± 24	32 ± 3	8 ± 1	0,986	170
-	-	285 ± 10	49 ± 8	9 ± 0	0,983	125

*ensaio não ultrapassou a FIPH (Fase Inicial de Produção de Hidrogênio)

Estes parâmetros de Gompertz levaram a obtenção de uma regressão que resultou na equação 5.2:

$$Y = 369 - 127 x_1 - 112 x_1^2 - 32 x_2^2 \text{ (Equação 5.2)}$$

Sendo,

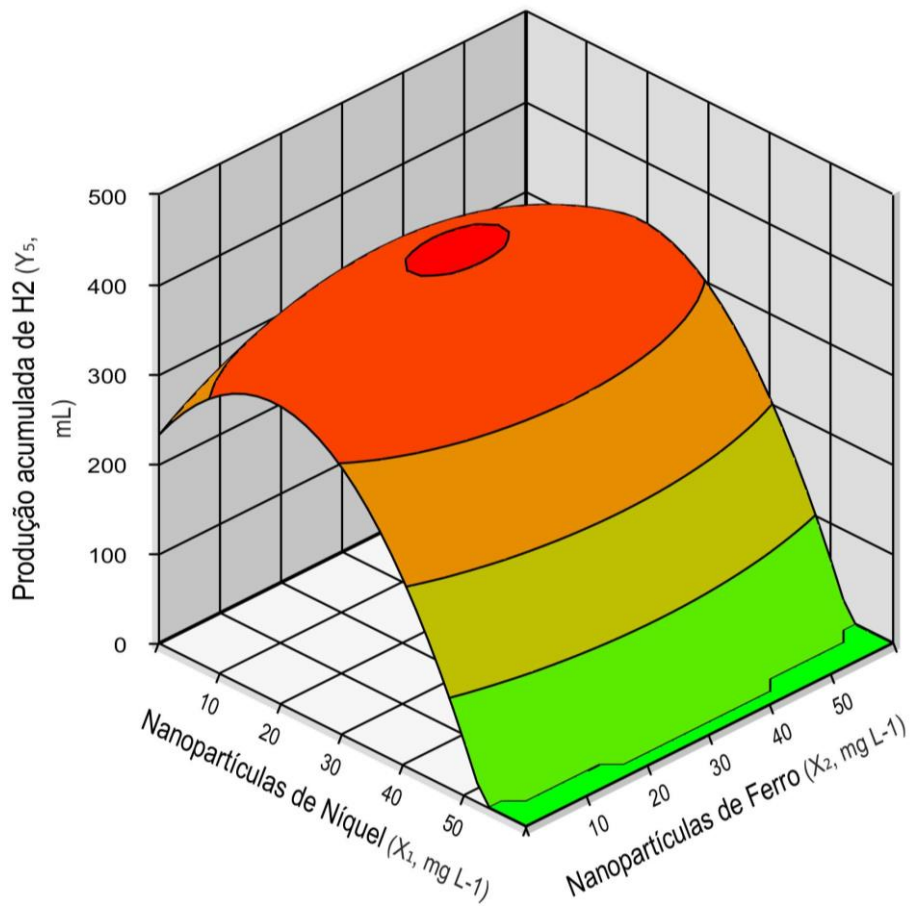
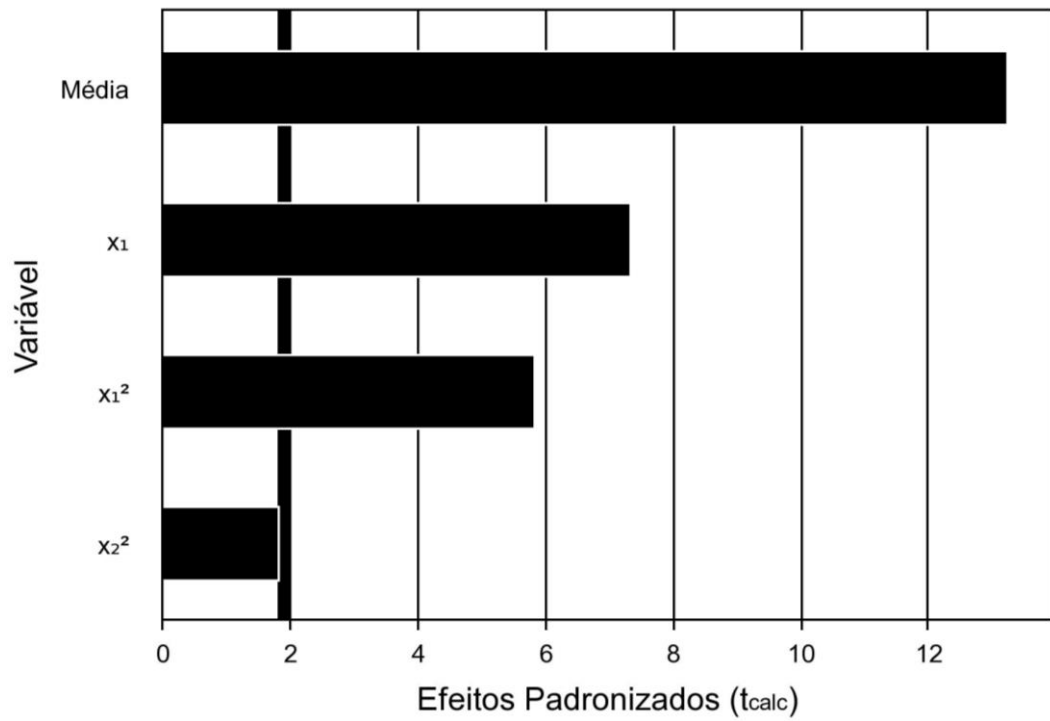
Y = produção acumulada de hidrogênio (mL);

x_1 = concentração de nanopartículas de níquel (mg L^{-1}).

x_2 = concentração de nanopartículas de ferro (mg L^{-1}).

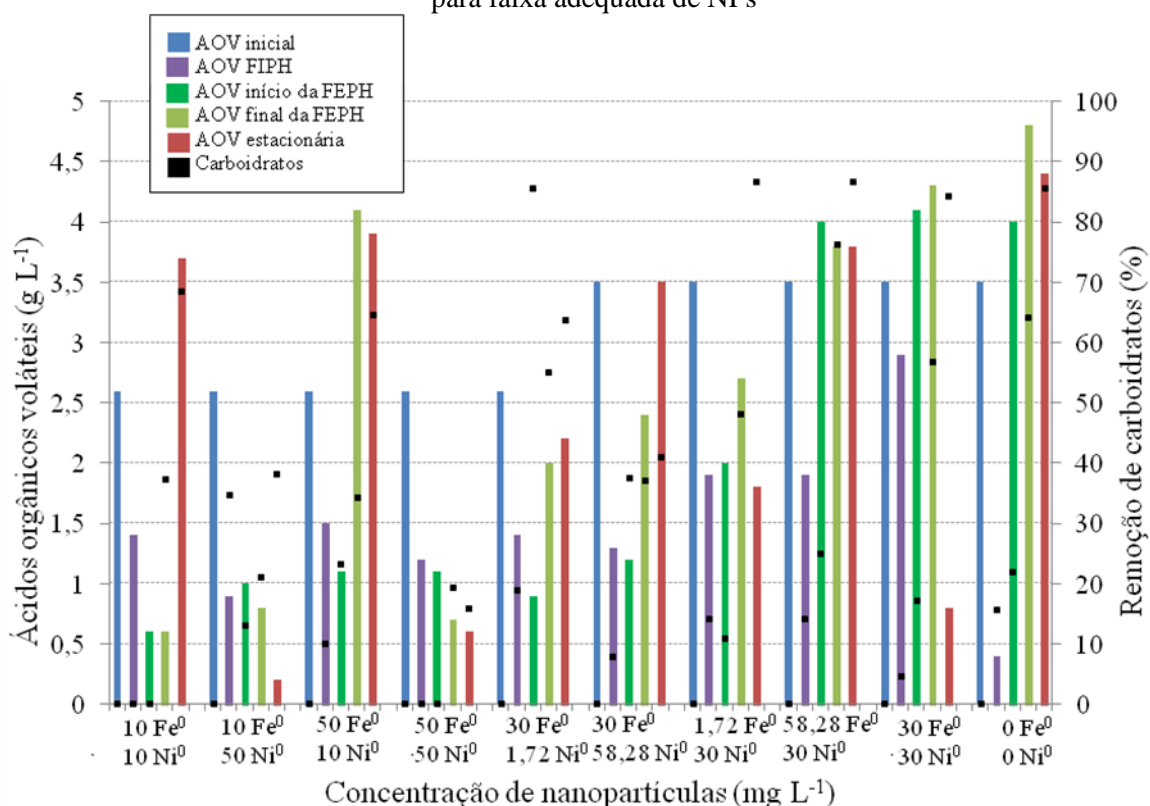
O nível de significância de 10% ($\alpha=0,1$) foi adotado, pois é o indicado para ensaios biológicos (Rodrigues e Iemma, 2005), e as premissas da ANOVA foram atendidas, com $R^2 = 92\%$. Segundo o gráfico de Pareto e a curva obtida do ANOVA (Figura 5.32) a concentração de NPs influenciou de forma estatisticamente significativa na produção de H_2 e seu máximo foi obtido para $30 \text{ mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $20 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$ com a produção de $404 \pm 34 \text{ mL}$ de H_2 que corresponderia ao rendimento de 177 mL de $\text{H}_2 \text{ g}^{-1}$ de DQO, 42% maior do que aquele obtido no ensaio controle (sem a adição de NPs).

Figura 5.32: Gráfico de Pareto e curva de otimização da produção de hidrogênio com variação da concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada



Nas condições em que a produção de H_2 foi inibida ($NPs > 50 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$) a eficiência de remoção de carboidratos não foi maior que 40% (Figura 5.33). Enquanto, em todas as outras condições, a remoção foi acima de 60%. Ou seja, a remoção de carboidratos novamente esteve relacionada a produção de H_2 . Enquanto a concentração de AOV nas amostras ao final do processo fermentativo foi acima de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, com exceção das condições com $10 \text{ mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $50 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$; $50 \text{ mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $50 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$; $30 \text{ mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $30 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$ e novamente não tiveram associação direta com a produção acumulada de H_2 .

Figura 5.33: AOV e remoção de carboidratos nos ensaios de otimização da produção de hidrogênio para faixa adequada de NPs

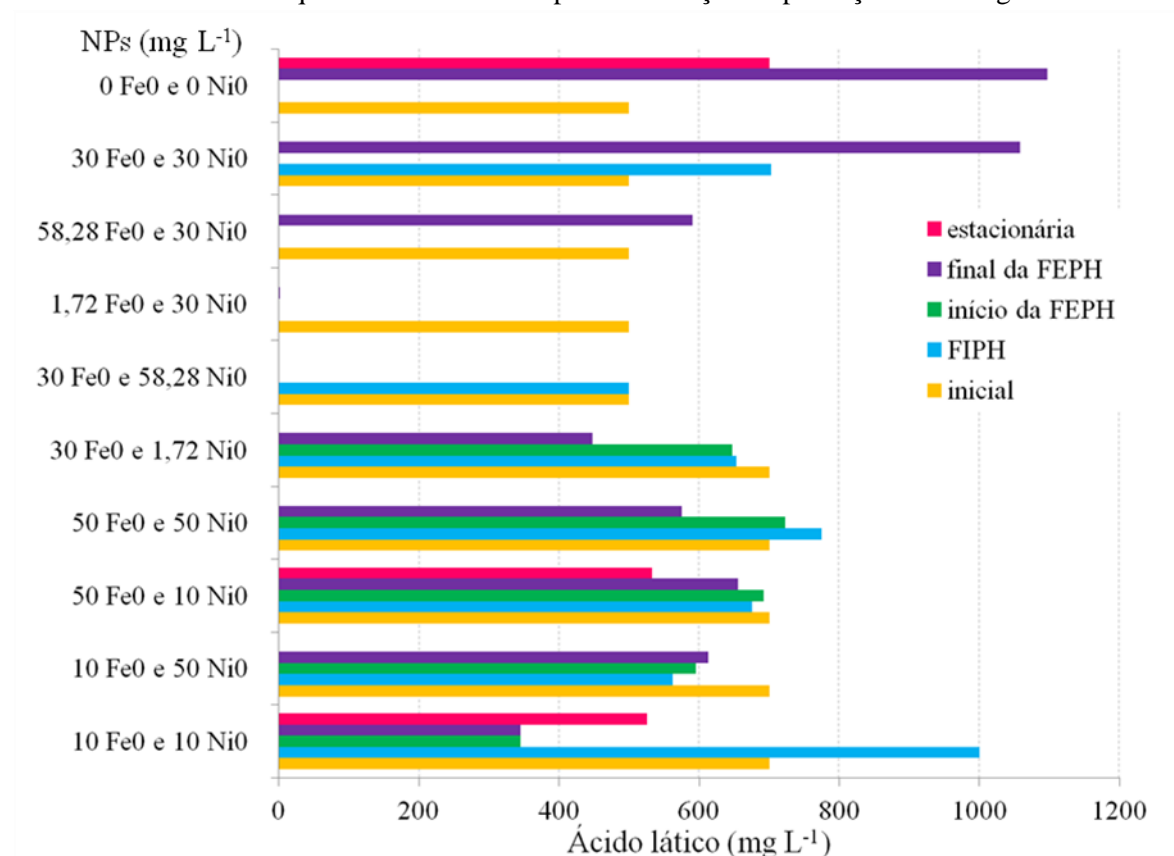


FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio

Nos ensaios da etapa 2, o consumo de ácido lático durante o processo fermentativo esteve relacionado a presença de ácido acético e maior produção de H_2 . Nos ensaios da etapa 3, este consumo foi desfavorecido para concentração de glicose acima de 5 g L^{-1} . Nos ensaios da etapa 4a, a observação deste ácido nas amostras da fase estacionária do processo fermentativo esteve relacionada a concentrações de NPs de Fe^0 acima de 180 mg L^{-1} . Nesta etapa (4b), em que a concentração de NPs adicionada ao meio foi mais adequada para otimização da produção de H_2 , a presença de ácido lático na fase estacionária do processo

fermentativo só ocorreu nas condições controle (sem adição de NPs); com $10 \text{ mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $10 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$; e com $50 \text{ mgFe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $10 \text{ mgNi}^0 \text{ L}^{-1}$ nas concentrações de 700, 525 e 532 mg L^{-1} , respectivamente (Figura 5.34). Desta forma, a rota de consumo de ácido láctico ilustrada na Figura 5.15 foi desfavorecida em condições com baixas concentrações de NPs de níquel.

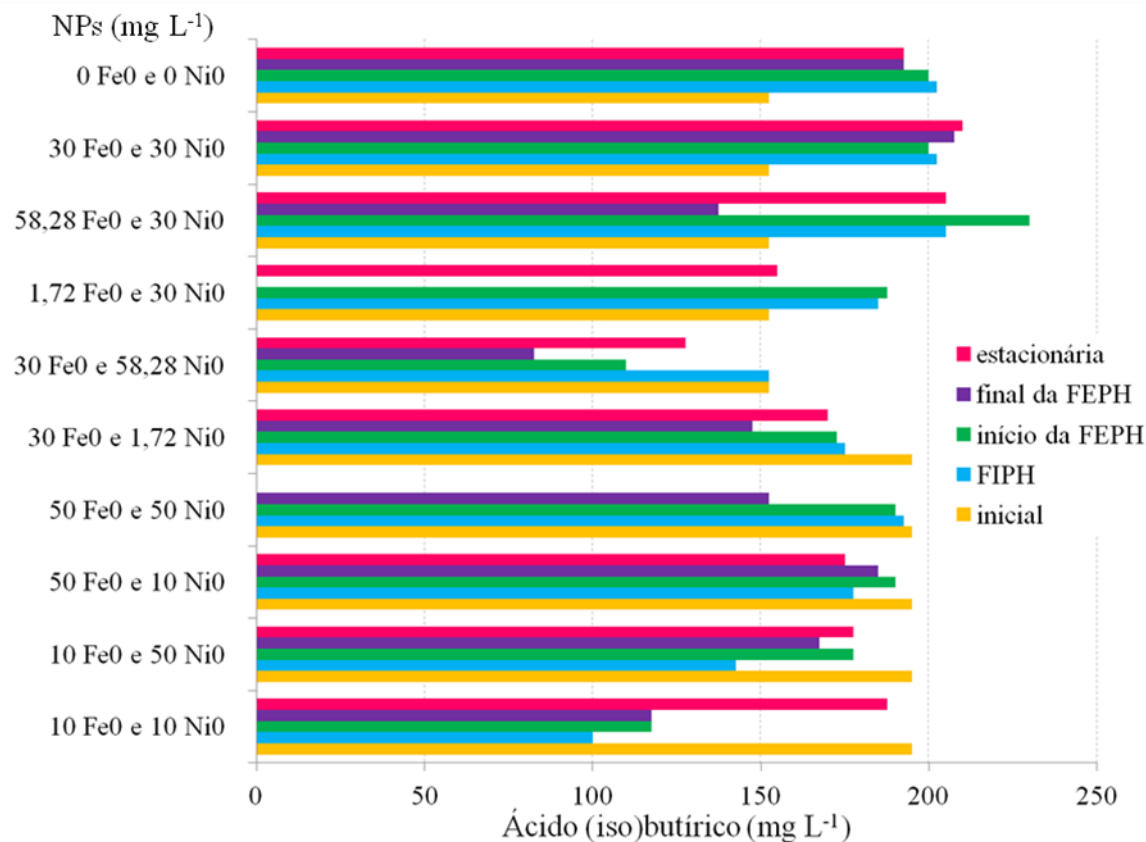
Figura 5.34: Ácido láctico do ensaio de DCCR com a concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada como variáveis para otimização da produção de hidrogênio



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio.

O ácido isobutírico foi observado nas amostras da fase estacionária de produção de H_2 em todas as condições desta etapa. A concentração desse ácido nestas amostras variou de 128 mg L^{-1} (com $30 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $58,28 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$) até 210 mg L^{-1} (com $30 \text{ mg Fe}^0 \text{ L}^{-1}$ e $30 \text{ mg Ni}^0 \text{ L}^{-1}$) (Figura 5.35). Estas concentrações foram próximas aos valores reportados na fase estacionária dos ensaios da etapa 4a, de 152 a 210 mg L^{-1} . Estes valores foram inferiores aos encontrados na etapa 3, em que NPs metálicas não foram adicionadas ao meio. Desta forma, é possível afirmar que nesta etapa a rota metabólica de produção do ácido butírico ilustrada na Figura 5.15 continuou sendo desfavorecida.

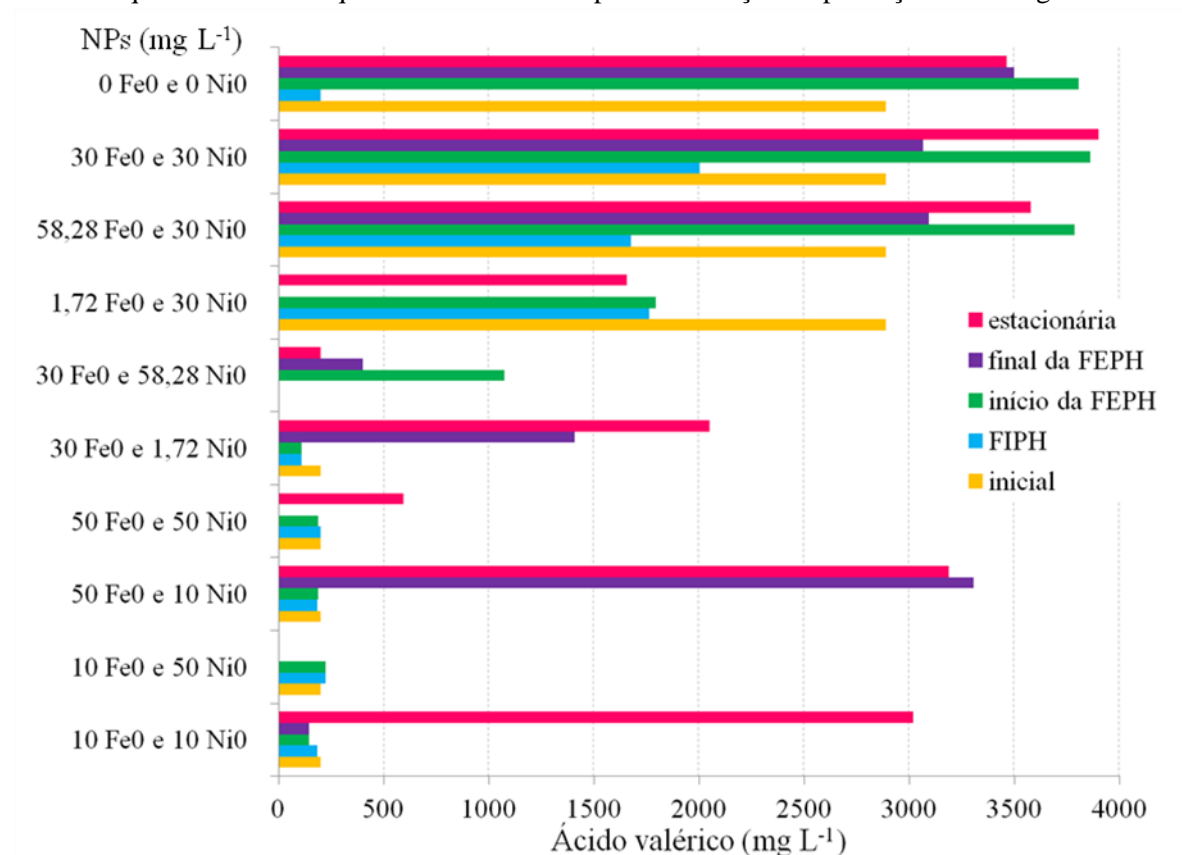
Figura 5.35 Ácido (iso)butírico do ensaio de DCCR com a concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada como variáveis para otimização da produção de hidrogênio



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio.

As condições com os maiores valores de rendimento da produção de H₂ observados foram com 30 mg Fe⁰ L⁻¹ e 30 mg Ni⁰ L⁻¹; 58,29 mg Fe⁰ L⁻¹ e 30 mg Ni⁰ L⁻¹, com rendimento de 170 e 162 mL de H₂ g⁻¹ de DQO, respectivamente. Sob tais condições observou-se as maiores concentrações de ácido valérico na fase estacionária, de 3.900 e 3.578 mg L⁻¹, respectivamente. Nas condições em que a concentração de NPs de níquel > 50 mgL⁻¹, a produção de H₂ foi inibida, e os valores de ácido valérico na amostra da fase estacionária da fermentação variaram de inferior ao limite de detecção do método até 595 mg L⁻¹ (Figura 5.36). Desta forma, pode-se afirmar que a rota de produção do ácido valérico (Figura 5.15) esteve relacionada a produção de H₂ mais elevada por *C. butyricum* na presença de NPs de níquel e ferro em meio RCM otimizado.

Figura 5.36: Ácido valérico do ensaio de DCCR com a concentração de nanopartículas de ferro e níquel em faixa adequada como variáveis para otimização da produção de hidrogênio



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio

C. Validação experimental do modelo para produção otimizada de hidrogênio

A otimização da produção acumulada de H₂ com 30 mgFe⁰ L⁻¹ e 20 mgNi⁰ L⁻¹ resultou em aumento de 27%, ou seja, de 342 ± 8 para 434 ± 13 mL de H₂ (Figura 5.37 e Tabela 5.7). A produção acumulada de H₂ obtida com a adição de NPs foi ainda maior do que a prevista pelo modelo ANOVA (404 ± 34 mL).

Taherdanak et al. (2015) também otimizaram a produção de H₂ ao adicionar NPs de Ferro e Níquel em reatores em batelada alimentados com amido e inoculados com lodo anaeróbico de ETE. Os autores operaram os reatores a 37°C e reportaram as concentrações de 37,5 mgNi⁰ L⁻¹ e 37,5 mgFe⁰ L⁻¹ como adequadas à produção otimizada de H₂. O rendimento obtido nesta condição foi de 142 mL de H₂ g⁻¹ de DQO e foi 97% maior em relação obtido no ensaio controle (72 mL de H₂ g⁻¹ de DQO). Os autores observaram que a adição de NPs ao meio de fermentação pode: diminuir a viabilidade de O₂ indesejado, levando assim a melhor desempenho das hidrogenases sensíveis ao oxigênio. Desta forma será interessante avaliar o

comportamento das hidrogenases quando a concentração ótima de NPs foi adicionada, em comparação ao ensaio controle.

Figura 5.37: Produção acumulada de hidrogênio nos ensaios de validação da otimização da concentração de nanopartículas

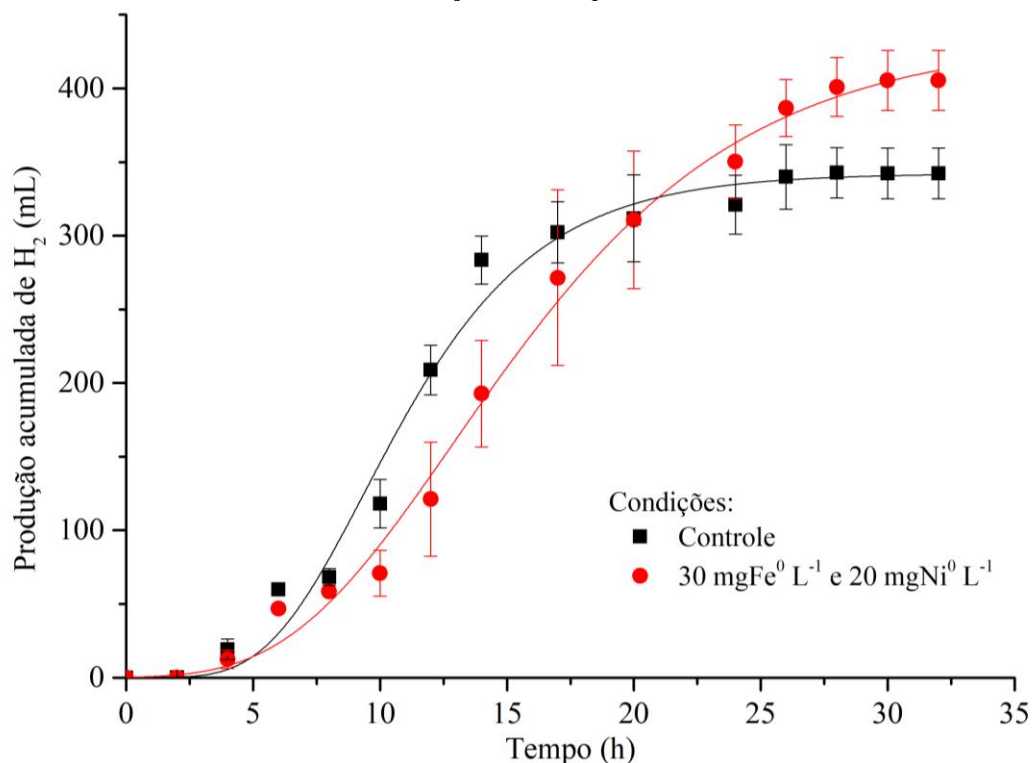
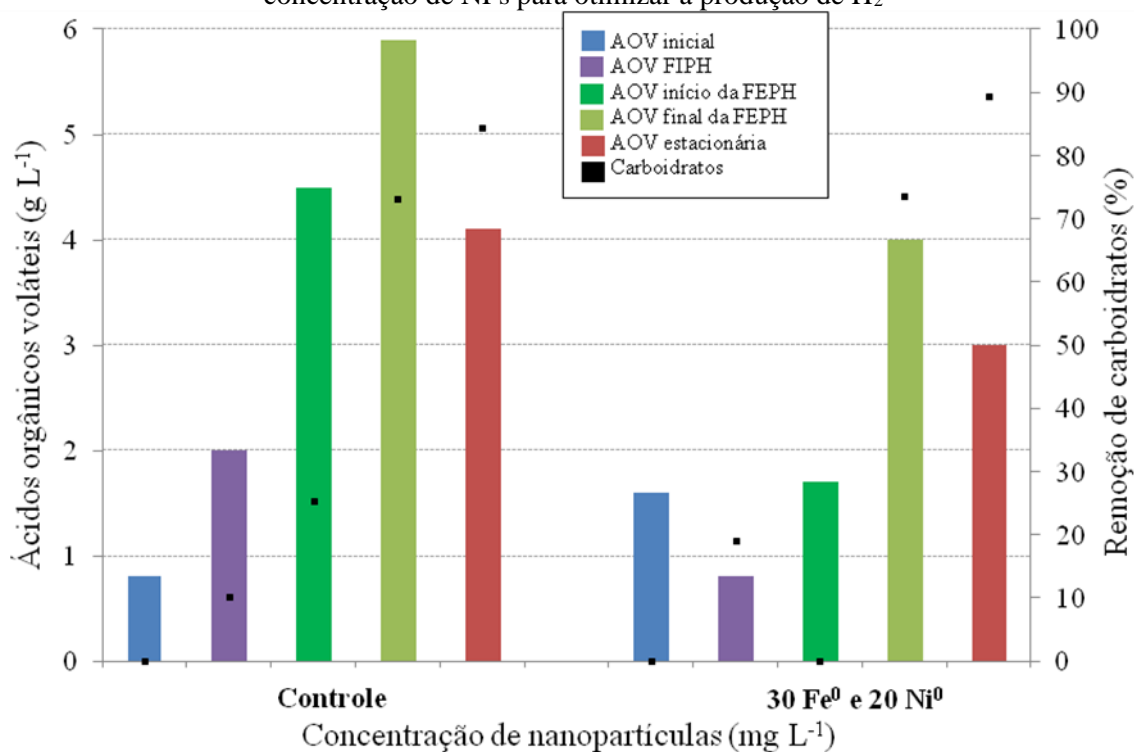


Tabela 5.7: Condições dos reatores nos ensaios de validação da otimização da concentração de nanopartículas e respectivos parâmetros de Gompertz relacionados aos dados de produção acumulada de hidrogênio.

Fe ⁰ (mg L ⁻¹)	Ni ⁰ (mg L ⁻¹)	Produção máxima (mL)	Velocidade de produção de H ₂ (mL h ⁻¹)	FIPH (h)	R ²	Rendimento (mL de H ₂ g ⁻¹ de DQO)
-	-	342 ± 8	33 ± 3	6 ± 0	0,986	149
30	20	434 ± 13	25 ± 2	6 ± 0	0,994	190

FIPH = Fase Inicial para Produção de Hidrogênio.

Figura 5.38: AOV e eficiência de remoção de carboidratos nos ensaios de validação do modelo de concentração de NPs para otimizar a produção de H₂



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio

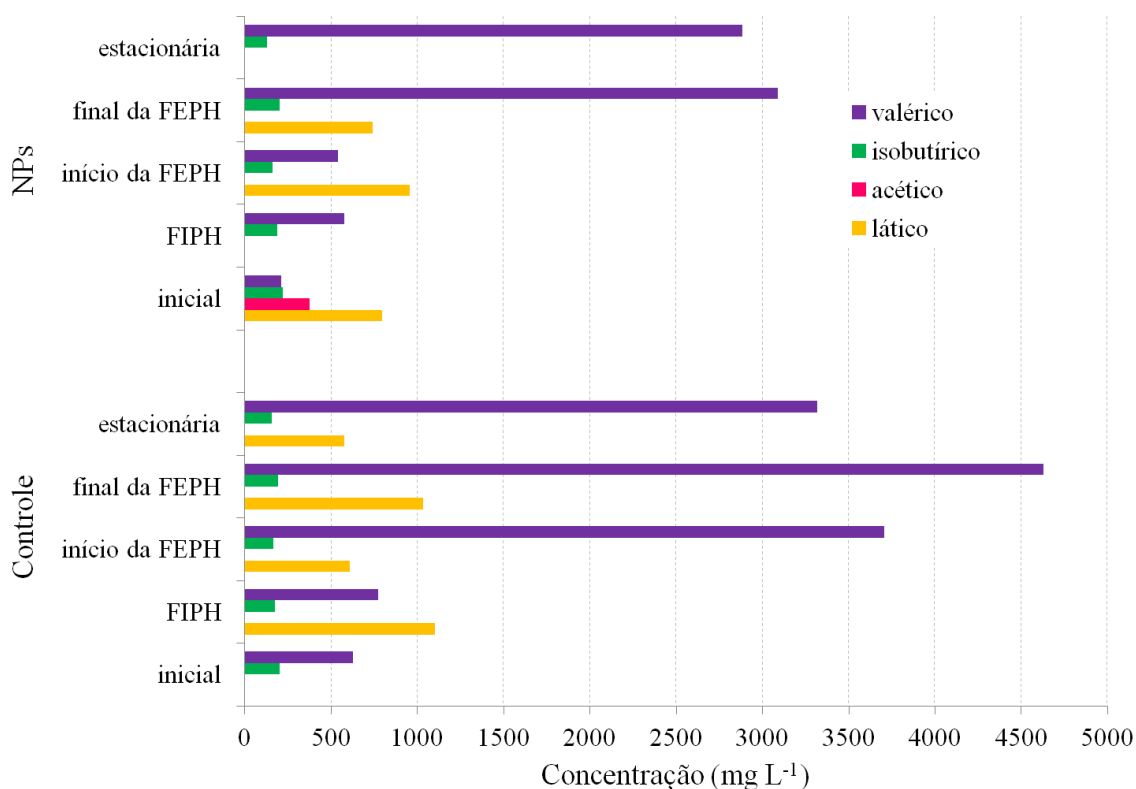
A eficiência da remoção de carboidratos foi similar e de 89% no ensaio controle e 84% no ensaio com a adição de NPs. AOV de 4,1 g L⁻¹, foi maior no ensaio controle quando comparado ao ensaio com NPs (3 g L⁻¹). Os ácidos orgânicos observados no ensaio de validação foram láctico, acético, isobutírico e valérico (Figura 5.39). O ácido acético foi observado apenas na amostra inicial do reator com NPs, na concentração de 375 mg L⁻¹. O ácido isobutírico foi observado em todas as amostras, porém, assim como observado na etapa 4a e 4b, não teve muita variação de concentração durante as etapas do processo fermentativo. Com a concentração de 202 e 218 mg L⁻¹ no início do processo fermentativo e 158 e 127 mg L⁻¹ na fase estacionária de produção de H₂, nos reatores controle e com adição de NPs, respectivamente.

Spirito et al. (2014) reportaram que o alongamento da cadeia a partir de ácido acético e propiônico leva a formação de ácido valérico, que pode também ser um produto de valor agregado no processo, juntamente com o H₂ (Figura 5.15). Nesta etapa do estudo, o ácido valérico foi aquele produzido em concentrações mais elevadas, de 210 e 627 mg L⁻¹ na amostra inicial e 2.882 e 815 mg L⁻¹ na fase estacionária, dos reatores com e sem a adição de

NPs, respectivamente (Figura 5.39). Desta forma, é possível inferir que nas etapas 2 e 3 deste estudo, quando apenas os componentes do meio e concentração de substrato eram variados entre os ensaios, a produção de ácido valérico não foi evidenciada, quando comparado aos ensaios das etapas 4a, 4b e 4c.

O ácido láctico foi observado em 578 mg L^{-1} no reator controle, todavia não foi observado na amostra final do processo fermentativo com NPs (Figura 5.39). Desta forma, a ausência de ácido láctico ao final do ensaio em que NPs foram adicionadas foi uma diferença metabólica entre os reatores desta etapa. O consumo deste ácido durante a fermentação é interessante porque indica que após sua formação (que não produz H_2), está sendo reutilizado e pode ser direcionado a rotas que produzem H_2 , como ilustrado na Figura 5.15. Porém, diferentemente da rota reportada por Cai et al. (2013), neste ensaio, a maior produção de H_2 não esteve relacionada a presença de ácido acético e maior produção de ácido butírico, e sim, a formação de ácido valérico.

Figura 5.39: AOV nos ensaios de validação da ANOVA com concentração de NPs para produção de hidrogênio otimizada e reator controle



FIPH = Fase Inicial para Produção de hidrogênio; FEPH = Fase Exponencial de Produção de Hidrogênio

A análise de MEV do reator com NPs foi realizada no ensaio de validação experimental do modelo de otimização da produção de H₂. A amostragem foi obtida dos aglomerados que se formam em volta das partículas, visando identificar possível utilização das mesmas como material suporte (Figura 5.40 (A)). Porém, na análise de MEV foi possível observar que as partículas são menores que as células e por isso, não podem funcionar como material suporte (Figura 5.40 (B)). A composição de ferro e níquel nas partículas entre as células da imagem foi confirmada pela espectroscopia de energia dispersiva EDS (Figura 5.40).

Figura 5.40: Foto de aglomerado de células no reator em batelada (A) e bactérias e nanopartículas em MEV (B).

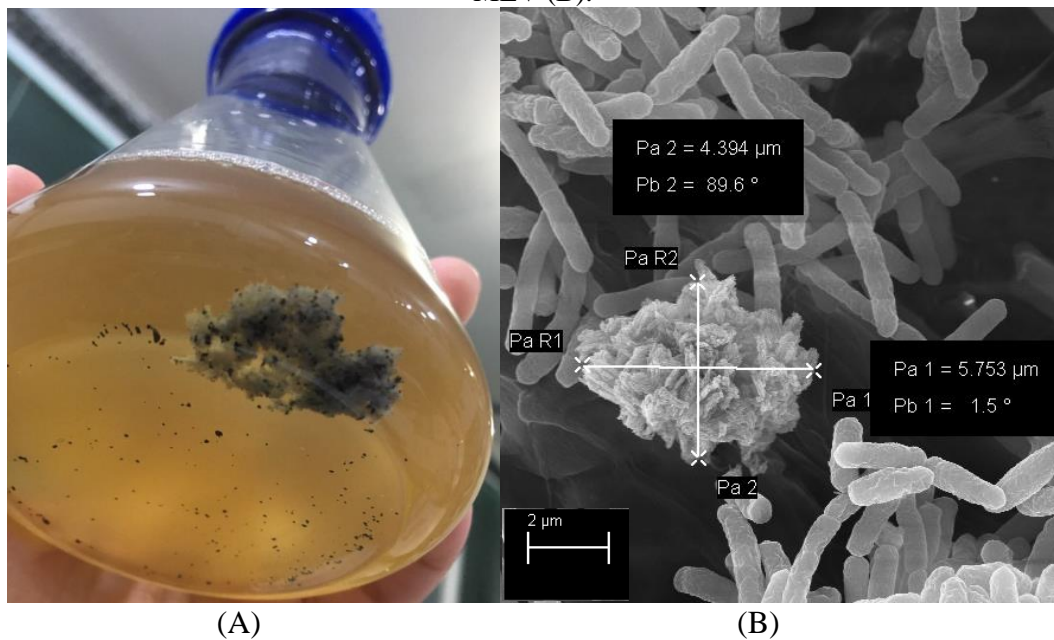
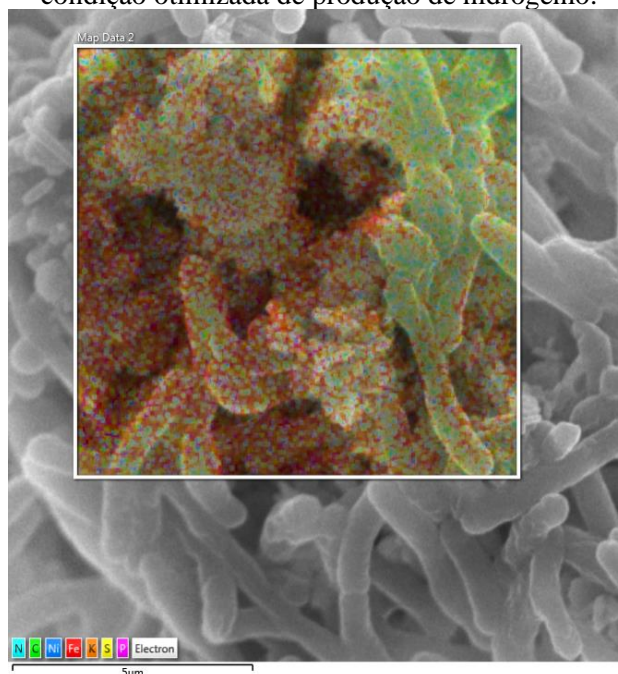


Figura 5.41: EDS da amostra biológica com nanopartículas do reator no ensaio de validação da condição otimizada de produção de hidrogênio.



5.1.6 Quantidade e expressão da hidrogenase na presença de nanopartículas metálicas

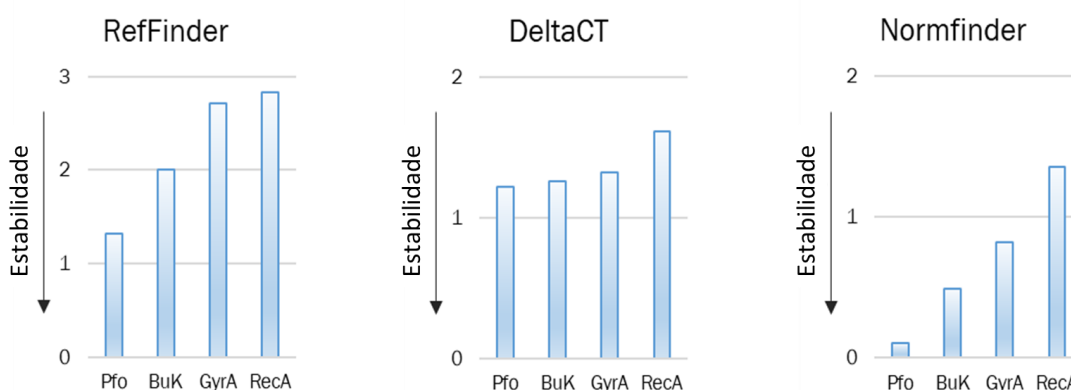
Amostras do experimento de validação (etapa 4c) foram coletadas para realização das análises de qPCR e RT-qPCR. A eficiência de cada primer do qPCR variou de 1,890 até 1,972, estes valores de eficiência próximos a 2,0 são satisfatórios (Pfaffl, 2001). Além disso, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,999 para todos os primers (Tabela 5.8).

Tabela 5.8: Sequência de primers para genes alvo e genes referência

Gene	Sequências dos primers	Tamanho (bp)	Eficiência	R^2
HydA	F: AAATGTGGGGTCTGTGCAGTAG R: GCTGCCACTCTCATCTTTACTCTC	137	1,972	0,9998
Buk	F: GTTGGTAGAGGTGGAATGCT R: CATGAGGTCCTTGAACCTCCTAC	100	1,936	0,9997
Pfo	F: CGCAGCAATCGATAAGGGTGTT R: AGTAGCACCTTGATTGGAGC	103	1,900	0,9997
GyrA	F: GGATTCGGTAAGAGAACTCCTGTC R: GTGGCACCTGTAAGTTTTCCAGTC	110	1,890	0,9997
RecA	F: TAGTGC GTTCTGGAGCTATTG R: CTCGCTTGAAGACCTATATGAGAA	112	1,897	0,9996

A partir do teste de estabilidade dos candidatos a gene de referência (Buk, Pfo, GyrA and RecA), concluiu-se que o gene Pfo é o mais estável nas condições experimentais avaliadas (Figura 5.42). O gene Pfo codifica a enzima piruvato-Fd oxidoreductase, que é essencial para o metabolismo bacteriano, pois catalisa a conversão do piruvato em acetil Co-A, levando à redução da liberação de ferredoxina durante a glicólise (Yang et al., 2016). Assim, foi o gene utilizado como referência para normalizar a expressão gênica da *hydA*, e a produção de H₂ está diretamente envolvida com esta reação.

Figura 5.42: Estabilidade dos candidatos a gene de referência da *Clostridium butyricum* de acordo com os algoritmos RefFinder, delta CT e Normfinder



Em estudos em que o gene Pfo não foi avaliado, GyrA e RecA já foram apontados como os genes mais estáveis para monitorar consórcios artificiais compostos por diferentes *Clostridium* spp. produtores de H₂, incluindo *C. butyricum*. Rabelo et al. (2020) analisaram diferentes genes como referência (GyrB, Pfo e RecA) para *Paraclostridium* sp., uma bactéria da classe Clostridia, e obtiveram Pfo como gene mais estável. Portanto, a utilização do gene Pfo deve ser considerada em outros estudos de PCR envolvendo *C. butyricum hydA*, uma vez que pode contar com maior estabilidade e, conseqüentemente, resultados mais precisos relacionados ao monitoramento da expressão gênica.

5.1.6.1 Quantidade de hidrogenases (qPCR)

A qPCR é considerada altamente sensível para a quantificação de organismos microbianos em amostras ambientais (Tkacz et al., 2018), bem como em reatores fermentativos (Wan et al., 2016). A quantificação dos números de cópias do DNA *hydA* em reatores de fermentação foi realizada de acordo com a Equação 5.3 ($R^2 = 0,9976$).

$$Cq = -3,59 * HydA + 36,21 \text{ (Equação 5.3)}$$

Assumindo que cada célula continha uma cópia de *hydA* (Zhao et al., 2019), o padrão de crescimento de bactérias observado no reator com NPs foi diferente, quando comparado ao

reator controle. Nos reatores contendo NPs, o número de cópias aumentou de $2,6 \cdot 10^9$, na fase de produção de H_2 no início do experimento ($t = 0$), para $9,2 \cdot 10^{10}$ na fase estacionária de produção de H_2 ($t = 26h$). No reator controle (sem NPs), o crescimento bacteriano foi observado até a fase de produção exponencial de H_2 , de $2,6 \cdot 10^9$ ($t = 0$) a $3,7 \cdot 10^{10}$ ($t = 8h$) e estabilização do crescimento ($3,6 \cdot 10^{10}$) foi observada na fase estacionária de produção de H_2 ($t = 26h$).

Zhang et al. (2020) quantificaram o gene *hydA* em reatores em batelada de produção de H_2 por consórcio bacteriano misto e observaram o crescimento bacteriano até a fase exponencial de produção de H_2 , semelhante aos resultados observados no experimento controle do presente estudo. Portanto, pode-se afirmar que as NPs adicionados nos reatores favorecem maior duração do crescimento bacteriano, uma vez que o Ferro e o Níquel fazem parte da constituição celular, incluindo o sítio ativo das enzimas *hydA* (Zhao et al., 2019). O crescimento celular nos reatores NP foi observado durante todas as fases, mesmo na fase estacionária de produção de H_2 , o que pode ter resultado em produção de H_2 mais elevada (434 mL) do que no reator controle (342 mL) (Figura 5.43).

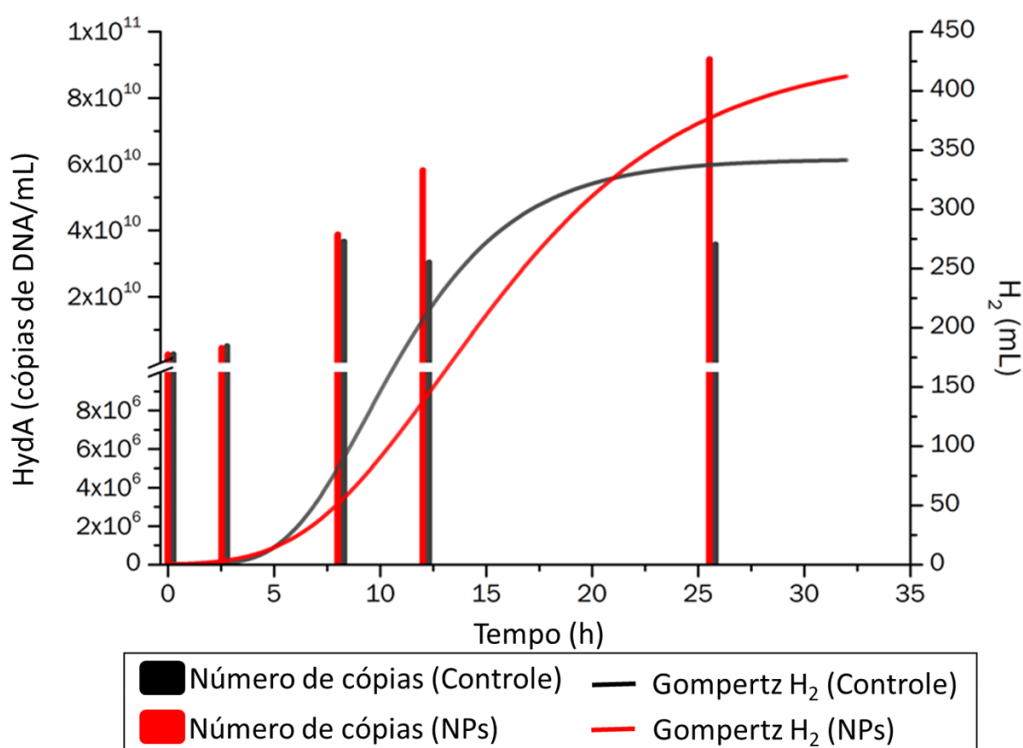


Figura 5.43: Número de cópias de *hydA* durante as fases de produção de hidrogênio nos reatores com NPs e controle

O tempo de geração para *C. butyricum* foi obtido com base nos valores de crescimento bacteriano. No reator com NPs, o tempo de geração foi de 1,6 h e no reator de controle foi de

1,8 h. Os valores estimados de tempo de geração para *C. butyricum*, com glicose como fonte de carbono, foram menores que os tempos de geração de 4,3 h para *C. cellulolyticum* cultivado em celobiose (Braga et al., 2019). Assim, no presente estudo, a fonte de carbono foi determinante para o baixo tempo de geração de *C. butyricum*, independente da adição de NPs.

5.1.6.2 Expressão da hidrogenase (RT-qPCR)

As alterações nos níveis de *hydA* mRNA normalizados com a amostra inicial ($t = 0$) obtidas foram avaliadas para comparar a expressão do gene *HydA* entre os reatores controle e NPs (Figura 5.44). Ou seja, foram evidenciadas quantas cópias de mRNA foram expressas em relação a $t = 0$.

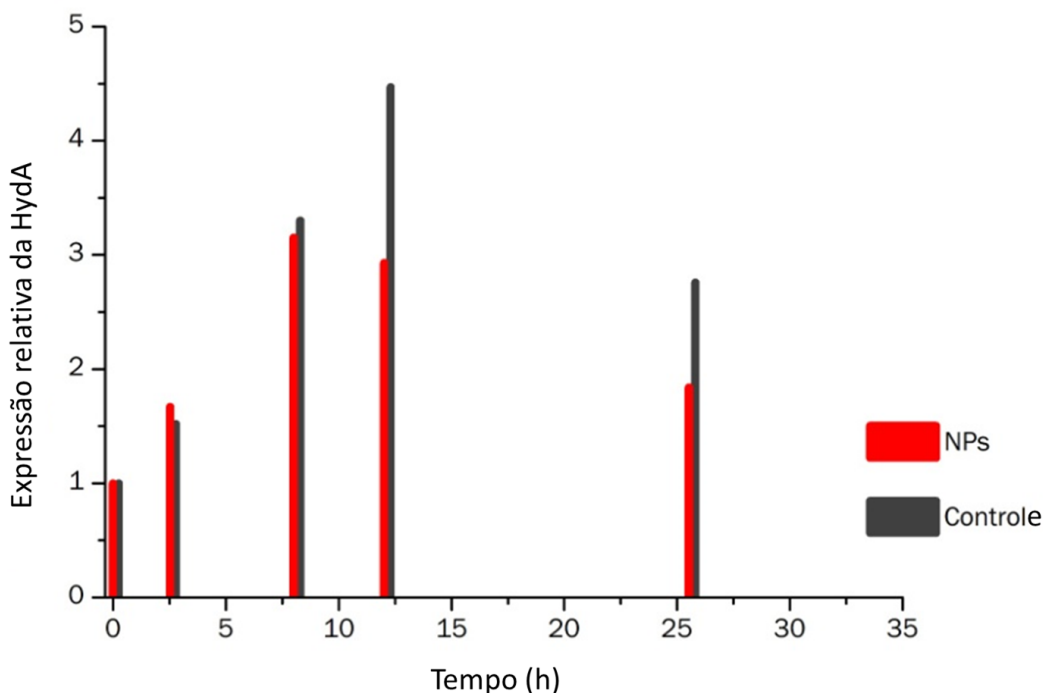


Figura 5.44: Expressão relativa da *hydA* nos reatores NPs e controle

Níveis semelhantes de transcritos de *hydA* foram observados entre os reatores NPs e controle, desde a fase inicial (expressão relativa de 1,5 e 1,7, respectivamente, em $t = 0$) até o início da fase de produção exponencial de H_2 (8h), onde a expressão relativa de *hydA* foi 3,3 e 3,2, nos reatores controle e NPs, respectivamente. No entanto, no final das fases exponencial e estacionária de produção de H_2 , a expressão de *hydA* foi maior no reator controle (4,5 e 2,8, após 12 e 26 h, respectivamente) em comparação ao reator com NPs (2,9 e 1,8, após 12 e 26 h, respectivamente). Ou seja, no reator com NPs, a expressão de *hydA* foi menor do que no reator de controle. Desta forma, a adição de NPs favoreceu a atividade

enzimática de *hydA*, uma vez que o aumento da produção de H_2 foi observado mesmo durante uma menor expressão do gene de *hydA*.

Wang et al. (2008) avaliaram a expressão de *hydA* de *C. butyricum* durante a fermentação da sacarose e observaram que a expressão de *hydA* foi menor durante a fase de maior produção de H_2 . Portanto, a alta produção de H_2 provavelmente resultou da atividade *hydA* remanescente, e não devido ao aumento dos transcritos de mRNA. Em outro estudo, Wang et al. (2008a) adicionaram meio de cultura fresco aos reatores em batelada após a fase estacionária de produção de H_2 por *C. butyricum*. Os autores observaram que a produção de H_2 aumentou após a adição do meio de cultura, mesmo na presença de baixos níveis de expressão do gene *hydA*, provavelmente devido à atividade *hydA* que ainda estava presente no meio.

No presente estudo, a maior produção de H_2 em reatores em batelada também foi relacionada a uma menor expressão de *hydA*, isso significa que o H_2 foi produzido principalmente por *hydA* já existente, ao invés de novos transcritos. Desta forma, as NPs Fe^0 e Ni^0 , metais parte do sítio ativo, indispensáveis para a estabilidade e atividade enzimática (Wodrich e Hu, 2018), foram importantes para manter um maior número de cópias disponíveis e ativas da hidrogenase, em vez de uma maior transcrição do gene durante o estágio de produção exponencial de H_2 (Figura 5.43 e 5.44).

5.2 Fermentação da glicose na presença de nanopartículas metálicas em reator contínuo

5.2.1 Metais

Nos reatores que foram alimentados com glicose, a concentração de metais na cinasita que não passou pelo procedimento de imobilização de Ferro e Níquel foi de 1,65 e 0,01 $mg\ g^{-1}$ de cinasita, respectivamente (Tabela 5.9). Todavia, para a cinasita que passou pelo processo de imobilização de metais obteve-se 16,7 mg de $Fe^0\ g^{-1}$ de cinasita e 0,02 mg de $Ni^0\ g^{-1}$ de cinasita (Tabela 5.9). É possível afirmar que a partir do protocolo modificado de Delgado e Mendez (2012) para imobilização de NPs obteve-se resultados melhores com imobilização do ferro na cinasita, quando comparado ao níquel. Além disso, o consumo de ferro pelas bactérias no RALF - NP pode ser evidenciado pela concentração de metais na

cinasita ao final da operação, que foi de 1,21 mg g⁻¹ de cinasita para o ferro e 0,01 mg g⁻¹ de cinasita para o níquel (Tabela 5.9).

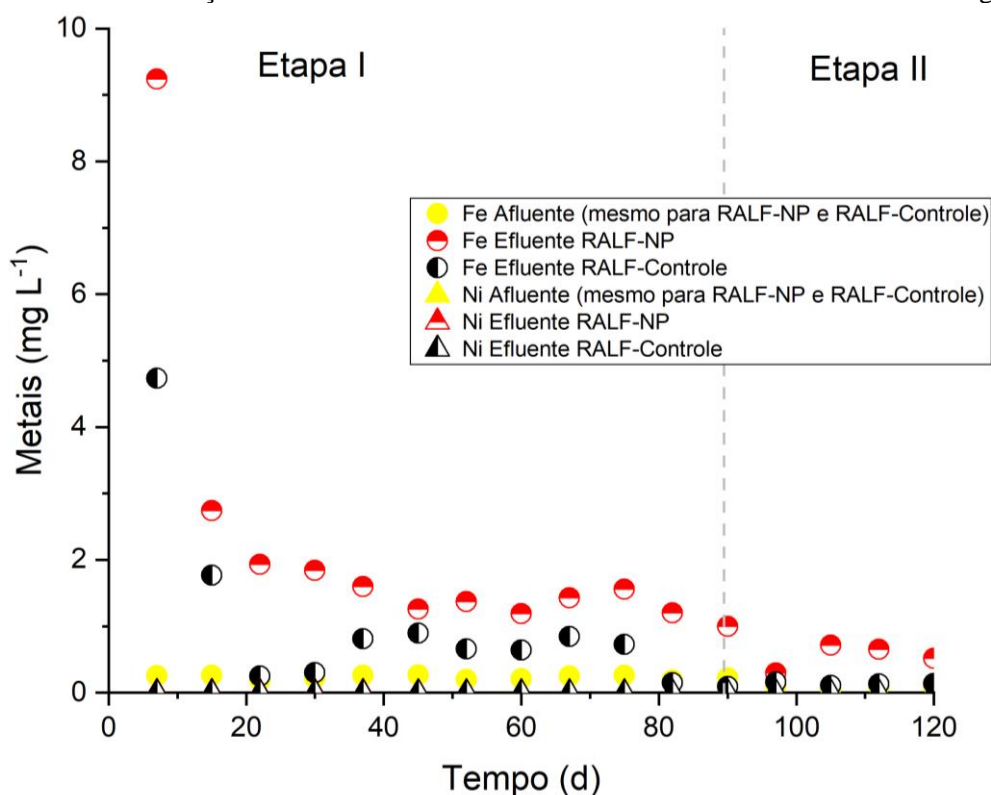
Casals et al. (2014) descreveram o processo de desintegração de NPs de ferro em um reator anaeróbio. Usando difração de raios-X, os autores relataram a dissolução de NPs e a diminuição de seu tamanho durante a produção de biogás. Quando avaliadas as estruturas eletrônicas do ferro, maior teor de Fe⁺³ foi observado, a partir de espectroscopia de absorção de raios-x. Além disso, um menor teor de ferro nas NPs foi observado ao final do processo fermentativo por meio de espectroscopia de perda de energia de elétrons. Neste estudo, o mesmo conteúdo inferior do metal foi observado em cinasita, usando espectroscopia de absorção atômica (Tabela 5.9).

Tabela 5.9: Concentração de metais no material suporte dos RALFs alimentados com glicose

Etapa de operação	Ferro (mg g ⁻¹ de cinasita)		Níquel (mg g ⁻¹ de cinasita)	
	RALF NP	RALF controle	RALF NP	RALF controle
Início	16,7	1,6	0,04	0,01
Final	1,2	1,3	0,01	0,01

A liberação de íons ferro para a fase líquida foi observada tanto no RALF-NP quanto no RALF-Controle, ao longo de todos os dias operacionais (Figura 5.45). No RALF-Controle, provavelmente recebeu a composição original de ferro na cinasita (1,65 mg g⁻¹ - Tabela 5.9). Os valores médios da concentração de ferro no efluente do RALF-NP e do RALF-Controle na Etapa I foram 2,3 ± 1,1 e 1,3 ± 0,7 mg L⁻¹, respectivamente. A diferença de apenas 1 mg L⁻¹ foi suficiente para alterar as vias metabólicas, uma vez que o ferro é um micronutriente importante para as atividades enzimáticas (Lee et al., 2009). Durante o Estágio II, a concentração de ferro no efluente foi menor tanto no RALF-NP (0,9 ± 0,3 mg L⁻¹) quanto no RALF-Controle (0,3 ± 0,1 mg L⁻¹). Provavelmente, a menor atividade fermentativa desencadeou menor utilização de ferro pelos microrganismos e conseqüente menor liberação de ferro para o meio (Lee et al., 2009).

Figura 5.45: Concentração de metais no afluente e efluente dos RALFs alimentados com glicose



Neste estudo, as NPs foram imobilizados em material poroso (argila expandida) e foi evidenciado sua eficácia e consumo por microrganismos (Tabela 5.9 e Figura 5.45). Zhu e Xu, (2016) descreveram a imobilização de NPs em diversos materiais porosos, como grafeno, nanotubos de carbono e sílica. Os autores relataram que, devido à sua alta energia superficial, os NPs tendem a se agregar. Porém, quando utilizado com materiais porosos com alta área superficial, o confinamento espacial pode evitar o ato de aglutinação, favorecendo a catálise de reação na qual essas partículas estão envolvidas. Além disso, os materiais de suporte podem interagir com NPs e modificar suas propriedades catalíticas.

A concentração de ferro no efluente do RALF-NP ($4,7 \pm 1,0$ e $8,1 \pm 1,8$ mg L⁻¹ nas etapas I e II, respectivamente) foi maior quando comparado ao RALF-Controle ($4,3 \pm 0,9$ e $7,2 \pm 0,7$ mg L⁻¹ nas etapas I e II, respectivamente) e provavelmente também com maior concentração de fração estável, pois resultou em maior produção de ácidos orgânicos. Zhong et al. (2020) avaliaram a influência de NPs de magnetita na fermentação de glicose em reator EGSB inoculado com lodo anaeróbico e operado em condições mesofílicas em 6 h HRT. Os autores relataram que os NPs de ferro promoveram a atividade de coenzimas chave, por meio de cadeias condutoras eletrônicas, o que aumentou a eficiência do transporte de elétrons no lodo granular. EGSB_t (com NPs de magnetita), EGSB_{fe} (com ferro solúvel - FeCl₃) e EGSB_c

(controle - sem metais) foram operados por esses autores, e uma maior estabilidade do ferro (fração residual de ferro) foi observada no efluente EGSB_t, quando comparado com EGSB_{fe} e EGSB_c, onde o ferro instável estava principalmente presente (frações solúvel, redutível e oxidável). Portanto, a adição de NPs de Fe₃O₄ pode transferir a fração de ferro do estado instável para o estado estável dentro do lodo, o que formaria cadeias de condução elétrica na superfície das células microbianas para elevar a produção de H₂ e AOV.

Desta forma, a disponibilidade de metais no meio foi essencial para as primeiras etapas da degradação da glicose, que resultou em maior produção de AOV. Fu et al. (2021) avaliaram o efeito sinérgico do Fe-Ni na hidrogenação da glicose. Os autores relataram que Fe e Ni na forma de liga são menos propensos à oxidação do que Fe e Ni monometálicos, de modo que sítios de Fe e Ni metálicos permanecem na superfície dos catalisadores bimetálicos, contribuindo para a divisão do hidrogênio necessário para o processo catalítico. Portanto, a presença de Ni-Fe em conjunto foi favorável à sua estabilidade e liberação de elétrons no meio.

5.2.2 Degradação de matéria orgânica

A simplificação da composição da alimentação não alterou a eficiência de remoção de matéria orgânica no RALF NP, que manteve a média de $8 \pm 5\%$ em ambas as etapas de operação. Enquanto no RALF controle a eficiência de remoção de matéria orgânica aumentou de $6 \pm 4\%$ na etapa I para $14 \pm 10\%$ na etapa II (Tabela 5.9). Este aumento na remoção está relacionado a menor concentração de ácidos orgânicos deste reator nesta etapa. Na operação de reatores acidogênicos, a remoção de matéria orgânica normalmente não ultrapassa 30%, devido as elevadas concentrações de ácidos orgânicos neste reator, e nem chega a ser um objetivo, por esta configuração sempre preceder um sistema metanogênico, onde a remoção de matéria orgânica ocorrerá de forma mais eficiente (Fuess et al., 2017).

Neste estudo as cargas orgânicas específicas e volumétricas no afluente dos RALFs foram de 20 ± 2 gDQO gVS⁻¹ d⁻¹ e 56 ± 6 gDQO L⁻¹ d⁻¹ na Etapa I, e 8 ± 1 gDQO gVS⁻¹ d⁻¹ e 21 ± 2 gDQO L⁻¹ d⁻¹ na Etapa II, respectivamente (Tabela 5.10). Altos valores de carga orgânica afluente, tanto específica quanto volumétrica, são necessários para manutenção de condições acidogênicas em reatores anaeróbios. Paudel et al. (2017) estudaram o efeito de cargas orgânicas na eficiência de reatores acidogênicos e sugeriram cargas orgânicas ≥ 10 gDQO gVS⁻¹ d⁻¹.

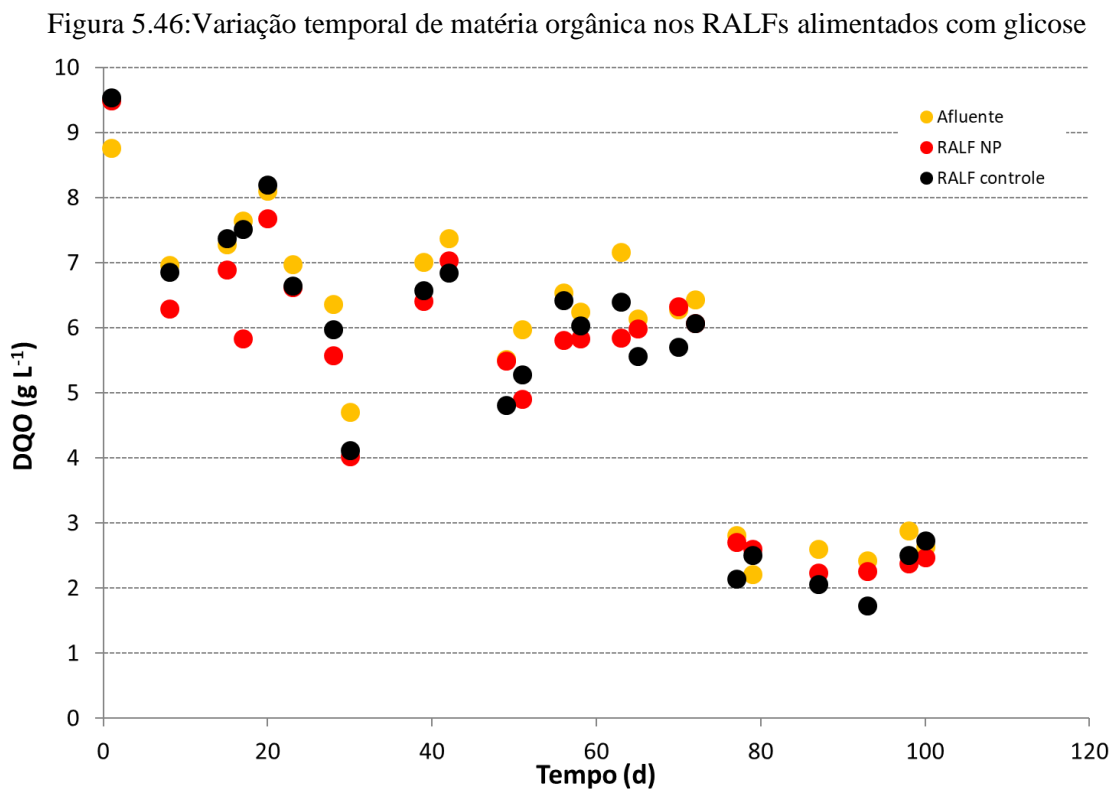
Tabela 5.10: Remoção de matéria orgânica dos RALFs NP e controle alimentados com glicose

Parâmetros	Etapa I			Etapa II		
	Afluente	RALF NP	RALF controle	Afluente	RALF NP	RALF controle
DQO (g L ⁻¹)	7 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	3 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
Remoção (%)	-	8 ± 5	6 ± 4	-	8 ± 5	14 ± 10
Carga Específica* (gDQO gVS ⁻¹ d ⁻¹)	20 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	8 ± 1	1 ± 0	1 ± 1
Carga Volumétrica* (gDQO L ⁻¹ d ⁻¹)	56 ± 6	5 ± 3	3 ± 2	21 ± 2	2 ± 1	3 ± 3

*removida no caso das amostras de efluente.

Observou-se menor remoção de matéria orgânica (6 a 14% para DQO afluente 3-7 g L⁻¹ - Tabela 5.10) em relação aquelas observadas por Amorim et al. (2012), os quais também operaram RALFs com argila expandida como meio suporte, TDH de 2 h e condição mesofílica, porém inoculados com lodo anaeróbico. Os autores utilizaram glicose como substrato e reportaram que a partir de 10 ± 1 g L⁻¹ de matéria orgânica a remoção foi de 16 ± 2%, e para 2,7 ± 0,2 g L⁻¹, a remoção foi de 26 ± 6%. Ou seja, a utilização de autofermentação bioaumentada com *C. butyricum* como estratégia de inoculação prejudicou a eficiência de remoção de matéria orgânica do reator, quando comparado a sistema inoculado com consórcio microbiano anaeróbico, provavelmente devido a menor diversidade de organismos (Jobard et al., 2017) no caso específico dessa pesquisa, em relação a Amorim et al. (2012).

A estabilidade temporal dos parâmetros relacionados a degradação de matéria orgânica pode ser observada na Figura 5.46.



5.2.3 Remoção de carboidratos

A remoção de carboidratos foi estável durante toda a operação (Tabela 5.11 e Figura 5.47). Fato já esperado, por ser um reator alimentado com substrato de fácil degradação (glicose e amido – Etapa I; glicose – Etapa II). A retirada do amido da alimentação favoreceu a remoção de carboidratos que aumentou de $86 \pm 8\%$ para $93 \pm 2\%$ e de $85 \pm 7\%$ para $91 \pm 3\%$ nos RALFs metais e controle, respectivamente, para concentração afluente de carboidratos de $2 \pm 0 \text{ g L}^{-1}$ e $2 \pm 0 \text{ g L}^{-1}$. Ao comparar os reatores entre si, tanto a carga específica de carboidrato removida ($5 \pm 1 \text{ mg gVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ – Etapa I e $6 \pm 0 \text{ mg gVS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ – Etapa II; em ambos os reatores), quanto a carga volumétrica de carboidrato removida ($12 \pm 3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ – Etapa I e $15 \pm 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ – Etapa II; em ambos os reatores) tiveram valores estatisticamente semelhantes (Tukey, $p > 0,05$). Ou seja, a imobilização de metais (ferro e níquel) no material suporte e sua consequente maior disponibilidade não afetaram de forma significativa a eficiência de remoção de carboidratos.

A eficiência de remoção de carboidratos reportada neste estudo (85-93% para 2 g L^{-1} afluente) com glicose em RALF foi similar àquela reportada por Lima et al. (2013), de 84-98% para o mesmo substrato orgânico (2 g L^{-1} afluente) em reator de leito fixo inoculado via

fermentação natural e operado no mesmo TDH (2 h) e em condição mesofílica (25°C). Desta forma, é possível afirmar que a eficiência de remoção de carboidratos facilmente assimiláveis é robusta e se mantém mesmo em diferentes configurações de reatores contínuos com diferentes fontes de inóculo.

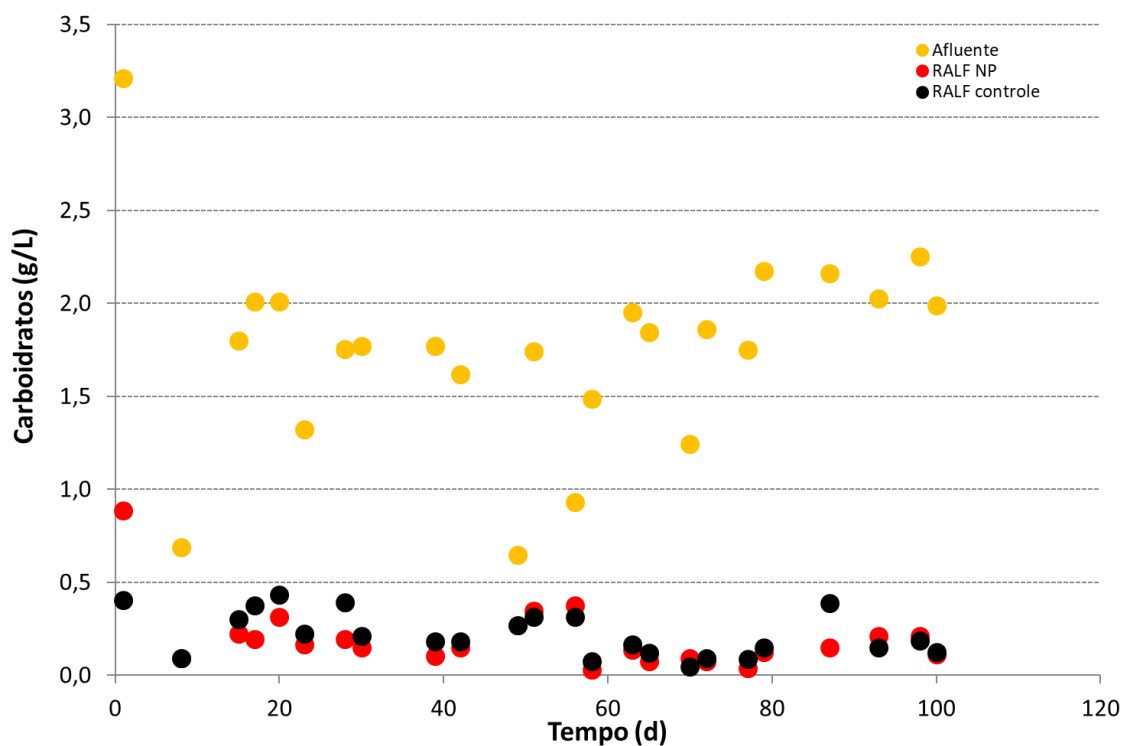
Segundo Won et al. (2013), a produtividade de H₂ depende da concentração de carboidratos e matéria orgânica quando a fermentação ocorre em menor TDH. Maior concentração de substrato pode elevar a produção de H₂, no entanto, concentrações excessivas podem diminuir esta capacidade. Neste estudo, a concentração ótima de carboidratos obtida de ensaios em batelada foi aplicada nos RALFs, mas não resultou em otimização da produção de H₂ (item 5.2.4), provavelmente devido as diferenças na cinética microbiana características entre reatores em batelada e contínuos (Russo et al., 2018).

Tabela 5.11: Remoção de carboidratos nos RALFs alimentados com glicose

Parâmetros	Etapa I			Etapa II		
	Afluente	RALF NP	RALF controle	Afluente	RALF NP	RALF controle
Carboidratos (g L ⁻¹)	2 ± 0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2 ± 0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Remoção (%)	-	86 ± 8	85 ± 7	-	93 ± 2	91 ± 3
Carga Específica* (mgcarb gVS ⁻¹ d ⁻¹)	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0
Carga Volumétrica* (mgcarb L ⁻¹ d ⁻¹)	59 ± 6	12 ± 3	12 ± 3	21 ± 2	15 ± 1	15 ± 1

*removida no caso das amostras de efluente.

Figura 5.47: Variação temporal de carboidratos nos RALFs alimentados com glicose



5.2.4 Biogás

Os valores médios de produção de H_2 durante a etapa I foram de 899 ± 1303 mL e 951 ± 779 mL para os RALF NP e controle, respectivamente (Tabela 5.12). Desta forma, diferentemente dos resultados obtidos em batelada (relatório parcial I), a adição de NPs de ferro e níquel no material suporte de reatores contínuos não favoreceu de forma significativa a produção contínua de biogás (Teste Tukey, $p > 0,05$).

Amorim et al. (2009) avaliaram condições similares a deste estudo ($30^\circ C$, TDH de 2 h, alimentado com 2 g de glicose L^{-1} , com cinasita como meio suporte, inoculado com lodo anaeróbio) em RALF e reportaram produção de H_2 de $1,3$ mL h^{-1} . Wu et al. (2003) também operaram RALF em condições mesofílicas, com argila expandida como meio suporte, TDH de 2 h, inoculado com lodo anaeróbio e alimentado com 2 g L^{-1} de sacarose. Os autores reportaram produção de $0,96$ mL de H_2 h^{-1} . Em ambos os trabalhos foi reportada produção de H_2 menor que a média obtida durante a Etapa I, tanto no RALF NP, quanto no RALF controle (3 ± 1 e 3 ± 1 mL de H_2 h^{-1} , respectivamente). Provavelmente, a adição de co-substratos como a peptona, extrato de levedura e extrato de carne; além do amido e glicose favoreceram a maior produção de biogás durante o processo fermentativo neste estudo, quando comparado a

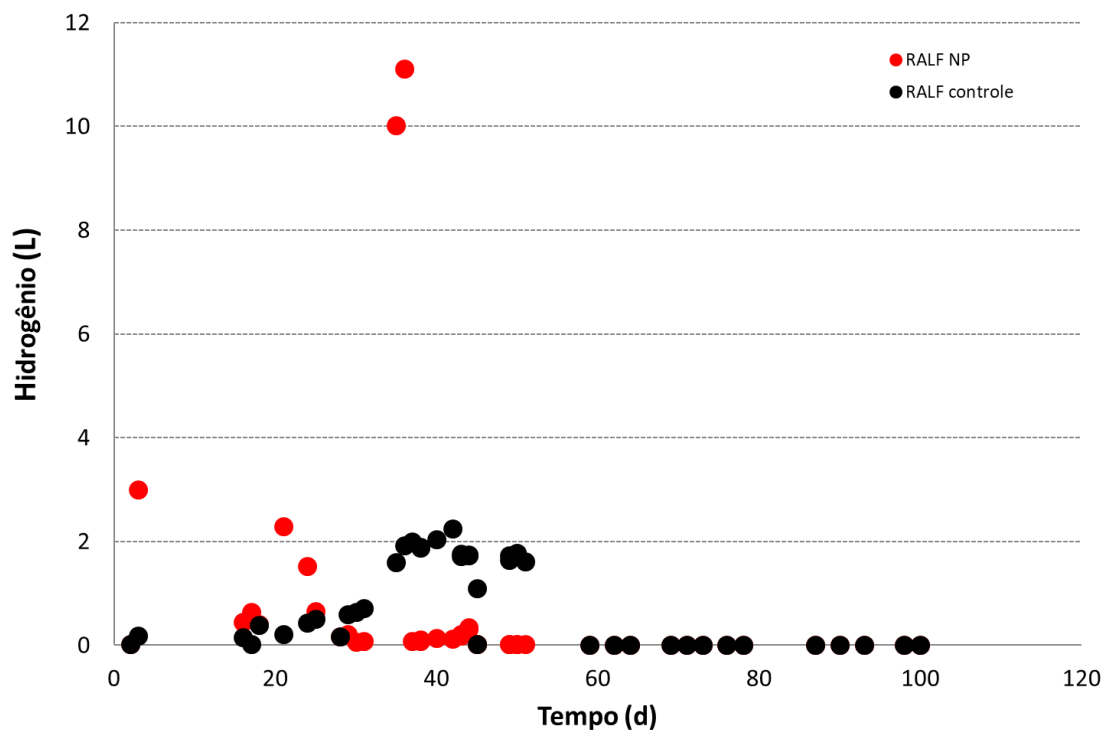
Amorim et al. (2009) e Wu et al. (2003), os quais alimentaram o reator apenas com glicose/sacarose e solução de sais.

Tabela 5.12: Produção de hidrogênio dos RALFs metais e controle alimentados com glicose

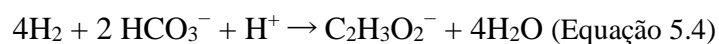
Parâmetros	Etapa I (RCM otimizado)		Etapa II (glicose e ext. de lev.)	
	RALF NP	RALF controle	RALF NP	RALF controle
H ₂ (mL h ⁻¹)	3 ± 1	3 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
H ₂ (mL)	899 ± 1303	951 ± 779	0 ± 0	0 ± 0
H ₂ (%)	74 ± 35	83 ± 28	0 ± 0	0 ± 0

Ao analisar de forma pontual a produção de H₂ (Figura 5.48), no 35° e 36° dias de operação a produção de H₂ foi 10 e 11 L no RALF NP e 2 e 2 L no RALF controle, respectivamente. Nestes dias, a produção de ácidos orgânicos no RALF NP (3,8 e 3,5 gHac L⁻¹) foi menor do que a reportada no RALF controle (6,1 e 6,0 gHac L⁻¹), diferentemente da média durante toda a operação (6,2 gHac L⁻¹ no RALF NP e 4,9 gHac L⁻¹ no RALF controle - item 5.2.5). Nestes dias, a glicose foi fermentada via produção de propiônico (1.393 mg L⁻¹), butírico (1.331 mg L⁻¹) e acético (1.307 mg L⁻¹), além do H₂, no RALF NP. Esta rota foi descrita por Li et al. (2008) ao avaliar a produção de H₂ em pH entre 5,5 e 6,0 (o pH efluente no RALF NP foi de 5,2). Enquanto a rota de degradação da glicose com produção de ácido láctico (1.491 mg L⁻¹) foi favorecida no RALF controle. Esta rota foi descrita por Moreira et al. (2017) ao avaliar a produção de H₂ em ciclos em bateladas utilizando lodo pré-tratado termicamente e foi relacionada a menor produção de H₂ em pH 5 (o pH efluente no RALF controle foi de 4,4).

Figura 5.48: Variação temporal da produção de hidrogênio dos RALFs alimentados com glicose

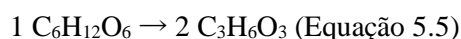


Durante o final da Etapa I (a partir do 59º dia de operação), mesmo com a continuidade dos ácidos acético e butírico como metabólitos principais, menor produção de H₂ foi observada no RALF NP (Figura 5.48). Regueira et al. (2018) reportaram resultados similares e propuseram duas possibilidades: regeneração da ferredoxina sem a formação de H₂ (fenômeno o qual os autores denominaram bifurcação de elétrons) e homoacetogênese. A bifurcação de elétrons, observada em espécies de Clostridia (Jungermann et al., 1973), consiste na utilização dos dois elétrons da ferredoxina em reações anabólicas, provavelmente reações altamente endergônicas nas quais NADH₂ não é um doador de elétrons suficientemente forte. Enquanto, a homoacetogênese consiste no consumo de H₂ com formação de ácido acético (Equação 5.4), o qual foi reportado em função do baixo rendimento de H₂ (Bundhoo and Mohee, 2016; Dinamarca and Bakke, 2009; Fang and Liu, 2002; Guo et al., 2010; Hallenbeck and Ghosh, 2009; Karadag and Puhakka, 2010; Saady, 2013).



Durante a Etapa II, a produção de H₂ nula tanto no RALF NP, quanto no RALF controle, esteve relacionada a produção de ácido láctico como principal metabólito (Moreira et al., 2017), via metabólica de fermentação da glicose que não produz H₂ (Equação 5.5).

Provavelmente, a retirada de co-substratos (extrato de carne, peptona e amido) da alimentação favoreceu esta rota em ambos os reatores.



5.2.5 Produção de ácidos orgânicos

A maior disponibilidade dos metais ferro e níquel, dada a presença de NPs, favoreceu a produção de AOV do processo fermentativo em reator anaeróbico contínuo alimentado com glicose. No presente estudo, maior produção de AOV (78-98%) foi obtida quando NPs de Ferro e Níquel foram adicionados ao reator (Tabela 5.13). Durante a etapa I do RALF-NP, os metabólitos com maior produção foram os ácidos acético ($0,62 \text{ g L}^{-1}$) e butírico ($0,60 \text{ g L}^{-1}$). Enquanto maior produção de ácido láctico ($0,44 \text{ g L}^{-1}$) foi observada durante a etapa II de operação deste mesmo reator. Desta forma, ocorreu uma mudança na rota metabólica, ou seja, quando o amido, o extrato de carne e a peptona foram removidos da composição da alimentação (etapa II), a produção de ácido láctico foi favorecida. Todavia, durante a etapa I, a concentração de ácido láctico no efluente foi menor do que no afluente, ou seja, constatou-se o consumo de ácido láctico ($0,18 \text{ g L}^{-1}$) (Tabela 5.13).

Tabela 5.13: Concentração de ácidos orgânicos no afluente e efluente do reator anaeróbico contínuo alimentado com glicose

	Ácidos (g L^{-1})	AOV total*	Acético	Butírico	Propiônico	Lático	Valérico
Etapa I	Afluente	4.86 ± 1.08	0.60 ± 0.21	0.44 ± 0.10	0.92 ± 0.27	0.76 ± 0.34	0.46 ± 0.11
	RALF-NPs	6.23 ± 1.52	1.22 ± 0.33	1.04 ± 0.37	0.99 ± 0.54	0.58 ± 0.19	0.57 ± 0.24
	RALF-Controle	4.89 ± 1.48	0.94 ± 0.32	0.54 ± 0.27	0.84 ± 0.39	1.23 ± 0.25	0.97 ± 0.17
Etapa II	Afluente	0.69 ± 0.25	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.21 ± 0.06	0.10 ± 0.01	0.00 ± 0.00
	RALF-NPs	1.87 ± 0.41	0.15 ± 0.02	0.46 ± 0.12	0.27 ± 0.05	0.53 ± 0.10	0.00 ± 0.00
	RALF-Controle	0.95 ± 0.06	0.17 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.39 ± 0.20	0.01 ± 0.01

*($\text{g Hac}_{\text{eq}} \text{ L}^{-1}$)

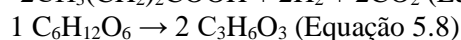
Braga et al. (2020) avaliaram a influência dos metais ferro, níquel e selênio na produção de ácidos butírico e acético a partir da co-digestão de glicose e substratos celulósicos por *C. butyricum* em reatores em batelada. Maior concentração de AOV ($3,23$ e $5,56 \text{ g L}^{-1}$ dos ácidos butírico e acético, respectivamente) foi observada no ensaio com $25 \mu\text{M}$ Fe no meio, quando comparado a ensaios com $25 \mu\text{M}$ Fe + $1 \mu\text{M}$ Ni ($3,17$ e $5,10 \text{ g L}^{-1}$ dos

ácidos butírico e acético, respectivamente); 25 μM Fe + 1 μM Ni + 1 μM Se (3,61 e 4,03 g L^{-1} dos ácidos butírico e acético, respectivamente) e Controle - sem adição de metais (2,81 e 2,92 g L^{-1} dos ácidos butírico e acético, respectivamente). Os autores concluíram que ferro, níquel e selênio foram importantes co-fatores para hidrogenase e para maior produção de AOV, resultado semelhante ao relatado neste estudo, com reator contínuo alimentado com glicose e NPs de Fe^0 e Ni^0 no material de suporte.

Neste estudo, o maior rendimento de H_2 foi relacionado com a via do ácido acético, enquanto o menor rendimento de H_2 foi relacionado com a via do ácido láctico. Sewwandi e Nitorisavut (2020) estudaram ferro zero valente suportado por quitosana como um catalisador para melhorar a produção de AOV em reatores batelada. A fermentação foi realizada por *Enterobacter aerogenes* utilizando glicose como fonte de carbono em condição mesofílica (37°C). A distribuição de AOV relacionou a via acética com a produção de H_2 , resultando em uma correlação positiva entre o rendimento de H_2 e a concentração de ácido acético.

Mudanças nas rotas metabólicas foram observadas com a adição de NPs, assim como, de acordo com a composição do meio. A transição da rota relacionada com a produção de ácido acético-butírico (Equações 5.6 e 5.7) para aquela relacionada com a produção de ácido láctico (Equação 5.8) é frequentemente relatada como prejudicial à produção de H_2 [34], o que explica a menor produção de H_2 em reator durante esta fase (Figura 5.48).

Maior produção de ácido valérico (0,51 g L^{-1}) e ácido láctico (0,45 g L^{-1}) foi observada no RALF-Controle, durante a etapa I. Enquanto isso, na etapa II, o ácido láctico (0,29 g L^{-1}) foi o metabólito predominante. Desta forma, é possível afirmar que a retirada dos co-substratos da alimentação favoreceu a rota de produção de ácido láctico, tanto na presença de NPs imobilizadas no leito do reator, quanto na sua ausência.



Shida et al. (2009) estudaram a produção de AOV em RALF alimentado com 2 g de glicose L^{-1} , além de solução nutritiva (incluindo metais) a 30°C , TDH de 2 h e inoculado com lodo anaeróbio. Os autores relataram como metabólitos principais os ácidos butírico (1,01 g L^{-1}) e acético (0,52 g L^{-1}). Assim, a proporção butírico/acético (B: A) foi de 2:1 e diferente das obtidas no RALF-NP (1:1) e RALF-Controle (1:2) durante a etapa I deste estudo.

Provavelmente, as diferenças metabólicas foram atribuídas a diferentes microrganismos realizando o processo fermentativo.

Zhong et al. (2020) avaliaram o efeito da adição de Fe_3O_4 NPs em reatores EGSB alimentados com glicose, em condições mesofílicas, TDH de 6 h e inoculados com lodo anaeróbio. Os autores relataram que, quando NPs foram adicionadas, a concentração de butirato diminuiu de 0,42 para 0,19 g L^{-1} , a concentração de acetato e etanol aumentou de 0,31 para 0,39 g L^{-1} e de 0,52 para 0,72 g L^{-1} , respectivamente, após 20 dias de operação. Ou seja, a adição de NPs alterou a rota fermentativa que estava relacionada a produção de butírico para rota relacionada a produção de etanol. Portanto, neste estudo, um inóculo diferente (autofermentação e bioaugmentação de *C. butyricum*) e uma maior taxa de fluxo de recirculação foram os parâmetros que influenciaram nas vias metabólicas, quando comparados a Zhong et al. (2020). Além disso, a mudança no tipo de fermentação da rota relacionada ao ácido láctico para a rota relacionada aos ácidos butírico e acético foi observada com a adição de NPs.

5.2.6 pH e alcalinidade

A não adição de bicarbonato na alimentação, resultou em baixos valores de alcalinidade parcial durante a etapa I, tanto no RALF NP ($6 \pm 11 \text{ mg L}^{-1}$), quanto no RALF controle ($11 \pm 22 \text{ mg L}^{-1}$), além de alto desvio padrão (instabilidade) nos valores. Durante a etapa II a alcalinidade parcial foi nula em ambos os RALFs (Tabela 5.14). A relação custo/benefício do uso de bicarbonato é alta, dado que apesar de caro, a instabilidade na alcalinidade não prejudica o processo fermentativo acidogênico, já que a alcalinidade é garantida pela presença de ácidos orgânicos (alcalinidade intermediária) (Parawira et al., 2007).

A geração de alcalinidade intermediária foi observada na Etapa I com valores afluente, RALF NP e RALF controle de 265 ± 93 , 942 ± 402 e $510 \pm 495 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. No entanto, ao retirar os co-substratos (etapa II) e diminuir a eficiência do processo fermentativo (menor produção de ácidos orgânicos quando comparado a etapa I – Tabela 5.13), a alcalinidade intermediária passou a não ser mais gerada e os valores afluente, RALF NP e RALF controle foram de 76 ± 33 , 11 ± 19 e $0 \pm 0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

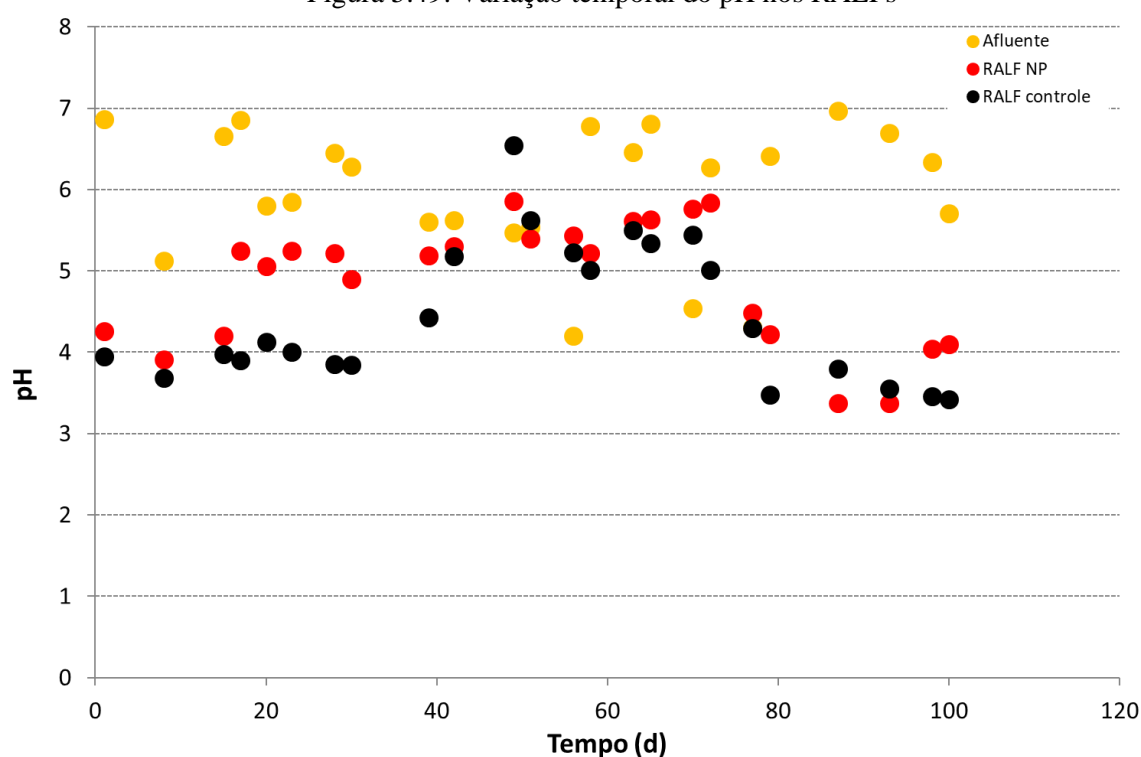
Tabela 5.14: pH e alcalinidade nos RALFs NP e controle alimentados com glicose

Parâmetros (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	Etapa I (RCM otimizado)			Etapa II (glicose e ext. de lev.)		
	Afluente	RALF NP	RALF controle	Afluente	RALF NP	RALF controle
pH*	6,0 ± 0,6	5,2 ± 0,4	4,7 ± 0,7	6,1 ± 0,7	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,3
Alcalinidade Parcial	33 ± 31	6 ± 11	11 ± 22	14 ± 10	0 ± 0	0 ± 0
Alcalinidade Total	265 ± 93	942 ± 402	510 ± 495	76 ± 33	11 ± 19	0 ± 0

*adimensional

O pH do reator com NP esteve ligeiramente mais elevado ($5,2 \pm 0,4$ – Etapa I e $3,9 \pm 0,4$ – Etapa II) quando comparado ao pH do RALF controle ($4,7 \pm 0,7$ – Etapa I e $3,7 \pm 0,3$ – Etapa II) (Tabela 5.14 e Figura 5.49). A presença de NPs metálicas pode influenciar o pH do meio e muitas vezes é um dos fatores que está associado a maior produtividade de H₂ (Llorca e Idriss, 2011).

Figura 5.49: Variação temporal do pH nos RALFs



5.2.7 Sólidos Suspensos

Ao avaliar os sólidos suspensos, é possível verificar ligeiro escape de sólidos no efluente, provavelmente devido a elevada agitação característica da configuração de reatores fluidificados (Moharram et al., 2019). Tanto na Etapa I, quanto na Etapa II, a diferença estatística (Teste Tukey – $p > 0,05$) não foi significativa quando comparada a concentração de

sólidos suspensos no efluente do RALF NP com a do efluente no RALF controle (Tabela 5.15).

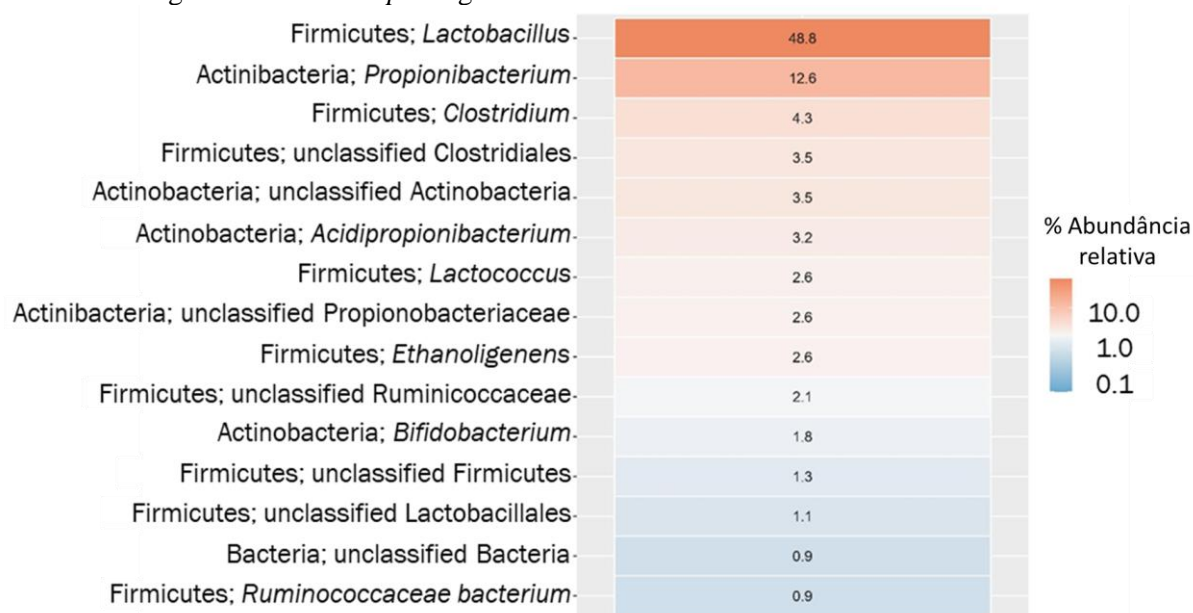
Tabela 5.15: Sólidos nos RALFs NP e controle alimentados com glicose

Parâmetros (g L ⁻¹)	Afluente	RALF NP	RALF controle	Afluente	RALF NP	RALF controle
Sólidos Suspensos Totais	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Sólidos Suspensos Voláteis	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1

5.2.8 Metagenoma do biofilme do reator contínuo

5.2.8.1 Taxonomia

Embora a bioaugmentação com *C. butyricum* tenha sido realizada no RALF, a autofermentação favoreceu o crescimento de outros gêneros bacterianos, uma vez que o gênero mais abundante (48,8%) observado no biofilme de argila expandida, ao final da operação do RALF-NP, foi o *Lactobacillus* (Figura 5.50). De acordo com Rajab et al. (2020), *Lactobacillus* são bactérias em forma de bastonete, não formadoras de esporos e conhecidas como anaeróbios aerotolerantes, adaptando-se assim a condições microaerofílicas, dada a alta taxa de fluxo de recirculação da configuração RALF durante a autofermentação. Este gênero se caracteriza pela capacidade de produzir ácido lático como subproduto do metabolismo da glicose, sendo compatível com as análises de produção de AGV observadas neste estudo. (Carosia et al., 2017) também operaram RALF alimentado com glicose em condições mesofílicas e 2 h de TDH, porém inoculado com lodo anaeróbio. Os autores relataram *Lactobacillus* como o segundo gênero mais abundante (15%) no biofilme que se formou utilizando pneus como material suporte, depois de *Ethanoligenens* (57%), que teve abundância de 2,6% no biofilme deste estudo (Figura 5.50).

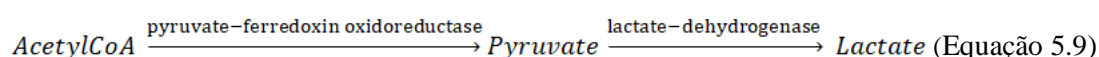
Figura 5.50: *Heatmap* dos gêneros mais abundantes no biofilme do RALF-NP

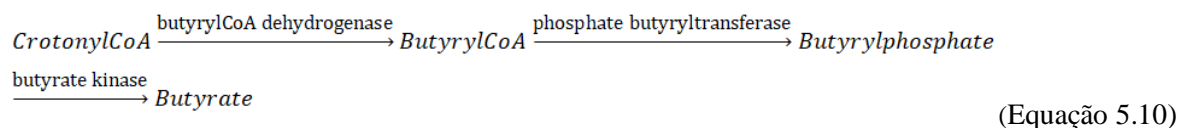
Propionibacterium é desejável em reatores acidogênicos cujo propósito é a produção de ácido propiônico e vitamina B12, e é comumente aplicado como cultura pura em reatores anaeróbios de engenharia metabólica (Hedayati et al., 2020; McCubbin et al., 2020; P. Wang et al., 2020; Z. Wang et al., 2020). Este gênero foi o segundo mais abundante no biofilme do RALF-NP neste estudo (12,6% - Figura 5.50). Além disso, o ácido propiônico foi o terceiro ácido mais presente (Tabela 5.13), tanto na Etapa I - $0,99 \pm 0,54 \text{ g L}^{-1}$ (após os ácidos acético - $1,22 \pm 0,33 \text{ g L}^{-1}$ e butírico - $1,04 \pm 0,37 \text{ g L}^{-1}$) quanto na Etapa II - $0,27 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ (após os ácidos láctico - $0,53 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ e butírico - $0,46 \pm 0,42 \text{ g L}^{-1}$). Desta forma, a presença de NPs na cinasita do RALF alimentado com glicose favoreceu o cultivo de *Propionibacterium* e a produção de ácido propiônico.

O gênero *Clostridium* utilizado na inoculação do reator foi o terceiro gênero mais abundante no biofilme do RALF-NP (4,3%). Uma vez que esses microrganismos são caracterizados por fermentar glicose, principalmente, em H_2 e ácidos butírico e acético, os resultados do metagenoma estão em concordância com a produção de AOV (Tabela 5.13). Além disso, este metabolismo / predominância de microrganismos foi mantido até o 58 ° dia de operação do RALF-NP, ou seja, quando foi observada a produção de H_2 (Figura 5.48). Em seguida, a via metabólica mudou para produção de H_2 nula e rota de produção de ácido láctico, provavelmente quando *Lactobacillus* foi favorecido e superou a abundância relativa de *Clostridium* na comunidade microbiana do biofilme. Essa mudança de comunidades é

Bactérias semelhantes ao gênero *Lactobacillus* foram as que apresentaram maior abundância relativa (48,8% - Figura 5.51) e maior número de genes relacionados à presença de ferro (K04069: piruvato-formiato liase, K00925: acetato quinase, K00873: piruvato quinase, K00850: 6-fosfofrutoquinase, K00845: glucoquinase, K00626: acetil-CoA C-acetiltransferase, K00625: fosfato acetiltransferase, K00074: 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase, K00016: L-lactato desidrogenase - Figura 5.51). No entanto, uma vez que esses organismos estão relacionados à produção de ácido láctico, e esse metabólito estava presente tanto no efluente do RALF-NP quanto no efluente do RALF-Controle, provavelmente sua atividade foi favorecida, não apenas por causa da disponibilidade de ferro, mas também pela condição microaerofílica da configuração do reacional.

O maior rendimento com NPs de ferro ($170 \text{ mLH}_2 \text{ gDQO}^{-1}$), quando comparada ao Controle (sem NPs - $125 \text{ mLH}_2 \text{ gDQO}^{-1}$) em reatores descontínuos inoculados com *C. butyricum* e alimentados com RCM modificado, em pH inicial 6,8 e 37°C , foi relatado por Moura et al. (2020). Neste estudo, as mesmas condições foram aplicadas em uma configuração de reator contínuo (RALF-NP) e os genes K03737 e K00248 foram identificados como simultaneamente relacionados à presença de ferro e bactérias semelhantes ao gênero *Clostridium*. Ambos os genes representam enzimas intermediárias da fermentação da glicose para atingir metabólitos finais (AOV). O gene K03737 refere-se a piruvato-ferredoxina oxidoreductase, uma enzima caracterizada como responsável pela conversão de acetil-CoA em piruvato e, posteriormente, o piruvato é convertido em lactato pela enzima K00016-lactato-desidrogenase (Equação 5.9). O gene K00248 está relacionado à butiril-CoA desidrogenase, uma enzima que converte crotonil-CoA em butiril-CoA, que é posteriormente convertida em butirilfosfato (K00634-fosfato butiriltransferase) e, finalmente, em ácido butírico por K00929-butirato quinase (Equação 5.10) (Lu Zhang et al., 2020). Bactérias semelhantes a *Clostridium* não foram relacionadas com as enzimas usadas na segunda etapa da equação 5.7 (K00016: L-lactato desidrogenase) e 5.8 (K00634: fosfato butiriltransferase e K00929: butirato quinase) (Figura 5). Portanto, a autofermentação com bioaugmentação de *C. butyricum* permitiu ao consórcio microbiano obter ácido láctico e butírico como produtos finais.

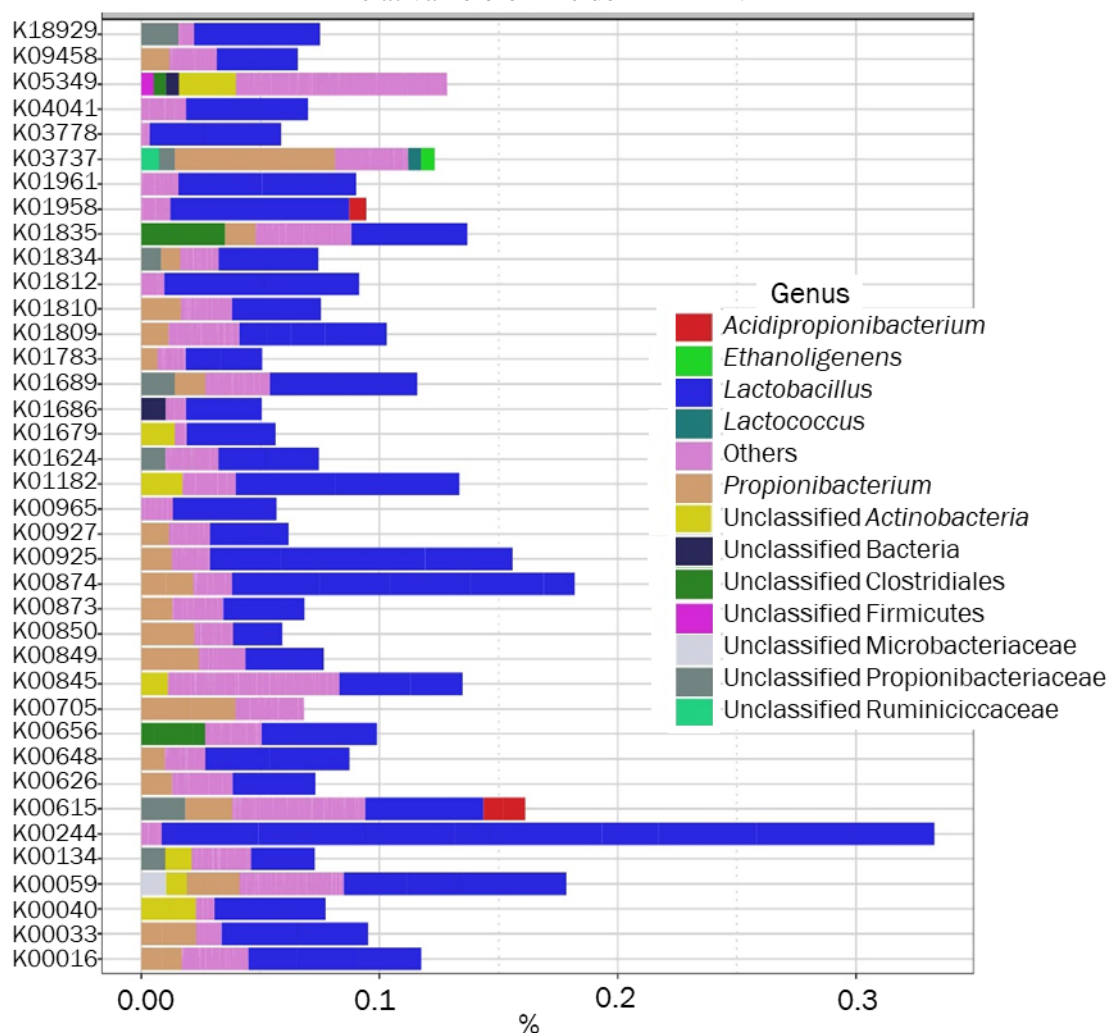




5.2.8.3 Genes relacionados ao níquel

Na Figura 5.52 é possível observar abundâncias relativas de enzimas relacionadas a biodisponibilidade de níquel (Lu et al., 2020). K00244 - flavoproteína fumarato redutase foi a enzima que apresentou maior abundância relativa (0,33%) e foi principalmente (0,31%) identificado em bactérias semelhantes ao gênero *Lactobacillus*. Essa enzima utiliza quinóis de baixo potencial, como menaquinol e rodoquinol, para reduzir o fumarato como etapa final de uma cadeia respiratória anaeróbia. Koendjiharie e Van Kranenburg, (2019) relataram a flavoproteína fumarato redutase como envolvida na bifurcação de elétrons, processo que provavelmente ocorreu no reator RALF-NP.

Figura 5.52: Taxonomia bacteriana relacionada a biodisponibilidade de níquel e sua abundância relativa no biofilme do RALF - NP

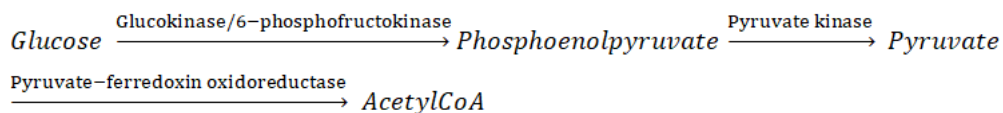


A segunda, terceira e quarta enzima relacionada ao níquel de maior abundância foram, respectivamente, K00874 - gene 2-desidro-3-desoxigluconocinase, K00059 - 3-oxoacil redutase e K00615 - transquetolase (Figura 5.52). De acordo com os módulos KEGG, o gene 2-desidro-3-desoxigluconocinase está relacionado à degradação da pectina, o gene 3-oxoacil redutase está relacionado à biossíntese e alongamento de ácidos graxos e o gene da transquetolase está relacionado à biossíntese de aminoácidos.

5.2.8.4 Genes relacionados a sinergia entre ferro e níquel

O efeito sinérgico de ferro e níquel foi evidenciado em genes relacionados à glicólise: K00845 [glucoquinase], K00850 [6-fosfofrutocinase], formação e degradação de ácido pirúvico: K00873 [piruvato quinase], K03737 [piruvato-ferredoxina oxidoreductase] (Equação

5.11) (Park et al., 2021). Assim, além da abundância relativa das enzimas relacionadas a degradação da glicose, as quais foram associados à presença sinérgica de ferro e níquel no RALF-NP, também foi observada maior produção total de AOV nas Etapas I e II ($6,23 \pm 1,52$ e $1,87 \pm 0,41 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente), quando comparado ao RALF-Controle ($4,89 \pm 1,48$ e $0,95 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente).

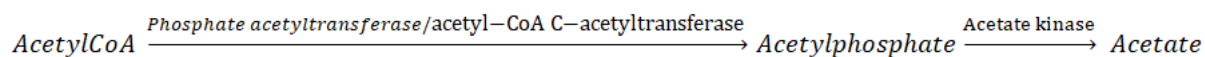


(Equação 5.11)

Lactobacillus contribuiu 0,36, 0,33 e 0,29% na expressão dos genes da glucoquinase, 6-fosfoftuctoquinase e piruvato quinase, respectivamente. Enquanto isso, *Propionibacterium* contribuiu com 58% para a expressão do gene piruvato-ferredoxina oxidoreductase. Rodríguez et al. (2020) estudaram a resposta de *Lactobacillus* à exposição a NPs de óxido metálico, como óxido de ferro (Fe_2O_3), dióxido de silício (SiO_2), dióxido de titânio (TiO_2) ou óxido de zinco (ZnO). A microscopia confocal detectou fortes interações bactérias-NP. Liu et al., (2020) realizaram análises proteômicas para avaliar as vias metabólicas de bactérias semelhantes ao gênero *Propionibacterium* e relataram subsistemas de transporte de níquel e ferro por *quorum sensing* e transportadores ABC, respectivamente. Xie et al. (2019) relataram *Lactobacillus* e *Propionibacterium* como um consórcio eficiente na co-fermentação de farelo de trigo para a produção in situ de vitamina B12. Neste estudo, *Lactobacillus* e *Propionibacterium* foram favorecidos na presença de NPs de níquel e ferro e provavelmente trabalharam juntos nas primeiras etapas de fermentação da glicose (Figura 5.51, Figura 5.52).

O efeito sinérgico de ferro e níquel foi evidenciado em K00925 [acetato quinase], K00625 [fosfato acetiltransferase] e K00626 [acetil-CoA C-acetiltransferase]. As enzimas bacterianas acetato quinase (K00925) e fosfato acetiltransferase (K00625) formam uma via chave para a síntese do metabólito intermediário acetil-CoA, a partir do acetato ou para a geração de ATP do excesso de acetil-CoA (Equação 5.12) (Smith et al., 2006). Esse resultado condiz com a maior produção de ácido acético ($1,22 \pm 0,33 \text{ g L}^{-1}$) no RALF-NP quando comparado ao Controle ($0,94 \pm 0,32 \text{ g L}^{-1}$), observada na Etapa I. Satar et al. (2020) avaliaram o desempenho do cátodo de espuma de níquel-ferro (Ni-Fe) em sistema bioeletroquímico para produção de H_2 , a partir de efluente de fermentação de glicose, usando lodo anaeróbico de efluente de fábrica de óleo de palma como fonte de inóculo. Os autores observaram o ácido acético como principal produto metabólico. Portanto, a maior biodisponibilidade de níquel e

ferro também esteve relacionada à maior produção de ácido acético, conforme relatado neste estudo.



Equação 5.12

Organismos semelhantes ao gênero *Lactobacillus* foram um dos principais envolvidos na ocorrência da Equação 5.12, e contribuíram com 0,70, 0,40 e 0,85% para a expressão das enzimas fosfato acetiltransferase, acetil-CoA C-acetiltransferase e acetato quinase, respectivamente (Figura 5.51 e Figura 5.52). Li et al. (2021) compararam os efeitos das bactérias relacionadas a produção dos ácidos acético e láctico na diversidade microbiana e nas vias funcionais da massa, conforme revelado pelo sequenciamento metagenômico de alto rendimento. Os autores utilizaram farinha de trigo comercial como inóculo e verificaram que as espécies de *Lactobacillus* são favorecidas no metabolismo de carboidratos e uma correlação positiva foi observada entre o conteúdo de ácido acético e a abundância relativa de *Lactobacillaceae*. Neste estudo, também foi observada relação do gênero *Lactobacillus* com a produção de ácido acético.

5.3 Fermentação da vinhaça na presença de nanopartículas metálicas em reator contínuo

5.3.1 Metais

Nos reatores que foram alimentados com vinhaça, a concentração de Ferro e Níquel na cinasita com metais imobilizados adicionada ao RALF - NP foi de 45,1 mg de ferro g⁻¹ de cinasita e 4,2 mg de níquel g⁻¹ de cinasita. Ao analisar a cinasita adicionada ao RALF - Controle, que não passou pelo processo de imobilização de metais, a concentração foi de 1,4 mg de ferro g⁻¹ de cinasita e <0,008 mg de níquel g⁻¹ de cinasita (Tabela 5.16). Desta forma, é possível afirmar que a imobilização de metais na cinasita foi bem sucedida, porém com maior facilidade para a sedimentação do ferro do que para o níquel. Ao final da operação dos reatores, a concentração de metais na cinasita foi de 0,4 mg de ferro g⁻¹ de cinasita e <0,008 mg de níquel g⁻¹ de cinasita no RALF - NP e 0,8 mg de ferro g⁻¹ de cinasita e <0,008 mg de níquel g⁻¹ de cinasita no RALF controle (Tabela 5.16). Ou seja, o consumo dos metais imobilizados foi efetivo, e o consumo de ferro já existente na cinasita (cinasita do RALF -

Controle) também aconteceu, apesar de que em menor escala quando comparado a porção que foi imobilizada (cinasita do RALF - NP).

Tabela 5.16: Concentração de metais no material suporte dos RALFs alimentados com vinhaça

Etapa de operação	Ferro (mg g^{-1} de cinasita)		Níquel (mg g^{-1} de cinasita)	
	RALF NP	RALF controle	RALF NP	RALF controle
Início	45,1	1,4	4,2	<0,008
Final	0,4	0,8	<0,008	<0,008

A concentração de ferro já presente na vinhaça afluyente foi de $3,0 \pm 1,9$, $3,9 \pm 1,3$ e $6,1 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$ nas etapas I, II e III, respectivamente. As concentrações de ferro no efluente foram maiores que a afluyente tanto no RALF controle ($3,3 \pm 0,5$; $4,3 \pm 0,9$ e $7,2 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$ nas etapas I, II e III, respectivamente), quanto no RALF NP ($6,2 \pm 0,6$; $4,7 \pm 1,0$ e $8,1 \pm 1,8 \text{ mg L}^{-1}$ nas etapas I, II e III, respectivamente) (Tabela 5.17). Ou seja, mesmo no RALF controle, houve oxidação de ferro no meio, sendo este um processo característico do tratamento da vinhaça (Fregolente et al., 2020). Tal resultado também condiz com aqueles reportados por Junior et al. (2019). Os autores observaram que o tratamento anaeróbico da vinhaça conserva os micronutrientes (incluindo o ferro), permitindo a continuidade do seu uso na fertirrigação. Além disso, os metais solúveis podem também acumular no efluente recirculado. Todavia, é possível observar que o ferro presente na vinhaça não foi suficiente e quantidades maiores e estatisticamente significativas foram liberadas das NPs incorporadas ao material suporte no efluente do RALF NP nas etapas I ($3,3 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ no RALF controle *versus* $6,2 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ no RALF NP) e III ($7,2 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$ no RALF controle *versus* $8,1 \pm 1,8 \text{ mg L}^{-1}$ no RALF NP).

Tabela 5.17: Concentração de metais nos RALFs NP e controle

	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Ferro (mg L^{-1})			
Afluyente	$3,0 \pm 1,9$	$3,9 \pm 1,3$	$6,1 \pm 0,7$
RALF NP	$6,2 \pm 0,6$	$4,7 \pm 1,0$	$8,1 \pm 1,8$
RALF controle	$3,3 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,9$	$7,2 \pm 0,7$
Níquel (mg L^{-1})			
Afluyente	<0,008	<0,008	<0,008
RALF NP	<0,008	<0,008	<0,008
RALF controle	<0,008	<0,008	<0,008

Zhong et al. (2020) avaliaram a influência de NPs de magnetita na fermentação de glicose em reator EGSB inoculado com lodo anaeróbico e operado em TDH de 6 h. Os autores reportaram que as NPs de ferro promoveram a atividade de co-enzimas chave e produtos

microbianos solúveis, através de cadeias de condução eletrônica, que aumentaram a eficiência do transporte de elétrons no lodo granular. Três reatores foram operados, a saber, EGSB_t - NPs de magnetita foram adicionadas; EGSB_{fe} – Suplementado com cloreto férrico (ferro na forma solúvel) e EGSB_c – sem a suplementação de ferro. A maior estabilidade do ferro (fração residual) no efluente do EGSB_t foi observada quando comparada ao EGSB_{fe} e EGSB_c, cuja fração de ferro instável foi maior (fração solúvel, reduzível e oxidável). Desta forma, o uso de NPs foi efetivo na transferência de frações instáveis para frações estáveis em relação a distribuição das especiações do ferro. Por meio desta transferência tem-se maior formação de cadeias condutoras de elétrons na superfície de células microbianas, aumentando a bioconversão de carboidratos em ácidos orgânicos e biogás. Neste estudo, a concentração de ferro no efluente do RALF NP ($6,2 \pm 0,6$; $4,7 \pm 1,0$ e $8,1 \pm 1,8$ mg L⁻¹ nas etapas I, II e III, respectivamente) foi maior quando comparada ao RALF controle ($3,3 \pm 0,5$; $4,3 \pm 0,9$ e $7,2 \pm 0,7$ mg L⁻¹ nas etapas I, II e III, respectivamente) e, provavelmente, também com maior concentração de fração estável, pois resultou em maior produção de biogás (item 5.3.4) e de ácidos orgânicos (item 5.3.5).

Izadi et al. (2020) estudaram o efeito da suplementação de diferentes concentrações (0,5 - 5 mg L⁻¹) de metais (cobre, cobalto, zinco e ferro) e vitaminas (biotina, B1, B2, B3, B6 e B12) na digestão anaeróbia de resíduos sólidos municipais e obtiveram produção de metano 30% maior no meio com metais, quando comparado a sistemas suplementados apenas com vitaminas. Os autores avaliaram reatores em batelada inoculado com lodo anaeróbio a 35°C. Neste estudo, a suplementação com metais resultou em até 37% maior composição de H₂ no biogás na Etapa III (8 g de carboidratos L⁻¹) de operação (item 5.3.4).

Apesar da efetiva imobilização de níquel na cinasita do RALF NP (item 4.3), este metal não foi identificado em concentrações acima de 0,008 mg L⁻¹ no efluente deste reator. Níquel também não foi identificado em concentrações acima de 0,008 mg L⁻¹ nem no efluente do RALF controle, nem no afluente (Tabela 5.17). A menor demanda deste metal no processo anaeróbio, quando comparado ao ferro, também foi reportada no relatório parcial I, relatório parcial II e por Parsaee et al. (2019).

5.3.2 Degradação de matéria orgânica

O aumento da concentração de matéria orgânica afluente durante as etapas I, II e III (10 ± 3 , 14 ± 2 e 23 ± 4 g L⁻¹, respectivamente) diminuiu a eficiência de remoção de 20 ± 14

para 16 ± 6 e $14 \pm 9\%$ no RALF NP e de 17 ± 15 para 14 ± 7 e $12 \pm 7\%$ no RALF controle, respectivamente (Tabela 5.18). Esta diminuição já era esperada, pois o aumento da porção de vinhaça no afluente, além de aumentar a matéria orgânica, aumenta também a concentração de compostos recalcitrantes que compõem esta água residuária (Godoi et al., 2019). Gamboa et al. (2017) estudaram a degradação de vinhaça em RALF inoculado com *Tametes versicolor* em condições não estéreis e 6 h de TDH. Os autores obtiveram 10% de eficiência de remoção de matéria orgânica, para 7 g L^{-1} afluente. Neste estudo, a eficiência obtida em condições semelhantes (Etapa I) foi de 17 a 20%. Provavelmente, a inoculação com lodo anaeróbio favoreceu a remoção de matéria orgânica devido a maior diversidade de organismos (Jobard et al., 2017).

Tabela 5.18: Remoção de matéria orgânica dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça

	Etapa I	Etapa II	Etapa III
DQO (g L^{-1})			
Afluente	10 ± 3	14 ± 2	23 ± 4
RALF NP	7 ± 2	12 ± 1	21 ± 3
RALF controle	8 ± 2	12 ± 1	22 ± 2
Remoção (%)			
RALF NP	20 ± 14	16 ± 6	14 ± 9
RALF controle	17 ± 15	14 ± 7	12 ± 7
Carga Específica ($\text{gDQO gSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$)			
Aplicada no Afluente	35 ± 12	50 ± 6	88 ± 12
Removida no RALF NP	9 ± 7	8 ± 4	13 ± 0
Removida no RALF controle	8 ± 8	7 ± 4	11 ± 8
Carga Volumétrica ($\text{gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)			
Aplicada no Afluente	96 ± 34	137 ± 16	243 ± 33
Removida no RALF NP	24 ± 19	23 ± 10	36 ± 25
Removida no RALF controle	23 ± 22	20 ± 10	31 ± 22

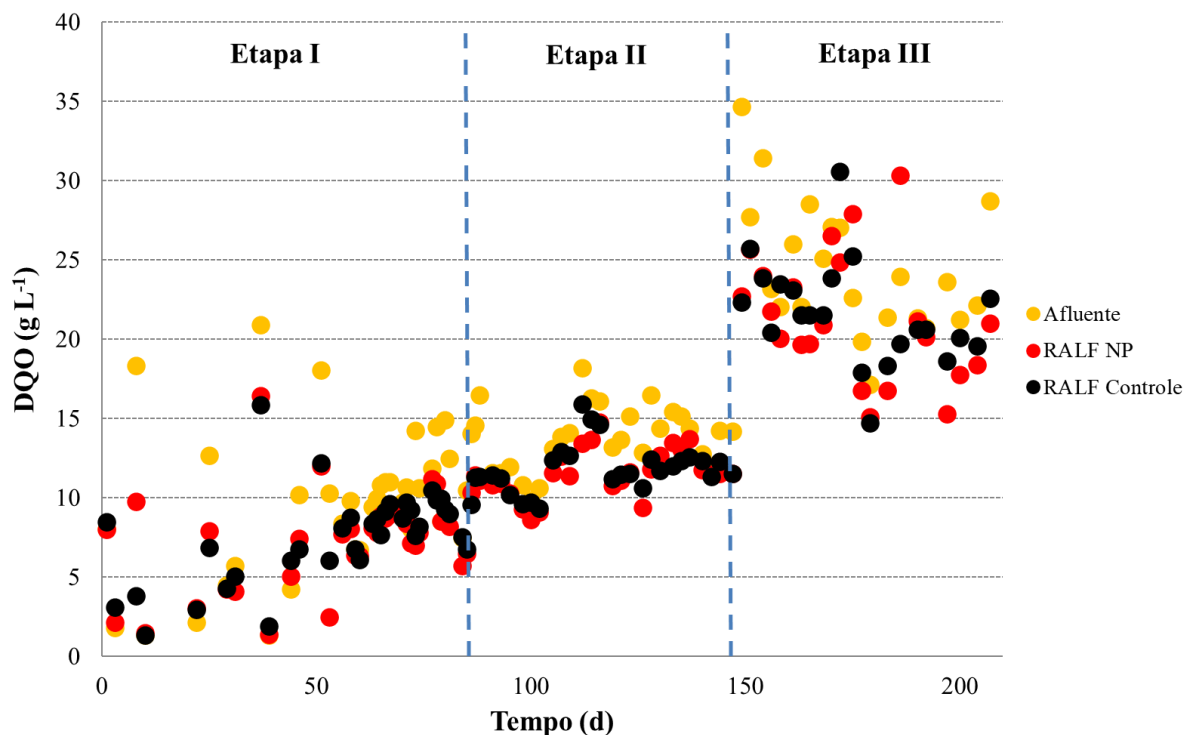
Diferença estatística entre as eficiências de remoção do RALF NP e RALF controle só foi observada na Etapa III (Tukey, $p < 0,05$). A influência positiva da presença de metais na remoção de matéria orgânica quando ocorre aumento da concentração de compostos recalcitrantes foi reportada por Isfahani et al., (2020) quando estudaram a influência de NPs de TiO_2 na digestão anaeróbia de substrato lignocelulósico. Os autores observaram aumento de 13% na eficiência de remoção de matéria orgânica ao adicionar $0,252 \text{ mg}$ de NPs de $\text{TiO}_2 \text{ g}^{-1}$ de sólidos totais. O aumento da eficiência ocorreu devido ao aumento da taxa de hidrólise. Neste estudo, a presença de NPs de ferro e níquel na Etapa III resultou em apenas 2% de aumento na eficiência de remoção de matéria orgânica, ao comparar o RALF NP com o RALF controle.

As respectivas cargas orgânicas específicas e volumétricas aplicadas em ambos os RALFs foram de 35 ± 12 gDQO gSV⁻¹ d⁻¹ e 96 ± 34 gDQO L⁻¹ d⁻¹ na Etapa I; 50 ± 6 gDQO gSV⁻¹ d⁻¹ e 137 ± 16 gDQO L⁻¹ d⁻¹ na Etapa II; 88 ± 12 gDQO gSV⁻¹ d⁻¹ e 243 ± 33 gDQO L⁻¹ d⁻¹ na Etapa III (Tabela 5.18). Altos valores de carga orgânica específica afluyente (≥ 10 gDQO gSV⁻¹ d⁻¹) são necessários para manutenção de condições acidogênicas em reatores anaeróbios (Paudel et al., 2017) estudaram o efeito de cargas orgânicas na eficiência de reatores acidogênicos e sugeriram cargas orgânicas.

Fuess et al. (2017) avaliaram reator de leito fixo, com TDH de 7,5 h e 28 g L⁻¹ de matéria orgânica no afluyente. Os autores observaram operação estável para cargas de 30 gDQO L⁻¹ d⁻¹. Ramos e Silva (2020) operaram RALF alimentado com vinhaça, TDH de 4h e 10 g L⁻¹ de matéria orgânica no afluyente. Os autores aplicaram carga volumétrica de 60 gDQO L⁻¹ d⁻¹. Neste estudo o RALF foi operado em TDH de 3h e as cargas orgânicas aplicadas foram de 96 a 243 gDQO L⁻¹ d⁻¹. Ou seja, os reatores de leito fluidificado podem ser submetidos a maiores cargas orgânicas volumétricas, quando comparados aos reatores de leito fixo. Tanto Fuess et al. (2017), quanto Ramos e Silva (2020) e este estudo, observam produção de biogás mais altas, quando maiores cargas orgânicas foram aplicadas.

A estabilidade temporal dos parâmetros relacionados a degradação de matéria orgânica pode ser observada na Figura 5.53.

Figura 5.53: Variação temporal de matéria orgânica nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça



5.3.3 Remoção de carboidratos

A remoção de carboidratos foi estável durante toda a operação (Tabela 5.19 e Figura 5.54). A maior proporção de vinhaça na alimentação favoreceu a remoção de carboidratos de 66 ± 11 para 78 ± 3 e $76 \pm 6\%$ no RALF NP e de 63 ± 12 para 78 ± 2 e $77 \pm 4\%$ no RALF controle, respectivamente, para 2 ± 1 ; 4 ± 0 e 7 ± 1 g L⁻¹ afluente, nas fases I, II e III. Na análise comparativa das cargas específicas de carboidrato removidas nas etapas I, II e III (5 ± 2 ; 11 ± 1 ; 20 ± 2 mgcarb gSV⁻¹ d⁻¹ no RALF NP e 5 ± 2 ; 11 ± 1 ; 19 ± 2 mgcarb gSV⁻¹ d⁻¹ no RALF controle) e carga volumétrica de carboidrato removida (14 ± 5 ; 30 ± 3 ; 56 ± 7 mgcarb L⁻¹ d⁻¹ no RALF NP e 14 ± 5 ; 30 ± 3 ; 55 ± 7 mgcarb L⁻¹ d⁻¹ no RALF controle) verificou-se valores estatisticamente semelhantes (Tukey $p > 0,05$). Ou seja, a imobilização de NPs de ferro e níquel no material suporte e sua consequente maior disponibilidade não afetaram de forma significativa a eficiência de remoção de carboidratos.

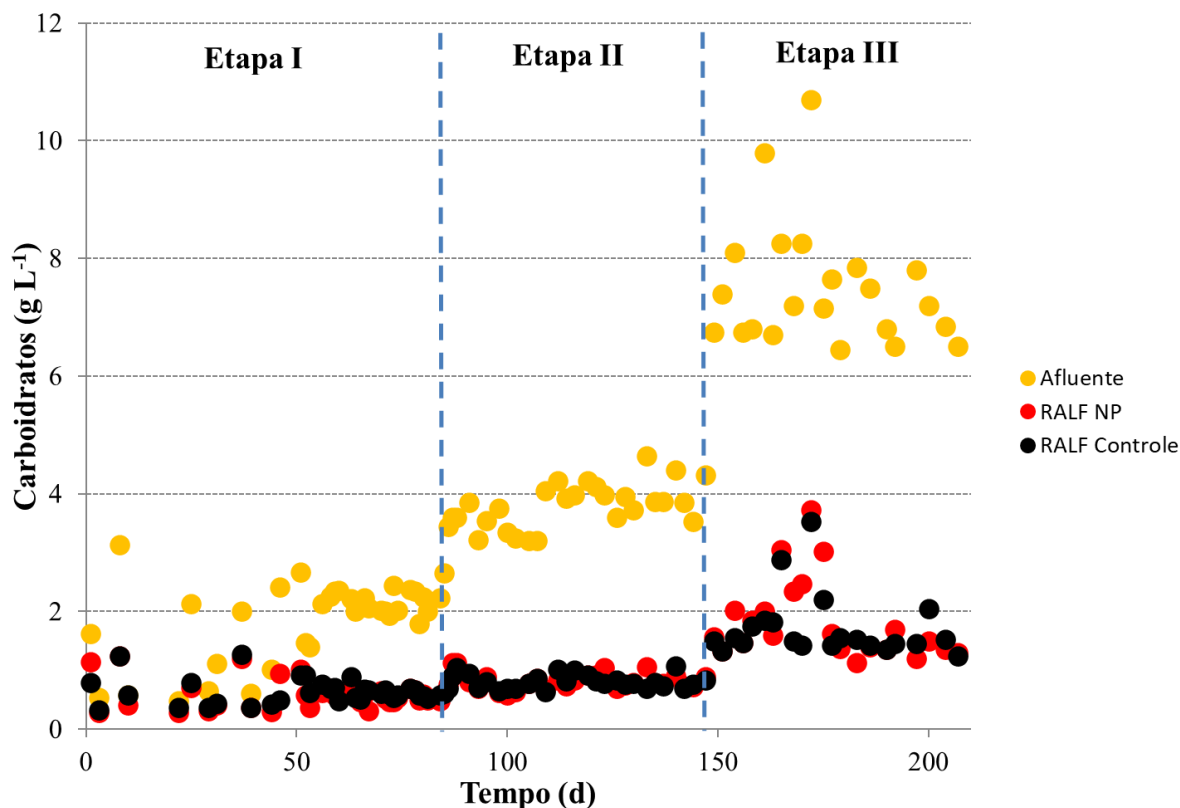
Tabela 5.19: Remoção de carboidratos dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça

	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Carboidratos (g L ⁻¹)			
Afluente	2 ± 1	4 ± 0	7 ± 1
RALF NP	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,5
RALF controle	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,4
Remoção (%)			
RALF NP	66 ± 11	78 ± 3	76 ± 6
RALF controle	63 ± 12	78 ± 2	76 ± 4
Carga Específica (mgcarb gVS ⁻¹ d ⁻¹)			
Aplicada no Afluente	7 ± 2	14 ± 3	27 ± 3
Removida no RALF NP	5 ± 2	11 ± 1	20 ± 2
Removida no RALF controle	5 ± 2	11 ± 1	19 ± 2
Carga Volumétrica (mgcarb L ⁻¹ d ⁻¹)			
Aplicada no Afluente	20 ± 6	38 ± 3	75 ± 8
Removida no RALF NP	14 ± 5	30 ± 3	56 ± 7
Removida no RALF controle	14 ± 5	30 ± 3	55 ± 7

Santos et al. (2014) operaram RALF termofílico (55°C) alimentado com vinhaça diluída em glicose e vinhaça bruta em TDH de 1, 2, 4, 6 e 8 h, com concentração de matéria orgânica afluente entre 10 e 30 g L⁻¹. Sob tais condições, os autores verificaram eficiências de remoção de carboidratos entre 37 e 52%. Neste estudo, em condição mesofílica (37°C) e TDH de 3 h e matéria orgânica entre 10 e 23 g L⁻¹, a eficiência de remoção de carboidratos foi entre 63 e 78%. Ou seja, sob condição mesofílica obteve-se maior remoção de carboidratos quando comparado a condição termofílica.

Chang et al. (2011) operaram reator de mistura completa em condição mesofílica (35°C) alimentado com vinhaça resultante do processamento de beterraba com carga orgânica volumétrica de 20 a 44 gDQO L⁻¹ d⁻¹. Os autores observaram 79% de eficiência de remoção de carboidratos. Freitas et al. (2020) operaram EGSB alimentado com vinhaça de cana de açúcar e sacarose, também em condição mesofílica (30°C), e obtiveram eficiência de remoção de carboidratos entre 91 e 96% ao aplicar COV de 15 a 60 gDQO L⁻¹ d⁻¹. Neste estudo, operou-se RALFs alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar e as COVs foram de 96 a 243 gDQO L⁻¹ d⁻¹. As eficiências de remoção de carboidratos obtidas foram de 63 a 78%. Ou seja, a aplicação de menores COVs e co-digestão da vinhaça com sacarose favoreceram a remoção de carboidratos quando comparado às condições deste estudo.

Figura 5.54: Variação temporal de carboidratos nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça



5.3.4 Biogás

A maior porcentagem de H_2 na composição do biogás do RALF NP (65 ± 35 ; 50 ± 24 e $61 \pm 25\%$ nas etapas I, II e III, respectivamente) foi observada em todas as etapas, quando comparado ao RALF controle (43 ± 29 ; 27 ± 26 e $24 \pm 20\%$ nas etapas I, II e III, respectivamente) (Tabela 5.20). Desta forma, é possível afirmar que a adição de NP de ferro e níquel favoreceu a produção qualitativa de H_2 . No entanto, a produção volumétrica deste gás só foi significativamente maior no RALF NP ($0,54 \pm 0,22$ mmol) quando comparado ao RALF controle ($0,46 \pm 0,12$ mmol) na Etapa III (7 ± 1 gcarb L^{-1}) de operação. Ou seja, a Etapa III foi a melhor condição para produção de H_2 na presença de NP, com maior porcentagem e produção volumétrica deste gás. Enquanto, nas Etapas I e II, não houve diferença estatística entre a produção volumétrica de H_2 do RALF NP ($0,40 \pm 0,05$ e $0,51 \pm 0,12$ mmol nas Etapas I e II, respectivamente) quando comparado ao RALF controle ($0,40 \pm 0,05$ e $0,54 \pm 0,13$ mmol nas Etapas I e II, respectivamente). Ou seja, apesar de menor porcentagem de H_2 na composição do seu gás, o volume total de gás produzido no RALF controle foi semelhante ao do RALF NP.

Tabela 5.20: Produção de biogás dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça

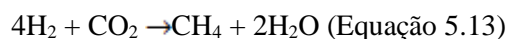
	Etapa I		Etapa II		Etapa III	
	RALF NP	RALF controle	RALF NP	RALF controle	RALF NP	RALF controle
(mmol)						
H ₂	0,40 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,51 ± 0,12	0,54 ± 0,13	0,54 ± 0,22	0,46 ± 0,12
CH ₄	0,25 ± 0,30	0,02 ± 0,03	0,17 ± 0,11	0,07 ± 0,06	0,09 ± 0,11	0,21 ± 0,26
CO ₂	0,46 ± 0,52	2,01 ± 2,04	0,72 ± 0,49	4,57 ± 2,79	0,78 ± 0,11	7,16 ± 7,13
(%)						
H ₂	65 ± 35	43 ± 29	50 ± 24	27 ± 26	61 ± 25	24 ± 20
CH ₄	13 ± 14	0 ± 0	10 ± 5	1 ± 1	4 ± 3	1 ± 2
CO ₂	22 ± 24	57 ± 29	40 ± 20	72 ± 25	35 ± 23	75 ± 20

Freitas et al. (2020) operaram reatores EGSB em condição mesofílica (30°C), TDH de 1 h e alimentado com vinhaça e sacarose nas concentrações de matéria orgânica de 10 e 15 g L⁻¹ e obtiveram produção volumétrica de H₂ de 5 e 21 mmol, respectivamente. Reis et al. (2015) operaram RALF em condição mesofílica, TDH de 6h e alimentado com vinhaça e glicose na concentração de 10 g L⁻¹ de matéria orgânica e obtiveram produção volumétrica de H₂ de 13 mmol. Neste estudo, a máxima produção de H₂ (0,54 ± 0,22 mmol) ocorreu na Etapa III do RALF NP para 23 g L⁻¹ afluente. Desta forma, a co-digestão da vinhaça com substratos de fácil degradação como a glicose e sacarose (Freitas et al., 2020 e Reis et al., 2015) favoreceram a produção volumétrica de H₂ de forma mais significativa, do que a adição de metais ao meio (este estudo). Pois a produção de H₂ obtida a partir da fermentação da vinhaça utilizando co-substratos (5-21 mmol) foi maior quando comparada a obtida utilizando metais (0,54 mmol). Nos relatórios parciais I e II também foi observada a maior influência dos substratos na produção de H₂ em comparação a adição de metais.

Ramos e Silva (2020) avaliaram a produção de H₂ em RALF termofílico (55°C), TDH de 4h, alimentado com vinhaça e entre 5 e 10 g L⁻¹ de matéria orgânica. Os autores obtiveram composição de H₂ no gás de 24% e produção volumétrica de 3,4 mmol de H₂. Neste estudo, para 10 a 23 g L⁻¹ de matéria orgânica afluente e TDH de 3h, obteve-se máxima composição e produção volumétrica de H₂ de 65% e 0,54 mmol, respectivamente. Desta forma, a utilização de NPs metálicas favoreceu a produção qualitativa de H₂, ou seja, sua maior composição no biogás. No entanto, o volume de gás produzido em condições termofílicas (Ramos e Silva, 2020) foi maior quando comparado a condições mesofílicas (este estudo).

A produção de metano (CH₄) foi favorecida na presença de NP quando comparada ao controle nas Etapas I (0,25 ± 0,30 e 0,02 ± 0,03 mmol nos RALF NP e controle,

respectivamente) e II ($0,17 \pm 0,11$ e $0,07 \pm 0,06$ mmol nos RALF NP e controle, respectivamente). No entanto, na Etapa III a produção de CH_4 no RALF controle ($0,21 \pm 0,26$ mmol) foi maior quando comparada ao RALF NP ($0,09 \pm 0,11$). De acordo com (Yun e Cho, (2017), as etapas com maior produção de CH_4 estão relacionadas com a menor produção de H_2 , devido ao seu consumo no processo metanogênico (Equação 5.13).



A maior produção de CH_4 na presença de NP metálicas foi reportada por Ajay et al. (2020). Os autores reportaram que a transferência de elétrons entre espécies é o principal mecanismo que favorece a produção de CH_4 na presença de NP. Os autores observaram aumento de 46% no conteúdo de CH_4 quando trataram lodo anaeróbico com 0,75 g de NP de Fe^0 . Feng et al. (2014) observaram aumento de 44% nas mesmas condições, no entanto os autores também reportaram que quando adicionadas em excesso (1,5 g de NP de Fe^0), as NPs provocaram a diminuição da produtividade de CH_4 em 30% comparado ao reator controle (sem adição de NPs), devido a efeitos de toxicidade.

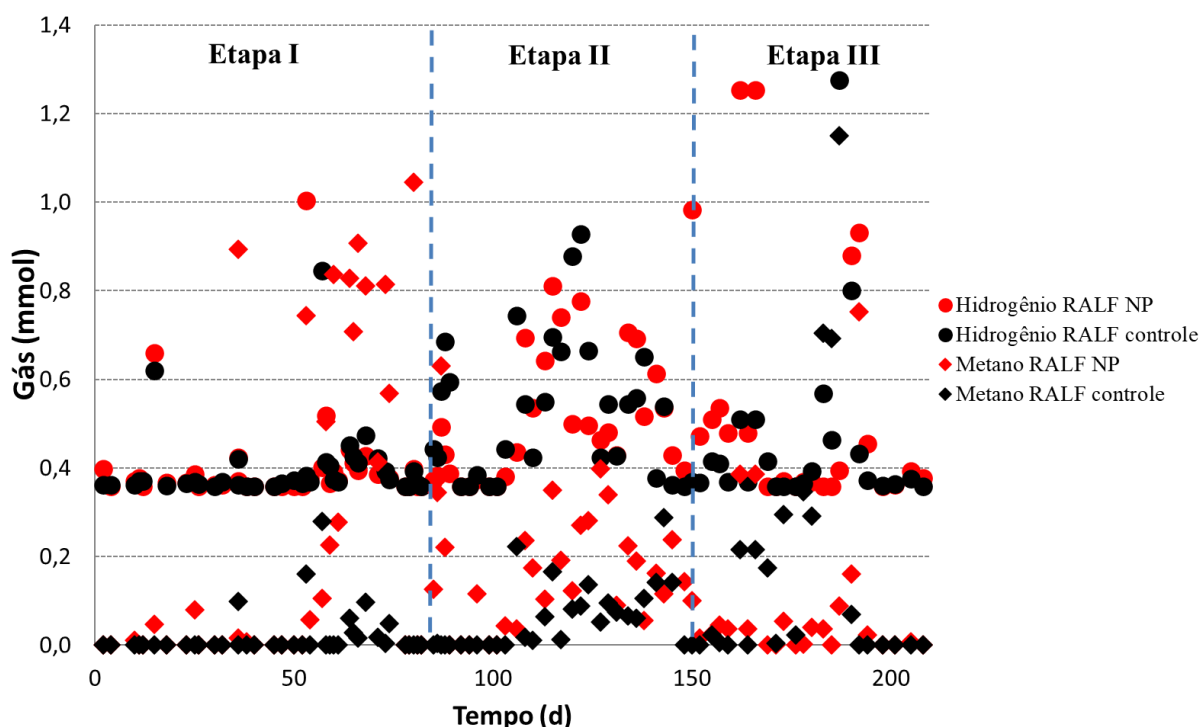
A variação temporal da produção de CH_4 e H_2 nos reatores RALF NP e RALF controle está ilustrada na Figura 5.55. É possível observar que ao final da Etapa I (50° ao 90° dia de operação) houve aumento na produção de CH_4 (~0,8 mmol) no RALF NP, o qual foi interrompido com o aumento da carga orgânica de 35 ± 12 para 50 ± 6 gDQO gVS⁻¹ d⁻¹, nas Etapas I e II, respectivamente. Nesse período (50°-90° dia de operação) observou-se aumento da produção de ácido propiônico (1 a 1,5 g L⁻¹) e valérico (0,3 a 0,5 g L⁻¹) no reator RALF NP (Figura 5.56).

A maior produção contínua de H_2 foi observada entre o 108° e 140° dias de operação, em ambos os reatores, e foi relacionada ao aumento da produção de ácido butírico (item 5.3.5 – Figura 5.56). A relação entre a produção de ácido butírico e H_2 no processo fermentativo da vinhaça em co-digestão com soro de leite foi reportada por Ramos e Silva, (2018) em RALF operado em temperatura termofílica (55°C). Os autores reportaram porcentagens máximas deste ácido (30%) na condição de maior produção de H_2 (8,2 mmol de H_2). Neste estudo, a porcentagem máxima de ácido butírico em ambos os reatores foi de 25%, e a respectiva produção volumétrica de H_2 foi de 0,5 mmol de H_2 .

Por outro lado, as maiores produções pontuais de H_2 ocorreram nos dias 166° e 187° de operação dos reatores RALF NP e RALF controle, respectivamente e estiveram

relacionadas ao aumento da produção de ácido acético no RALF NP e de ácido butírico no RALF controle.

Figura 5.55: Variação temporal da produção de hidrogênio dos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça



5.3.5 Produção de ácidos orgânicos

A respectiva produção de AOV nas etapas I ($10 \text{ gDQO}_{\text{afluente}} \text{ L}^{-1}$), II ($14 \text{ gDQO}_{\text{afluente}} \text{ L}^{-1}$) e III ($23 \text{ gDQO}_{\text{afluente}} \text{ L}^{-1}$) foram 1708 ± 743 , 3423 ± 746 e $4256 \pm 1104 \text{ mgHac L}^{-1}$ no RALF - NP e 1628 ± 635 , 3657 ± 923 e $4148 \pm 1054 \text{ mgHac L}^{-1}$ no RALF - Controle (Tabela 5.18). Não foi observada diferença estatística significativa (Tukey, $p > 0,05$) entre a produção total de AOV do RALF - NP e RALF - Controle. Os principais metabólitos do tratamento anaeróbico com vinhaça neste estudo foram os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e lático, respectivamente em ordem decrescente (Tabela 5.21). As rotas metabólicas relacionadas à produção de ácido acético, butírico e propiônico estão descritas nas Equações 5.4, 5.5 e 5.6, respectivamente. A rota do ácido acético está relacionada à produção de $4 \text{ mol de H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de glicose, enquanto a rota do ácido butírico gera $2 \text{ mol de H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de glicose. Se o objetivo principal é produzir H₂ a partir da degradação dos carboidratos, a rota do ácido propiônico é indesejável, pois consome H₂.

O ácido valérico foi o único ácido orgânico com maior produção estatisticamente significativa (Tukey, $P < 0,05$) no RALF - NP ($532 \pm 62 \text{ mg L}^{-1}$) quando comparado ao RALF - Controle ($452 \pm 47 \text{ mg L}^{-1}$), durante a etapa III (Tabela 5.18). A produção de ácido valérico no processo fermentativo está geralmente relacionada ao alongamento da cadeia dos ácidos acético e propiônico (Spírito et al., 2014)). NPs de ferro e níquel que favorecem o alongamento da cadeia também foram relatados nos reatores batelada deste estudo, os quais foram alimentados com glicose e inoculados com *C. butyricum*.

Tabela 5.21: Produção de ácidos orgânicos nos reatores anaeróbios contínuos com e sem a adição de nanopartículas metálicas alimentados com vinhaça

Etapa	I	II	III
Ácido acético (mg L^{-1})			
RALF - NP	886 ± 184	1186 ± 91	1616 ± 115
RALF - Controle	876 ± 153	1264 ± 164	1564 ± 67
Ácido butírico (mg L^{-1})			
RALF - NP	234 ± 84	796 ± 149	1192 ± 141
RALF - Controle	230 ± 74	798 ± 189	1204 ± 107
Ácido propiônico (mg L^{-1})			
RALF - NP	650 ± 139	1278 ± 118	1608 ± 102
RALF - Controle	634 ± 126	1424 ± 158	1752 ± 108
Ácido valérico (mg L^{-1})			
RALF - NP	246 ± 82	490 ± 99	532 ± 62
RALF - Controle	218 ± 70	502 ± 117	452 ± 47
Ácido láctico (mg L^{-1})			
RALF - NP	48 ± 7	40 ± 5	87 ± 31
RALF - Controle	28 ± 7	40 ± 5	74 ± 19
Ácido capróico (mg L^{-1})			
RALF - NP	22 ± 10	52 ± 15	80 ± 13
RALF - Controle	18 ± 7	72 ± 21	72 ± 10
Ácidos orgânicos totais (mgHac L^{-1})			
RALF - NP	1708 ± 743	3423 ± 746	4256 ± 1104
RALF - Controle	1628 ± 635	3657 ± 923	4148 ± 1054

Ramos e Silva, (2020) estudaram a fermentação da vinhaça em RALF em condição termofílica (55°C) e parâmetros operacionais (lodo anaeróbico como inóculo, TDH de 4 h, $10 \text{ gDQO}_{\text{afluente}} \text{ L}^{-1}$) semelhante a etapa I deste estudo (lodo anaeróbico como inóculo, TDH de 3 h, $10 \text{ gDQO}_{\text{afluente}} \text{ L}^{-1}$). Os autores relataram, respectivamente, 19, 30, 13 e 10% de ácido acético, butírico, propiônico e láctico no efluente do reator. Neste estudo, em condições mesofílicas (37°C), os respectivos percentuais foram 40, 11, 30 e 4% no RALF - NP e RALF - Controle. Portanto, as condições termofílicas (Ramos e Silva, 2020) favoreceram a rota metabólica relacionada ao ácido butírico e a mesofílica (este estudo) favoreceram as rotas

relacionadas a produção dos ácidos acético e propiônico, a partir da fermentação da vinhaça, com e sem adição de metais ao meio.

As concentrações de ácido láctico observadas nas etapas I, II e III foram 48 ± 7 , 40 ± 5 e 87 ± 31 mg L⁻¹ no RALF - NP e 28 ± 7 , 40 ± 5 e 74 ± 19 mg L⁻¹ no RALF - Controle, respectivamente (Tabela 5.21). Dada a concentração de ácido láctico no afluyente dos reatores (340, 680 e 1360 mg L⁻¹, nas etapas I, II e III, respectivamente), seu consumo foi observado em todos os estágios operacionais. O consumo de ácido láctico é interessante no contexto de produção de H₂, uma vez que pode levar a rotas de produção de H₂ (Detman et al., 2019). Autores que estudaram previamente a fermentação da vinhaça em RALF relataram a produção e não consumo de ácido láctico (Freitas et al., 2020; Ramos and Silva, 2020). No entanto, Detman et al. (2019) relataram relação da presença de *C. butyricum* com a rota de consumo de ácido láctico, e como o inóculo deste estudo foi bioaumentado com *Clostridium butyricum*, provavelmente, este foi o motivo da diferença da rota metabólica láctica entre estudos anteriores de fermentação da vinhaça e este estudo.

Um aumento na produção contínua de H₂ foi observada entre o 108 ° e 140 ° dia de operação, tanto no RALF - NP quanto no RALF - Controle, e esteve relacionado à maior produção de ácido butírico (1,0 - 1,5 g L⁻¹). A relação entre a produção de ácido butírico e maior rendimento de H₂ foi relatada na co-digestão termofílica (55 C) de vinhaça e soro de queijo usando RALF, os autores relataram maior produção de H₂ (8,2 mmol de H₂) com porcentagem máxima de ácido butírico (30%) Neste estudo, a maior porcentagem de ácido butírico foi de 25% com 0,5 mmol de produção de H₂. Além disso, maiores produções pontuais de H₂ foram observadas no 166 ° e 187 ° dia de operação, respectivamente, do RALF - NP e do RALF-Controle, e esteve relacionada à maior produção de ácido acético no RALF- NP (2,3 e 2,1 g L⁻¹) e maior produção de ácido butírico no RALF - Controle (2,0 e 2,1 g L⁻¹).

Ácido acético foi observado nas Etapas I, II e III em 886 ± 184 , 1186 ± 91 e 1616 ± 115 mg L⁻¹ no RALF NP e 876 ± 153 , 1264 ± 164 e 1564 ± 67 mg L⁻¹ no RALF controle (Tabela 5.21). Em ambos os reatores, a porcentagem de ácido acético em relação a produção total de ácidos foi de 40, 30 e 30% nas Etapa I, II e III, respectivamente. Freitas et al. (2020) operaram EGSB mesofílico alimentado com vinhaça e sacarose (15 g L⁻¹) e TDH de 4h e obtiveram 50% de ácido acético (500 mg L⁻¹). Desse modo, mesmo em diferentes

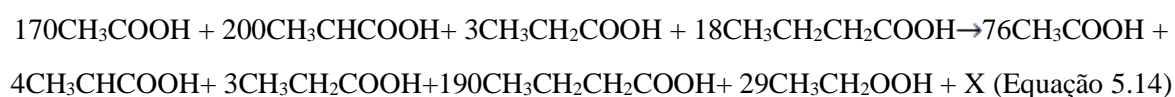
configurações reacionais, o ácido acético é um dos principais metabólitos resultantes da fermentação de vinhaça.

As concentrações de ácido butírico observadas nas respectivas Etapas I, II e III foram de 234 ± 84 , 796 ± 149 e 1192 ± 141 mg L⁻¹ no RALF NP e 230 ± 74 , 798 ± 189 e 1204 ± 107 mg L⁻¹ no RALF controle (Tabela 5.21). Em ambos os reatores, a porcentagem de ácido butírico em relação a produção total de ácidos foi de 10, 20 e 15% nas Etapa I, II e III, respectivamente. Santos et al., (2014) operaram RALF termofílico alimentado com vinhaça e glicose (10 g L⁻¹) e 4h de TDH e obtiveram 581 ± 50 mg L⁻¹ de ácido butírico, concentração maior do que as reportadas neste estudo. Provavelmente, a adição de um substrato de fácil degradação favoreceu a produção de butírico quando comparado a esse estudo.

As concentrações de ácido propiônico observadas nas respectivas Etapas I, II e III foram de 650 ± 139 , 1278 ± 118 e 1608 ± 102 mg L⁻¹ no RALF NP e 634 ± 126 , 1424 ± 158 e 1752 ± 108 mg L⁻¹ no RALF controle (Tabela 5.21). A produção de ácido propiônico em reatores acidogênicos geralmente é indesejada, pois esta rota metabólica consome H₂ (Equação 5.6). Ferreira et al. (2018) estudaram as rotas metabólicas de RALFs alimentados com sacarose (5 gDQO L⁻¹) e TDH de 4 h. Os autores reportaram que não houve produção de ácido propiônico no processo fermentativo, tanto em condição mesofílica (30°C), quanto em condição termofílica. Neste estudo, o ácido propiônico foi o segundo metabólito mais produzido e isto pode ter contribuído para as baixas produções volumétricas de H₂ (item 5.3.4).

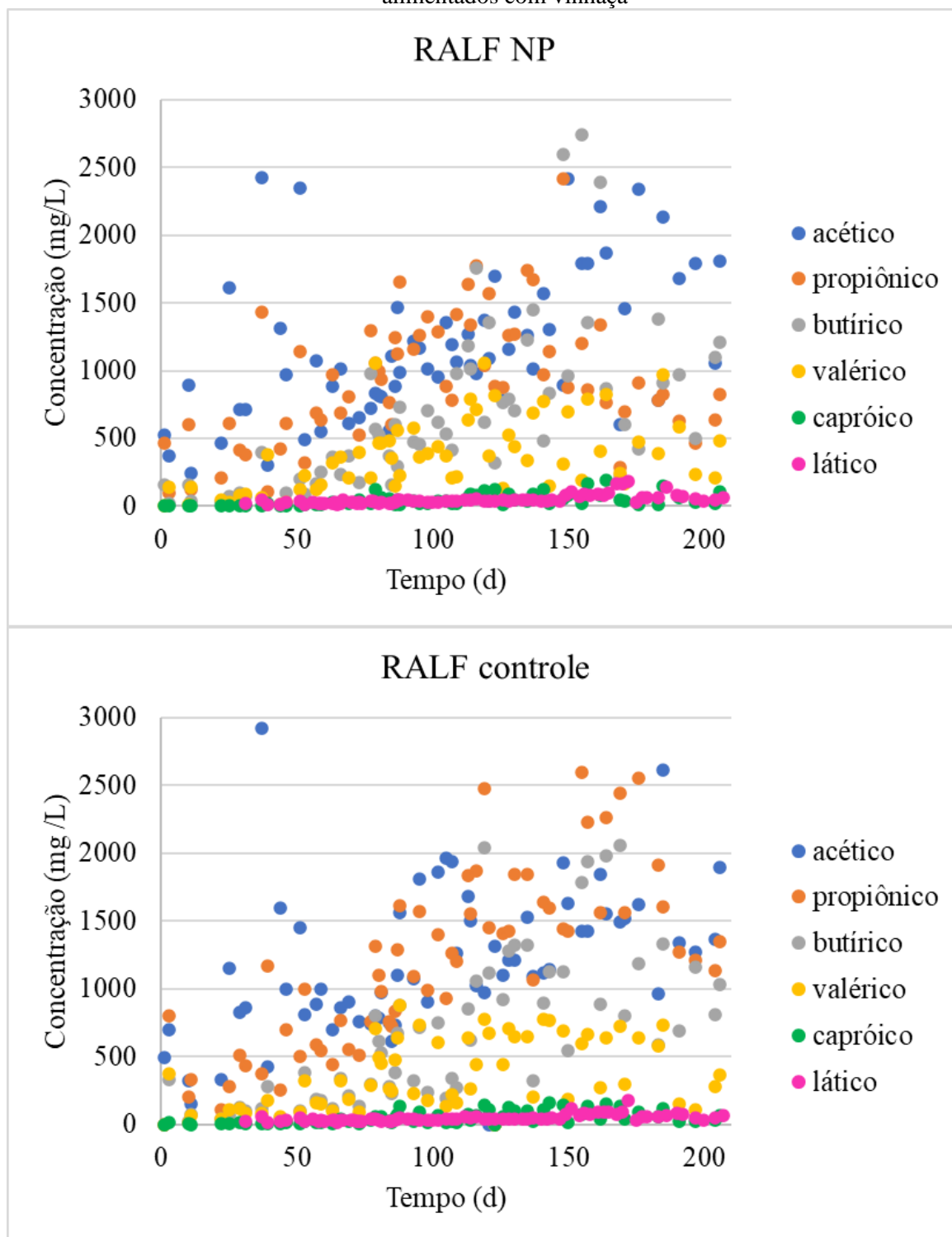
As concentrações de ácido valérico observadas nas respectivas Etapas I, II e III foram de 246 ± 82 , 490 ± 99 e 532 ± 62 mg L⁻¹ no RALF NP e 218 ± 70 , 502 ± 117 e 452 ± 47 mg L⁻¹ no RALF controle (Tabela 5.21). Quando adicionadas em reatores em batelada com glicose como substrato (Relatório Parcial I), as NPs de ferro e níquel aumentaram em 5 vezes produção de ácido valérico. Nesta etapa do estudo, não houve diferença estatística na produção de ácido valérico ao comparar o RALF NP com o RALF controle. Ferreira et al. (2018) avaliaram a influência do TDH (1, 2, 4, 6 e 8h) na produção de metabólitos de RALF alimentado com glicose. Os autores reportaram a produção de ácido valérico apenas em TDH de 8h. No estudo de Ferreira et al. (2018), o ácido valérico foi produzido em todas as etapas de operação, em TDH de 4h. Ou seja, a utilização de água residuária real (vinhaça), favoreceu a produção de ácido valérico, quando comparado ao substrato sintético (glicose).

As concentrações de ácido láctico observadas nas respectivas Etapas I, II e III foram 48 ± 7 , 40 ± 5 e 87 ± 31 mg L⁻¹ no RALF NP e 28 ± 7 , 40 ± 5 e 74 ± 19 mg L⁻¹ no RALF controle (Tabela 5.21). Dada a concentração afluyente deste ácido (1082 ± 109 mg L⁻¹), seu consumo foi observado em todas as Etapas (Equação 5.14). O consumo deste ácido durante a fermentação é interessante porque pode ser direcionado a rotas que produzem H₂, já que está relacionado a produção de ácido butírico (Detman et al., 2019). Autores que estudaram a degradação de vinhaça em RALF normalmente relatam a produção e não o consumo de ácido láctico (Freitas et al., 2020; Ramos and Silva, 2020; Santos et al., 2014). Todavia, Detman et al. (2019) relataram o seu consumo, e também avaliaram com *Clostridium butyricum* em seu inóculo. Provavelmente, a presença de *Clostridium butyricum* no meio favorece esta rota metabólica.



Sendo, X a biomassa bacteriana e outros produtos da fermentação, como por exemplo os gases.

Figura 5.56: Variação temporal da produção de ácidos orgânicos voláteis nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça



5.3.6 pH e alcalinidade

Toda a alcalinidade do reator foi referente a presença de AOV devido a não adição de bicarbonato na alimentação, e em todas as etapas, a alcalinidade do RALF NP foi maior do

que a do RALF controle, devido a maior concentração de AOV na presença de NP metálicas. Nas respectivas Etapas I, II e III os valores foram de 618 ± 169 , 519 ± 107 e 1194 ± 244 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ no RALF NP e 355 ± 106 , 302 ± 46 e 695 ± 101 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ no RALF controle (Tabela 5.22).

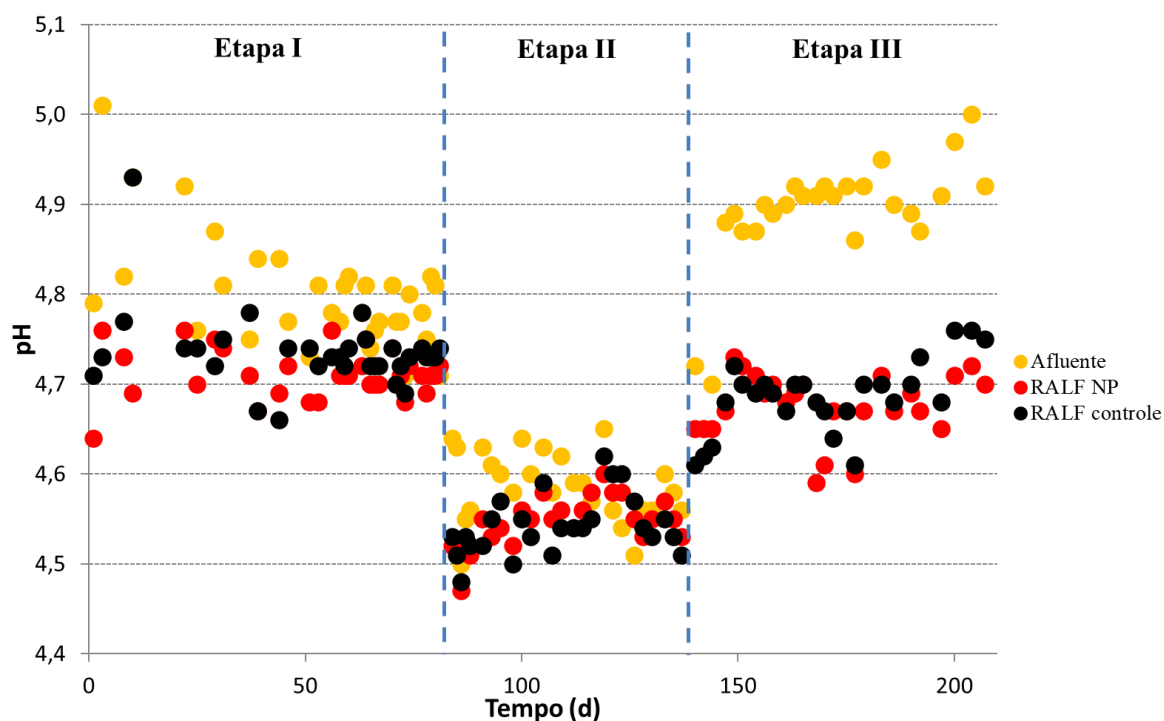
Tabela 5.22: pH e alcalinidade nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça

	Etapa I	Etapa II	Etapa III
pH			
Afluente	$4,8 \pm 0,0$	$4,6 \pm 0,0$	$4,9 \pm 0,0$
RALF NP	$4,7 \pm 0,0$	$4,6 \pm 0,0$	$4,7 \pm 0,0$
RALF controle	$4,7 \pm 0,0$	$4,6 \pm 0,0$	$4,7 \pm 0,0$
Alcalinidade ($\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)			
Afluente	328 ± 107	219 ± 40	741 ± 110
RALF NP	618 ± 169	519 ± 107	1194 ± 244
RALF controle	355 ± 106	302 ± 46	695 ± 101

A presença de NPs metálicas pode influenciar o pH do meio e muitas vezes é um dos fatores que está associado a maior produtividade de H_2 (Llorca e Idriss, 2011). Esta diferença de pH na presença de NP metálicas foi observada nos resultados do Relatório Parcial II, quando os RALFs foram alimentados com glicose. Quando alimentados com vinhaça, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de pH no RALF NP ($4,7 \pm 0,0$; $4,6 \pm 0,0$ e $4,7 \pm 0,0$ nas Etapas I, II e III, respectivamente) e RALF controle ($4,7 \pm 0,0$; $4,6 \pm 0,0$ e $4,7 \pm 0,0$ nas Etapas I, II e III, respectivamente) (Tabela 5.22 e Figura 5.57). Provavelmente, a influência dos diversos compostos presentes em água residuária real, mascarou a influência dos metais no pH (Godoi et al., 2019).

Ramos and Silva, (2020) operaram RALF alimentado com vinhaça (10 gDQO L^{-1}) em condição termofílica (55°C) e TDH de 4h. Os autores reportaram pH efluente de $4,8 \pm 0,2$. Valor muito similar aos obtidos neste estudo ($4,6 \pm 0,0$ a $4,9 \pm 0,0$). Ou seja, a mudança de temperatura não afeta os valores de pH ao final do processo acidogênico.

Figura 5.57: Variação temporal do pH nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça



5.3.7 Sólidos Suspensos

O escape de sólidos no efluente devido a elevada agitação é característica da configuração de reatores fluidificados (Moharram et al., 2019). No entanto, como a vinhaça é uma água residuária real com elevada concentração de sólidos, houve remoção de sólidos totais voláteis, que provavelmente foram hidrolisados no reator, quando comparou-se a concentração afluente (9 ± 5 , 11 ± 2 e 21 ± 2 g L⁻¹ nas Etapas I, II e III, respectivamente) com a dos RALF NP (4 ± 1 , 6 ± 1 e 11 ± 2 g L⁻¹ nas Etapas I, II e III, respectivamente) e RALF controle (4 ± 1 , 6 ± 1 e 10 ± 0 g L⁻¹ nas Etapas I, II e III, respectivamente) (Tabela 5.23). Ramos e Silva, (2020) também observaram remoção de sólidos em RALF alimentado com vinhaça ($3,2 \pm 0,4$ gSST L⁻¹) em condições termofílica (55°C) e TDH de 4h. Os autores reportaram respectivas concentrações efluente de sólidos suspensos totais, sólidos suspensos voláteis e sólidos suspensos fixos de $1,0 \pm 0,3$; $0,8 \pm 0,2$; $0,2 \pm 0,1$ g L⁻¹. Neste estudo, as concentrações de sólidos suspensos foi maior e variou de $1,0 \pm 0,4$ a $2,5 \pm 0,5$ g L⁻¹, provavelmente devido a maior concentração de sólidos suspensos também no afluente ($2,0 \pm 0,4 - 5,1 \pm 0,5$ g L⁻¹).

Tabela 5.23: Concentração de sólidos nos RALFs NP e controle alimentados com vinhaça

	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Sólidos Totais (g L⁻¹)			
Afluente	12 ± 7	15 ± 2	29 ± 3
RALF NP	7 ± 3	10 ± 1	20 ± 1
RALF controle	7 ± 2	10 ± 1	18 ± 0
Sólidos Totais Voláteis (g L⁻¹)			
Afluente	9 ± 5	11 ± 2	21 ± 2
RALF NP	4 ± 1	6 ± 1	11 ± 2
RALF controle	4 ± 1	6 ± 1	10 ± 0
Sólidos Suspensos (g L⁻¹)			
Afluente	3,6 ± 4,3	2,0 ± 0,4	5,1 ± 0,5
RALF NP	1,0 ± 0,4	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,5
RALF controle	1,0 ± 0,4	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,3
Sólidos Suspensos Voláteis (g L⁻¹)			
Afluente	3,2 ± 4,0	1,8 ± 0,3	4,4 ± 0,4
RALF NP	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,5
RALF controle	0,9 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3

Em todas as etapas de operação a diferença estatística (Teste Tukey – $p > 0,05$) não foi significativa quando comparada a concentração de sólidos suspensos totais no efluente do RALF NP ($1,0 \pm 0,4$, $1,3 \pm 0,2$ e $2,5 \pm 0,5$ g L⁻¹ nas Etapas I, II e III, respectivamente) com a do efluente no RALF controle ($1,0 \pm 0,4$, $1,9 \pm 0,5$ e $2,3 \pm 0,3$ g L⁻¹ nas Etapas I, II e III, respectivamente) (Tabela 5.23). Ou seja, a adição de NP metálicas não influenciou na dinâmica de sólidos dos reatores.

5.3.8 Metagenoma do biofilme

5.3.8.1 Taxonomia

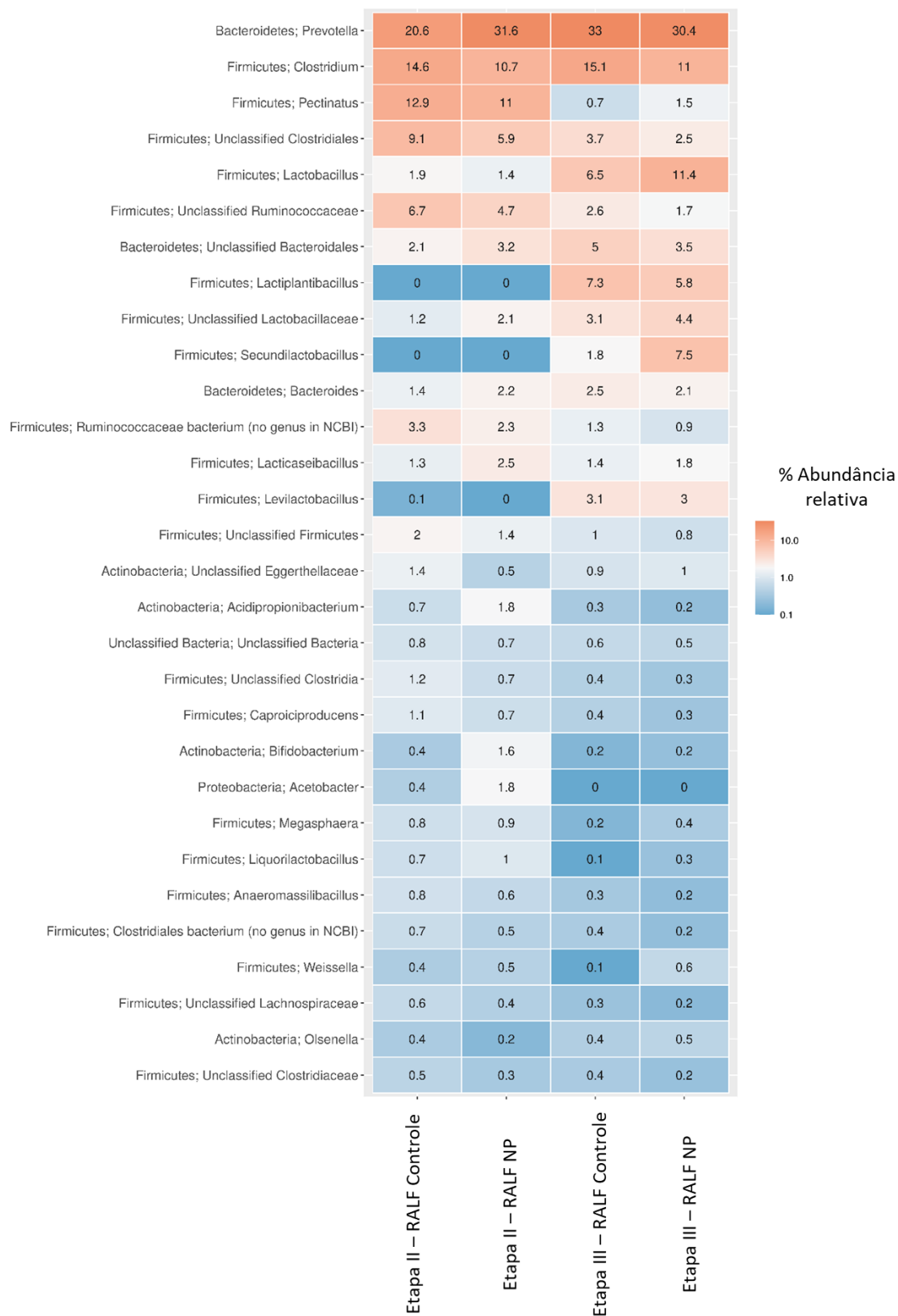
Durante todas as etapas de operação, e tanto no RALF - NP quanto no RALF - Controle, *Prevotella* foi o gênero mais abundante no biofilme dos reatores [respectivamente nas etapas II e III: 31,6 e 30,4% no RALF - NP e 20,6 e 33,0% no RALF - Controle], seguido por *Clostridium* [respectivamente nas etapas II e III: 10,7 e 11,0% no RALF - NP e 14,6 e 15,1% no RALF - Controle] (Figura 5.58). *Prevotella* é caracterizada como bactéria da vinhaça (Cassman et al., 2018) e utiliza sacarídeos como xilana, xilose e pectina para produzir acetato e succinato (Diaz e Salas, 2020). *Clostridium* sp. é frequentemente identificada como abundante na fermentação da vinhaça, além de ser uma bactéria produtora de solvente que

tem a capacidade de converter uma variedade de carboidratos em produtos finais, como acetona, butanol e etanol (Diaz e Salas, 2020).

Alguns dos gêneros identificados na análise taxonômica do biofilme diminuíram sua abundância relativa com o aumento da carga orgânica, ou seja, na passagem da etapa II para a etapa III, tanto no RALF - NP quanto no RALF - Controle: *Pectinatus* sp. [respectivamente nas etapas II e III: 11,0 e 1,5% no RALF - NP e 12,9 e 0,7% no RALF - Controle], *Acidipropionibacterium* sp. [respectivamente nas etapas II e III: 1,8 e 0,2% no RALF - NP e 0,7 e 0,3% no RALF - Controle], *Acetobacter* sp. [respectivamente nas etapas II e III: 1,8 e 0,0% no RALF - NP e 0,4 e 0,0% no RALF - Controle], e *Megasphaera* sp. [respectivamente nas etapas II e III: 0,9 e 0,4% no RALF - NP e 0,8 e 0,2% no RALF - Controle] (Figura 5.58).

Microrganismos do gênero *Pectinatus* convertem a glicose em ácido propiônico e acético (Costa et al., 2020). A produção de H₂ a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente foi avaliada em um TDH de 24 h, uma carga orgânica de 36,2 kgDQO m³ d⁻¹ e 25°C. Nestas condições, *Pectinatus* e *Megasphaera* foram associados a baixos rendimentos de H₂. Os autores relataram que organismos do gênero *Pectinatus* foram dominantes (54,1%) no início (10° dia) e não dominantes (3,1%) no final (50° dia) da operação do reator (Júnior et al., 2015). Neste estudo, também foi observada uma redução na abundância relativa do início [11,0 e 12,9% na etapa II do RALF - NP e - Controle, respectivamente] para o final [0,7 e 1,5% na etapa III do RALF - NP e - Controle, respectivamente].

Figura 5.58: *Heatmap* da abundância relativa dos gêneros observados no biofilme dos RALFs NP e Controle ao final das etapas operacionais II e III



Acetobacter sp. é um dos microrganismos que participam na produção de vinho e é capaz de converter o etanol produzido pelas leveduras em ácido acético e, assim, aumentar a acidez volátil do vinho (Niu et al., 2019). *Acetobacter* foi também classificada como parte do microbioma central da cana-de-açúcar, e foi relatado como um gênero significativamente abundante na vinhaça, portanto descrita como bactéria da vinhaça (Cassman et al., 2018). Neste estudo, maior abundância relativa de *Acetobacter* (1.8%) foi observada no biofilme do RALF - NP durante a etapa II, e provavelmente foi uma das responsáveis pela produção de ácido acético ($1,20 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$) neste reator (Figura 5.56 e Tabela 5.21).

A evidência genômica levou à divisão do gênero *Propionibacterium* em *Propionibacterium* e *Acidipropionibacterium*. São bastonetes pleomórficos, anaeróbios a aerotolerantes, mesofílicos, Gram-positivos e de alto G + C. Estes organismos produzem ácido propiônico como o principal produto final da degradação de diversos substratos. Bactérias do gênero também produzem vitaminas e outros compostos de interesse e podem ser usados como probióticos. Ferramentas genéticas e sequências de genoma estão agora disponíveis para os gêneros *Propionibacterium* e *Acidipropionibacterium*, o que irá melhorar suas aplicações (Turgay et al., 2020). Neste estudo, as abundâncias relativas de *Acidipropionibacterium* foram respectivamente nas etapas II e III: 1,8 e 0,2% no RALF - NP e 0,7 e 0,3% no RALF - Controle, e evidencia como o aumento da carga orgânica (14 a 23 gDQO_{afluente} L⁻¹, respectivamente nas etapas II e III) não favoreceu sua presença no meio, tanto na presença, quanto na ausência de NPs metálicas.

O gênero *Lactobacillus* foi proposto por Beijerinck em 1901 e inclui microrganismos Gram-positivos, fermentativos, facultativamente anaeróbios e não formadores de esporos. O gênero está classificado no filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae, que contém os gêneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus*. O gênero *Lactobacillus* compreende 261 espécies extremamente diversas nos níveis fenotípico, ecológico e genotípico. Com base na filogenia do genoma central, identidade média de pares de aminoácidos, genes de assinatura específicos, critérios fisiológicos e a ecologia dos organismos, a reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 gêneros foi proposta (Zheng et al., 2020). Seis dos 25 gêneros propostos foram observados neste estudo: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Secundilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Liquorilactobacillus*.

A abundância relativa dos gêneros *Liquorilactobacillus* e *Lacticaseibacillus* diminuiu quando a carga orgânica dos reatores aumentou de 14 gDQO_{afluente} L⁻¹ (etapa II) para 23 gDQO_{afluente} L⁻¹ (etapa III) (Figura 5.58). *Liquorilactobacillus*, um lactobacillus referindo-se ao isolamento da maioria das espécies a partir de líquidos, incluindo melão fermentado, seiva vegetal e bebidas alcoólicas. O gênero é caracterizado como homofermentativo, Gram positivo e produtor de dextrana a partir da sacarose (Zheng et al., 2020). Neste estudo, a abundância relativa de *Liquorilactobacillus* foi, respectivamente nas etapas II e III, 1,0 e 0,3% no RALF - NP e 0,7 e 0,1% no RALF - Controle. *Lacticaseibacillus* também diminuiu sua abundância relativa quando a carga orgânica aumentou no RALF - NP [2,5 e 1,8% nas etapas II e III, respectivamente] e manteve abundância relativa semelhante nas etapas II e III do RALF - Controle [respectivamente, 1,3 e 1,4%]. As cepas de *Lacticaseibacillus* são homofermentativas, não móveis, oxidase negativas e frequentemente produzem ácido lático a partir da glicose, além de metabolizar pentoses através da via da fosfocetolase (Zheng et al., 2020).

Ademais, o aumento na abundância relativa de *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Secundilactobacillus* e *Levilactobacillus* foi observado da etapa II para a etapa III. Ou seja, o aumento da proporção da vinhaça na alimentação favoreceu a maior abundância relativa dos gêneros relacionados a *Lactobacillus*.

Lactiplantibacillus são bastonetes Gram-positivos, não formadores de esporos, homofermentativos e não móveis, os quais tem sido amplamente utilizados como espécie modelo para estudos metabólicos, ecológicos e genéticos em *Lactobacillus*. Sua importância comercial vem de sua aplicação como cultura inicial para múltiplas fermentações alimentares (mandioca, feijão, couve, etc) além de ser uma cultura probiótica. Este gênero produz lactato a partir de um amplo espectro de pentoses, hexoses e dissacarídeos (Zheng et al., 2020). A abundância relativa de *Lactiplantibacillus* foi, respectivamente nas etapas II e III, 0,0 e 5,8% no RALF - NP e 0,0 e 7,3% no RALF - Controle (Figura 5.55).

Por outro lado, *Secundilactobacillus* e *Levilactobacillus* são relativamente homogêneos no que diz respeito à sua identidade de aminoácidos, mas eles são separados por análise filogenética e sua ecologia. O *Secundilactobacillus* é um lactobacillus que ocorre em fermentação secundária ou como um organismo de deterioração depois que os fermentadores primários esgotaram hexoses e dissacarídeos. Gram-positivo, em forma de bastonete, catalase negativa, heterofermentativo. Corresponde à adaptação a habitats empobrecidos por hexose,

incluindo silagem, cerveja, licor e cidra de maçã. A abundância relativa de *Secundilactobacillus* foi, respectivamente nas etapas II e III, 0,0 e 7,5% no RALF - NP e 0,0 e 1,8% no RALF - Controle (Figura 5.58). *Levilactobacillus* refere-se à ocorrência de múltiplas espécies do gênero que são utilizadas como levedura. Foi descrito como Gram-positivo, em bastonete, catalase negativo e heterofermentativo. A abundância relativa do *Levilactobacillus* foi, respectivamente nas etapas II e III, 0,0 e 3,0% no RALF - NP e 0,1 e 3,1% no RALF - Controle (Figura 5.58). As cepas nos gêneros *Secundilactobacillus* e *Levilactobacillus* geralmente abrigam genes que codificam transaldolase/transquetolase, as quais mediam o metabolismo de pentoses em piruvato (Zheng et al., 2020).

A maior influência das NPs metálicas na composição da taxonomia foi observada na abundância relativa de *Secundilactobacillus*, a qual foi de 7,5% no RALF - NP versus 1,8% no RALF - Controle, na etapa III ($7 \pm 1 \text{ gcarb L}^{-1}$). *Secundilactobacillus* é um gênero caracterizado como bactéria láctica e foi relatado que sua presença aumenta a capacidade de ligação, digestibilidade, absorção e solubilidade de minerais como o ferro (Ashaolu e Reale, 2020). Thomas et al. (2021) estudaram a microbiologia da fermentação de cervejas históricas e relataram 31% da abundância relativa de *Secundilactobacillus*, bem como uma predominância de chumbo e ferro como os principais íons detectáveis. Neste estudo, a maior abundância relativa de *Secundilactobacillus* esteve relacionada com a maior disponibilidade de ferro no meio, dada a adição de NPs na argila expandida do RALF-NP.

Durante a etapa II, os gêneros com pelo menos 2 vezes a abundância relativa no RALF - NP quando comparados com RALF-Controle foram: *Acidipropionibacterium* [1,8 versus 0,7%, respectivamente], *Acetobacter* [1,8 versus 0,4%, respectivamente] e *Bifidobacterium* [1,6 versus 0,4 %, respectivamente] (Figura 5.58). Ou seja, da comunidade de biofilme formada durante a fermentação da vinhaça com 4 gcarb L^{-1} na alimentação, esses foram os gêneros influenciados pela maior disponibilidade de metais (ferro e níquel) no meio. *Acidipropionibacterium* é um novo gênero proposto a partir de *Propionibacterium* e foi descrito como contendo genes de aquisição de ferro (Scholz and Kilian, 2016). O estudo do papel do ferro na resistência ao estresse oxidativo de organismos semelhantes ao gênero *Acetobacter* revelou que a proteína de ligação ao DNA incorpora um ferro divalente intracelularmente, formando um centro de ferroxidase (Suzuki et al., 2021). Portanto, tanto *Acidipropionibacterium* quanto *Acetobacter* foram relacionados à disponibilidade de ferro no meio na literatura e, neste estudo, a maior disponibilidade de ferro resultou em maior

abundância relativa destes gêneros no RALF - NP quando comparado ao RALF-Controle no final da etapa II.

O efeito da disponibilidade de ferro na fermentação foi avaliado e uma diminuição de 15% na abundância relativa de *Bifidobacterium* foi observada, sob condições de quelação de ferro (Parmanand et al., 2019). Penella et al. (2012) observaram a relação entre a absorção celular de ferro e organismos do gênero *Bifidobacterium*. Os autores reportaram que os conteúdos dialisáveis de ferro para amostras com *Bifidobacteria* aumentaram 2,3-5,6 vezes em comparação com os controles. O metabolismo do ferro em bifidobactérias foi descrito como dois sistemas de absorção de ferro: um operando em baixas concentrações externas de ferro (1 a 20 μM); e um operando em concentrações mais altas (até 400 μM). O ferro está localizado principalmente na superfície e na fração solúvel em células em baixas concentrações de ferro. Em níveis elevados, o ferro está associado principalmente à fração insolúvel (particulada) (Bezkorovainy et al., 1996). Neste estudo, provavelmente o sistema de captação do ferro em níveis elevados favoreceu o crescimento de *Bifidobacterium* no RALF-NP quando comparado ao RALF-Controle, durante a etapa II.

Durante a etapa III, os gêneros com pelo menos 2 vezes a abundância relativa no RALF - NP quando comparados com RALF-Controle foram: *Pectinatus* [respectivamente, 1,5 versus 0,7%], *Secundilactobacillus* [respectivamente, 7,5 versus 1,8%], *Megasphaera* [respectivamente, 0,4 versus 0,2%], *Liquorilactobacillus* [respectivamente, 0,3 versus 0,1%] e *Weissella* [respectivamente, 0,6 versus 0,1%] (Figura 5.58).

As cepas de *Weissella* são capazes de descarboxilar compostos fenólicos poliméricos resultando em sua melhor biodisponibilidade, e são potenciais iniciadores poderosos para a fermentação de alimentos. Além de sua presença já ter sido relatada em amostras com alta concentração de metais, uma cepa específica, *Weissella oryzae*, foi relatada como envolvida na síntese de bionanopartículas de prata com 10-30 nm, esférica e intracelular (Rana et al., 2020). A relação de *Pectinatus*, *Megasphaera* e *Liquorilactobacillus* com a suplementação de ferro e níquel ainda não é relatada na literatura, mas os genes relacionados foram descritos neste estudo, no item 5.3.7 B.

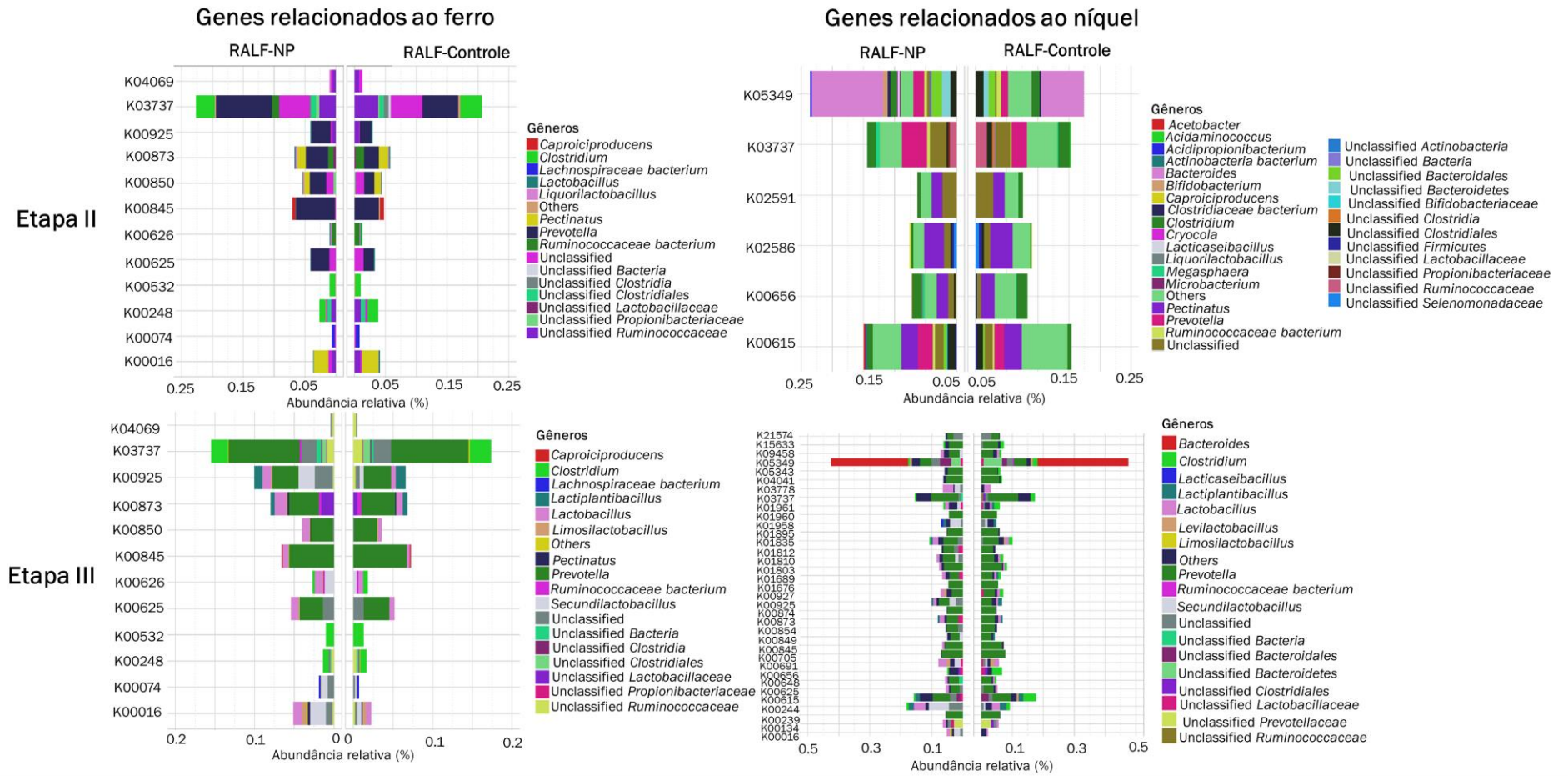
5.3.8.2 Genes relacionados ao ferro e ao níquel

Durante a etapa II, os genes relacionados à suplementação de ferro com maior porcentagem no RALF - NP quando comparados ao RALF - Controle foram: K00845 - glucoquinase (0,07 versus 0,05%) e K03737 - piruvato-ferredoxina oxidoreductase (0,23

versus 0,21%) (Figura 5.59). Ambos são genes unitários relacionados às etapas iniciais da degradação da glicose (Figura 5.60) e sua maior abundância foi associada a uma maior presença no gênero *Prevotella* (Figura 5.59). Heibel et al. (2018) descreveu como a suplementação de ferro estimula a glicólise e inibe a gliconeogênese em células de *Bactris setosa*. Os autores relataram que a suplementação de ferro melhora a resposta da glicose intracelular, estimulando as enzimas limitantes da taxa glicolítica: glucoquinase e fosfofrutoquinase, e inibindo a enzima gliconeogênica glicose-6-fosfatase. Neste estudo, as NPs de ferro adicionadas ao material suporte do RALF-NP também favoreceram as enzimas glicolíticas, que eram a glucoquinase e a piruvato-ferredoxina oxidoreductase (Figura 5.60).

Além disso, durante a etapa II, K05349 - beta-glicosidase foi o único gene relacionado à suplementação de níquel e com maior abundância no RALF - NP quando comparado ao RALF - Controle (0,24 *versus* 0,17%). E sua maior presença estava relacionada ao gênero *Bacteroides* (Figura 5.59). É um gene responsável pela hidrólise de compostos em glicose (Figura 5.60). Uma vez que a glucosidase desempenha papel fundamental na produção de biocombustíveis a partir de biomassa, muitos esforços para melhorar sua atividade são relatados na literatura, como a seleção do inóculo (*Penicillium*, *Lichtheimia*, etc) e estratégias para as desvantagens da inibição enzimática (pré-tratamento) (Srivastava et al., 2019). Neste estudo, a suplementação de níquel é dada como uma das possibilidades ainda não consideradas na literatura, de melhorar a atividade desta enzima. Jiang, (2014) estudou a hidrogenação hidrolítica de celulose em álcoois por sais de níquel e relatou rendimento de 87,9% na presença de NiSO₄.

Figura 5.59: Abundância relativa de genes e gêneros associados relacionados a presença de ferro e níquel no meio

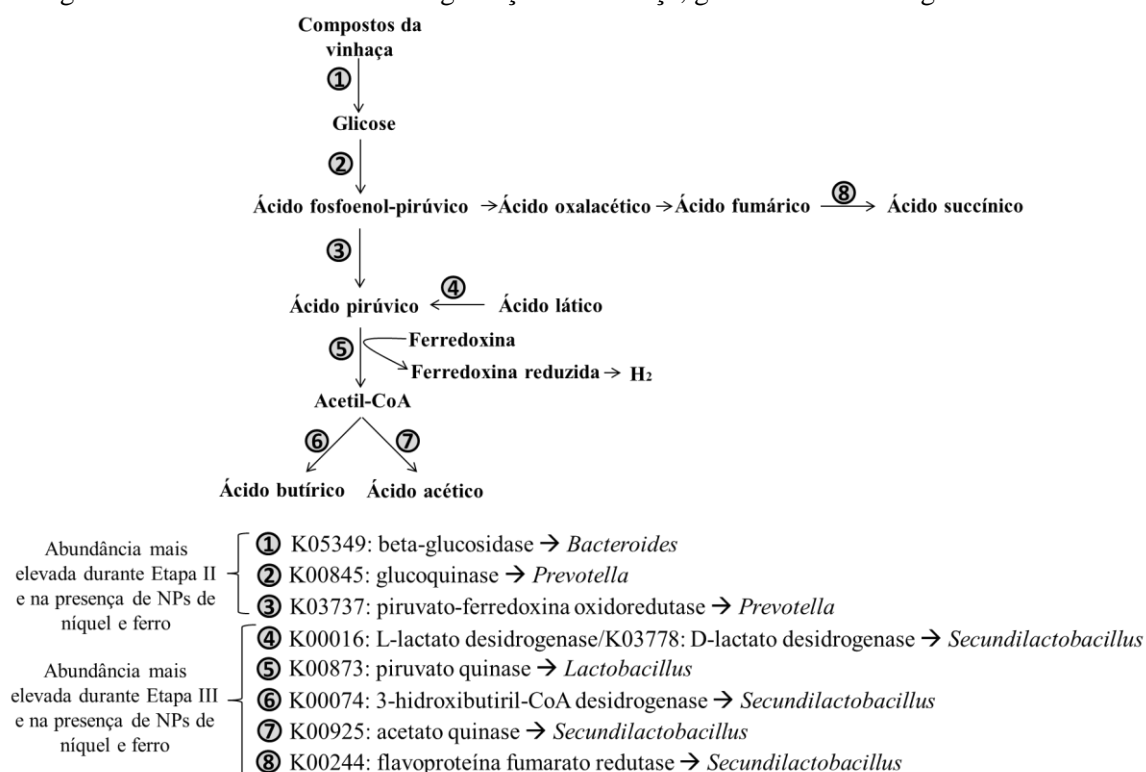


Durante a etapa III, os genes relacionados à suplementação de ferro com maior porcentagem no RALF - NP quando comparado ao RALF - Controle foram: K00925 - acetato quinase (0,10% *versus* 0,06%), K00873 - piruvato quinase (0,08 *versus* 0,05%), K00074 - 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (0,02 *versus* 0,01) e K00016 - L-lactato desidrogenase (0,05 *versus* 0,02%). K00873 - piruvato quinase está envolvida nas primeiras etapas da fermentação da glicose e sua bifurcação metabólica adicional pode resultar no uso dos outros três genes descritos acima: K00925 - acetato quinase, K00074 - 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase e K00016 - L-lactato desidrogenase tendo como produtos finais os ácidos acético, butírico e láctico, respectivamente (Figura 5.59). Além dessa distinção na atividade dos genes, não foi observada diferença entre o RALF - NP e o RALF - Controle na concentração total de ácidos voláteis obtida no monitoramento de análises químicas. Além disso, avaliando o monitoramento de AOV, é possível inferir que o ácido láctico estava sendo consumido a piruvato, uma vez que a concentração de ácido láctico no efluente (28-87 mg L⁻¹) foi menor do que no afluente (354-541 mg L⁻¹), indicando seu consumo nos RALFs e em todas as fases operacionais.

O uso de cápsulas de pectina-ferro para estabilizar e liberar bactérias de ácido láctico foi relatado por Ghibaudo et al. (2017). Além disso, a atividade catalítica do níquel e do ferro na desidrogenação do ácido láctico em ácido pirúvico é descrita na literatura (Lomate et al., 2013). Neste estudo, a suplementação de níquel e ferro estava relacionada a maior abundância de genes relacionados ao consumo de ácido láctico.

Durante a etapa III, os genes relacionados à suplementação de níquel com maior porcentagem no RALF- NP quando comparados ao RALF - Controle foram: K00016 - L-lactato desidrogenase (0,05 *versus* 0,02%), K00244 - fumarato redutase flavoproteína (0,19 *versus* 0,09%) , K00925 - acetato quinase (0,10 *versus* 0,06%) e K03778 - D-lactato desidrogenase (0,06 *versus* 0,01%) (Figura 5.59). A maior porcentagem destas enzimas está relacionada a sua presença nos gêneros *Secundilactobacillus* e/ou *Lactobacillus*. Portanto, a suplementação de níquel foi relacionada à rota do lactato ilustrada na Figura 5.60.

Figura 5.60: Rota metabólica de degradação da vinhaça, genes associados e gêneros relacionados



5.4 Comparação da influência das nanopartículas metálicas nas diferentes configurações reacionais

O ácido valérico é considerado um produto da fermentação de alto valor agregado (US\$ 3,0 kg⁻¹) e a suplementação com metais na forma de NPs de ferro e níquel resultou em produção mais elevadas desse ácido, quando comparado ao reator controle, tanto no experimento de DCCR dos reatores em batelada alimentados com RCM (3,9 e 3,4 mg L⁻¹ no reator NP e controle, respectivamente – Figura 5.37), quanto no RALF alimentado com vinhaça (532 e 452 mg L⁻¹ no RALF – NP e -Controle, respectivamente - item 5.3.5).

Todavia, no reator contínuo alimentado com RCM, a rota de produção dos ácidos acético e butírico foi favorecida no RALF-NP, quando comparado ao RALF-Controle, cuja rota de produção de ácido láctico foi favorecida. Provavelmente, a autofermentação foi uma estratégia que mudou a estrutura da comunidade bacteriana e modificou as rotas de fermentação (Russo et al., 2018). Ou seja, os resultados obtidos em reatores descontínuos não foram reproduzidos em reatores contínuos, mesmo quando condições notavelmente semelhantes (mesma temperatura, pH inicial e alimentação) foram aplicadas. É importante

ressaltar que as condições controladas dos reatores em batelada garantiram o metabolismo da glicose apenas pela cultura pura de *C. butyricum*, enquanto no RALF-NP, além do *Clostridium* (4,3%), também foi obtida abundância relativa maior para *Lactobacillus* (48,8%) e *Propionibacterium* (12,6%).

Ao analisar de forma pontual a produção de H₂ nos RALF alimentados com glicose (Figura 5.48), no 35° e 36° dias de operação a produção de H₂ foi 10 e 11 L no RALF - NP e 2 e 2 L no RALF - Controle, respectivamente. Nestes dias, a fermentação da glicose esteve relacionada a produção de propiônico (1,4 g L⁻¹), butírico (1,3 g L⁻¹) e acético (1,3 g L⁻¹), no RALF - NP e a produção de ácido lático (1,5 g L⁻¹) no RALF - Controle. Além disso, os gêneros *Lactobacillus* (48,8%) e *Propionibacterium* (12,6%) foram os mais abundantes no biofilme do RALF - NP ao final da operação, e as respectivas enzimas mais abundantes relacionadas a suplementação de ferro e níquel foram K00925: acetato quinase - 0,18% e K00244: fumarato flavoproteína redutase - 0,33%.

No RALF alimentado com vinhaça, a maior produção pontual de H₂ foi observada no 166 ° e 187 ° dia de operação, respectivamente, do RALF - NP e do RALF-Controle, e estiveram relacionadas à maior produção de ácido acético no RALF- NP (2,3 e 2,1 g L⁻¹) e maior produção de ácido butírico no RALF - Controle (2,0 e 2,1 g L⁻¹). Além disso, o aumento da proporção da vinhaça na alimentação favoreceu a maior abundância relativa do gênero *Lactobacillus* tanto no RALF-NP (1,4 e 11,4% nas etapas II e III, respectivamente) quanto no RALF - Controle (1,9 e 6,5% nas etapas II e III, respectivamente). A suplementação com NPs de níquel e ferro esteve associada a maior abundância de genes relacionados ao consumo de ácido lático. A relação de *Pectinatus*, *Megasphaera* e *Liquorilactobacillus* com a suplementação de ferro e níquel ainda não relatada na literatura, foi descrita neste estudo. Ademais, a suplementação de níquel é dada como uma das possibilidades ainda não consideradas na literatura, de melhorar a atividade da enzima glucosidase, responsável pela hidrólise de compostos orgânicos complexos em glicose.

6 CONCLUSÕES

- Otimização da produção de H₂ foi obtida nos reatores em batelada alimentados com RCM e inoculados com a cultura pura de *C. butyricum*, por meio do ajuste na composição nutricional utilizando planejamento experimental e a adição de NPs de ferro (30 mg Fe⁰ L⁻¹) e níquel (20 mg Ni⁰ L⁻¹). Todavia, a adição de NPs de níquel acima de 50 mg L⁻¹ foi desfavorável para a produção de H₂. Ademais, maior eficiência de conversão de carboidratos esteve diretamente ligada a maior produção acumulada de H₂, e a atividade da enzima hidrogenase na fase exponencial foi crucial para maior produção de H₂, pois foi nesta fase que a presença de íons fornecidos pelas NPs foram diferenciais na fermentação. Além disso, a rota de produção de ácido valérico (ácido de alto valor agregado no mercado) foi favorecida em detrimento a de ácido acético e butírico quando NPs foram adicionadas ao meio. A suplementação de metais na forma de NPs metálicas nos reatores em batelada resultaram em maior quantidade e em menor expressão da enzima hydA quando comparado ao reator controle.
- Nos reatores contínuos alimentados com glicose e inoculados por autofermentação com bioaugmentação de *C. butyricum*, a imobilização de metais (ferro e níquel) no material suporte e sua consequente maior disponibilidade não afetaram de forma significativa a eficiência de remoção de carboidratos e a produção de H₂. Todavia, a presença de NPs favoreceu a maior produção de AOVs, quando comparado ao reator controle. Além disso, a adição de NPs influenciou nas rotas metabólicas, com maior produção dos ácidos acético e butírico no RALF - NP e ácido lático no RALF - Controle. A retirada de co-substratos (extrato de carne, peptona e amido) da alimentação favoreceu a rota de produção de ácido lático em ambos os reatores (RALF - NP e RALF - Controle). Bactérias semelhantes ao gênero *Lactobacillus*, e relacionadas à produção de ácido lático e síntese da enzima lactato-desidrogenase (11,8% de abundância relativa), foram identificadas com maior abundância relativa (48,8%) no biofilme do RALF-NP;
- Nos reatores contínuos alimentados com vinhaça e inoculados com lodo anaeróbio bioaugmentado com *C. butyricum*, a imobilização de metais (ferro e níquel) no material suporte e sua consequente maior disponibilidade não afetaram de forma significativa a eficiência de remoção de carboidratos e a produção de AOV. Todavia, a composição

de H₂ no biogás foi significativamente maior no RALF - NP quando comparado ao RALF - Controle. Tanto no RALF - NP, quanto no RALF - Controle, os ácidos acético, propiônico e butírico foram os principais metabólitos. Além disso, o consumo de ácido láctico no processo fermentativo da vinhaça foi observado em ambos os reatores e em todas as etapas operacionais, provavelmente devido a bioaugmentação com *C. butyricum*. Durante a etapa II, as NPs metálicas favoreceram genes relacionados às primeiras etapas da digestão da vinhaça, com maiores percentuais das enzimas beta-glucosidase, glucoquinase e piruvato-ferredoxina oxidoreductase e relacionadas com maior abundância relativa de *Bacteroides* e *Prevotella*. No entanto, quando alimentado com vinhaça mais concentrada (etapa III), L- e D-lactato desidrogenase, 3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase, acetato quinase, piruvato quinase e flavoproteína fumarato redutase foram as enzimas favorecidas na presença de NPs. Estas enzimas estão relacionadas às etapas finais da degradação dos compostos orgânicos da vinhaça e sua maior abundância foi relacionada aos gêneros *Lactobacillus* e *Secundilactobacillus*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, C., Dincer, I., 2019. Review and evaluation of hydrogen production options for better environment. *J. Clean. Prod.* 218, 835–849. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.046>
- Adorno, M.A., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *Am. J. Anal. Chem.* 406–414.
- Ajay, C.M., Mohan, S., Dinesha, P., Rosen, M.A., 2020. Review of impact of nanoparticle additives on anaerobic digestion and methane generation. *Fuel* 277, 118234. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118234>
- Amorim, E.L.C., Sader, L.T., Silva, E.L., 2012. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1248–1263. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9511-9>
- Anburajan, P., Pugazhendhi, A., Park, J.H., Sivagurunathan, P., Kumar, G., Kim, S.H., 2018. Effect of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) on high-rate continuous biohydrogen production from galactose. *Bioresour. Technol.* 247, 1197–1200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.001>
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I. V., Lyberatos, G., 2010. Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 1921–1928. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.175>
- APHA, 2012. Standart methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed. American Publisher Health Association, Washington, DC, USA.
- Ashaolu, T.J., Reale, A., 2020. A holistic review on euro-asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms* 8, 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081176>
- Azwar, M.Y., Hussain, M.A., Abdul-Wahab, A.K., 2014. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 31, 158–173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>
- Bao, M.D., Su, H.J., Tan, T.W., 2013. Dark fermentative bio-hydrogen production: Effects of substrate pre-treatment and addition of metal ions or L-cysteine. *Fuel* 112, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.063>
- Barca, C., Ranava, D., Bauzan, M., Ferrasse, J.H., Giudici-Ortoni, M.T., Soric, A., 2016. Fermentative hydrogen production in an up-flow anaerobic biofilm reactor inoculated with a co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Desulfovibrio vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 221, 526–533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.072>
- Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-orton, M., Ferrasse, J., 2015. Bioresource Technology Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 185, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.063>
- Barros, L.B.M., Brasil, Y.L., Silva, A.F.R., Andrade, L.H., Amaral, M.C.S., 2020. Potassium recovery from vinasse by integrated electrodialysis – precipitation process: Effect of the electrolyte solutions. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 104238. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104238>

- Bello, M.M., Raman, A.A.A., Purushothaman, M., 2017. Applications of fluidized bed reactors in wastewater treatment – A review of the major design and operational parameters. *J. Clean. Prod.* 141, 1492–1514. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.148>
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, 36–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bezkorovainy, A., Kot, E., Miller-Catchpole, R., Haloftis, G., Furmanov, S., 1996. Iron metabolism in bifidobacteria. *Int. Dairy J.* 6, 905–919. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00003-9)
- Braga, J.K., Abreu, A.A., Motteran, F., Pereira, M.A., Alves, M.M., Varesche, M.B.A., 2019. Hydrogen Production by *Clostridium cellulolyticum* a Cellulolytic and Hydrogen-Producing Bacteria Using Sugarcane Bagasse. *Waste and Biomass Valorization* 10, 827–837. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0105-9>
- Braga, J.K., Stancari, R.A., Motteran, F., Malavazi, I., Varesche, M.B.A., 2020. Metals addition for enhanced hydrogen, acetic and butyric acids production from cellulosic substrates by *Clostridium butyricum*. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105679>
- Buchanan, I.D., Nicell, J.A., 1997. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 251–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970505\)54:3<251::AID-BIT6>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<251::AID-BIT6>3.0.CO;2-E)
- Buller, L.S., Romero, C.W. da S., Lamparelli, R.A.C., Ferreira, S.F., Bortoleto, A.P., Mussatto, S.I., Forster-Carneiro, T., 2020. A spatially explicit assessment of sugarcane vinasse as a sustainable by-product. *Sci. Total Environ.* 142717. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142717>
- Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., 2016. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Cai, G., Jin, B., Monis, P., Saint, C., 2013. A genetic and metabolic approach to redirection of biochemical pathways of *Clostridium butyricum* for enhancing hydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 338–342. <https://doi.org/10.1002/bit.24596>
- Cai, G., Jin, B., Saint, C., Monis, P., 2010. Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 6681–6690. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.097>
- Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., Wilmotte, A., 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: A comparative genomic perspective. *Microbiology* 156, 1575–1588. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032771-0>
- Carosia, M.F., dos Reis, C.M., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 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. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 9600–9610. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.127>
- Casals, E., Barrena, R., García, A., González, E., Delgado, L., Busquets-Fité, M., Font, X., Arbiol, J., Glatzel, P., Kvashnina, K., Sánchez, A., Puentes, V., 2014. Programmed iron oxide nanoparticles disintegration in anaerobic digesters boosts biogas production. *Small* 10, 2801–2808. <https://doi.org/10.1002/sml.201303703>
- Cassman, N.A., Lourenço, K.S., Do Carmo, J.B., Cantarella, H., Kuramae, E.E., 2018. Genome-resolved metagenomics of sugarcane vinasse bacteria. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1036-9>

- Castelló, E., Nunes, D.A.F., Andreani, C., Damasceno, S., Maintinguer, S.I., Palomo-briones, R., Razo-flores, E., Schiappacasse-dasati, M., Vesga-baron, A., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2020. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation : Possible causes and solutions. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 119. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Cavalcante de Amorim, E.L., Barros, A.R., Rissato Zamariolli Damianovic, M.H., Silva, E.L., 2009. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.007>
- Chang, S., Li, J., Liu, F., 2011. Continuous biohydrogen production from diluted molasses in an anaerobic contact reactor. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 5, 140–148. <https://doi.org/10.1007/s11783-010-0258-2>
- Cheng, R., Zhou, W., Wang, J.L., Qi, D., Guo, L., Zhang, W.X., Qian, Y., 2010. Dechlorination of pentachlorophenol using nanoscale Fe/Ni particles: Role of nano-Ni and its size effect. *J. Hazard. Mater.* 180, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.068>
- Costa, B.L., Kennes, C., Veiga, M.C., 2020. Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 308, 123226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123226>
- Couto, G.G., 2006. Nanopartículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono.
- Cui, M., Shen, J., 2012. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 1120–1124. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.078>
- Delgado, C.N., Mendez, J.R.R., 2012. Anchorage of iron hydro (oxide) nanoparticles onto activated carbon to remove As (V) from water. *Water Res.* 46, 2973–2982. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.026>
- Dessì, P., Porca, E., Waters, N.R., Lakaniemi, A.M., Collins, G., Lens, P.N.L., 2018. Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidised bed reactors: Biohydrogen production and active microbial community. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 5473–5485. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.158>
- Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., Błaszczuk, M.K., Sikora, A., 2019. Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microb. Cell Fact.* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1085-1>
- Diaz, L.A.O., Salas, A.M.B., 2020. Molecular identification of microbial communities in the methane production from vinasse: A review. *BioResources* 15, 4528–4552. <https://doi.org/10.15376/biores.15.2.4528-4552>
- Dinamarca, C., Bakke, R., 2009. Apparent hydrogen consumption in acid reactors: Observations and implications. *Water Sci. Technol.* 59, 1441–1447. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.135>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El-Emam, R.S., Özcan, H., 2019. Comprehensive review on the techno-economics of sustainable large-scale clean hydrogen production. *J. Clean. Prod.* 220, 593–609. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.309>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H.S., 2017. A critical review on inhibition of

- dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Elreedy, A., Ibrahim, E., Hassan, N., El-Dissouky, A., Fujii, M., Yoshimura, C., Tawfik, A., 2017. Nickel-graphene nanocomposite as a novel supplement for enhancement of biohydrogen production from industrial wastewater containing mono-ethylene glycol. *Energy Convers. Manag.* 140, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.02.080>
- Englilman, N.S., Abdul, P.M., Wu, S.Y., Jahim, J.M., 2017. Influence of iron (II) oxide nanoparticle on biohydrogen production in thermophilic mixed fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 27482–27493. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.224>
- España-Gamboa, E., Vicent, T., Font, X., Dominguez-Maldonado, J., Canto-Canché, B., Alzate-Gaviria, L., 2017. Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *J. Biol. Eng.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13036-016-0042-3>
- Fang, H.H.P., Liu, H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.* 82, 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9)
- Feng, K., Li, H., Zheng, C., 2018. Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* 270, 180–188.
- Feng, Y., Zhang, Y., Quan, X., Chen, S., 2014. Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron. *Water Res.* 52, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.072>
- Ferreira, T.B., Rego, G.C., Ramos, L.R., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., de Oliveira, L.L., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2018. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 18908–18917. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.08.177>
- Fontes Lima, D.M., Moreira, W.K., Zaiat, M., 2013. Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 15074–15083. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.003>
- Fregolente, L.G., de Castro, A.J.R., Moreira, A.B., Ferreira, O.P., Bisinoti, M.C., 2020. New proposal for sugarcane vinasse treatment by hydrothermal carbonization: An evaluation of solid and liquid products. *J. Braz. Chem. Soc.* 31, 40–50. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190122>
- Freitas, I.B.F., Aparecida de Menezes, C., Luiz Silva, E., 2020. An alternative for value aggregation to the sugarcane chain: Biohydrogen and volatile fatty acids production from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed reactors. *Fuel* 260, 116419. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116419>
- Fritsch, M., Hartmeier, W., Chang, J.S., 2008. Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fittings. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6549–6557. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.070>
- Fu, Y., Ding, L., Singleton, M.L., Idrissi, H., Hermans, S., 2021. Synergistic effects altering reaction pathways: The case of glucose hydrogenation over Fe-Ni catalysts. *Appl. Catal. B Environ.* 288, 119997. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2021.119997>
- Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Ferraz, A.D.N., 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. *Appl. Energy* 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>
- Gadhe, A., Sonawane, S.S., Varma, M.N., 2015. Enhancement effect of hematite and nickel nanoparticles on biohydrogen production from dairy wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 4502–4511. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.046>
- Gadow, S.I., Jiang, H., Watanabe, R., Li, Y.Y., 2013. Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.* 142, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.102>
- Ghibaudo, F., Gerbino, E., Campo Dall'Orto, V., Gómez-Zavaglia, A., 2017. Pectin-iron capsules: Novel system to stabilise and deliver lactic acid bacteria. *J. Funct. Foods* 39, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.028>
- Ghofrani-Isfahani, P., Baniamerian, H., Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M., Kasama, T., Shahrokhi, M., Vossoughi, M., Angelidaki, I., 2020. Effect of metal oxide based TiO₂ nanoparticles on anaerobic digestion process of lignocellulosic substrate. *Energy* 191, 116580. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116580>
- Godoi, L.A.G., Camiloti, P.R., Bernardes, A.N., Sanchez, B.L.S., Torres, A.P.R., da Conceição Gomes, A., Botta, L.S., 2019. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 29267–29282. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>
- Gonzalez, F.D., Russell, J.B., Hunter, J.B., 1995. The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Arch. Microbiol.* 164, 36–42. <https://doi.org/10.1007/BF02568732>
- Goyal, V., Meena, M.R., Kumar, S., 2019. Effect of vinasse (spentwash) on quality of soil and sugarcane-A review. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika* 34, 2029. <https://doi.org/10.18805/bkap148>
- Goyal, Y., Kumar, M., Gayen, K., 2013. Metabolic engineering for enhanced hydrogen production: A review. *Can. J. Microbiol.* 59, 59–78. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0494>
- Guo, X.M., Trabaly, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Hallenbeck, P.C., Abo-Hashesh, M., Ghosh, D., 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 110, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.103>
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol.* 27, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Hedayati, R., Hosseini, M., Najafpour, G.D., 2020. Optimization of semi-anaerobic vitamin B12 (cyanocobalamin) production from rice bran oil using *Propionibacterium freudenreichii* PTCC1674. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 23, 101444. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101444>
- Heibel, A.B., da Cunha, M. de S.B., Ferraz, C.T.S., Arruda, S.F., 2018. Tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart.) may enhance hepatic glucose response by suppressing gluconeogenesis and upregulating *Slc2a2* via AMPK pathway, even in a moderate iron supplementation condition. *Food Res. Int.* 113, 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.032>
- Iglesias, R.I., Campanaro, S., Treu, L., Kennes, C., Veiga, M.C., 2019. Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. *Bioresour. Technol.* 291, 121817.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121817>
- Im, W.T., Kim, D.H., Kim, K.H., Kim, M.S., 2012. Bacterial community analyses by pyrosequencing in dark fermentative H₂-producing reactor using organic wastes as a feedstock. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 8330–8337. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.167>
- Izadi, Parnian, Izadi, Parin, Eldyasti, A., Cheng, C., Beckley, M., 2020. Influence of vitamin coupled with micronutrient supplement on the biomethane production, process stability, and performance of mesophilic anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 141, 105706. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105706>
- Jamali, N.S., Dzul Rashidi, N.F., Jahim, J.M., O-Thong, S., Jehlee, A., Engliman, N.S., 2019. Thermophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent: Effect of immobilized cells on granular activated carbon in fluidized bed reactor. *Food Bioprod. Process.* 117, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.012>
- Jiang, C., 2014. Cellulose Chemistry and Technology Hydrolytic Hydrogenation of Cellulose To Sugar Alcohols By Nickel Salts. *Cellul. Chem. Technol.* 48, 75–78.
- Jiang, D., Fang, Z., Chin, S.X., Tian, X.F., Su, T.C., 2016. Biohydrogen Production from Hydrolysates of Selected Tropical Biomass Wastes with *Clostridium Butyricum*. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep27205>
- Jobard, M., Pessiot, J., Nouaille, R., Fonty, G., Jobard, M., Pessiot, J., Nouaille, R., Fonty, G., 2017. Microbial diversity in support of anaerobic biomass valorization. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 1–10. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1100584>
- Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., Decker, K., 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 305, 268–280.
- Júnior, A.D.N.F., 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, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.008>
- Junior, A.S.E., Duda, R.M., Oliveira, R.A. de, 2019. Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in two-stage anaerobic reactors. *J. Clean. Prod.* 238, 117577. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.07.052>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K., 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J. Mol. Biol.* 428, 726–731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Karadag, D., Puhakka, J.A., 2010. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10245–10251. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.139>
- Kargi, F., Eren, N.S., Ozmihci, S., 2012. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 2260–2266. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.018>
- Koendjibiharie, J.G., Van Kranenburg, R., 2019. Identification of a Novel Fumarate Reductase Potentially Involved in Electron Bifurcation Hypothesis Introduction. *Preprints* 1. <https://doi.org/10.20944/preprints201912.0288.v1>
- Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H., Puhakka, J.A., 2007. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 742–758. <https://doi.org/10.1002/bit.21299>
- Kreuzer, H.W., Hill, E.A., Moran, J.J., Bartholomew, R.A., Yang, H., Hegg, E.L., 2017.

- Contributions of the [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenase to H₂ production in *Shewanella oneidensis* MR-1 as revealed by isotope ratio analysis of evolved H₂. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 18–24. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12361>
- Kumar, G., Mathimani, T., Sivaramakrishnan, R., Shanmugam, S., Bhatia, S.K., Pugazhendhi, A., 2020. Application of molecular techniques in biohydrogen production as a clean fuel. *Sci. Total Environ.* 722, 137795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137795>
- Lee, D., Li, Y., Oh, Y., Kim, M., Noike, T., 2009. Effect of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 1244–1252. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.093>
- Li, H., Fu, J., Hu, S., Li, Z., Qu, J., Wu, Z., Chen, S., 2021. Comparison of the effects of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria on the microbial diversity of and the functional pathways in dough as revealed by high-throughput metagenomics sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* 346, 109168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109168>
- Li, Y.C., Nissilä, M.E., Wu, S.Y., Lin, C.Y., Puhakka, J.A., 2012. Silage as source of bacteria and electrons for dark fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15518–15524. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.060>
- Li, Y.F., Ren, N.Q., Chen, Y., Zheng, G.X., 2008. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 755–760. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.004>
- Lin, C., Lay, C., Sen, B., Chu, C., 2012. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15632–15642. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>
- Lin, C.N., Wu, S.Y., Chang, Jian Sheng, Chang, Jo Shu, 2009. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Bioresour. Technol.* 100, 3298–3301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.027>
- Lin, C.Y., Lay, C.H., Sen, B., Chu, C.Y., Kumar, G., Chen, C.C., Chang, J.S., 2012. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15632–15642. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>
- Liu, T., Zhao, Q., Li, Y., Zhu, L., Jiang, L., Huang, H., 2020. Transcriptomics and Proteomics Analyses of the Responses of *Propionibacterium acidipropionici* to Metabolic and Evolutionary Manipulation. *Front. Microbiol.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01564>
- Llorca, J., Idriss, H., 2011. The effect of gold loading and particle size on over Au / TiO₂ nanoparticles. *Nat. Chem.* 3, 489–492. <https://doi.org/10.1038/nchem.1048>
- Lo, Y.C., Chen, X.J., Huang, C.Y., Yuan, Y.J., Chang, J.S., 2013. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 15815–15822. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.083>
- Lomate, S., Bonnotte, T., Paul, S., Dumeignil, F., Katryniok, B., 2013. Synthesis of pyruvic acid by vapour phase catalytic oxidative dehydrogenation of lactic acid. *J. Mol. Catal. A Chem.* 377, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.05.006>
- Louca, S., Polz, M.F., Mazel, F., Albright, M.B.N., Huber, J.A., O'Connor, M.I., Ackermann, M., Hahn, A.S., Srivastava, D.S., Crowe, S.A., Doebeli, M., Parfrey, L.W., 2018. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 936–943. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Analysis of protein concentration using a method. *J. Biol. Chem.* 193, 265–270.

- Lu, Z., Xu, Z., Kong, L., Shen, H., Aschenbach, J.R., 2020. Functional Changes of the Community of Microbes With Ni-Dependent Enzyme Genes Accompany Adaptation of the Ruminal Microbiome to Urea-Supplemented Diets. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596681>
- Madaleno, L.L., Barros, V.G. de, Kesserling, M.A., Teixeira, J.R., Duda, R.M., Oliveira, R.A. de, 2020. The recycling of biodigested vinasse in an upflow anaerobic sludge blanket reactor is a feasible approach for the conservation of freshwater in the biofuel ethanol industry. *J. Clean. Prod.* 262, 121196. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121196>
- Mahmood, T., Zada, B., Malik, S.A., 2013. Effect of Iron Nanoparticles on Hyacinthy's Fermentation. *Int. J. Sci.* 2, 106–121.
- Mäkinen, A.E., Nissilä, M.E., Puhakka, J.A., 2012. Dark fermentative hydrogen production from xylose by a hot spring enrichment culture. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 12234–12240. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.158>
- Malik, S.N., Pugalenti, V., Vaidya, A.N., Ghosh, P.C., Mudliar, S.N., 2014. Kinetics of nano-catalysed dark fermentative hydrogen production from distillery wastewater. *Energy Procedia* 54, 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.284>
- Mazareli, R.C. da S., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2019. *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. *J. Environ. Manage.* 247, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.040>
- McCubbin, T., Gonzalez-Garcia, R.A., Palfreyman, R.W., Stowers, C., Nielsen, L.K., Marcellin, E., 2020. A pan-genome guided metabolic network reconstruction of five propionibacterium species reveals extensive metabolic diversity. *Genes (Basel)*. 11, 1–26. <https://doi.org/10.3390/genes11101115>
- Mohamed, S.N., Thomas, N., Tamilmani, J., Boobalan, T., Matheswaran, M., Kalaihelvi, P., Alagarsamy, A., Pugazhendhi, A., 2020. Bioelectricity generation using iron(II) molybdate nanocatalyst coated anode during treatment of sugar wastewater in microbial fuel cell. *Fuel* 277, 118119. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118119>
- Mohanraj, S., Anbalagan, K., Kodhaiyolii, S., Pugalenti, V., 2014. Comparative evaluation of fermentative hydrogen production using *Enterobacter cloacae* and mixed culture: Effect of Pd (II) ion and phytogenic palladium nanoparticles. *J. Biotechnol.* 192, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.012>
- Moharram, M.A., Abdelhalim, H.S., Rozaik, E.H., Moharram, M.A., Abdelhalim, H.S., Rozaik, E.H., 2019. Anaerobic up flow fluidized bed reactor performance as a primary treatment unit in domestic wastewater treatment Anaerobic up flow fluidized bed reactor performance as a primary treatment unit in domestic wastewater treatment. *HBRC J.* 12, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2014.09.003>
- Montoya, A.C.V., Cristina, R., Palladino, T., Borin, V., Kimiko, I., Oliveira, D., Luiz, E., 2019. Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 21434–21450. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.115>
- Moraes, B.S., Junqueira, T.L., Pavanello, L.G., Cavalett, O., Mantelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M., 2014. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Appl. Energy* 113, 825–835. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>
- Moreira, F.S., Machado, R.G., Romão, B.B., Batista, F.R.X., Ferreira, J.S., Cardoso, V.L., 2017. Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch

- cycles. *Process Biochem.* 58, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.013>
- Moura, A.G.L., Rabelo, C.A.B.S., Okino, C.H., Maintinguer, S.I., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. Enhancement of *Clostridium butyricum* hydrogen production by iron and nickel nanoparticles: Effects on *hydA* expression. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 28447–28461. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.161>
- Muthukumar, H., Mohammed, S.N., Chandrasekaran, N.I., Sekar, A.D., Pugazhendhi, A., Matheswaran, M., 2019. Effect of iron doped zinc oxide nanoparticles coating in the anode on current generation in microbial electrochemical cells. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 2407–2416. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.06.046>
- Narueworanon, P., Laopaiboon, L., Phukoetphim, N., 2020. Impacts of Initial Sugar, Nitrogen and Calcium Carbonate on Butanol Fermentation from Sugarcane Molasses by *Clostridium beijerinckii*. *Energies* 13, 694–713.
- Nath, D., Manhar, A.K., Gupta, K., Saikia, D., Das, S.K., Mandal, M., 2015. Phytosynthesized iron nanoparticles: Effects on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DH-89. *Bull. Mater. Sci.* 38, 1533–1538. <https://doi.org/10.1007/s12034-015-0974-0>
- Niu, D., Wang, L.H., Zeng, X.A., Wen, Q.H., Brennan, C.S., Tang, Z.S., Wang, M.S., 2019. Effect of ethanol adaption on the inactivation of *Acetobacter* sp. by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 52, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.009>
- Ottaviano, L.M., Ramos, L.R., Botta, L.S., Amâncio Varesche, M.B., Silva, E.L., 2017. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 4848–4860. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.168>
- Pachapur, V.L., Sarma, S.J., Brar, S.K., Bihan, Y. Le, Buelna, G., Verma, M., 2017. Hydrogen production from biodiesel industry waste by using a co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Biofuels* 8, 651–662. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1122471>
- Pant, D., Adholeya, A., 2007. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 98, 2321–2334. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.027>
- Parawira, W., Murto, M., Read, J.S., Mattiasson, B., Murto, M., Read, J.S., Study, B.M.A., 2007. A Study of Two-Stage Anaerobic Digestion of Solid Potato Waste using Reactors under Mesophilic and Thermophilic Conditions. *Environ. Technol.* 28, 1205–1216. <https://doi.org/10.1080/09593332808618881>
- Park, Jong Hun, Kim, D.H., Baik, J.H., Park, Jeong Hoon, Yoon, J.J., Lee, C.Y., Kim, S.H., 2021. Improvement in H₂ production from *Clostridium butyricum* by co-culture with *Sporolactobacillus vineae*. *Fuel* 285, 119051. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119051>
- Parmanand, B.A., Kellingray, L., Le Gall, G., Basit, A.W., Fairweather-Tait, S., Narbad, A., 2019. A decrease in iron availability to human gut microbiome reduces the growth of potentially pathogenic gut bacteria; an in vitro colonic fermentation study. *J. Nutr. Biochem.* 67, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.010>
- Parsaee, M., Kiani Deh Kiani, M., Karimi, K., 2019. A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy* 122, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>
- Patel, S.K.S., Lee, J.K., Kalia, V.C., 2018. Nanoparticles in Biological Hydrogen Production: An Overview. *Indian J. Microbiol.* 58, 8–18. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0678-9>
- Patra, S., Lay, C., Lin, C., O-thong, S., Reungsang, A., 2010. Performance and population

- analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 8697–8703. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.120>
- Paudel, S., Kang, Y., Yoo, Y.S., Seo, G.T., 2017. Effect of volumetric organic loading rate (OLR) on H₂ and CH₄ production by two-stage anaerobic co-digestion of food waste and brown water. *Waste Manag.* 61, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.013>
- Peñas, F.J., Sevillano, X., Peñas, M.I., 2019. Modeling of organic shock loading in a fluidized-bed bioreactor containing sorbent particles. *Biochem. Eng. J.* 151, 107308. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107308>
- Penella, J.M.S., Laparra, J.M., Sanz, Y., Haros, M., 2012. Assessment of iron bioavailability in whole wheat bread by addition of phytase-producing bifidobacteria. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3190–3195. <https://doi.org/10.1021/jf205048r>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids. Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Rabelo, C.A.B.S., Okino, C.H., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2020. Isolation of *Paraclostridium* CR4 from sugarcane bagasse and its evaluation in the bioconversion of lignocellulosic feedstock into hydrogen by monitoring cellulase gene expression. *Sci. Total Environ.* 715, 136868. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136868>
- Rabelo, C.A.B.S., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. *J. Environ. Manage.* 223, 952–963. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.015>
- Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M.K., Alahyaribeik, S., 2020. The effect of lactobacillus cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe* 62, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102103>
- Ramos, L.R., Silva, E.L., 2020. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 5239–5251. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.025>
- Ramos, L.R., Silva, E.L., 2018a. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 13081–13089. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.070>
- Ramos, L.R., Silva, E.L., 2018b. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 13081–13089. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.070>
- Rana, A., Yadav, K., Jagadevan, S., 2020. A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *J. Clean. Prod.* 272, 122880. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122880>
- Regueira, A., Cabaleiro, R., Ofiteru, I.D., Rodríguez, J., Lema, J.M., 2018. Electron bifurcation mechanism and homoacetogenesis explain products yields in mixed culture anaerobic fermentations. *Water Res.* 141, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.013>
- Reis, C.M., Carosia, M.F., Sakamoto, I.K., Amâncio Varesche, M.B., Silva, E.L., 2015. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 8498–8509. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.136>

- Rodrigues, M.I., Iemma, P.E., 2005. Otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.
- Rodríguez, A.G., Moreno-Olivas, F., Marcos, R., Tako, E., Marques, C.N.H., Mahler, G.J., 2020. The role of metal oxide nanoparticles, *Escherichia coli*, and *Lactobacillus rhamnosus* on small intestinal enzyme activity. *Environ. Sci. Nano* 7, 3940–3964. <https://doi.org/10.1039/d0en01001d>
- Russo, V., Hrobar, V., Mäki-Arvela, P., Eränen, K., Sandelin, F., Di Serio, M., Salmi, T., 2018. Kinetics and Modelling of Levulinic Acid Esterification in Batch and Continuous Reactors. *Top. Catal.* 61, 1856–1865. <https://doi.org/10.1007/s11244-018-0998-y>
- Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Santos, S., Ru, P., Sakamoto, I.K., Ama, M.B., Luiz, E., Luis, R.W., 2014. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 9599–9610. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.104>
- Satar, I., Bakar, M.H.A., Daud, W.R.W., Mohd Yasin, N.H., Somalu, M.R., Kim, B.H., 2020. Performance of nickel-iron foam (Ni-Fe) cathode in bio-electrochemical system for hydrogen production from effluent of glucose fermentation. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 260, 114613. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114613>
- Scholz, C.F.P., Kilian, M., 2016. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus propionibacterium to the proposed novel genera acidipropionibacterium gen. nov., cutibacterium gen. nov. and pseudopropionibacterium gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4422–4432. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001367>
- Seelert, T., Ghosh, D., Yargeau, V., 2015. Improving biohydrogen production using *Clostridium beijerinckii* immobilized with magnetite nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4107–4116. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6484-6>
- Sewwandi, K.A.H.S., Nitorisavut, R., 2020. Nano zero valent iron embedded on chitosan for enhancement of biohydrogen production in dark fermentation. *Energy Reports* 6, 392–396. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2020.11.225>
- Shah, T.M., Ramaswami, S., Behrendt, J., Otterpohl, R., 2017. Journal of Water Process Engineering Simultaneous removal of organics and ammonium-nitrogen from reverse osmosis concentrate of mature landfill leachate. *J. Water Process Eng.* 19, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.07.024>
- Sharma, K., 2019. Carbohydrate-to-hydrogen production technologies: A mini-review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 105, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.054>
- Shida, G., Rocha, A., Marques, C., Zamariolli, R., Lucena, E., Amorim, C. De, Luiz, E., Luis, R.W., 2009. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 3679–3688. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.076>
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L., 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
- Smith, C.I., Martin, S.R., Smith, K.S., 2006. Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends Microbiol.* 14, 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.001>
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr.*

- Opin. Biotechnol. 27, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.003>
- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V.K., Sengar, R.S., Gupta, V.K., Mazumder, P.B., Khan, A.F., Mishra, P.K., 2019. Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversion for biofuels application. *Biomolecules* 9, 1–23. <https://doi.org/10.3390/biom9060220>
- Sun, Y.P., Li, X. qin, Cao, J., Zhang, W. xian, Wang, H.P., 2006. Characterization of zero-valent iron nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 120, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.03.001>
- Suzuki, T., Kobayashi, S., Miyahira, K., Sugiyama, M., Katsuki, K., Ishikawa, M., 2021. DNA-binding protein from starvation cells traps intracellular free-divalent iron and plays an important role in oxidative stress resistance in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *J. Biosci. Bioeng.* 131, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.005>
- Taherdanak, M., Zilouei, H., Karimi, K., 2016. The effects of Fe0 and Ni0 nanoparticles versus Fe2+ and Ni2+ ions on dark hydrogen fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.110>
- Taylor, K.A.C.C., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 56, 49–58. <https://doi.org/10.1007/BF02787869>
- Thomas, K., Ironside, K., Clark, L., Bingle, L., 2021. Preliminary microbiological and chemical analysis of two historical stock ales from Victorian and Edwardian brewing. *J. Inst. Brew.* <https://doi.org/10.1002/jib.641>
- Tkacz, A., Hortala, M., Poole, P.S., 2018. Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples. *Microbiome* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0491-7>
- Turgay, M., Bachmann, H.-P., Irmeler, S., von Ah, U., Fröhlich-Wyder, M.-T., Falentin, H., Deutsch, S.-M., Jan, G., Thierry, A., 2020. *Propionibacterium* spp. and *Acidipropionibacterium* spp., in: Reference Module in Food Science. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Turhal, S., Turanbaev, M., Argun, H., 2019. Hydrogen production from melon and watermelon mixture by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 4, 18811–18817. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.011>
- Valdez, I., Amado, R., Souza, F., Elia, E., 2012. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. *Quim. Nova* 35, 601–607.
- Wan, J., Jing, Y., Zhang, S., Angelidaki, I., Luo, G., 2016. Mesophilic and thermophilic alkaline fermentation of waste activated sludge for hydrogen production: Focusing on homoacetogenesis. *Water Res.* 102, 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.002>
- Wang, J., Wan, W., 2008. Influence of Ni2+ concentration on biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 99, 8864–8868. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.052>
- Wang, M.Y., Olson, B.H., Chang, J.S., 2008a. Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, *hydA* gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 525–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1317-x>
- Wang, M.Y., Tsai, Y.L., Olson, B.H., Chang, J.S., 2008b. Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 4730–4738. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.048>

- Wang, P., Shen, C., Li, L., Guo, J., Cong, Q., Lu, J., 2020. Simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 from corn stalk hydrolysates by *Propionibacterium freudenreichii* in an expanded bed adsorption bioreactor. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 50, 763–767. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1734942>
- Wang, Q., Kuninobu, M., Ogawa, H.I., Kato, Y., 1999. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 16, 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00016-1)
- Wang, Z., Xu, G., Du, W., Zhang, Y., Wang, Y., Su, Z., 2020. Efficient ex-situ biosynthesis of vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* using membrane separation coupling technology. *Biochem. Eng. J.* 161, 107688. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107688>
- White, D., 2000. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. Oxford University Press.
- Wicher, E., Seifert, K., Zagrodnik, R., Pietrzyk, B., Laniecki, M., 2013. Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 7767–7773. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.04.008>
- Wodrich, M.D., Hu, X., 2018. Natural inspirations for metal–ligand cooperative catalysis. *Nat. Rev. Chem.* 2, 1–7. <https://doi.org/10.1002/9783527809080.catanz04003>
- Won, S.G., Baldwin, S.A., Lau, A.K., Rezadehbashi, M., 2013. Optimal operational conditions for biohydrogen production from sugar refinery wastewater in an ASBR. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13895–13906. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.071>
- Wong, Y.M., Wu, T.Y., Ling, T.C., Show, P.L., Lee, S.Y., Chang, J.S., Ibrahim, S., Juan, J.C., 2018. Evaluating new bio-hydrogen producers: *Clostridium perfringens* strain JJC, *Clostridium bifermentans* strain WYM and *Clostridium* sp. strain Ade.TY. *J. Biosci. Bioeng.* 125, 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.012>
- Wu, S., Lin, C., Chang, J., 2003. Hydrogen Production with Immobilized Sewage Sludge in Three-Phase Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 19, 828–832.
- Wu, S.H., Chen, D.H., 2003. Synthesis and characterization of nickel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol. *J. Colloid Interface Sci.* 259, 282–286. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00135-2)
- Xie, C., Coda, R., Chamlagain, B., Varmanen, P., Piironen, V., Katina, K., 2019. Co-fermentation of *propionibacterium freudenreichii* and *lactobacillus brevis* in wheat bran for in situ production of vitamin B12. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01541>
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Yang, S., Liu, Y., Wu, N., Zhang, Y., Svoronos, S., Pullammanappallil, P., 2019. Low-cost, Arduino-based, portable device for measurement of methane composition in biogas. *Renew. Energy* 138, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.083>
- Yang, X., Xu, M., Yang, S.T., 2016. Restriction modification system analysis and development of in vivo methylation for the transformation of *Clostridium cellulovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2289–2299. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7141-9>
- Yin, Y., Wang, J., 2021. Mechanisms of enhanced hydrogen production from sewage sludge by ferrous ion: Insights into functional genes and metabolic pathways. *Bioresour. Technol.* 321, 124435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124435>
- Yin, Y., Wang, J., 2019. Enhanced biohydrogen production from macroalgae by zero-valent iron nanoparticles: Insights into microbial and metabolites distribution. *Bioresour.*

- Technol. 282, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.128>
- Yin, Y., Wang, J., 2017. Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 12173–12180. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.083>
- Yun, J.H., Cho, K.S., 2017. Effect of hydraulic retention time on suppression of methanogens during a continuous biohydrogen production process using molasses wastewater. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 52, 37–44. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1221221>
- Zhang, C., Hu, C., Cao, W., Wang, M., Hou, F., Yu, A., Xie, H., Lou, J., Sun, C., Liu, R., 2019. Essential regulators of iron chemical speciation distributions in anaerobic digestion of pretreated food waste: Organic volatile fatty acids or inorganic acid radicals? *Bioresour. Technol.* 293, 122051. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122051>
- Zhang, L., Loh, K.C., Lim, J.W., Zhang, J., 2019. Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 100, 110–126. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.10.021>
- Zhang, Lei, Xu, D., Kong, D., Ji, M., Shan, L., Zhao, Y., 2020. Improving dark fermentative hydrogen production through zero-valent iron/copper (Fe/Cu) micro-electrolysis. *Biotechnol. Lett.* 42, 445–451. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02793-5>
- Zhang, Lu, Zhao, R., Jia, D., Jiang, W., Gu, Y., 2020. Engineering *Clostridium ljungdahlii* as the gas-fermenting cell factory for the production of biofuels and biochemicals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 59, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.010>
- Zhang, Lei, Zhang, Lixia, Li, D., 2015. Enhanced dark fermentative hydrogen production by zero-valent iron activated carbon micro-electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 12201–12208. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.106>
- Zhang, Y., Shen, J., 2007. Enhancement effect of gold nanoparticles on biohydrogen production from artificial wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.004>
- Zhang, Z., Guo, L., Wang, Y., Zhao, Y., She, Z., Gao, M., Guo, Y., 2020. Application of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles during the two-stage anaerobic digestion with waste sludge: Impact on the biogas production and the substrate metabolism. *Renew. Energy* 146, 2724–2735. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.078>
- Zhang, Z., Show, K., Tay, J., Tee, D., Lee, D., 2008. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors — A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.048>
- Zhang, Z.P., Show, K.Y., Tay, J.H., Liang, D.T., Lee, D.J., 2008. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.048>
- Zhao, W., Zhang, Y., Du, B., Wei, D., Wei, Q., Zhao, Y., 2013. Enhancement effect of silver nanoparticles on fermentative biohydrogen production using mixed bacteria. *Bioresour. Technol.* 142, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.042>
- Zhao, X., Wang, Z., Zhou, X., Qi, N., Chen, F., Li, D., Li, X., 2019. Full length obtains of *hydA* and phylogenetic analysis of bio-hydrogen production new species of *Clostridium* based on efficient *hydA* degenerate primers. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 29493–29499. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.050>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle,

- M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhong, D., Li, J., Ma, W., Xin, H., 2020. Magnetite nanoparticles enhanced glucose anaerobic fermentation for bio-hydrogen production using an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 10664–10672. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.095>
- Zhu, Q.L., Xu, Q., 2016. Immobilization of Ultrafine Metal Nanoparticles to High-Surface-Area Materials and Their Catalytic Applications. *Chem* 1, 220–245. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2016.07.005>