

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E
SANEAMENTO



THIAGO DIAS MARQUES

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM UM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO
FLUIDIFICADO A PARTIR DO SORO DE LEITE

Maceió
2018

THIAGO DIAS MARQUES

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM UM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO
FLUIDIFICADO A PARTIR DO SORO DE LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena
Cavalcante de Amorim

Maceió

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

M357p

Marques, Thiago Dias.

Produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fluidificado a partir do soro de leite / Thiago Dias Marques. – 2019.

73f. : il. color.

Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 69-73.

1. Digestão anaeróbia. 2. Hidrogênio - Produção. 3. Soro do leite.
4. Fermentação escura. I. Título.

CDU: 621.318.43




Folha de Aprovação

THIAGO DIAS MARQUES

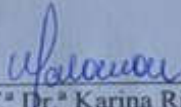
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM UM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO
FLUIDIFICADO A PARTIR DO SORO DE QUEIJO

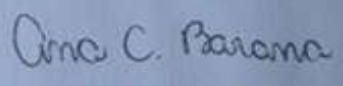
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Em: 26/03/2018


Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim (Orientador- PPGRHS)

Banca examinadora:


Prof.ª Dr.ª Karina Ribeiro Salomon
(Examinadora interna – PPGRHS/CTEC/UFAL)


Prof.ª Dr.ª Ana Cláudia Barana
(Examinadora externa – UEPG)

“À Deus por todo seu amor e misericórdia”
“Aos meus Pais Maria e José e a minha irmã Tayane” Por todo
apoio e amor incondicional que sempre tiveram por mim”

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado força e sabedoria para que pudesse terminar mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais e minha irmã Tayane por todo amor e carinho que foram fundamentais durante esta caminhada.

À minha família que mesmo distante sempre me apoiou.

Aos meus primos Anderson, Neto, Taymare e Raquel.

Ao meu orientador Eduardo Lucena por toda paciência e apoio durante toda pesquisa.

Aos meus companheiros de casa Heitor e Cinthia pelos momentos vividos em Maceió.

Aos meus colegas de turma que me receberam tão bem em Maceió em especial ao Klewerton, Valquernei e o Aldo.

Aos colegas da turma 2016 em especial ao Tardelly, Marconi e a Renata

Aos companheiros da casinha sem a ajuda de vocês tudo seria muito mais complicado em especial ao Vinicius, Taciana e a Alice.

Ao corpo docente do PPGRHS por todo conhecimento transmitido e infraestrutura fornecida durante a pesquisa.

Aos professores da EESC/USP Maria Bernadete, Marcia Damianovic, Eugenio Foresti e Edson Luiz por todos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas cursadas nesta instituição.

Aos colegas que compartilharam casa comigo durante minha estadia em São Carlos, Gregório e Jailto, que foram fundamentais para minha adaptação nesta cidade.

Aos meus amigos da graduação Ricardo Silvestre, Newton Braga, Jadson, João, André Luiz e Ícaro.

A minha namorada Larissa pelo seu apoio durante os momentos difíceis.

E por fim queria agradecer a todos aqueles que me apoiaram de maneira direta ou indireta.

Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa”

Albert Einstein

RESUMO

O gás hidrogênio é considerado uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis por ser altamente energético, limpo e renovável. Este pode ser obtido através da digestão anaeróbia utilizando águas residuais proveniente das indústrias. Os resíduos gerados na indústria de laticínios são altamente poluentes e ricos em carboidratos (lactose) e são gerados em altas quantidades o que torna a produção de hidrogênio a partir desse efluente viável pela fermentação escura. Uma das alternativas para produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia é a utilização de um reator anaeróbio de leito fluidificado, entretanto, é necessário o estudo dos parâmetros operacionais que interferem na produção de hidrogênio. O objetivo deste trabalho, foi estudar o efeito do tempo de detenção hidráulica em um reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) com soro de leite como fonte de carbono em temperatura mesofílica. Neste trabalho foi operado um RALF com um tempo de detenção hidráulica- TDH variável (6,4, 2, 1 e 0,5h) e com uma concentração fixa de 2800 mg carboidrato L⁻¹, o reator foi inoculado com lodo proveniente de um reator UASB com tratamento térmico para inativar os microrganismos metanogênicos, foi operado durante 223 dias com pneu triturado como meio suporte para aderência da comunidade microbiana e uma temperatura que variou 25,9 e 33,2 sempre na faixa mesofílica. Foi verificada uma redução na taxa de eficiência de remoção de carboidrato de 81,02±5,30 para 54,45±2,47 % e um aumento na produção volumétrica de hidrogênio de 0,039±0,009 para 1,433± 0,133 L H₂.LReator⁻¹ com a redução do TDH de 6 para 0,5 h, o melhor rendimento de hidrogênio foi de 2,73 mol H₂ mol.glicose⁻¹ e ocorreu no TDH = 6h. Os principais metabólitos produzidos pelo reator foram ácido acético e butírico também houve a presença de metanol, etanol n-butanol, ácido caproico. As análises de DGGE mostraram uma similaridade das comunidades microbianas de 80% entre os TDHs 6 e 0,5 h e de 83% entre TDHs 4 e 2 h. O trabalho mostrou a viabilidade da produção de hidrogênio nas condições aplicadas no estudo.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia. Produção de hidrogênio. Efluentes de laticínios. Fermentação escura.

ABSTRACT

The hydrogen gas is considered a promising alternative to fossil fuels by being highly energetic, clean and renewable. This can be obtained by using anaerobic digestion from wastewater industries. The waste generated in the dairy industry are highly polluting and rich in carbohydrates and are generated in large quantities which makes hydrogen production from wastewater is feasible by dark fermentation. One of the alternatives for hydrogen production from anaerobic digestion is the use of an anaerobic Fluidised bed reactor, however, it is necessary to study the operating parameter that interfere with the production of hydrogen. The objective of this work was to study the effect of hydraulic detention time in an anaerobic Fluidised bed reactor (AFRB) with whey as carbon source at mesophilic. In this work, we operated a RALF with a hydraulic detention time-TDH variable (6.4, 2, 1 and 0.5 h) and with a fixed 2800 mg glucose L⁻¹ concentration the reactor was inoculated with sludge from a UASB reactor with heat treatment to inactivate microorganisms metanogênicos, was operated during 223 days with shredded tire as a means to support adherence of the microbial community and a temperature that varied 25.9 and 33.2 always in the range mesophilic. It was verified a reduction in the rate of carbohydrate removal efficiency of 81.02±5.30 to 54.45±2.47% and an increase in volume production of hydrogen of 0.039± 0.009 to 1.433± 0.133 LH₂. L Reactor⁻¹ with the reduction of TDH of 6 for 0.5 h, the best hydrogen yield was 2.73 mol glucose .mol⁻¹H₂ and it occurred on the TDH = 6 h the main metabolites produced by the reactor were acetic acid and butyric acid, there was also the presence of methanol, ethanol, n-butanol, caproic acid. DGGE analysis showed a similarity of the microbial communities of 80% between the TDHs 6 and 0.5 h and 83% between 4 and 2 h. The work showed the viability of hydrogen production under the conditions applied in this study.

Key words: Anaerobic digestion. Hydrogen production. Dark fermentation. Dairy wastewater

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção biológica de hidrogênio.....	19
Figura 2 - Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.....	20
Figura 3 - Esquema das rotas metabólicas nos processos anaeróbios.....	23
Figura 4 - Fluxograma da metodologia utilizada no experimento.....	36
Figura 5 - Pneu triturado que foi utilizado como meio suporte do Ralf.....	38
Figura 6 - Tratamento de Inóculo.....	39
Figura 7 - Configuração do Reator e as Bombas utilizadas no estudo.....	40
Figura 8 - Medidor volumétrico de gás hidrogênio.....	42
Figura 9 - Comportamento do carboidrato afluente, efluente e eficiência.....	49
Figura 10 - Comportamento da DQO afluente, efluente e eficiência.....	51
Figura 11 - Comportamento do pH durante a operação do reator.....	53
Figura 12 - Comportamento do rendimento de hidrogênio.....	56
Figura 13 - Comportamento da produção volumétrica de hidrogênio.....	58
Figura 14 - Conteúdo médio do biogás.....	59
Figura 15 - Metabólitos produzidos pelo reator.....	61
Figura 16 - Dendrograma da operação do reator.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Histórico da produção de leite no Brasil.....	24
Tabela 2 - Quantidade de efluente gerado por produto fabricado.....	25
Tabela 3 - Característica dos efluentes gerados na indústria de laticínios.....	26
Tabela 4 - Produção de hidrogênio utilizando efluente da indústria de laticínio.....	29
Tabela 5- Produção de hidrogênio em diversos reatores.....	33
Tabela 6 - Característica do soro de leite em pó que foi utilizado no estudo para uma porção de 26 G.....	37
Tabela 7- Principais características do pneu triturado.....	38
Tabela 8 - Fases de operação do reator durante o período de estudo.....	41
Tabela 9 - Métodos da análises físico-química.....	44
Tabela 10 - Primers utilizados na análises de biologia molecular.....	46
Tabela 11- Condições usadas no termociclador.....	46
Tabela 12 - Propriedades físico-químicas do soro de leite na concentração de 2800 mg/L..	48
Tabela 13 - Valores médios de carboidrato afluente, efluente e eficiência.....	49
Tabela 14 - Valores médios de DQO afluentes, efluentes e eficiência.....	52
Tabela 15 - Valores médios de ph durante toda operação.....	53
Tabela 16 - Valores médios dos sólidos voláteis efluente.....	54
Tabela 17 - Valores médios do rendimento de hidrogênio.....	55
Tabela 18 - Valores médios da produção volumétrica de hidrogênio.....	57
Tabela 19 - Valores médios do conteúdo de biogás (%).....	59
Tabela 20 - Valores dos metabólitos produzidos.....	62
Tabela 21 - Balanço de DQO.....	63
Tabela 22- Resumo dos melhores parâmetros operacionais.....	66

LISTA DE SIGLAS

AnSBBR:	Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial contendo Biomassa Imobilizada
BNR:	Bactérias Nitrato-Redutoras
BRS:	Bactérias Redutoras de Sulfatos
CSTR:	Reator Contínuo de Tanque Agitado
DBO:	Demanda Biológica de Oxigênio
DGGE:	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DQO:	Demanda Química de Oxigênio
FID:	Detector de Ionização de Chamas
HPR:	Produção Volumétrica de Hidrogênio
HY:	Rendimento de Hidrogênio
PVH:	Produção Volumétrica de Hidrogênio
LPB:	Laboratório de Processos Biológicos
LSA:	Laboratório de Saneamento Ambiental
PCR:	Reação de Cadeia em Polimerase
PPGRHS:	Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos
RALF:	Reator Anaeróbios de Leito Fluidificado
TDH:	Tempo de Detenção Hidráulica
UFAL:	Universidade Federal de Alagoas
USP:	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS E METAS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Produção de hidrogênio	17
3.2	Digestão anaeróbia	19
3.3	Rotas metabólicas da digestão anaeróbia	21
3.4	Indústria de laticínios e os subprodutos gerados	23
3.5	Produção de hidrogênio a partir dos subprodutos da indústria de laticínio	26
3.6	Fatores operacionais na produção de H₂	30
3.6.1	Temperatura.....	30
3.6.2	ph.....	30
3.6.3	Tempo de detenção hidráulica.....	31
3.6.4	Substrato.....	32
3.6.5	Reatores anaeróbios na produção de hidrogênio.....	33
3.6.6	Meio suporte.....	34
4	METODOLOGIA	36
4.1	Água residuária	37
4.2	Material suporte	37
4.3	Inóculo	38
4.4	Operação do reator	39
4.5	Análises físico-químicas	41
4.5.1	Determinação do teor de carboidratos totais.....	41
4.5.2	Determinação do teor de biogás e hidrogênio.....	41
4.5.3	Determinação dos metabolitos.....	42
4.5.4	periodicidade das análises.....	43
4.6	Cálculos dos principais parâmetros	44
4.7	Análise da biologia molecular dos microrganismos	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1	Caracterização físico-química do soro de leite	48
5.2	Teor de carboidrato total	48

5.3	Demanda Química de Oxigênio (DQO)	50
5.4	Potencial hidrogeniônico (pH)	52
5.5	Determinação de sólidos suspensos	53
5.6	Produção do biogás	54
5.6.1	Rendimento de hidrogênio (HY)	54
5.6.2	Produção volumétrica de hidrogênio (PVH).....	57
5.6.3	Conteúdo do biogás.....	58
5.7	Metabólitos produzidos pelo reator	60
5.8	Balço de carbono	62
5.9	Análise da dinâmica microbiana	64
5.10	Discussão sobre as melhores condições operacionais	65
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados é atualmente a principal fonte de energia do mundo. Porém, o uso excessivo desses combustíveis pode ocasionar problemas como esgotamento dessa fonte energética, por ser não renovável, e impactos ambientais negativos visto que, na combustão desses combustíveis são lançados gases prejudiciais a camada de ozônio (AMORIM; SADER; SILVA,2012; OTAVVIANO, 2014).

Nesse contexto, outras fontes de energias alternativas vêm sendo exploradas. O hidrogênio surge como um forte concorrente para substituição dos combustíveis fósseis, por ser uma fonte energia limpa por liberar apenas vapor d'água em sua combustão, e ter alto poder energético (142 kJ/g^{-1}) e ser uma fonte de energia renovável (AMORIM,SADER; SILVA, 2012; OTAVVIANO, 2014).

Apesar de ser o elemento mais abundante do mundo, o hidrogênio quase sempre se encontra de forma combinada e, não pode ser utilizado diretamente como fonte de energia (AMORIM; SADER; SILVA, 2012).O hidrogênio para ser utilizado como fonte de energia deve ser separado e extraído na sua forma molecular dos outros elementos quais se encontram combinados (ANDRADE, 2007).

As principais metodologias para produção de hidrogênio são a partir de combustíveis fósseis, água e processos biológicos (AMORIM, 2009). Entretanto, os processos que utilizam combustíveis fósseis e os que utilizam água podem não ser ambientalmente corretos ou economicamente inviáveis (AMORIM, 2009).

O processo biológico, fermentação, pode ser uma forma sustentável de produzir hidrogênio. Visto que, utiliza diversos resíduos industriais como fonte de carboidrato para os microrganismos que são utilizados no processo (REIS, 2010).

Diante disso, diversos estudos têm avaliado os parâmetros para otimização da produção de hidrogênio a partir da fermentação (CAPPELLETTI, 2009; LAMAISON, 2009). Entre estes parâmetros, o tipo de substrato é importante. Diversos resíduos industriais têm sido estudados no processo da fermentação (manipueira, soro de leite, glicerina, melaço e outros).O soro de leite surge como um potencial substrato para produção de hidrogênio. Este resíduo é um subproduto da indústria de laticínio rico em matéria carbonácea o que beneficia a produção de hidrogênio (AZBAR, 2009; OTAVVIANO, 2014; REIS, 2010).

Os efluentes, que são gerados na indústria de laticínio podem ser facilmente biodegradáveis, com elevadas carga orgânica e são considerados altamente poluente. Este

resíduo, é composto por lactose (70-72%), proteína (8-10%) e minerais (12-15%) e tem Demanda Química de Oxigênio(DQO) variando entre 25 e 80 g DQO/L o que torna a digestão anaeróbia um processo altamente atrativo para o tratamento deste resíduo (OTTAVIANO, 2014).

Os resíduos da indústria de laticínio, se não forem dispostos de maneira correta podem impactar o meio ambiente por possuírem uma grande quantidade de carga orgânica e serem produzidos em grandes volumes (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2013). O processo de tratamento através da digestão anaeróbia é considerado uma medida mitigadora do referido impacto ambiental, além de poder promover a recuperação de energia através dos gases hidrogênio e metano e gerar subprodutos com valor agregado (etanol, ácido lático, ácido acético e outros) (SHOW, 2011).

Nota-se que para o tratamento através da digestão anaeróbia, diversas configurações de reatores podem ser utilizadas, entre elas, CSTR, UASB, batelada, RALF e outros. O RALF é um reator anaeróbio para tratamento de resíduos orgânicos, geralmente utilizado em baixos TDHs que apresenta alta eficiência de remoção de matéria orgânica por ter um sistema de recirculação do efluente e utilizar um sistema de fluidização do material suporte, o que aumenta o contato entre os microrganismos e o substrato (SHIDA, 2008).

Percebe-se que os parâmetros operacionais (TDH, tipo do substrato, concentração inicial do substrato, TCO, tratamento do inóculo e outros) interferem diretamente na produção de hidrogênio, e por isso diversos estudos têm sido realizados em busca da otimização dos parâmetros para uma melhor produção de hidrogênio. Entre estes parâmetros, o TDH é de suma importância pois através dele ocorre o controle TCO e o controle do crescimento dos microrganismos consumidores de hidrogênio e podem ser lavados do reator em baixos TDHs (CHINELLATO et al., 2013)

Estudos anteriores (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2009; LIMA et al., 2016;MACÁRIO, 2016; OTTAVIANO et al., 2016; ROSA et al., 2014), usaram efluente da indústria de laticínio como substrato para produção de hidrogênio e obtiveram resultados satisfatórios, com rendimento entre 1,12 e 3,67 mol H₂/mol lactose⁻¹ mostrando a viabilidade do estudo

O efluente do laticínio, foi estudado em diversas configurações de reatores utilizando várias estratégias operacionais. Entretanto, o efeito do tempo de detenção hidráulica em um RALF não foi estudado sob condições mesofílicas utilizando soro de queijo em pó como substrato.

Baseado na revisão bibliográfica, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do tempo de detenção hidráulica sob um RALF em temperatura mesofílica utilizando soro de leite em pó como substrato.

Vale ressaltar, que este trabalho está inserido no projeto intitulado Produção de Biohidrogênio e Bioetanol a partir de resíduos agroindustriais do edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 com processo nº 441495/2014-1. Além disso, outros trabalhos na linha de produção de hidrogênio com diversos substratos (manipueira, beneficiamento do coco, suínocultura, vinhaça, indústria de refrigerantes), foram desenvolvidos no Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos-PPGRHS da Universidade Federal de Alagoas – UFAL e este trabalho dará continuidade as pesquisas anteriormente realizadas (AMORIM; SADER; SILVA,2012; CARDOSO, 2014; MACÁRIO, 2016; SILVA, 2015; VILELA, 2013).

2 OBJETIVOS E METAS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência da concentração inicial de substrato e do tempo de detenção hidráulica na produção de hidrogênio utilizando um reator anaeróbio de leite fluidificado sobre condições mesofílicas com soro de leite em pó como substrato.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do TDH na produção de hidrogênio;
- Avaliar as remoções de DQO e carboidrato com o aumento da TCO;
- Avaliar a composição dos metabólitos solúveis e gasosos produzidos (etanol, ácido acético, butírico, propiônico, hidrogênio, gás carbônico e metano);
- Avaliar a dinâmica microbiana envolvida no processo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de hidrogênio

O hidrogênio é um combustível limpo, produzindo na sua combustão apenas vapor d'água e ainda é considerado uma fonte de energia renovável, por isso é considerado um combustível ambientalmente correto, sustentável e uma alternativa energética aos combustíveis fósseis. Além disso, o hidrogênio possui alto poder calorífico (142kJ/g) maior que os combustíveis fósseis como gasolina (43 kJ/g) e gás natural (57kJ/g) (AMORIM, 2009; OTTAVIANO 2014; REIS, 2015).

O hidrogênio é o elemento químico mais abundante da terra, entretanto, ele não se encontra pronto para o uso e convencionalmente é produzido a partir da reforma a vapor do gás natural e podem ser produzidos pelos métodos da biofotólise direta e indireta, fotofermentação e fermentação no escuro. De uma maneira geral, existem três fontes para produção de hidrogênio que são: combustíveis fósseis, água e biomassa. Vale ressaltar, que os métodos a partir de combustíveis fósseis não são ambientalmente correto, sendo necessário a busca por uma produção de hidrogênio de águas residuais e biomassa (AMORIM, 2009; OTTAVIANO 2014; REIS, 2015).

A biofotólise direta é um método semelhante ao que ocorre na fotossíntese das algas, e tem como principal vantagem obtenção de hidrogênio a partir da água. No entanto, utiliza uma enzima chamada Fe-hidrogenase que é extremamente sensível à presença de oxigênio e, portanto precisa de condições especiais para ocorrer a produção de hidrogênio. Neste processo, as algas verdes capturam energia da luz e convertem água em hidrogênio e oxigênio conforme a equação (1) (AMORIM, 2009; AMORIM; SADER, SILVA, 2012).



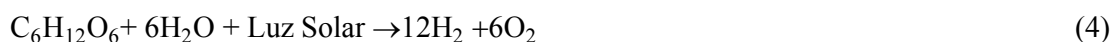
Na biofotólise indireta ocorre produção de hidrogênio a partir das cianobactérias, que utilizam o dióxido de carbono da atmosfera (fonte de carbono), água (doador de elétrons) e luz solar (fonte de energia) para geração de hidrogênio conforme as equações (2) e (3). As cianobactérias utilizam primeiro o CO₂ para produzir substâncias celulares, que logo após são utilizadas para produção de hidrogênio (AMORIM, 2009; AMORIM; SADER; SILVA, 2012).





Na fotofermentação, as bactérias fotossintetizantes utilizam glicose e água e convertem em dióxido de carbono e hidrogênio equação (4). Essas bactérias não conseguem dividir a molécula de água. No entanto, em condições anaeróbias conseguem utilizar ácidos orgânicos simples como doadores de elétrons que são transportados pela Fe-nitrogenase pelo uso de energia na forma de ATP. Na ausência de nitrogênio essa enzima pode reduzir prótons em gás hidrogênio (AMORIM, 2009).

As vantagens desse processo são o alto rendimento de conversão teórica de hidrogênio e a utilização de substratos orgânicos como fonte de carbono (AMORIM; SADER; SILVA, 2012).

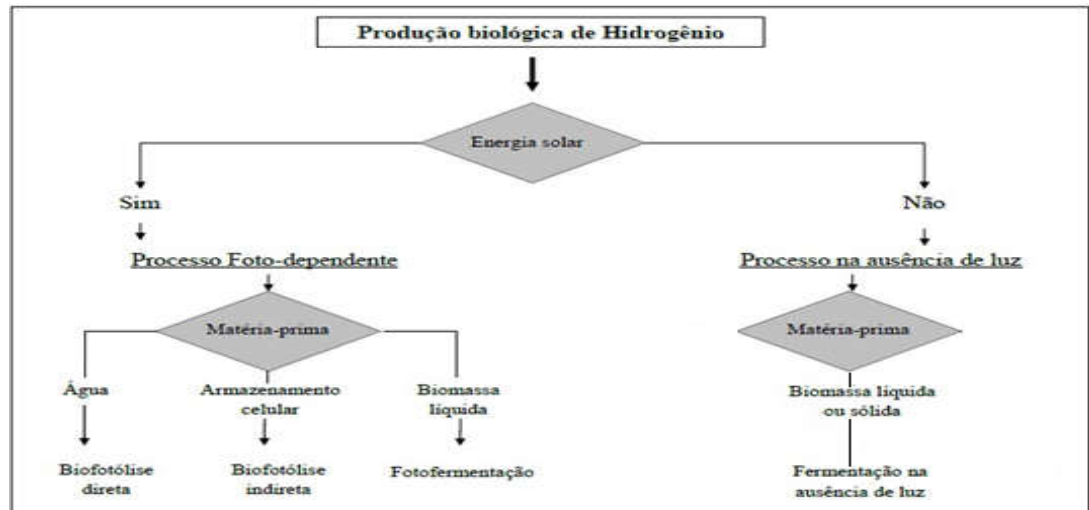


Na fermentação no escuro, o gás hidrogênio pode ser produzido por microrganismos anaeróbios na ausência de luz, a partir de substratos ricos em carbono em um processo conhecido como fermentação no escuro (AMORIM, 2009).

Nesse processo o hidrogênio é obtido misturado com o dióxido de carbono e por isso é necessário a separação dos gases. Além disso, outros metabólitos são gerados nesse processo como etanol, metanol e outros álcoois e ácidos que podem ser dotados de valor econômico o que pode tornar este processo ainda mais vantajoso. Uma outra vantagem desse processo é a produção contínua e a alta velocidade da reação (AMORIM; SADER; SILVA, 2012).

Neste trabalho foi utilizado a fermentação no escuro por ser considerado uma tecnologia ambientalmente correta, por tratar um resíduo rico em matéria orgânica reduzindo a quantidade de matéria orgânica, e ser uma tecnologia simples. A figura x mostra um esquema dos tipos de produção biológica de hidrogênio de hidrogênio.

Figura 1- Produção biológica de hidrogênio



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de OTTAVIANO, 2014.

3.2 Digestão anaeróbia

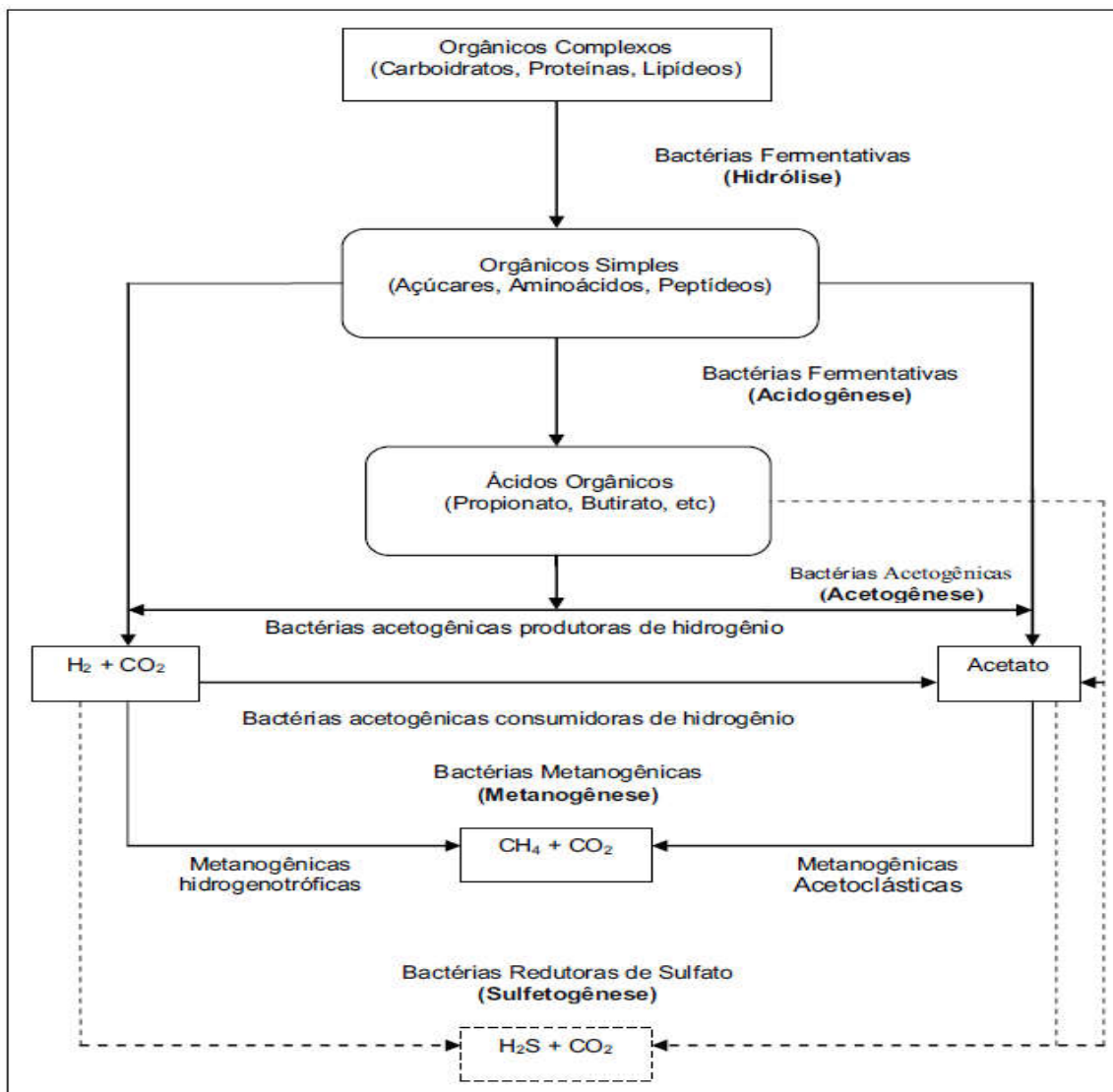
A digestão anaeróbia é um processo autorregulado, que ocorre na ausência de oxigênio em que determinados grupos de microrganismos atuam interativamente na transformação de matéria orgânica complexa em substratos mais simples tais como, metano, água, gás carbônico e outros. Esse processo pode trazer vantagens como baixo custo energético, baixa produção de lodo e a recuperação dos gases produzidos no processo (MOSEY, 1983).

O processo de digestão anaeróbia é dividido nas seguintes etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese e sulfetogênese.

Na primeira etapa, ocorre a hidrólise através das bactérias fermentativas hidrolíticas, que utilizam exoenzimas para conversão de material particulado complexo (polímeros) em material dissolvido mais simples, que são capazes de atravessar a parede celular. Na acidogênese, os produtos resultantes da hidrólise são metabolizados no interior da célula pelo metabolismo fermentativo e geram produtos mais simples que são ácidos graxos voláteis, gás hidrogênio e carbônico, álcoois e outros. As bactérias sintróficas acetogênicas, são responsáveis pela conversão de produtos intermediários da acidogênese em acetato e gás carbônico e hidrogênio. Vale ressaltar, que para ocorrer produção de acetato a partir de propionato e butirato requer baixa pressão parcial de hidrogênio no reator ($H_2 < 10^{-4}$) para reação ser energeticamente favorável, a maior parte do hidrogênio é produzido pela oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e dos ácidos graxos voláteis, nesta fase pode ocorrer ainda homoacetogênese onde os microrganismos utilizam H_2 e tem como produto final acetato.

Nametanogênese as arqueias, utilizam os substratos da acetogênese (acetato e hidrogênio) e geram metano e gás carbônico. Este processo, é mediado por dois grupos de arqueias, as acetoclásticas que utilizam acetato e representa aproximadamente 70% da produção de metano no reator e as hidrogenotróficas que utilizam H_2 e representam aproximadamente 30% da produção de metano. Na presença de sulfato e nitrato no meio favorece as bactérias nitrato-redutoras - BNR e as bactérias redutoras de sulfatos - BRS que são capazes de utilizar acetato e hidrogênio para gerarem amônia e sulfeto respectivamente causando competição entre as arqueias metanogênicas e as BRS e BNR (CHERNICHARO, 1997; METCALF; EDDY, 2015). A figura 2 traz um esquema das principais etapas da digestão anaeróbia.

Figura 2 - Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia

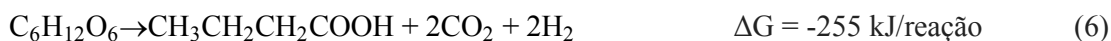
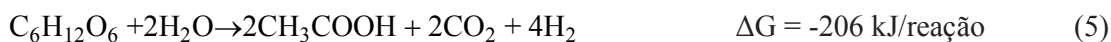


Fonte:CHERNICHARO, 1997.

Vale ressaltar, que o hidrogênio é produzido na fase acidogênica e portanto, para sua produção por meio da digestão anaeróbia é necessário interromper a fase metanogênicas no reator que pode ocorrer pelo controle do pH ácido (SHIDA, 2008).

3.3 Rotas metabólicas da digestão anaeróbia

De uma maneira geral, a formação de ácido butírico (Hbu) e acético (Hac) são favoráveis a produção de hidrogênio. A razão entre os ácidos acético e butírico é um dos parâmetros utilizados para certificar o favorecimento da produção de hidrogênio, quanto maior esta razão maior é favorecimento da produção de biohidrogênio, visto que, a rota do Hac produz quatro (4) moles de hidrogênio, enquanto, a rota do Hbu produz dois (2) moles de hidrogênio. Vale ressaltar que do ponto vista termodinâmico a rota do ácido butírico é mais favorável que a rota do acetato visto que possui uma energia livre Giggbs menor nas condições normais de temperatura e pressão (CNTTP), conforme as equações (5) e (6) (AMORIM, 2009; REIS, 2010).



Uma outra rota que ocorre a partir da fermentação da glicose é a do ácido propiônico que não produz nenhum mol de hidrogênio a partir da digestão da glicose e ainda consome dois (2) moles de hidrogênio através da equação (7) e por isso é considerada uma substância inibidora para produção de hidrogênio. Além dos ácidos de cadeia curta, outros metabólitos também são produzidos na digestão anaeróbia como etanol que pode ser produzido por duas rotas conforme as equações (8) e (9). A equação cinco é extremamente interessante pois, ela produz concomitantemente etanol e hidrogênio que são duas fontes de energia (GOIS, 2017).

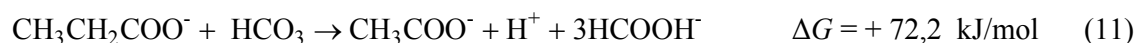
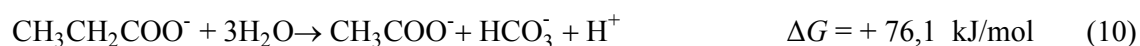


Produção de etanol:

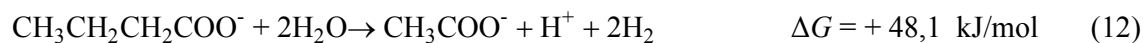


Apesar de não serem rotas favoráveis do ponto de vista termodinâmico ($\Delta G > 0$) as reações acetogênicas descritas nas equações de (10) a (13) ocorrem de maneira espontânea no reator anaeróbio. Os microrganismos acetogênicos são os responsáveis pelas reações que convertem ácido propiônico, ácido butírico e etanol em ácido acético (GOIS, 2018).

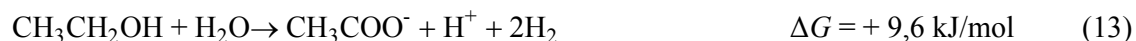
Produção de ácido acético a partir de ácido propiônico:



Produção de ácido acético a partir de ácido butírico:



Produção de ácido acético a partir de etanol:

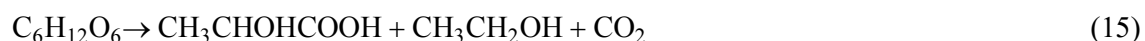


A produção de ácido láctico é observada em reatores acidogênicos e sua produção ocorre por três vias: homofermentação, que produz apenas ácido láctico, heterofermentação, que produz ácido láctico, etanol, ácido acético e dióxido de carbono e a rota da fermentação mista que é uma mistura de ácidos e lactato. Essas rotas são descritas respectivamente pelas equações 14, 15 e 16 (REIS, 2015).

Rota homofermentativa:



Rota heterofermentativa:

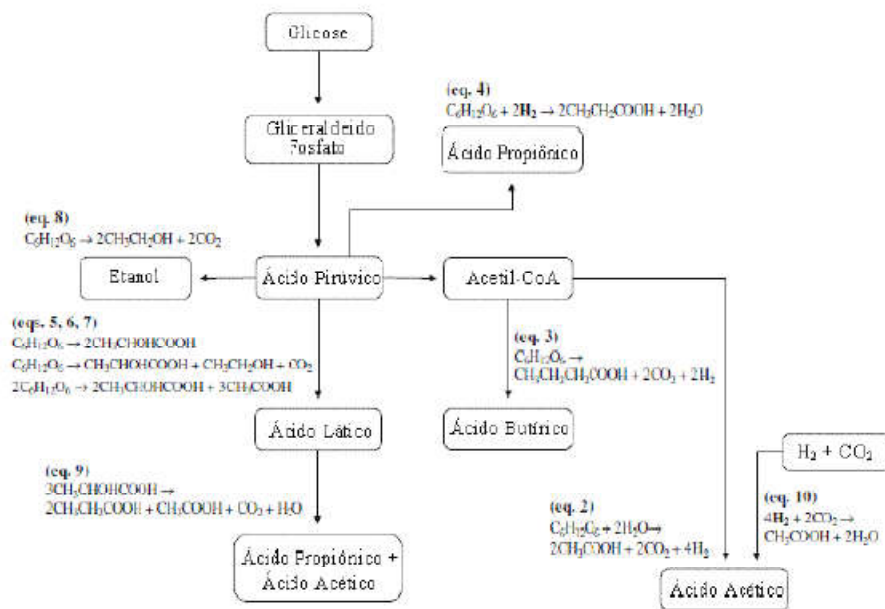


Rota bifidum:



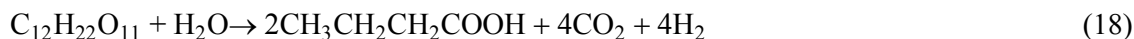
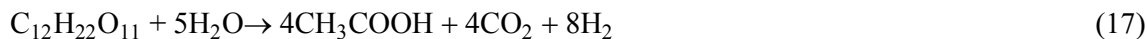
A figura 3 apresenta um esquema das rotas metabólicas a partir da glicose como fonte de carbono.

Figura 3- Esquema das rotas metabólicas nos processos anaeróbios



Fonte: Autor, 2018.

No tratamento de águas residuais provenientes da indústria de laticínio a principal fonte de carboidrato é a lactose que é um dissacarídeo com uma molécula de glicose e uma de galactose e pode gerar até 8 moles de hidrogênio pela via do acetato e 4 moles de hidrogênio pela via do ácido butírico conforme as equações (17) e (18) (OTTAVIANO,2014).



3.4 Indústria de laticínios e os subprodutos gerados

A produção de leite no Brasil, vem crescendo constantemente desde 1974, aumentando a produção de 7,1 bilhões de litros para aproximadamente 35 bilhões de litros em 2013,

ocupando a terceira posição no ranking mundial dos produtores de leite. A tabela 1 apresenta o crescimento histórico da produção de leite no país (MAIA et al.,2013).

Tabela 1 - Histórico da produção de leite no Brasil

ANO	Produção de leite ano (bilhões de litro)
1974	7,1
1980	11,2
1990	14,5
2000	19,8
2010	30,7
2013	35

Fonte: MAIA et al., 2013; IBGE, 2015.

Entretanto, durante as etapas do processo produtivo do setor de laticínios, existem diversos aspectos ambientais próprios. Esses aspectos em sua maioria são, os efluentes líquidos industriais gerados, resíduos sólidos gerados e as emissões atmosférica. Estes sem uma gestão adequada, possuem potencial para causar diversos impactos ambientais (TORRES FILHO, et al., 2014). A quantidade de efluentes gerados pela indústria do leite varia de três a cinco litros de acordo com produto gerado (tabela 2).

Vale ressaltar, que a maior parte dos efluentes não tem um tratamento adequado e é considerado o principal impacto causado ao meio ambiente pela indústria de laticínio (MAGANHA, 2006). De uma forma geral, os principais pontos de geração de efluentes na indústria do leite são:

- Lavagem e limpeza dos tanques de transporte do leite, tubulações, tanques de processo, pasteurizador e padronizadora, pisos e demais equipamentos envolvidos direta ou indiretamente no processo produtivo;
- Derrames devido a falhas de operação ou equipamentos em manutenção;
- Perdas no processo, durante a operação de equipamentos;
- Descartes de subprodutos ou produtos rejeitados;
- Soluções usadas na limpeza dos equipamento e pisos;
- Derrame ou descarte de soro proveniente da fabricação de queijos e manteiga.

Tabela 2 - Quantidade de efluente gerado por produto fabricado

Tipo de produto	Volume de efluentes líquidos (litro/kg de leite processado)
PRODUTOS “BRANCOS” (LEITE, CREMES E IOGURTES)	3
PRODUTOS “AMARELOS” (MANTEIGA E QUEIJOS)	4
PRODUTOS “ESPECIAIS” (CONCENTRADOS DE LEITE OU SORO E PRODUTOS LÁCTEOS DESIDRATADOS)	5

Fonte: European Commission. Integrated Pollution Prevention and Control (2006 apud, MAGANHA, 2006).

O esgoto industrial proveniente da indústria do leite, tem como característica altos teores de óleos e graxas, e a presença de sólidos suspensos, matéria orgânica expressa como Demanda Biológica de Oxigênio - DBO e Demanda Química de Oxigênio - DQO, e odor originado pela decomposição da caseína. O pH é praticamente neutro, mas tende a acidificar devido a fermentação láctea dos resíduos e sua posterior conversão em ácido láctico. Os principais parâmetros físicos e químicos dos efluentes gerados na indústria do leite são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Característica dos efluentes gerados na indústria de laticínios

Parâmetros	Faixa de variação	
	(1)	(2)
SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS	24-5700 mg/L	100-1000 mg/L
SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS	135-8500 mg/L	100-2000 mg/L
DBO ₅	450-4790 mg/L	4000 mg/L
PROTEÍNA	210-560 mg/L	ND
GORDURAS/ÓLEOS E GRAXAS	35-500 mg/L	95-550 mg/L
CARBOIDRATOS	252-931 mg/L	ND
NITROGÊNIO	15-180 mg/L	116 mg/L
FÓSFORO	20-250 mg/L	0,1-46 mg/L
CLORETOS	48-469 mg/L	ND
PH	5,3-9,4	1-12
TEMPERATURA	12-40°C	20-30°C

Fonte: Autor - Adaptado de (1) Environment Agency of England and Wales, 2000; European Commission – Integrated Pollution Prevention and Control, 2006; (2) ABIQ (apud, MAGANHA, 2006).

3.5 Produção de hidrogênio a partir dos subprodutos da indústria de laticínio

A produção de hidrogênio, é uma das alternativas para substituição dos combustíveis fósseis e tem potencial para ser produzido a partir da digestão anaeróbia, utilizando diversos efluentes industriais (PATELet al., 2016). Um dos substratos que pode ser utilizado são os resíduos provenientes da indústria do laticínio, que são facilmente biodegradáveis e ricos em carboidratos. Assim sendo, diversos estudos vêm relatando a produção de hidrogênio utilizando principalmente soro de leite e lactose isolada entre eles destacam-se Davila-Vazquez et al.(2009), Lima et al.(2016), Macário (2016); Otaviano et al. (2016), Rosa et al.(2014).

Otaviano et al. (2016) utilizaram dois reatores anaeróbios de leite fluidificado - RALF em condições termofílicas (55°C) com soro de queijo como substrato. No reator 1, foi utilizada uma concentração inicial de 4900 ± 200 mg lactose L⁻¹ fixa e foi variado o tempo de detenção hidráulica - TDH 8,6,4,2,1 e 0,5h e obteve a máxima produção volumétrica de hidrogênio -HPR foi 4.1 ± 0.2 L H₂L⁻¹h⁻¹ obtido no TDH de 0,5h e o máximo rendimento de

hidrogênio - HY foi $3,67 \pm 0,59$ mol H_2 mol Lactose⁻¹ no TDH 4h. No reator 2 foi utilizado um TDH fixo de 6 h e foram variadas as concentrações do soro de queijo 2800 ± 100 , 4900 ± 200 , 6800 ± 300 , 9800 ± 300 e $14,600 \pm 300$ mg lactose L⁻¹ o melhor HPR foi $0,85 \pm 0,12$ 2 2 L H_2 L⁻¹h⁻¹ na concentração 6800 ± 300 300 mg lactose L⁻¹ e o máximo HY foi $2,64$ mol H_2 mol Lactose⁻¹ na concentração 2800 ± 100 mg lactose L⁻¹. O trabalho concluiu que soro de queijo é uma fonte de carbono eficiente para produção de hidrogênio nos TDHs e concentrações de substratos avaliados neste estudo.

Davila-Vazquez et al. (2009) utilizaram um reator contínuo - CSTR que foi operado durante 65,6 d com soro de queijo em pó como substrato e adotou três TDHs (10, 6 e 4h) com carregamento fixo de 30 g CWP/L e a melhor taxa de produção de hidrogênio foi obtida com 6h e foi um $19,3 \pm 4$ mmol H_2 L⁻¹h⁻¹ Em uma segunda fase foi usado TDH fixo de 6h e foi alterado a taxa de carregamento orgânica - TCO para 92,4 115,5, 138,6 e 184,4 g lactose L⁻¹ d⁻¹ e a melhor produção atingida foi 138,6 g lactose/L/d que foi de $46,61 \pm 3,7$ mmol H_2 L⁻¹ h⁻¹. Com carregamento 184,4 g lactose/L/d o reator entrou em colapso. O estudo concluiu que ocorre o aumento da produção volumétrica de hidrogênio aumentando a carga orgânica e que a produção de hidrogênio utilizando uma comunidade microbiana mista é viável.

Rosa e colaboradores(2014), utilizaram dois reatores anaeróbios de leite fluidificado com duas fontes de inóculo (lodo de um reator UASB de suínocultura e lodo proveniente de abatedouro de aves) e foi usado um tempo de detenção hidráulica de 6h e uma concentração de 5g DQO/L para avaliar as diferentes razões da fonte de carbono que foram glicose e soro de leite. Na fermentação por glicose foi alcançado $1,37$ mmol H_2 /g DQO. A co-fermentação de glicose com soro de queijo foi favorável para aumento da produção de hidrogênio que foi $1,7$ mmol H_2 /g DQO e etanol que alcançou $3,45$ mol EtOH/g DQO no reator 2. Quando foi utilizado soro de leite como única fonte de carbono a produção de hidrogênio teve como resultado $1,9$ mmol H_2 /g DQO. Este trabalho concluiu que a partir da co-fermentação de glicose com soro de leite é possível produzir hidrogênio e etanol.

Macário (2016), utilizou dois reatores anaeróbios de leite fluidificado R1 e R2 para analisar a influência do inóculo na produção de hidrogênio. R1 foi inoculado com rúmen e o R2 foi utilizado autofermentação. Ambos os reatores teve as mesmas configurações e foram operados de forma semelhante. O tempo de detenção hidráulica foi alterado 6h, 4h e estabilizado em 2h o maior rendimento de hidrogênio obtido foi $1,66$ mol. H_2 /mol.carboidrato e aconteceu no R1, quando o soro de queijo foi o substrato usado, o R2 mostrou-se mais viável que R1 apenas quando o efluente utilizado foi laticínio real.

Lima et al.(2016) usaram um reator anaeróbio em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada – AnSBBR com recirculação e avaliou a concentração do substrato, tempo de alimentação e obteve. HY de $0,8 \text{ mol H}_2 \text{ mol Lactose}^{-1}$ e foi achada para uma concentração de $5,4 \text{ g DQO/L}$ e não foi encontrada diferença significativa para os tempos de alimentação analisados. A menor temperatura (15°) promoveu a maior produção de H_2 $1,12 \text{ mol H}_2 \text{ mol Lactose}^{-1}$ e a maior temperatura (45° C) não houve produção de H_2 e o estudo concluiu que os valores encontrados para produção de hidrogênio com esta configuração são maiores que aqueles encontrados em configurações tradicionais como UASB e EGSB. Karadag e colaboradores (2014), sintetizaram diversos trabalhos que foram desenvolvidos com foco na produção de hidrogênio a partir dos resíduos da indústria de laticínio. Estas pesquisas estão sintetizadas na tabela 4. Os estudos citados nesta seção, demonstram a viabilidade da produção de hidrogênio utilizando efluentes da indústria de laticínio e a necessidade de aprofundamento dos estudos para um melhor entendimento dos processos que ocorrem na fermentação escura, utilizando resíduos proveniente da indústria de laticínio como substrato para produção de hidrogênio.

Tabela 4 - Produção de hidrogênio utilizando efluente da indústria de laticínio

Substrato	Tipo do Reator	Inóculo	Temp. (°C)	TDH(h)	Carga Orgânica (kg COD m ⁻³ d ⁻¹)	*TVPH	*HY (m ³ H ₂ kg ⁻¹ COD)	Referência
Soro de queijo em pó	CSTR	Lodo de digestor anaeróbio	35-38	24	10,12	0.29	0.040-0.052	Yang et al. (2007)
Soro de queijo	CSTR	Lodo anaeróbio granular c/ tratamento térmico	55	24-120	21,35,47	0.3-7.9	0.117-0.493	Davila-Vazquez et al. (2009)
Soro de queijo em pó	CSTR	Lodo anaeróbio granular c/ tratamento térmico	37	4-10	63-208	2.47-25.2	0.020-0.056	Azbar et al. (2009)
Soro de queijo em pó	UASB	Lodo anaeróbio c/ tratamento térmico	35	24	20-35	0.30-0.96	0.016-0.035	Kisielewska et al. (2014)
Soro de queijo em pó	Reator de Leito Fixo	Partículas sólidas do tratamento de águas residuárias	35	24,48	6.3-18.8	NA	0.018-0.025	Fernandez et al. (2014)
Soro de queijo em pó	RALF	Lodo anaeróbio c/ tratamento térmico	30	1-4	30-120	0.23-0.74	0.014-0.038	Rosa et al. (2014)

Fonte: Autor, adaptado de KARADAG et al., 2014.

3.6 Fatores operacionais na produção de H₂

Os processos anaeróbios, são autorregulados e dependente de diversos fatores. Durante a operação dos reatores, alguns parâmetros operacionais devem ser ajustados visando uma melhor eficiência dos processos e conseqüentemente um melhor rendimento na produção de H₂. Entre eles, pode-se citar: temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica, substrato, entre outros. (WANG; WAN, 2009)

3.6.1 Temperatura

Temperatura é um fator que está diretamente ligado a velocidades das reações. Termodinamicamente é ligada a energia livre de Gibbs que é essencial para definição das vias metabólicas que serão utilizadas pelos microrganismos. Além disso, é um parâmetro essencial para diversidade microbiana existente no reator, já que os microrganismos sobrevivem em uma determinada faixa de temperatura (REIS, 2010). Tem sido demonstrado, que o aumento de temperatura pode melhorar a produção de hidrogênio significativamente. Porém, em níveis muito elevados pode haver uma redução significativa desta produção. Entretanto, não foi determinado uma temperatura ótima para produção de H₂ e diversos trabalhos tem sido feito em faixas mesofílicas e termofílicas (AMORIM, 2009).

Infantes et al. (2011), utilizou um reator sequencial batelada alimentado com glicose em uma concentração de 9g L⁻¹ e testou três temperaturas 26, 33 e 40°C e concluiu que a melhor produção de hidrogênio ocorreu na temperatura de 26°C e um pH de 5,4.

Youn e Shin (2005), compararam condições mesofílicas e termofílicas com diferentes TCOs e concluiu que o reator termofílico obteve melhores valores de produção volumétrica de hidrogênio que ficou entre 0,9 e 0,4 LH₂ LReator⁻¹ e o mesofílico teve um PVH entre 0,01 e 0,09 LH₂ LReator⁻¹. Foi detectado uma remoção de carboidrato melhor nos reatores termofílicos que ficou entre 87 e 94,1% já para os reatores mesofílicos a degradação de carboidrato foi de até 83,3% que é bastante elevada, entretanto, inferior ao reator termofílico.

3.6.2 pH

pH é um dos parâmetros mais importantes na produção biológica de hidrogênio pois, ele pode afetar a ação da hidrogenase (enzimas que catalisam a oxidação reversível de H₂) e as rotas metabólicas da digestão anaeróbia. Além disso, pode controlar as atividades das arqueias metanogênicas que são, microrganismos consumidores de H₂ e não sobrevivem em pH ácido (AMORIM, 2009; REIS, 2010).

Valores de pHs muito baixos pode reduzir a produção de hidrogênio, visto que, pode inibir a atividade da enzima hidrogenase (NUALSRI; KONGJAN.; REUNGSANG, 2016) Já o pH neutro favorece a atividade dos microrganismos metanogênicos o que também pode reduzir a produção de hidrogênio, autores relatam como faixa ótima de pH para produção de hidrogênio 5,5-6,5 (BHARATHIRAJA, 2016).

Davila-Vazquez e colaboradores (2008), utilizaram um reator batelada com soro de queijo em pó – SQP, lactose e glicose como substratos para avaliar a influência do pH (3,88-8,12) e da concentração inicial do substrato (0,86-29,14 g/L). Para lactose foi produzido 3,6 mol de H_2 mol Lactose⁻¹ e 5,6 mmol H_2 L⁻¹ h⁻¹ em um pH de 7,5 e uma concentração inicial de 5g de lactose L⁻¹, para o soro de queijo em pó produziu 3,1 mol de H_2 mol Lactose⁻¹ em um pH 6 e 15 g SQP/L. e 8,1 mmol H_2 L⁻¹ h⁻¹ em pH 7,5 e 25 g SQP/L. Para glicose foi produzido 1,46 mol H_2 mol Glicose⁻¹ em pH 7,5 e 5 g de glicose/L e 8,9 mmol H_2 L⁻¹ h⁻¹ em um pH de 8,12 e 15g glicose/L. Pode-se verificar que houve produção de hidrogênio em faixas ácidas, básicas e próximas a neutra.

Ferchichiet al. (2005), Relatou a produção de hidrogênio em uma faixa de pH entre 5 e 10 utilizando soro de queijo em pó como substrato e foi relatado que foi produzido hidrogênio durante todo experimento, entretanto, a produção máxima de hidrogênio foi no pH 6.

3.6.3 Tempo de detenção hidráulica

Um importante parâmetro para operação de reatores anaeróbios. Para utilização de altas taxas de carregamento orgânicos, que é obtida com um baixo TDH, pode inibir atividade de microrganismos metanogênicos. Além disso, em tempos baixos de TDH ocorre o arraste da biomassa que pode ser benéfico para produção de hidrogênio pois, as arqueias metanogênicas tem crescimento muito mais lento que as bactérias acidogênicas. Assim sendo, é possível eliminar microrganismos metanogênicos pelo arraste da biomassa (AMORIM, 2009).

Davila-Vazquez et al. (2009), estudaram a produção de hidrogênio a partir de um reator em um CSTR e utilizou soro de queijo em pó como substrato e utilizaram com TDHs de 10,6 e 4h e o maior valor de PVH foi obtido no TDH de 6 h.

Azbar et al. (2009), Utilizaram um CSTR contendo uma comunidade mista microbiana sob condições termofílicas, e utilizaram águas residuais da indústria do leite como substrato. O experimento, foi realizado com altas taxas de carregamento orgânicos (21, 35 e 47 g DQO/l/d), e altos TDHs de 3,5, 2 e 1 d respectivamente. O conteúdo do biogás produzido teve uma variação entre 5 e 82% com uma média de 45%, a produção volumétrica variou durante o

experimento entre 0,3 e 7,9LH₂ LReator⁻¹ com uma média de 2,LH₂ LReator⁻¹. O rendimento de hidrogênio variou entre 3 e 22 mmol H₂gDQO⁻¹. Os autores concluíram que o TDH teve um impacto direto na produção de H₂e que nos menores TDHs ocorreu um incremento na produção de hidrogênio e que a TCO não interferiu estatisticamente na produção de hidrogênio.

3.6.4 Substrato

Os substratos, que são utilizados na produção fermentativa de hidrogênio devem ser facilmente biodegradáveis, de baixo custo e que conduzam a uma degradação satisfatória da matéria orgânica. Efluentes industriais orgânicos, resíduos da agroindústria, materiais lignocelulósicos e os resíduos da indústria alimentícia estão entre as principais matérias primas utilizadas para produção de biohidrogênio (REIS, 2015).

Os carboidratos simples, como glicose e sacarose são facilmente degradáveis por meio biológico e por este motivo são utilizados como modelo para entendimento dos procedimentos que ocorrem para produção de H₂. No entanto, são fontes de elevado custo para produção de hidrogênio em grande escala (SÁ, 2011).

Tem sido verificado que o aumento da concentração inicial do substrato, pode aumentar a produção de biohidrogênio, porém elevadas concentrações de substrato podem inibir os microrganismos produtores de H₂ (AMORIM, 2009).

Amorim,Sader e Silva. (2012), utilizaram glicose para estudar o efeito da concentração inicial do substrato na produção de hidrogênio e foram variados o TDH entre 8 e 1 h e a concentração inicial do substrato entre 2g L⁻¹ e 25g L⁻¹em uma temperatura mesofílica e observou que o máximo rendimento ocorreu no TDH = 2 h e uma concentração 2 g L⁻¹ e o máximo PVH foi encontrado no TDH 1 h e uma concentração inicial de 10 g L⁻¹ foi verificado também que menores concentrações iniciais favoreceram a produção de ácido acético e butírico.

Kim, D. e Kim, M. (2012), utilizaram diversas fontes de carbono como substrato (xilose, glicose, galactose, sacarose, celobiose e amido) em condições termofílicas em um reator CSTR com uma cultura mista de microrganismos e observaram que o melhor rendimento ocorreu com a sacarose e o pior com a xilose e o melhor rendimento com a sacarose foi de 3,17 mol_{H2}.mol⁻¹_{hexose}.

3.6.5 Reatores anaeróbios na produção de hidrogênio

A produção de hidrogênio é fortemente influenciada pelo tempo de retenção do substrato indicando a influência do tipo de reator no processo (REN, *et al.*, 2010). Os trabalhos podem ser realizado em reatores em modo batelada ou em fluxo contínuo, a maior parte dos trabalhos têm sido realizados em modo batelada pela facilidade de operação e flexibilidade de mudança nos parâmetros operacionais, entretanto, os reatores de fluxo contínuos têm maiores taxas de rendimento e produção volumétrica de hidrogênio (ARGUN; KARGIN, 2011).

Os principais reatores anaeróbios de fluxo contínuo utilizados para produção de hidrogênio são: UASB, CSTR, leito fixo, EGSB. Os trabalhos descrito na tabela x apresenta alguns estudos para produção de hidrogênio com esses tipos de reatores.

Tabela 5- Produção de hidrogênio em diversos reatores

Reator	Substrato	Produtividade de H ₂	Referência
UASB	Amido	0,075 L.L ⁻¹ .h ⁻¹	Akutsu et al. (2009b)
	Soro de queijo	122 mL.L ⁻¹ .d ⁻¹	Castello et al. (2009)
	Soro de queijo	0,36 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	Carrillo-Reyes et al. (2012)
Reator Anaeróbio de leito fixo	Sacarose	2,981 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	Keskin; Aksöyek; Azbar (2011)
EGSB	Soro de queijo	1 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	Perna et al. (2013)
	Glicose	2,7 L L ⁻¹ .d ⁻¹	Abreu et al. (2010)
	Melaço	249 mmol.L ⁻¹ .d ⁻¹	Ren et al. (2006)
CSTR	Amido	2,8 mol.mol ⁻¹ glicose	Akutsu et al. (2009a)
	Soro de queijo	62,5 mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹	Azbar et al. (2009a)
	Sacarose	3,74 mol.mol ⁻¹ glicose	Yuan et al. (2009)
	Amido peptone	412 mmol.L ⁻¹ .d ⁻¹	Li et al. (2010)

Fonte: Autor, adaptada de OTTAVIANO, 2014.

O reator anaeróbio de leito fluidificado, é um reator com crescimento da biomassa aderido no meio suporte, com os microrganismos fixos no reator é possível desmembrar o tempo de detenção hidráulica do tempo de retenção celular, assim dispensando o uso de recirculação de biomassa. Este tipo de reator utilizado um sistema de fluidização do meio suporte para aumentar o fluxo de transferência de calor e massa o que melhorando o desempenho do reator permitindo altas eficiência em TDHs baixos (ROSA, 2014; OTTAVIANO, 2014; SHIDA, 2008).

Amorim et al. (2014), utilizou um reator anaeróbio de leito fluidificado para produção de hidrogênio a partir da manipueira e utilizou uma concentração de 4gDQO.L^{-1} e variou o TDH de 8 até 1 h com um pH 5 e obteve o melhor rendimento de hidrogênio $1,91\text{mol H}_2\text{mol.glicose}^{-1}$. Com TDH = 2 h e a melhor produção volumétrica ocorreu no TDH = 1 h e foi de $2,04\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

Ottaviano (2014), utilizou dois reatores anaeróbios de leito fluidificado com soro de queijo como substrato e variou o TDH entre 8 e 1 h e as concentrações iniciais entre 3000 mg DQOL^{-1} e 10000 mg L^{-1} com argila expandida como meio suporte e em temperatura termofílica e obteve HPR máximo de $2,9\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH 0,5 h e o maior rendimento ocorreu no TDH = 4 h e foi de $3,3\text{ mol H}_2\text{mol.glicose}^{-1}$. e quando foi variado as concentrações iniciais pode observar os seguintes valores $2,6\text{ mol H}_2\text{mol.glicose}^{-1}$. de rendimento máximo na concentração 3000 mg DQOL^{-1} e $0,854\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ na concentração 7000 mg DQOL^{-1} .

Shida et al. (2012), Avaliou o desempenho de dois reatores anaeróbios de leito fluidificados com adição de soluções para regular o pH afluyente (bicarbonato de sódio e ácido clorídrico), com uma faixa de pH entre 6 e 7, com uma variação de TDH entre 8 e 1 h e observou que os dois reatores obtiveram comportamentos similares houve aumento da produção de hidrogênio com a redução do TDH entre 8 e 2 horas e com a redução do TDH para uma 1 hora houve redução da produção de hidrogênio, entretanto, o reator que não teve soluções para regular o pH teve um desempenho superior.

3.6.6 Meio suporte

O tipo de material suporte para adesão da comunidade microbiana estabelecida no reator, afeta consideravelmente a produção de hidrogênio no meio. Estas matérias devem ser inerte, com alta rugosidade, alta porosidade, não tóxico, com alta resistência mecânica e de baixo custo e deve ser propícios para rápida adesão dos microrganismos.

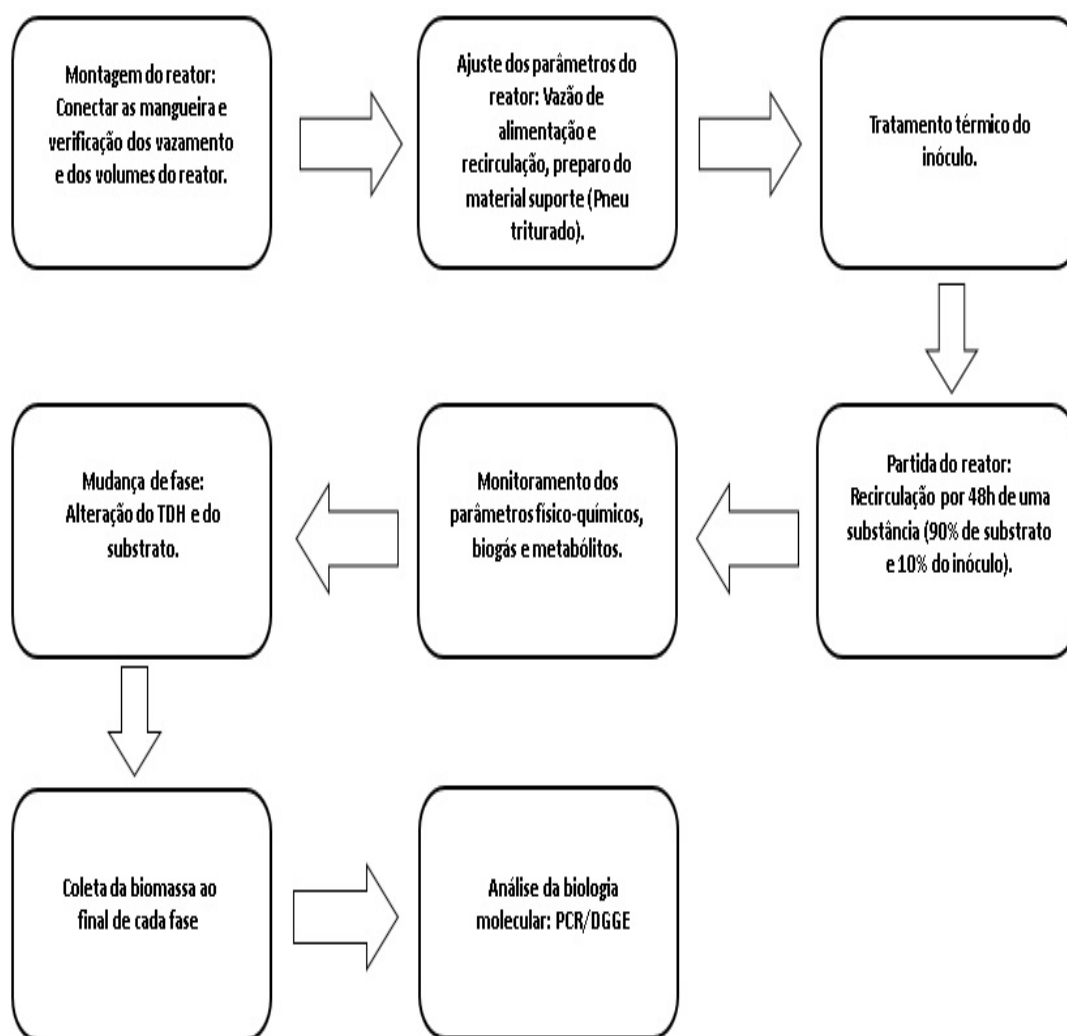
Barros (2009), utilizou três RALFs com volume de 4192 cm³ com materiais suportes diferentes poliestireno, pneu triturado inservível e PET. Os reatores foram alimentados com uma concentração de 4gL⁻¹ de glicose, teve um pH afluente de 7,0 e o efluente em torno de 5,5, em temperatura mesofílica de 30±1 °C e foi utilizado um tratamento térmico para o inóculo. Os TDHs foram variados entre 8 e 1 h. O melhor rendimento foi do reator com pneu triturado 2,15 mol H₂.mol.glicose⁻¹ com pneu triturado e o melhor conteúdo de hidrogênio 52,97% e com uma conversão de carboidrato em torno de 90%..

4 METODOLOGIA

Nesta seção, será apresentado a configuração do reator e da parte experimental, juntamente com os métodos utilizados para análises dos parâmetros adotados para avaliação do comportamento do reator anaeróbio de leito fluidificado – RALF.

A figura 4 apresenta um fluxograma da metodologia utilizada durante a fase experimental.

Figura 4 - Fluxograma da metodologia utilizada no experimento



Fonte: Autor, 2018.

4.1 Água residuária

Visando uma maior facilidade na logística para pesquisa realizada. O substrato que foi utilizado para produção de hidrogênio será efluente sintético produzido a partir do soro de leite em pó diluído em água da rede de abastecimento. O substrato que foi utilizado no estudo tem características descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Característica do soro de leite em pó que será utilizado no estudo para uma porção de 26 g.

PARÂMETRO	QUANTIDADE
CARBOIDRATO	22 g
PROTEÍNAS	4,0 g
GORDURA TOTAIS	0,3 g
GORDURAS SATURADAS	0,2 g
GORDURA TRANS	0
SÓDIO	324 mg

Fonte: Fabricante (Nutricom)

A escolha dos parâmetros operacionais descritos na tabela 6, foram determinados a partir do estudo de Ottaviano(2016), que avaliou um reator com a mesma configuração e obteve a melhor produção de hidrogênio com a menor concentração de substrato escolhida que foi 2800 mg lactose L⁻¹ com 6h de TDH. Entretanto, esse reator não foi operado na faixa mesofílica com TDH e concentrações inferiores.

4.2 Material suporte

O material suporte que foi utilizado no reator anaeróbio de leite fluidificado será pneu triturado seguindo a metodologia de Barros (2010), Silva (2015) e Macário (2016). No reator foi adicionado 750 ml.

O pneu utilizado foi cortado (figura 5) com um diâmetro aproximado de 3 mm e lavado com uma solução de hidróxido de sódio de 0,0075 M por 30 minutos, em seguida foi secada em uma estufa com temperatura de 40°C, este procedimento foi realizado 3 vezes. Este procedimento, foi realizado com a finalidade eliminar sujeiras como óleo e graxas comumente encontrados nesse material. Além disso, os pneus triturados passaram por um teste de densidade sendo colocado em um balde com água para verificação das partículas que

tinham densidade menor que da água, portanto, flutuando estas não foram utilizadas no RALF.

Figura 5 - Pneu triturado que será utilizado como meio suporte do RALF.



Fonte:MACÁRIO, 2016.

Barros (2009), verificou em sua pesquisa a viabilidade do poliestireno, pneu triturado e da PET para produção de hidrogênio, e observou que devido à rugosidade alta, as partículas de pneu demonstraram uma maior de aderência da biomassa. Além disso, Barros (2010), comparou o pneu triturado e a argila expandida como meio suporte em um reator anaeróbio de leito fluidificado - RALF para produção de hidrogênio utilizando a glicose como substrato e concluiu que ambos os materiais são adequados como meio suporte para produção de hidrogênio. As características do pneu triturado estão contidas na tabela 7.

Tabela 7- Principais característica do pneu triturado

Característica	Valor
DIMENSÃO (mm)	2,8 – 3,35
DENSIDADE (g.cm ⁻³)	1,14
RUGOSIDADE (%)	18

Fonte: BARROS, 2010.

4.3 Inóculo

O inóculo que foi utilizado no reator anaeróbio de leito fluidificado, foi proveniente de um reator UASB que é utilizado em uma ETE de um condomínio localizado na cidade de Maceió.

Nesta etapa foi utilizado tratamento térmico que consiste em elevar a temperatura do inóculo até 90°C e mantê-la por 10 minutos e depois resfriá-la com um banho de gelo até 25°C. Esse tratamento tem como finalidade inativar os microrganismos metanogênicos que consomem hidrogênio para geração de metano (MAITINGUERet al., 2008 adaptado KIM et al., 2006).A figura 6 mostra o inóculo sendo tratado.

Figura 6 – Tratamento do inóculo



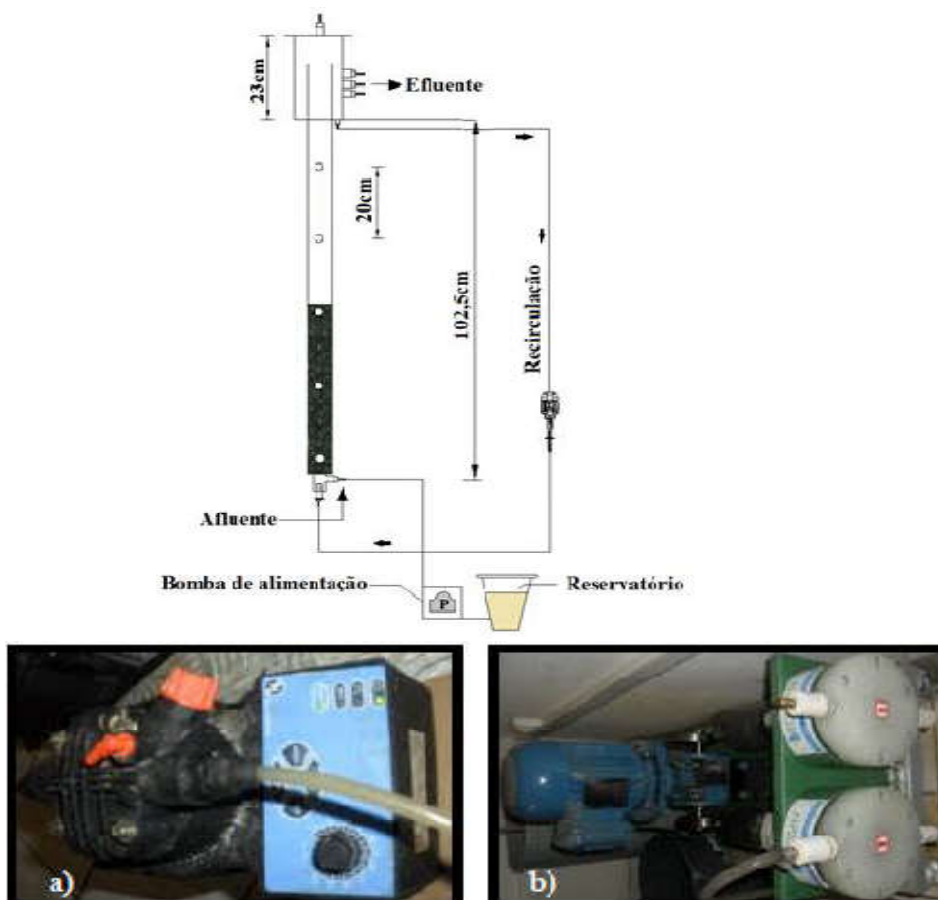
Fonte: Autor, 2018.

4.4 Operação do reator

Foi utilizado um reator anaeróbio de leito fluidificado construído de acrílico com 125,5cm de altura, diâmetro interno de 5cm e volume útil de 1200cm³, conforme figura 7. Primeiramente foram ajustadas as bombas de alimentação e recirculação do RALF que foram da marca DOSITEC, modelo DLX MA/A e ECOSAN respectivamente.

A velocidade empregada foi 1,534 que é 1,3 vezes maior que a velocidade mínima de fluidificação (1,18 cm/s, para o material suporte utilizado neste estudo) de acordo com estudos prévios. (Reis, 2014 e Amorim, 2009 e Barros, 2012).

Figura 7 - Configuração do reator e as bombas utilizadas no estudo



Fonte:MACÁRIO, 2016.

De acordo com estudos anteriores (AMORIM, 2009; MACÁRIO, 2016; REIS, 2014; SILVA, 2015) o reator atuou em modo batelada durante um período de 48h para imobilizar a biomassa nas partículas, sendo alimentado somente por uma única substância que consiste em inóculo (10% V/V) e substrato (90% V/V) com a finalidade de realizar uma partida rápida do RALF (REIS, 2014).

A operação do RALF ocorreu de maneira contínua durante 223 dias, e foi dividida em 5 fases. Durante todo o estudo, foi avaliado o efeito do tempo de detenção hidráulica – TDH (6h a 0,5h) e conseqüentemente a taxa de carregamento orgânico – TCO sob a produção de hidrogênio conforme a tabela 6.

Vale ressaltar, que em todas as fases do estudo o pH foi mantido na faixa ácida sem adição de nenhum ácido, o pH ácido auxiliou na inibição das arqueias metanogênicas beneficiando a produção a produção de hidrogênio. A temperatura não foi controlada e o

reator foi mantido durante toda operação em temperatura ambiente que variou entre 25,9 e 33,2°C sempre condições mesófilas.

Tabela 8 - Fases de operação do reator durante o período de estudo

Fase	TDH	Concentração (mg/L)
1	6	2800 mg lactose/L
2	4	2800 mg lactose/L
3	2	2800 mg lactose/L
4	1	2800 mg lactose/L
5	0,5	2800 mg lactose/L

Fonte: Autor, 2018.

4.5 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas durante toda operação do reator. Os parâmetros pH, DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis foram realizados de acordo com o AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATIO. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

4.5.1 Determinação do teor de carboidratototais

Na determinação dos carboidratos foi utilizado a metodologia de Dubois et al. (1956) que se baseia que carboidratos complexos e simples reagem com fenol e ácido sulfúrico dando uma coloração amarelo-alaranjada na substância formada, com uma coloração estável e uma reação sensível. A substância formada é lida no espectrofotômetro e a partir desta leitura é fornecido a quantidade de carboidrato na amostra em g.L^{-1} (AMORIM, 2012).

4.5.2 Determinação do teor de biogás e hidrogênio

A produção volumétrica de hidrogênio foi medido pelo medidor MilliGas-counter do fabricante Ritter que tem um recipiente acoplado com uma base (NaOH) na concentração molar de 5 mol/L. Este medidor era acoplado ao *headspacedo* reator para que o biogás entrasse em contato com o hidróxido de sódio (NaOH) formando CO_2 que fica retido na solução de NaOH e fosse medido apenas o volume de gás hidrogênio (PEIXOTO, 2008).

Figura 8- Medidor volumétrico de gás hidrogênio



Fonte: AMORIM, 2012.

A determinação do biogás (CO_2 , CH_4 e H_2) foi através da cromatografia gasosa de acordo com a metodologia de Maintinguer et al. (2008) e foi realizada através de cromatografia gasosa (SHIMADZU GC-2010 Plus), utilizando detector por condutividade térmica (TCD) e coluna (SupelcoCarboxen 1010 Plot) com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm com argônio como gás de arraste com um fluxo de x cm/s. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram mantidas a 30 °C, 200 °C e 230 °C, respectivamente. Para realização das análises foram retiradas amostras de 1 mL de gás do *headspace* do reator, com uma seringa gastigh com trava, e injetada no cromatógrafo.

4.5.3 Determinação dos metabolitos

Os metabólitos solúveis Acetona, álcoois (metanol, etanol e n-butanol) e ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caproico) produzidos durante todo experimento, foram determinados por cromatografia gasosa (cromatógrafo Shimadzu modelo GC 2010, software LabSolution acoplado por um amostrador automático HS-20) com detector de ionização de chamas - FID - e coluna SUPELCOWAXTM 10 com capilar de sílica fundida de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm e foi utilizado o método de extração do headspace adaptado de Adorno *et al* (2014).

As amostras dos efluentes foram preparadas em tubos de 10 mL de vidro com tampa rosqueável e septo de silicone, adicionando 1 g de NaCl, 2 mL de amostra,

70 μL de solução de isobutanol a 1 g/L, 100 μL de ácido crotônico a 700 mg/L e 200 μL de ácido sulfúrico 2 M, de acordo com Adorno et al. (2014).

Após etapa do preparo foram utilizadas os seguintes parâmetros no cromatógrafo adaptado de Adorno et al.(2014):

- Rampa de temperatura: 35 °C (0'), 2 °C/min 38 °C (0'), 10 °C/min 75 °C (0'), 35 °C/min 120 °C (1'), 10 °C/min 170 °C 2 °C/min;
- Temperaturas do injetor, do detector (FID) e da coluna: 250, 280 e 35 °C, respectivamente;
- Razão de Split: 16,3[M1] ;
- Fluxo do gás de arraste (H_2), do make-up ou gás auxiliar (N_2) e do gás de chama (ar sintético): 30, 30 e 300 mL/min, respectivamente;
- Velocidade linear constante: 41,8 cm/s;
- Fluxo da coluna: 1,56 mL/min.dia;
- Tempo total de análise: 14,49 min.

O amostrador automático HS-20 foi utilizado com as condições adaptadas de Frink e Armstrong (2017) e foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Pressão do gás de pressurização (Argônio): 100 kPa;
- Nível de agitação: 2;
- Temperaturas do forno, da linha de amostra e da linha de transferência: 105,3; 150 e 118 °C, respectivamente;
- Tempos de equilíbrio, de pressurização e de equilíbrio da pressão: 5; 0,5 e 0,10 minutos, respectivamente;
- Tempos de carregamento, de equilíbrio do carregamento e de injeção: 0,5; 0,10 e 0,5 minutos, respectivamente;
- Tempo de ciclo do GC: 14,99 minutos.

4.5.4 Periodicidade das análises

As análises físico químicas serão realizadas durante toda operação do reator, visando um melhor controle operacional e o alcance de uma melhor produção de hidrogênio. Na tabela 7 encontram-se as análises realizadas e sua periodicidade e metodologias.

Tabela 9 - Método da análise Físico-Química

Análise	Periodicidade	Metodologia
pH	Diário	American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environmental Federation (ed.). APHA; AWWA; WEF Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.
DQO	2x/semana	20th Edition.
Sólidos (sólidos totais – ST, sólidos suspensos totais – SST, sólidos suspensos voláteis – SSV)	2x/semana	Washington: APHA: AWWA; WEF ,1998.
NTK	Caracterização do efluente	Medidor MilliGascounter (Ritter)
Hidrogênio	2x/semana	Cromatografia gasosa (MODELO)
Ácidos Orgânicos Voláteis e Álcoois	2x/semana	Cromatografia gasosa (MODELO)
Carboidratos	2x/semana	Dubois et al.(1956)

Fonte: Autor, adaptada de MACÁRIO, 2016.

4.6 Cálculos dos principais parâmetros

A equações 19 a 25 foram utilizadas para determinação dos parâmetros aplicados a este estudos.

$$HY (\text{mol}_{\text{H}_2} / \text{mol}_{\text{glicose}}) = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (mol)}}{\text{Quantidade de glicose consumida (mol)}} \quad (19)$$

$$\text{HPR} (\text{L}_{\text{H}_2} / \text{L}_{\text{Reator}} \cdot \text{h}) = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (L)}}{\text{Tempo (h) x Volume útil do reator (L)}} \quad (20)$$

$$\text{Conversão de carboidrato (\%)} = \frac{100 * (\text{carboidrato}_{\text{af}} - \text{carboidrato}_{\text{ef}})}{\text{carboidrato}_{\text{af}}} \quad (21)$$

$$TDH_{\text{Real}} \text{ (h)} = \frac{\text{Volume útil do reator (mL)}}{\text{Vazão}_{\text{Real}} \text{ (mL.h}^{-1}\text{)}} \quad (22)$$

$$TCO_{\text{Teórica Aplicada}} \text{ (kg.m}^{-3}\text{.d}^{-1}\text{)} = \frac{DQO_{\text{Teórica Afluente}} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}}{TDH_{\text{Teórico}} \text{ (d)}} \quad (23)$$

$$TCO_{\text{Real Aplicada}} \text{ (kg.m}^{-3}\text{.d}^{-1}\text{)} = \frac{DQO_{\text{Real Afluente}} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}}{TDH_{\text{Real}} \text{ (d)}} \quad (24)$$

$$TCO_{\text{Real Removida}} \text{ (kg.m}^{-3}\text{.d}^{-1}\text{)} = \frac{[DQO_{\text{Real Afluente}} - DQO_{\text{Efluente}}] \text{ (g.L}^{-1}\text{)}}{TDH_{\text{Real}} \text{ (d)}} \quad (25)$$

4.7 Análise da biologia molecular dos microrganismos.

No final de cada etapa de operação do reator foram coletadas amostras do meio suporte com biofilme para análise da biologia molecular (PCR/DGGE). Esta análise permite estimar a diversidade bacteriana, análise da composição e diversidade genética, verificação do perfil da estrutura da comunidade bacteriana, informar o perfil e a dinâmica da comunidade bacteriana e a comparação entre as amostras no mesmo gel (SAKAMOTO; VARESCHE, 2015).

Para esta etapa do estudo adotou-se a metodologia do laboratório de processos biológicos - LPB da Universidade de São Paulo - USP que consiste em quatro etapas:

Em uma primeira etapa, a biomassa foi lavada em solução PBS (NaCl, KCl, Na₂ POH₄, KH₂PO₄) e centrifugada em 3000 rpm por 3 minutos com a finalidade de desprender a biomassa do meio suporte (SAKAMOTO; VARESCHE, 2015).

A extração do DNA, que foi realizada por um kit da marca MO BIO LABORATORIES e, apresenta basicamente dois procedimentos: lise celular que foi realizada por um processo físico, e a purificação da molécula de DNA que ocorreu através de seissoluções não descritas pelo kit utilizado para esta etapa do procedimento.

Os fragmentos de DNA extraídos foram amplificados por uma Reação de Cadeia em Polimerase –PCR. Esta técnica tem como finalidade amplificar a sequência DNA de interesse, através de uma síntese enzimática *in vitro*, criando diversas cópias do fragmento de DNA de interesse. Na referida etapa utilizaram-se enzimas (Taq polimerase), dNTPs (bases) e sequência de oligonucleotídeos (primers), as sequências utilizadas estão descritas na tabela x, e

um melhorador de GC. Neste procedimento ocorreram trinta e cinco (35) ciclos e em cada um desses houve: a desnaturação do DNA, em seguida o anelamento dos primers na região de interesse da fita de DNA e a extensão da dupla fita de DNA (SAKAMOTO; VARESCHE, 2015). Neste estudo, foi amplificado apenas o domínio bactéria, pois as arqueias foram inativadas no processo do tratamento térmico do inóculo.

Tabela 10 - Primers utilizados na análises de biologia molecular

Posição	Sequência	Domínio	Fonte
968 FGC	5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC - 3'	Bacteria	Nubel et al. (1996)
1401 R	5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC - 3'	Bacteria	Nubel et al. (1996)

Fonte: NUBEL et al., 1996.

Os ciclos para amplificação do DNA ocorreram no termociclador T100™ Thernal Cycler da BIORAD. As condições usadas na programação do aparelho para a amplificação do fragmento 16S de DNA foram de acordo com a tabela 11.

Tabela 11 - Condições usadas no termociclador

Condição da PCR	Bactéria Nubel et al (1996)
NÚMERO DE CICLOS	35
DESNATURAÇÃO INICIAL	94°C / 5 minutos
DESNATURAÇÃO	94°C / 1 minutos
ANELAMENTO	55°C / 1 minuto
EXTENSÃO	72°C / 1 minuto
FINAL DA EXTENSÃO	72°C / 7 minutos
RESFRIAMENTO	4°C

Fonte: Autor, 2018.

Para verificação do produto da PCR foi utilizado a técnica de eletroforese em gel que consiste em analisar a mobilidade do DNA amplificado e compará-los com marcadores padrões. Neste processo utilizou-se corante (tal), com alta mobilidade eletroforética, que foi misturado com as amostras auxílio da pipeta automática. Essas amostras correram em um gel de agarose com concentrações de 0,8% e 1,2%, mergulhado em solução tampão (TAE 1X)

na câmara eletroforética (Electrophoresis Power Supply EPS 301 - Amersham Pharmacia Biotech) por 30 minutos em 75 V.

O produto final da PCR foi submetido à eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE com a finalidade de separar os fragmentos de DNA. Foi utilizado um gel poliacrilamida 8% (massa/volume) em gradiente linear desnaturante (100% desnaturante: 7M uréia e 40% (v/v) formamida desionizada) variando de 45%-65%. As condições de corridas foram 75 V e 60°C durante 16 horas. Os perfis que foram visualizados pelo software Eagle Vista II e em seguida será utilizado o software Bionumerics 2.5 para obtenção do coeficiente de similaridade e o dendrograma que foram construídos segundo o coeficiente de Pearson.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, serão apresentados os resultados dos parâmetros analisados durante toda operação do reator anaeróbio de leito fluidificado que foi utilizado nesta pesquisa. O trabalho foi realizado em um único reator em cinco etapas diferentes denominadas 1, 2, 3, 4 e 5 que representam os TDHs 6, 4, 2, 1 e 0,5 horas respectivamente.

5.1 Caracterização físico-química do soro de leite

Foram realizadas análises físico-químicas do afluente (soro de leite) na mesma concentração (2800 mg/L) que foi utilizada durante toda pesquisa. Os resultados estão dispostos na tabela 12.

Tabela 12 - Propriedades físico-químicas do soro de leite na concentração de 2800 mg/L.

pH	6,1
Carboidrato total(g/L)	2,94
DQO (g/L)	3,33
SST (g/L)	0,19
SST (g/L)	0,03
SSF (g/L)	0,16
NTK (g/L)	0,06098

Fonte: Autor, 2018.

5.2 Teor de carboidrato total

Pode-se notar que os valores de carboidrato total, DQO e pH foram sempre superiores ao encontrado no afluente, isso ocorreu devido à autofermentação do afluente, pois as análises eram sempre feitas 24 horas após a alimentação.

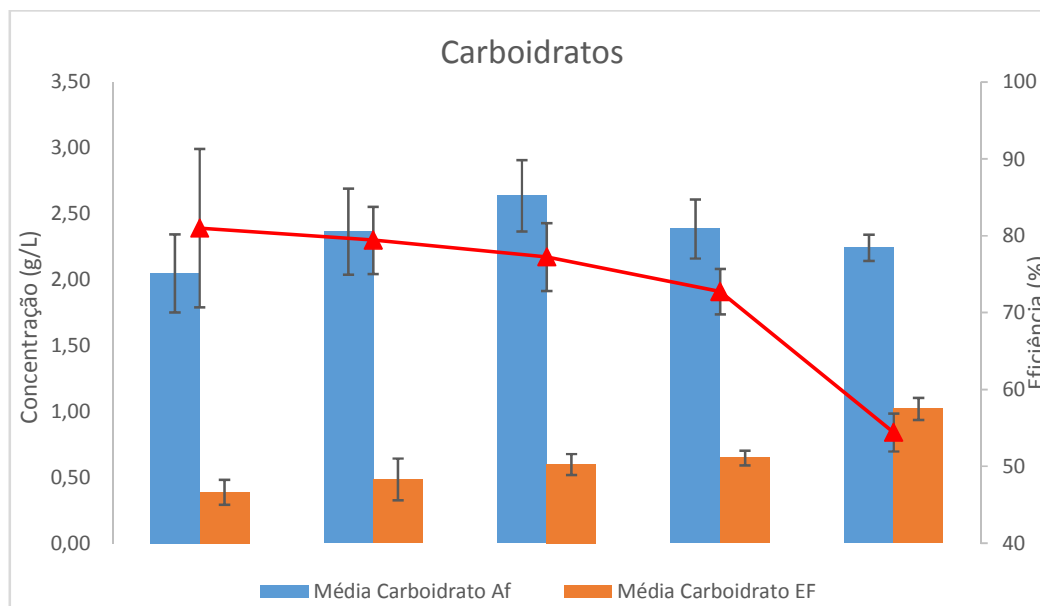
Durante toda operação do reator, a concentração teórica inicial de carboidrato foi mantida em 2,8 gcarboidratoL⁻¹. Entretanto, a média do carboidrato afluente real em todas as fases que variou entre 2,05 gcarboidrato L⁻¹ e 2,64 gcarboidrato L⁻¹ e foi sempre inferior aos 2,8 gcarboidratoL⁻¹, ou seja, menor que a concentração teórica inicial, pois, as análises de concentração de carboidrato foram realizadas no dia seguinte à alimentação e por isso ocorreu autofermentação do substrato, que consome uma parcela significativa do carboidrato afluente.

A média da concentração de carboidratos totais efluente variou entre 0,39 gcarboidratoL⁻¹ e 1,02 gcarboidrato L⁻¹. Pode-se observar que as fases um 1, 2 e 3 que a

eficiência de conversão de carboidrato foi em torno de 80%. Nas fases 4 e 5 houve uma redução na eficiência para 72% e 54% respectivamente. Isso mostra, que nos TDHs 1 e 0,5 h não ocorreram condições para maiores valores de degradação de carboidrato. A redução da taxa de conversão de carboidrato pode ter ocorrido por limitações cinéticas, devido à capacidade máxima de utilização do substrato pela comunidade microbiana, pois, com o aumento da TCO através da redução do TDH passou a existir no meio muito mais carboidrato que a capacidade máxima de consumo dos microrganismos e por isso houve aumento na concentração efluente. Pode-se notar, que com o aumento da TCO houve uma redução na eficiência do reator, indicando provavelmente que o TDH interferiu diretamente na conversão de carboidrato do sistema operado.

A figura 9e a tabela 13 mostra o comportamento do carboidrato afluente, efluente e da eficiência do consumo de carboidrato durante a operação do reator.

Figura 9– Comportamento do carboidrato afluente, efluente e eficiência



Fonte: Autor, 2018.

Tabela 13– Valores médios de carboidrato afluente, efluente e eficiência

Fases	Média – af(g/L)	Média – ef(g/L)	Média – eficiência (%)
1	2,05±0,30	0,39±0,09	81,02±10.30
2	2,37±0,33	0,49±0,16	79,43±4.38
3	2,64±0,27	0,60±0,08	77,26±4.40
4	2,39±0,22	0,65±0,06	72,77±2.95
5	2,24±0,10	1,02±0,06	54,45±2.47

Fonte: Autor, 2018.

Resultados similares, foram encontrados por Ottaviano et al.(2016) Operou um RALF em condições termofílicas e com uma concentração inicial do substrato 4980 ± 207 mg lactose L^{-1} e variou o TDH entre 8h e 0,5h e obteve uma eficiência que variou entre $52 \pm 4,12$ % e $83 \pm 1,38$ %. A menor taxa de de gradação do substrato ($52 \pm 4,12$ %), também ocorreu no TDH de 0,5 h. Entretanto, a maior conversão de carboidrato ($83 \pm 1,38$ %) ocorreu no TDH 1 h. Neste trabalho, também foi observado um aumento significativo na conversão de carboidrato do TDH 8h ($71 \pm 4,61$ %) para o TDH 6h ($80 \pm 2,54$ %).

Fang e Yu (2001) em um reator tipo UASB com um pH 5,5 e uma concentração inicial de substrato de 3400 mg lactose L^{-1} e em um TDH de 2h obteve uma conversão de carboidrato de 83%.

Marcário (2016), utilizando um RALF com soro de queijo como substrato e uma concentração de 458 ± 215 mg carboidrato L^{-1} e um TDH de 2h que foi inoculado com rumém bovino obteve uma eficiência na conversão de carboidrato de 69 ± 9 mais uma vez corroborando com os resultados encontrados neste estudo

Rosa (2014), utilizando um RALF em condições mesofílicas com uma concentração inicial de 5 g lactose L^{-1} com uma variação de TDH entre 6 e 1 h obteve uma degradação de carboidrato entre 85 e 95%. Esses valores foram superiores ao encontrado neste trabalho.

5.3 Demanda Química de Oxigênio - DQO

Observa-se que a DQO afluente teve uma grande variação durante toda operação do reator. Foi observado, que a DQO média afluente variou entre $3,29 \pm 0,30$ gDQO L^{-1} . e $2,53 \pm 0,83$ gDQO L^{-1} . e a média efluente variou entre $2,03 \pm 0,45$ g DQO L^{-1} e $2,65 \pm 0,63$ g DQO L^{-1} .

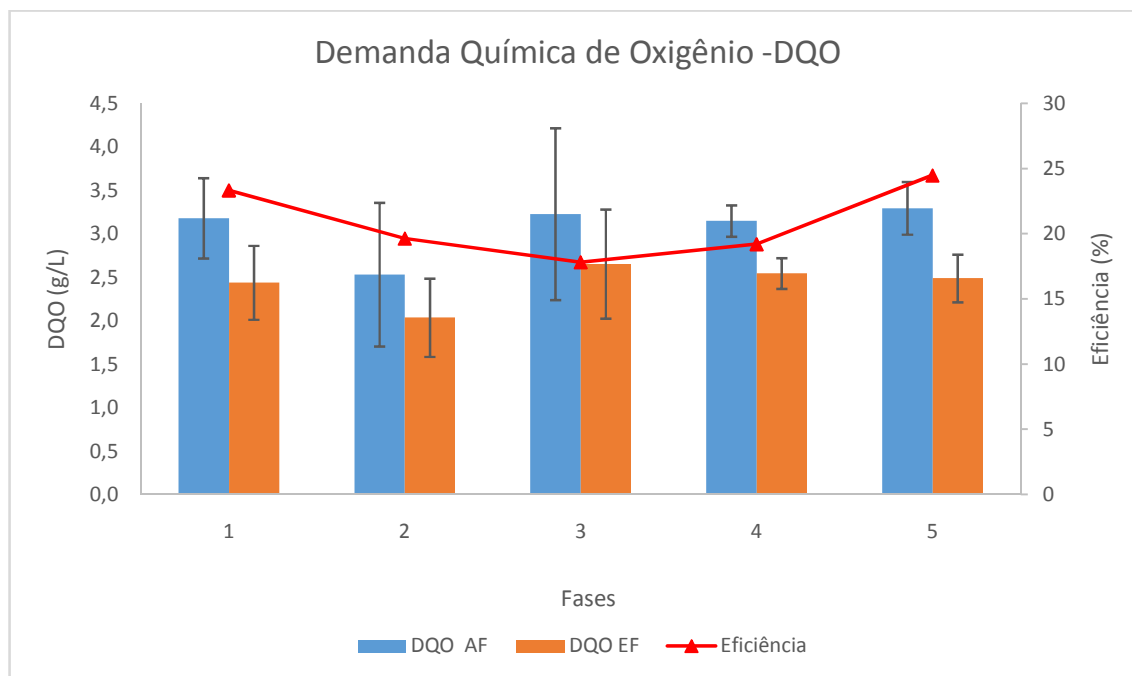
Apesar da utilização de um substrato sintético, houve uma dificuldade da estabilização da DQO afluente isso pode ter ocorrido devido ao fato das análises de DQO ocorrerem sempre no dia posterior ao da alimentação, ocorrendo autofermentação do substrato afluente que pode ser influenciada por diversos motivos como temperatura e quantidade de substrato afluente, na autofermentação ocorre a conversão de matéria orgânica pela ação de microrganismos que pode ser verificado neste experimento o que justifica a grande variação da DQO afluente. Vale ressaltar, que todos os dias antes da alimentação ocorreu a limpeza do barrilete com álcool 70% para eliminar os microrganismos, assim, reduzindo à autofermentação na tentativa de minimizar a autofermentação.

A eficiência durante toda operação ficou em torno de 20% sendo que a maior eficiência ocorreu na fase 5 com $24,48 \pm 4,23\%$, e a menor ocorreu na fase 3 com $17,81 \pm 8,30\%$. O comportamento de DQO mostrou um comportamento decrescente entre as fases 1 ($23,33 \pm 8,52\%$) e 3 ($17,81 \pm 8,30$) e um comportamento crescente nas fases 4 e 5. A tabela 13 mostra os valores médios de DQO durante toda operação do reator.

Os baixos valores de remoção de DQO durante toda operação do reator, pode ser associado à presença dos ácidos acético e butírico o que indica que a glicose foi convertida para estes ácidos e por isso ocorreu uma alta degradação de carboidrato e uma baixa conversão de DQO no reator, aparentemente ocorreu uma conversão incompleta do carboidrato o que pode ser benéfico para produção de hidrogênio. Assim, como ocorreu no reator de Perna et al. (2013), que utilizou um reator de leito fixo com um TDH de 24 h e uma TCO de 22 g DQO d^{-1} e obteve uma remoção de DQO 16,5 % e também justificaram esta baixa remoção pela presença dos ácidos orgânicos.

A figura 10 mostra o comportamento da DQO afluyente e efluente e a eficiência na remoção de DQO durante a primeira fase da operação.

Figura 10 - Comportamento da DQO afluyente, efluente e eficiência



Fonte: Autor, 2018.

Tabela 14 - Valores médios de DQO Afluente, Efluente e Eficiência

Fases	Média –af (g/L)	Média –ef (g/L)	Média – eficiência (%)
1	3,18 ± 0,46	2,44±0,43	23,33±8,52
2	2,53±0,83	2,03±0,45	19,63±10,62
3	3,23±0,99	2,65±0,63	17,81±8,30
4	3,15±0,18	2,54±0,18	19,19±5,75
5	3,29±0,30	2,49±0,27	24,48±4,23

Fonte: Autor, 2018.

Macário (2016), utilizou um RALF com soro de leite como substrato e inoculado com rúmen bovino e com um TDH de 2h obteve uma eficiência média de 47% de remoção de DQO. Esta diferença significativa no valor médio da DQO, pode ter ocorrido por fatores operacionais que beneficiaram alguns grupos de microrganismos que degradavam determinados tipos de matéria orgânica diferentes do carboidrato.

Rosa (2014), apresentou valores de remoção de DQO em torno de 38% em um reator anaeróbio de leite de fluidificado com soro de leite como substrato e utilizou lodo de suíno cultura para inoculação do reator com uma concentração inicial de 5065mg DQO L⁻¹ e um TDH que variou entre 6 e 1 h. Mais uma vez pode-se observar uma remoção de DQO superior ao que foi encontrado neste estudo.

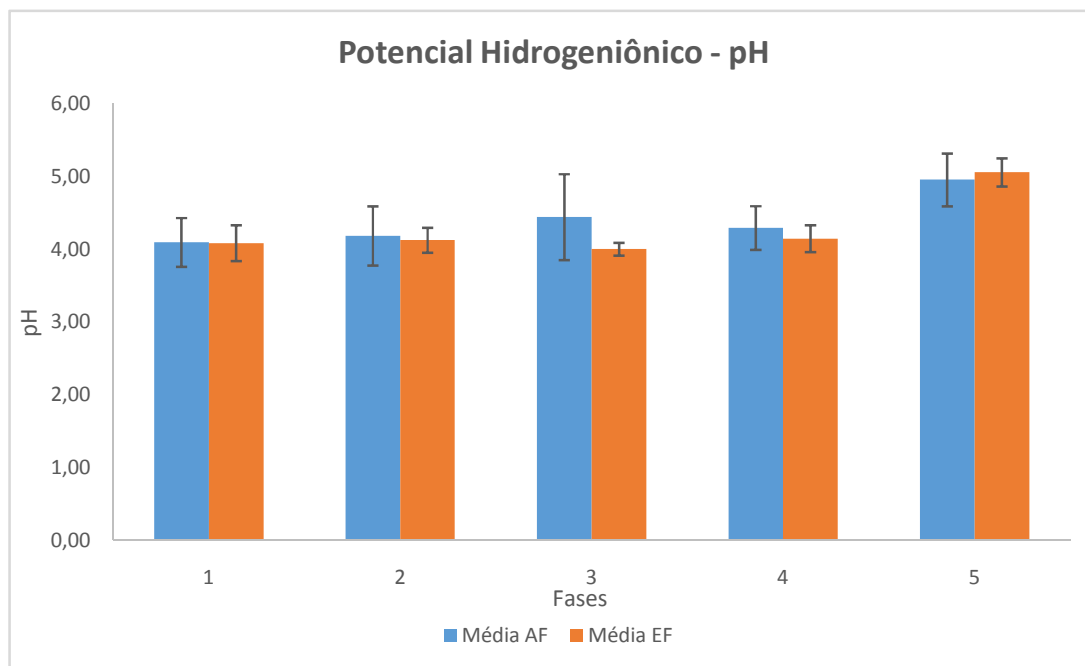
5.4 Potencial hidrogeniônico – pH

O pH é considerado um dos mais importantes e sensíveis parâmetros operacionais que afetam o desempenho da fermentação escura e pode alterar as rotas metabólicas, estrutura da comunidade microbiana e a atividade da enzima hidrogenase(ELBESHISHYET et al.; 2017; MASSET et al., 2010).

Na operação do reator o pH afluente médio variou entre 4,09 ± 0,34 e 4,95 ± 0,36 e o efluente variou entre 4,0±0,09 e 5,06±0,19. O estudo, mostra que os valores de pH afluente e efluente foram próximos durante toda operação do reator, ou seja, houve poucas alterações entre pH afluente e o pH efluente. Pode-se observar, que durante toda operação os pHs afluente e efluente na média ficaram na faixa ácida beneficiando a produção de H₂, pois, em pH ácido os inibe a presença dos microrganismos metanogênicos que são consumidores de hidrogênio.

O pH médio afluente e efluente na fase 5 foi superior às outras fases da operação e ficou em torno de 5, o que pode ter alterado a dinâmica microbiana do reator e com isto houve mudanças na rotas metabólicas.

Figura 11 - Comportamento do pH durante a operação do reator



Fonte: Autor, 2018.

Tabela 15 - Valores médios de pH durante toda operação

FASE	MÉDIA AF	MÉDIA EF
1	4,09 ± 0,34	4,08 ± 0,25
2	4,18 ± 0,41	4,12 ± 0,17
3	4,44 ± 0,59	4,00 ± 0,09
4	4,29 ± 0,30	4,14 ± 0,18
5	4,95 ± 0,36	5,06 ± 0,19

Fonte: Autor (2018).

O valor do pH efluente encontrado foi similar ao encontrado por Ottaviano et al. (2016), utilizando um RALF com soro de leite em pó como substrato em condições termofílicas obteve valores de pH afluente de $5,7 \pm 0,1$ e para o pH efluente foi obtido um valor de $4,3 \pm 0,1$ o pH efluente em ambos os experimentos foi mantido na faixa do ácido o que contribui para produção de hidrogênio.

5.5 Determinação de sólidos suspensos

A tabela 16 apresenta os valores dos sólidos suspensos totais, fixos e voláteis efluentes durante toda operação do reator.

Os sólidos suspensos totais variou entre $0,34 \pm 0,11$ g/L (TDH = 6 h) e $0,18 \pm 0,08$ g/L (TDH = 4 h). Já nos sólidos suspensos fixos essa variação foi de $0,02 \pm 0,007$ g/L (TDH = 6h) até $0,04 \pm 0,01$ (TDH 2h) e os sólidos suspensos voláteis $0,15 \pm 0,08$ g/L (TDH =4 h) até $0,30 \pm 0,09$ g/L (TDH = 6h)

Tabela 16 - Valores médios dos sólidos voláteis efluente

Fases	SST (g/L)	SSF(g/L)	SSV(g/L)	SSF (%)	SSV (%)
1	$0,34 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,09$	13	87
2	$0,18 \pm 0,08$	$0,03 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,08$	14	86
3	$0,23 \pm 0,07$	$0,02 \pm 0,007$	$0,21 \pm 0,06$	10	90
4	$0,25 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,08$	16	84
5	$0,19 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,07$	15	85

Fonte: Autor, 2018.

No contexto da produção de hidrogênio, os sólidos suspensos presente no substrato pode ser considerado um problema, pois, é necessário um tempo elevado de contato para ocorrer a hidrólise destas partículas (NASR et al., 2011).

Pode-se notar, que mesmo a quantidade de sólidos suspensos variando no reator ao longo da operação as proporções dos sólidos suspensos pouco se alteraram e a maior parte destes sólidos foi composta pelo SSV.

5.6 Produção do biogás

Neste item, serão apresentados os resultados e as discussões sobre o rendimento de hidrogênio, produção volumétrica e o conteúdo do biogás em relação à taxa de carregamento orgânico e a variação do tempo de detenção hidráulica durante toda operação do reator.

5.6.1 Rendimento de hidrogênio (HY)

Os valores de rendimentos de hidrogênio variou $2,73 \text{ mol H}_2 \text{ mol.glicose}^{-1}$ com $12,61 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$ e $1,61 \text{ mol H}_2 \text{ mol.glicose}^{-1}$. O maior valor de rendimento H_2 ($2,73 \text{ mol H}_2 \text{ mol.glicose}^{-1}$) ocorreu na fase 1 com TDH de 6h possivelmente devido à elevada eficiência na degradação de carboidrato, com a redução do TDH para 4 horas na fase 2 houve uma queda no HY para $1,61 \text{ mol H}_2 \text{ mol.glicose}^{-1}$, o rendimento de hidrogênio se manteve estável nas fases 3 e 4 e cresceu novamente na fase 5 ($2,43 \text{ mol H}_2 \text{ mol.glicose}^{-1}$). Possivelmente, o aumento do pH na fase 5 mudou a dinâmica microbiana do reator beneficiando os microrganismos produtores de ácido acético e conseqüentemente elevou o HY.

Os valores médios de cada fase da operação são demonstrados na tabela 17.

Tabela 17 - Valores médios do rendimento de hidrogênio

FASES	RENDIMENTO	TCO
1	$2,73 \pm 0,32$	12,34
2	$1,61 \pm 0,22$	15,40
3	$1,82 \pm 0,26$	33,02
4	$1,73 \pm 0,25$	67,78
5	$2,43 \pm 0,31$	163,02

Fonte: Autor, 2018.

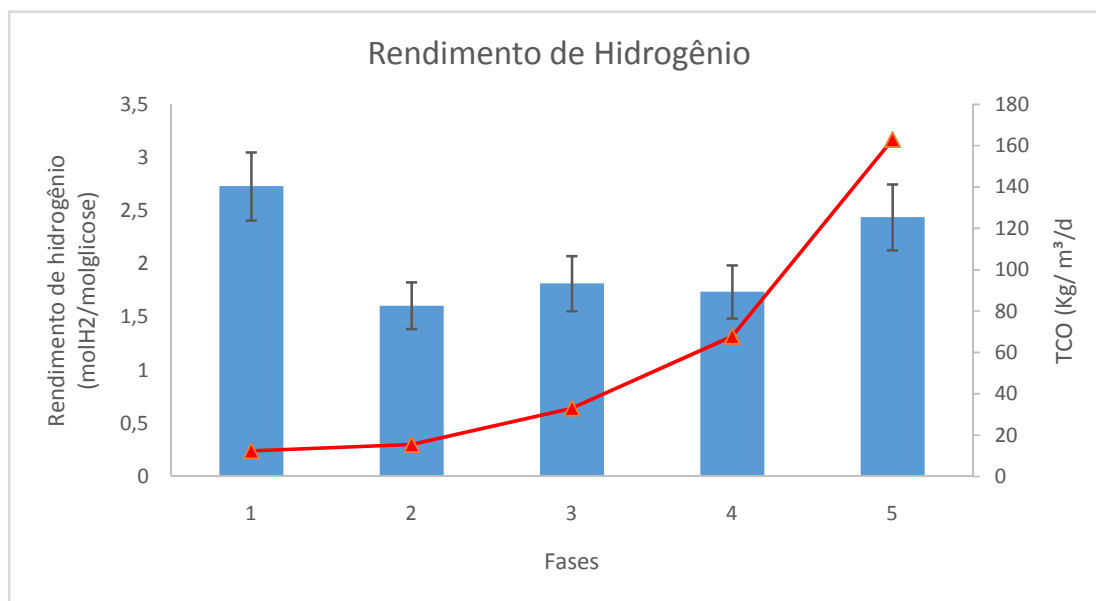
Ottaviano (2014), utilizando uma concentração 3 gDQOL^{-1} em um RALF com um TDH de 6 horas obteve uma produção de H_2 $2,6 \text{ mol mol H}_2 \text{ mol.lactose}^{-1}$ próxima a obtida neste estudo que foi $2,73 \text{ mol H}_2 \text{ mol.glicose}^{-1}$ e verificou que com o aumento da concentração da concentração inicial de substrato houve uma redução do HY. Em outra etapa deste mesmo estudo, Ottaviano verificou que com a redução do TDH de 8 para 4 horas houve um aumento no HY de 2,1 para $3,3 \text{ mol H}_2 \text{ mol.lactose}^{-1}$ em TDHs inferiores 2 e 1 h houve um decréscimo do HY para 2,7 e $2,4 \text{ mol H}_2 \text{ mol.lactose}^{-1}$ respectivamente, diferentemente deste estudo com a redução do TDH para 0,5 h houve um decréscimo do HY para $0,6 \text{ mol mol H}_2 \text{ mol.lactose}^{-1}$. De um modo geral, os resultados encontrados por Ottaviano são similares ao encontrado por este estudo com a exceção do TDH 0,5 h.

Dávilla-Vazquez et al. (2009), utilizou um CSTR com soro de queijo como substrato e verificou queda no HY com a redução do TDH de 10 para 4 horas de $2,4 \text{ mol H}_2 \text{ mol.lactose}^{-1}$ para $1,7 \text{ mol H}_2 \text{ mol.lactose}^{-1}$.

Silva-Illanes et al. (2017), observou o mesmo comportamento e utilizando um CSTR também verificou a redução do HY com a redução do TDH de 12 h ($0,58 \pm 0,13$) para 8 h ($0,22 \pm 0,05$) utilizando glicerol como substrato.

A figura 12 mostra o comportamento do rendimento da produção de H_2 durante a operação reator

Figura 12 – Comportamento do rendimento de hidrogênio



Fonte: Autor, 2018.

De um modo geral, ocorre limitação na produção de hidrogênio quando existe um aumento muito grande na TCO por limitações cinéticas, entretanto, na literatura existem alguns estudos que mostram que apesar do aumento da TCO pode haver um aumento também na produção de H_2 .

Dávilla-Vazquez et al. (2009) em um TDH fixo de 6 h utilizando um CSTR e com uma TCO 92 kgd e produziu 2,1 mol H_2 / mol lactose, com o aumento da TCO para 138 kg/m³.d esse valor passou para 2,8 mol H_2 / mol lactose.

Tawfik e Salem (2012), utilizaram resíduos da palha de arroz para em um reator anaeróbio de fluxo ascendente com um TDH 1,6 de variou a carga orgânica de 7,1 kg/m³.d para 21,4 kg/m³.d e teve aumento de 95 mmol/d para 121 mmol/d.

Os estudos citados nesta seção, mostram que a relação entre TCO e HY, pode ser diretamente ou inversamente proporcional. No presente estudo, as duas situações ocorreram

na fase 1 para fase 2 ocorreu uma relação inversamente proporcional e na fase 4 para fase 5 ocorreu uma relação diretamente proporcional, entre as fases 2 e 4 o PVH manteve-se estável.

5.6.2 Produção volumétrica de hidrogênio

Os valores obtidos da produção volumétrica de H_2 , estão descritos na tabela 18. Pode-se observar que o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio foi crescente durante toda operação do reator, ou seja, cresceu com o aumento da carga orgânica o que pode ser observado na figura 13.

A fase 1 obteve o melhor rendimento de hidrogênio e a melhor eficiência na degradação de carboidrato, o que indica que quase todo carboidrato do meio era convertido em hidrogênio, porém, nesta etapa ocorreu a menor HPR, isto possivelmente aconteceu pela baixa TCO na fase 1 como a quantidade de glicose disponível no meio foi baixa a HPR também reduziu. Com a redução do TDH consequentemente mais substrato ficou disponível do meio e apesar na queda de eficiência de remoção de carboidrato mais glicose estava sendo convertida para hidrogênio o que gerou uma produção volumétrica de hidrogênio maior, aparentemente existe uma relação de aumento da TCO com o aumento da HPR

O menor valor de HPR foi encontrado na fase 1 ($0,039 \text{ LH}_2 \text{ LReator}^{-1}$) e o maior foi encontrado na fase 5 ($1,433 \text{ LH}_2 \text{ LReator}^{-1}$). Este comportamento, foi similar ao encontrado por Ottaviano (2014) que ao reduzir o TDH de 8 para 0,5 h aumentou o PVH de $156,2 \text{ mLH}_2 \text{ LReator}^{-1}$ para $2999,4 \text{ mLH}_2 \text{ LReator}^{-1}$ reator. Com a exceção do TDH 0,5 h onde o estudo da Ottaviano apresentou um desempenho superior a este trabalho os valores foram similares.

Tabela 18 - Valores médios da produção volumétrica de hidrogênio

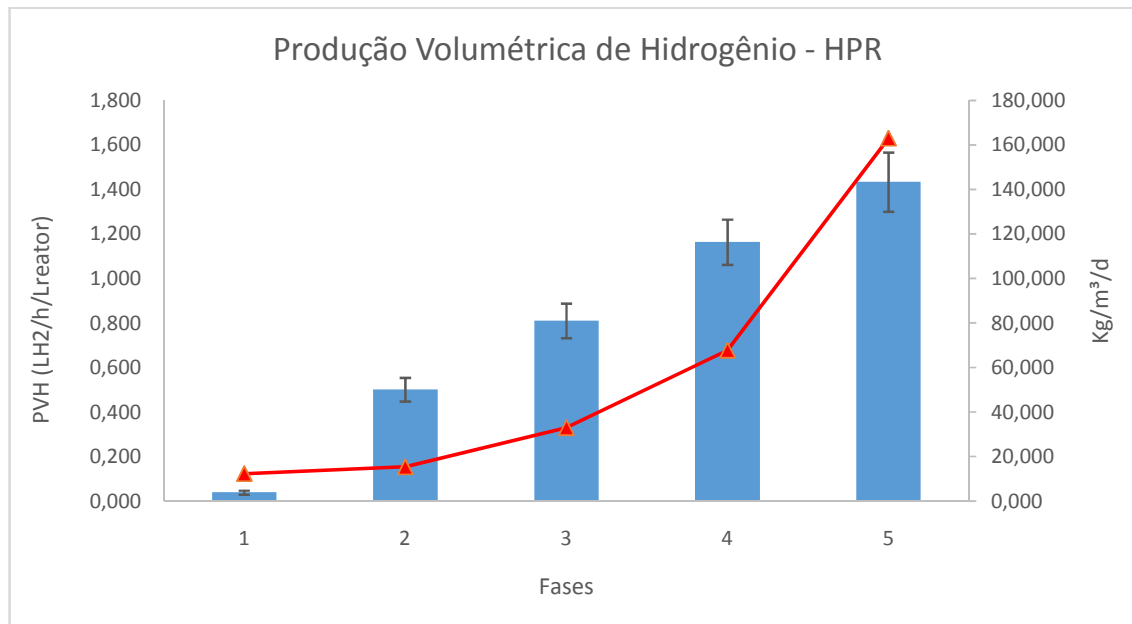
FASE	TDH	PVH	TCO
1	6	$0,039 \pm 0,009$	12,341
2	4	$0,501 \pm 0,053$	15,410
3	2	$0,810 \pm 0,078$	33,021
4	1	$1,163 \pm 0,102$	67,785
5	0,5	$1,433 \pm 0,133$	163,025

Fonte: Autor (2018).

Alexandropoulou, et al. (2018), utilizou um CSTR com TDH 12, 10, 6 e 4 h que apresentaram $4,13 \pm 0,14$, $5,63 \pm 0,15$, $8,72 \pm 0,32$, $10,79 \pm 0,21 \text{ LH}_2 \cdot \text{LReator}^{-1}$.d respectivamente. Pode-se observar que este experimento, também apresentou um

comportamento crescente na produção volumétrica com o aumento da carga orgânica, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Figura 13 - Comportamento da produção volumétrica de Hidrogênio



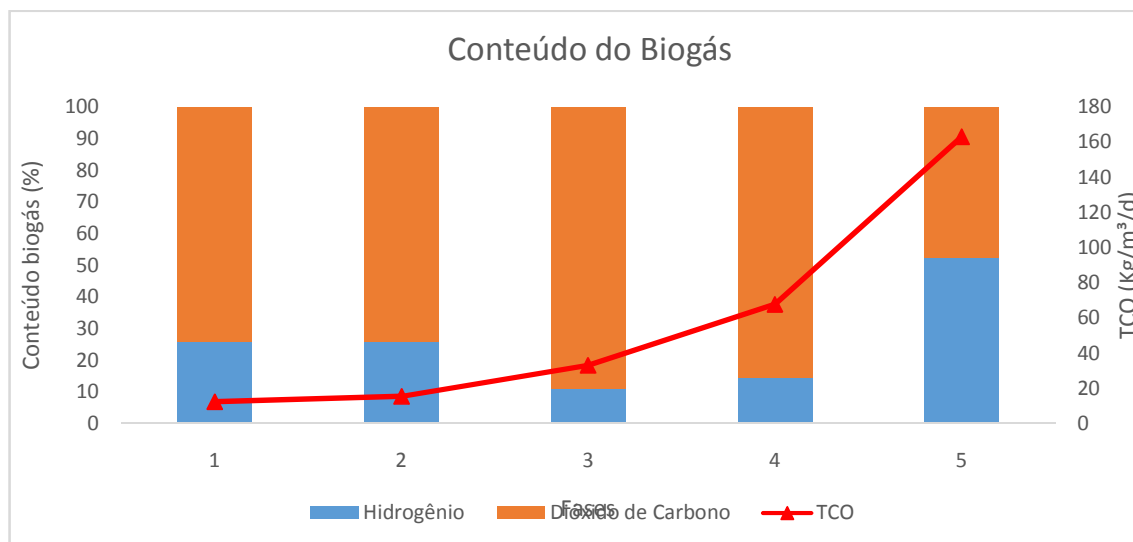
Fonte: Autor, 2018.

Carrilo-Reyes et al. (2014), ao utilizar soro de queijo como substrato em um reator UASB também verificaram um tendência de elevação da produção volumétrica de hidrogênio com a redução do TDH. Foi verificado pelo autores que com a redução do TDH de 13 para 10 h aumentou-se o PVH de $3,45 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para $4,3 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

5.6.3 Conteúdo do biogás

Durante toda operação do reator, observou-se apenas a presença de hidrogênio e dióxido de carbono na composição do biogás. Em nenhum momento da operação, foi encontrado metano, isso indica que o tratamento térmico do inóculo foi eficiente e que as condições acidogênicas do reator ajudaram na inibição dos microrganismos metanogênicos. Além disso, outros parâmetros operacionais como baixos TDHs que ajudaram no carreamento dos microrganismos metanogênicos e contribuíram para ausência de metano, já que as arqueias metanogênicas têm uma taxa de crescimento muito inferior aos microrganismos acidogênicos.

A figura 14 mostra o comportamento da composição do biogás durante toda operação do reator.

Figura 14 - Conteúdo médio do biogás

Fonte: Autor, 2018.

O conteúdo de hidrogênio no biogás variou entre 10,81% e 52,39%. Na fase 1 e 2 o conteúdo do biogás se manteve estável em torno de 25%. Na fase 3 houve uma redução de hidrogênio no conteúdo do biogás que ficou em 10,81%. A partir da fase 3, o reator se comportou de forma crescente, ou seja, teve um aumento no conteúdo de hidrogênio no biogás para 14,55% na fase 4 e 52,39% na fase 5. Percebe-se uma grande variação na composição do biogás ao longo da operação do reator. Este comportamento, indica que existe uma influência dos valores de TCO e do TDH na composição do biogás. Esses parâmetros operacionais, pode ter beneficiado determinados grupos de microrganismos e assim interferindo diretamente na composição do biogás. A tabela 19 mostra os valores médios de hidrogênio e dióxido de carbono no conteúdos de biogás durante toda operação do reator.

Tabela 19 - Valores médios do conteúdo de biogás (%)

FASES	TDH (H)	TCO	H ₂	CO ₂
1	6	12,34	25,80 ± 9,02	74,20 ± 9,02
2	4	15,40	25,87 ± 8,16	74,13 ± 8,16
3	2	33,02	10,81 ± 3,43	89,19 ± 3,43
4	1	67,78	14,55 ± 3,23	85,45 ± 3,23
5	0,5	163,02	52,39 ± 8,53	47,61 ± 8,53

Fonte: Autor, 2018.

Amorim (2009), em um RALF utilizando glicose e argila expandida como meio suporte em um TDH de 6h com uma concentração de 2000 mg glicose/L encontrou um

conteúdo médio de 75% CO₂ e 25% H₂ também não foi encontrado nenhum conteúdo de metano. Esses valores, são similares ao que foi encontrado nas fases 1 e 2 do reator em estudo.

Rosa (2014), utilizou um RALF, com soro de queijo como substrato e variou a TCO e encontrou valores estáveis, porém foram valores reduzidos da quantidade de hidrogênio no conteúdo do biogás que variaram em torno de 15 a 17%. Neste estudo, foi verificado uma quantidade de metano que variou entre 4 e 8%.

Ottaviano (2014), também utilizando um RALF e variando a TCO, em condições termofílicas, encontrou valores estáveis de quantidade de hidrogênio no conteúdo do biogás, entretanto, este estudo encontrou entre 40 e 60% de hidrogênio no biogás. Valores similares ao encontrado na fase 5.

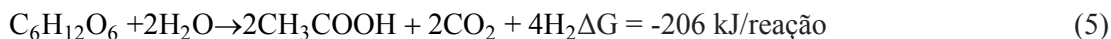
Os resultados dos estudos dos estudos citados anteriormente nesta seção, mostram que é possível obter resultado similares a este estudo, entretanto, nenhum dos estudos citados teve um comportamento similar em relação ao conteúdo de biogás.

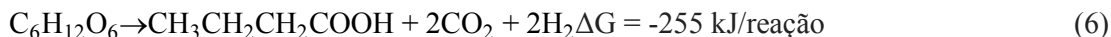
5.7 Metabólitos produzidos pelo reator

A quantificação dos ácidos orgânicos voláteis e álcoois no reator, é importante para verificação das rotas metabólicas adotadas pelas comunidades microbianas. Estas rotas, podem ser benéficas quando produzem hidrogênio ou malélicas quando consomem hidrogênio ou substrato do meio e assim, interfere diretamente no rendimento de hidrogênio. Além disso, alguns desses metabólitos gerados podem ter papel inibitório ou tóxico para os microrganismos produtores de H₂ (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008; OTTAVIANO, 2014).

Neste experimento, o reator produziu principalmente ácido acético (33,60% - 65,63 %) e butírico (40,16% - 21,21%) que são os principais metabólitos ligados à alta produtividade de hidrogênio. Nota-se que as proporções dos ácidos acético e butírico são inversamente proporcionais em todas as fases, ou seja, quando ocorreu o aumento de um desses metabólitos o outro reduziu.

A relação, Hac/Hbu, é um dos indicadores da produção de hidrogênio já que a rota do acético gera 4 moles de hidrogênio para cada mol de glicose por meio da equação 5, enquanto, a rota do ácido butírico gera apenas dois moles de hidrogênio para cada mol de glicose por meio da equação 6.





Um fator que foi benéfico para produção de hidrogênio no reator, foi a ausência do ácido propiônico em todas as fases da operação, entretanto, vale ressaltar, que este foi produzido em quantidades abaixo do limite de quantificação, já que o mesmo foi detectado. A rota do propionato, consome hidrogênio do meio pela equação 28 e por isso a baixa quantidade deste metabólito no reator é desejável para que ocorra uma melhor produção de hidrogênio.



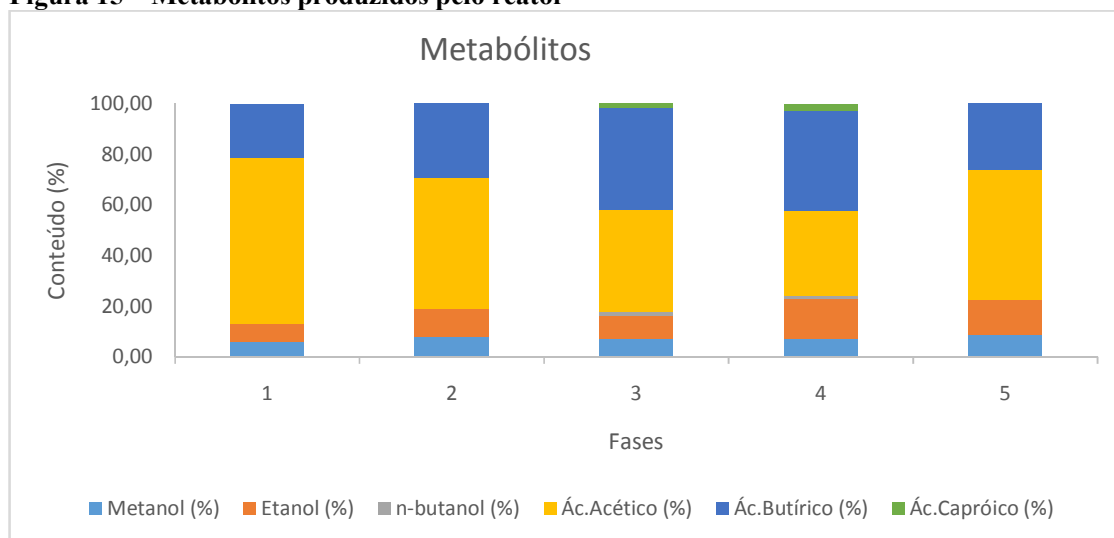
Em todas as fases, foi produzido etanol (7,30% - 15,53%), e metanol (5,87% - 8,76%). Estes álcoois foram produzidos em menores quantidades e pode não ser desejável no reator pois, estas rotas consomem substrato do meio e não produzem hidrogênio, entretanto, existe uma rota que pode produzir etanol e H_2 que pode ser verificada na equação 29.



Apenas, nas fases 3 e 4 ocorreu presença de n-butanol e ácido capríco em pequenas quantidades.

A figura 15 mostra os metabólitos produzidos durante toda a operação do reator em porcentagem molar.

Figura 15 – Metabólitos produzidos pelo reator



Fonte: Autor, 2018.

Nota-se que o aumento na produção do ácido acético conduziu o reator para um melhor rendimento na produção de hidrogênio indicando que não houve preferência dos microrganismos pela rota da homoacetogênese que consome 4 moles de H₂ e produz apenas 2 moles de H₂ através da equação 26.



A tabela 20 mostra os valores e os principais metabólitos pelo reator durante toda a operação.

Tabela 20 – Valores dos metabólitos produzidos

Metabólitos	FASES									
	1		2		3		4		5	
	(%)	(Mol)	(%)	(Mol)	(%)	(Mol)	(%)	(Mol)	(%)	(Mol)
Metanol	5,87	0,000919	7,99	0,000926	6,94	0,000925	7,31	0,000944	8,76	0,000889
Etanol	7,30	0,001143	11,24	0,001303	9,42	0,001255	15,53	0,002004	13,69	0,001388
n-butanol	0,00	0	0,00	0	1,24	0,000166	1,33	0,000172	0,00	0
Hac	65,63	0,010282	51,43	0,005963	40,45	0,005387	33,60	0,004337	51,27	0,0052
Hbu	21,21	0,003322	29,34	0,003402	40,16	0,005348	39,68	0,00512	26,28	0,002665
Hca	0,00	0	0,00	0	1,79	0,000238	2,55	0,000328	0,00	0

Fonte: Autor, 2018.

As fases 1 e 5 apresentaram uma maior quantidade de ácido acético 65,63% e 51,27% respectivamente. Foram nestas fases que houve os maiores rendimentos de hidrogênio. Nestas etapas, possivelmente houve favorecimento da rota metabólica do acetato que prevaleceu sobre as rotas do butirato e a etanólica o que beneficiou um alto rendimento de hidrogênio.

5.8 Balanço de carbono

O balanço de carbono, foi realizado em função da DQO medida e da DQO teórica dos metabólitos solúveis medidos, sólidos suspensos voláteis (SSV) e glicose encontrados na operação do reator. A partir das relações estequiométricas foram calculados as DQOs teóricas de cada componente do balanço de DQO. A tabela x apresenta os valores de DQO teórica de cada componente do balanço, DQO medida e a diferença entre as DQOs teórica e a medida.

O balanço demonstrou que a DQO medida foi sempre superior ao valor de DQO teórica com diferenças de 146,22 mg/L, 147,44 mg/L, 188,09, 68,32 mg/L, 174,15 mg/L para as fases 1, 2,3, 4 e 5 respectivamente. Essa diferença, ocorreu provavelmente pelo fato de existir outros metabólitos que não foram quantificados durante este estudo.

Tabela 21 – Balanço de DQO

TDH	Sólidos Suspensos Voláteis (g/L)	Glicose-Ef(g/L)	Metanol (g/L)	Etanol (g/L)	n-Butanol (g/L)	Hac (g/L)	HPr (g/L)	HBu (g/L)	Hca (g/L)	DQOEfiteórica(g/L)	DQOef (g/L)	DQOef-DQOteórica (g/L)	Dif (%)
6	532.77	414.32	44.10	109.74	0.00	658.18	0.00	531.59		2290.735	2436.96	146.22	6.00
4	273.32	518.56	44.46	125.07	0.00	381.68	0.00	544.27		1887.382	2034.83	147.44	7.25
2	367.18	639.00	44.38	120.50	31.77	344.83	0.00	855.80		2464.432	2652.52	188.09	7.09
1	331.17	692.25	45.29	192.42	32.99	277.59	0.00	819.25		2475.093	2543.42	68.32	2.69
0,5	289.43	1088.52	42.65	133.30	0.00	332.87	0.00	426.41		2313.210	2487.36	174.15	7.00

Fonte: Autor, 2018.

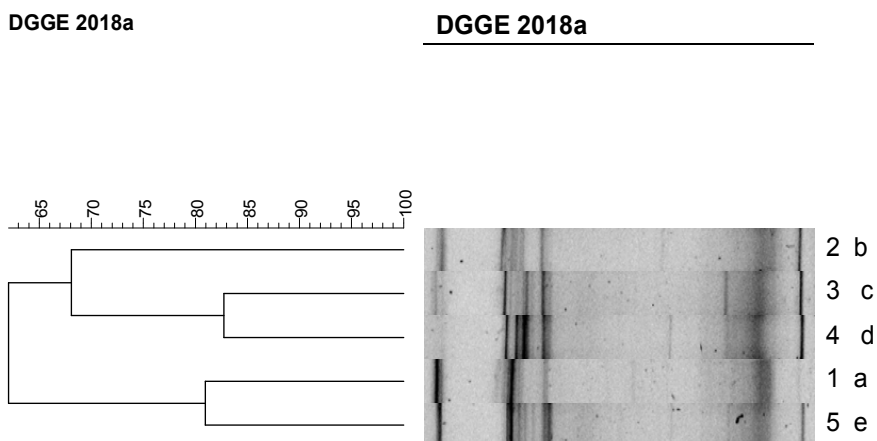
5.9 Análise da dinâmica microbiana

O estudo da comunidade microbiana através da análise de DGGE mostrou a influência da redução do TDH sobre a dinâmica microbiana no reator operado. A baixa correlação da similaridade das fases 2,3 e 4 com as fases 1 e 5 em torno de 63% mostra que a dinâmica da comunidade microbiana se alterou ao longo da operação e depois voltou ao estágio inicial, já que a similaridade entre as fases 1 e 5 foi alta em torno 80%.

A alta similaridade, entre as fases 1 e 5 indica que possivelmente a redução do TDH juntamente com o aumento do pH para 4,95 na fase 5 beneficiou alguns grupos de microrganismos produtores de hidrogênio que estavam presente no início da operação (fase 1), pois, nestas etapas foram obtidos os melhores rendimento de hidrogênio 2,73 mol de H₂ / mol glicose 2,43 H₂ / mol glicoserespectivamente.

A maior similaridade ocorreu entre as fases 3 e 4, em torno de 83%. Nestas etapas houve uma redução no HY e também a produção dos ácido capróico e n-butanol. As maiores produções ácido butírico 0,005348 mol/L e 0,00512mol/L fases 3 e 4 respectivamente indicaram que o aumento da TCO beneficiou a rota do ácido butírico o que fez o HY reduzir, pois, com o aumento do ácido butírico houve redução do ácido acético que produz uma quantidade maior de moles de H₂ a cada mol de glicose consumido.

A similaridade entre as fases 2 com as fases 3 e 4 ficou em torno 68% mostrando uma alteração na comunidade microbiana da fase 2 para as fases 3 e 4, entretanto, percebe-se que o HY manteve-se estável nas fases 2, 3 e 4, é possível, que nas fases 3 e 4 com a redução do TDH tenha ocorrido arraste do microrganismos, fazendo com que os que tem crescimento mais lento desaparecessem do reator assim, alterando a comunidade microbiana entre as fases. Porém, os microrganismos produtores de hidrogênio tem um crescimento mais rápido e por isso se mantiveram no reator o que estabilizou a produção de hidrogênio nestas etapas do experimento.

Figura 16 - Dendrograma da operação do reator

Fonte: Autor, 2018.

As análises de DGGE mostra que apesar da influência do TDH sobre a comunidade microbiana é possível adaptação os microrganismos em diversas condições operacionais (temperatura, carga orgânica pH e TDH), pois, a dinâmica microbiana mostrou comunidades similares em condições operacionais distintas o que fez que o reator tivesse um comportamento próximos entre fases com parâmetros operacionais muito diferentes.

5.10 Discussão sobre as melhores condições operacionais

Nesta seção, será apresentado as melhores resultados da remoção de carboidrato e DQO, rendimento de hidrogênio, produção volumétrica de hidrogênio e conteúdo do biogás. O reator foi operado com uma concentração fixa de 2800 mg carboidrato L-1 e foi variado o TDH de 6 para 0,5 h e com isto ocorreu o aumento da TCO entre as fases operacionais.

O melhor rendimento de hidrogênio 2,72 mol h²/mol glicose, ocorreu na fase 1 quando o TDH foi 6 h e a TCO foi 12,34 kg/m³.d. Nesta etapa do experimento, foi quando também ocorreu a maior quantidade ácido acético no reator indicando que rota acetato foi favorecida em relação às outras rotas metabólicas o que possivelmente beneficiou o rendimento de hidrogênio. Nesta etapa, também ocorreu a melhor redução de carboidrato 81,02±10,3 %, possivelmente baixa TCO beneficiou as condições cinéticas do reator o que possivelmente elevou as taxas de consumo de carboidrato.

A melhor remoção de DQO foi na fase 5 com TDH de 0,5h e um TCO de 163,02 kg/m³.d com 24,48%. Nota-se que nesta fase a eficiência na remoção de carboidrato baixa, o que indica que outras parcelas de matéria orgânica foram removidas nesta etapa do experimento e conseqüentemente melhorou à remoção de DQO nesta etapa do experimento.

Nesta etapa, o reator apresentou os melhores resultados para o PVH e o conteúdo de biogás 1,433Lh²/l reator.d52,39% respectivamente

De um modo geral, o comportamento do reator indicou que os menores TDHs e maiores taxas orgânicas são benéficos para produção de hidrogênio, pois, na fase com TDH 0,5 h ocorreu o maior PVH e o maior conteúdo de H₂, entretanto, o maior rendimento de H₂ ocorreu na fase com maior TDH o que indica que outras condições operacionais além da TCO influenciou nas rotas metabólicas e conseqüentemente em um maior rendimento de hidrogênio mesmo com uma TCO baixa.

Pode-se afirmar que o aumento da TCO foi benéfico para PVH e conteúdo de hidrogênio no biogás e a remoção de DQO e para o rendimento de hidrogênio, já que foi verificado aumento entre as fases 4 e 5. Baixas TCOs mostrou-se favorável para um melhor consumo de carboidrato e HY.

Tabela 22 - Resumo dos melhores parâmetros operacionais

TDH	HY
6	2,72
TDH	PVH
0,5	1,433
TDH	%H ₂
0,5	52,39
TDH	Remoção de carboidrato (%)
6	81,02±10,3 %,
TDH	Remoção DQO (%)
0,5	24,48

Fonte: Autor, 2018.

6 CONCLUSÕES

O estudo demonstrou a viabilidade da utilização do soro de queijo em pó como substrato para produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fluidificados sob diferentes TCOs (12,34 - 163,02 kg/m³.d) e uma temperatura mesofílica.

O inóculo utilizado foi proveniente de um UASB de uma ETE e formou uma comunidade microbiana adequada para produção de hidrogênio, além disso, o tratamento térmico mostrou-se eficiente, pois, não houve produção de metano durante toda operação do reator.

Observou-se que ocorreu uma redução na eficiência de remoção de carboidrato com o aumento da TCO por limitações cinéticas da comunidade microbiana ao consumo de carboidrato.

Concluiu-se que com a redução do TDH ocorreu um aumento da produção volumétrica de hidrogênio que atingiu o maior valor na fase 5 com um TDH = 0,5 h que foi de $1,433 \pm 0,133 \text{ LH}_2 \cdot \text{L Reator}^{-1}$ e o menor foi na fase 1 com um TDH = 6 h e uma produção volumétrica de $0,039 \pm 0,009 \text{ LH}_2 \cdot \text{L Reator}^{-1}$.

O aumento do pH na fase 5 para $5,06 \pm 0,19$ provocou uma alteração na comunidade microbiana e conseqüentemente nas rotas metabólicas e provocou um aumento na produção de ácido acético entre as fases 4 e 5 e conseqüentemente um aumento significativo no rendimento de hidrogênio.

As principais rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos foi a acetogênica e a butírica e por isso os ácidos acético e butírico foram os principais metabólitos produzidos pelo reator. A rota da homoacetogênese, não ocorreu uma vez, que com o crescimento do ácido acético no reator houve um aumento da produção de hidrogênio.

Verificou-se que a TCO influenciou fortemente os metabólitos que foram produzidos no reator, pois, à medida que a TCO aumentou a quantidade de ácido butírico também aumentou no reator e o ácido acético reduziu com a exceção da fase 5 que teve um pH maior que as outras fases o que interferiu nas rotas metabólicas. A presença de metanol, etanol, n-butanol e ácido caproico também foram verificados em menores quantidades.

A ausência de ácido propiônico no reator beneficiou a produção de hidrogênio, pois, a rota do propionato consome dois moles de hidrogênio para cada mol de glicose, assim, reduzindo os valores de HY e PVH.

Em relação a comunidade microbiana foi verificado que as fases 1 e 5 apresentaram uma similaridade de 80% e as fases 3 e 4 de 83%. As fases 1 e 5 teve os maiores rendimentos

de hidrogênio, entretanto, apresentaram PVHs diferentes enquanto a fase 1 teve um baixo PVH a fase 5 apresentou um PVH elevado o que pode ser explicado pela baixa TCO da fase 1 o que fez que a produção volumétrica de hidrogênio da fase 1 fosse muito menor que na fase 5. Já em relação as fases 3 e 4 teve comportamentos similares tanto no rendimento de hidrogênio quanto na produção volumétrica de hidrogênio.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA): AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA): WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 1998.

AMORIM, E. L. C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2009. 192 f. Orientador: :Edson Luiz Silva. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, 166, p. 1248-1263, 2012.

AMORIM, N. C. S. *et al.* Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 603–612, 2014.

ARGUN, H.; KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, 7443-7459, 2011.

AZBAR, N. *et al.* Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. **International Journal of Green Energy**, New York, v. 6, 192-200, 2009.

BARROS, A. R. *et al.* Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, p. 3379-3388, 2010.

BHARATHIRAJA, B. *et al.* Biohydrogen and biogas: an overview on feedstocks and enhancement process. **Fuel**, Amsterdam, v. 185, p. 810–828, 2016.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997.

CHINELLATO, G. *et al.* Biohydrogen production from food waste in batch and semi-continuous conditions: Evaluation of a two-phase approach with digestate recirculation for pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 38, p.4351-4260, 2013.

DAVILA-VAZQUEZ, G. *et al.* Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 33, p. 4989–4997, 2009.

DAVILA-VAZQUEZ, G. *et al.* Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 34, p. 4296–4304, 2009.

DUBOIS, S. M. *et al.* Colorimetric Methods for determination of sugar and related substance. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 228, p.13-21. 1956.

FANG, H. H. P.; YU, H. Q. Acidification of lactose in wastewater. **Journal of Environmental engineering**, New York, v.127, 825-831, 2001.

FERCHICHI, M. *et al.* A Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 120, n. 4, p. 402-409, 2005.

GOIS, G. N. S. B. **Produção de hidrogênio e metano a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de leito fluidizado**. 2017. 90 f. Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, 2017.

INFANTES, D. *etal.* Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, p. 15595–15601, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo agropecuário 2015**. Rio de Janeiro, IBGE, 2017.

KARADAG, D. *et al.* A review on fermentative hydrogen production from dairy industry wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 89, n. 11, p. 1627-1636, 2014.

KIM, D.; KIM, M. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 2021–2027, 2012.

LAMAISON, F. C. *et al.* Pretreatment on anaerobic sludge for enhancement of biohydrogen production from cassava processing wastewater. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 437–444, 2014.

LIMA, D. M. F. *et al.* Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey. **Journal of Environmental Management**, London, v. 169, p. 191-201, 2016.

MACÁRIO, S. C. A. **Influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir do soro de queijo em pó, da lactose isolada e do efluente da indústria de laticínios em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2016. 67 f. Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

MAGANHA, M. F. B. **Guia técnico de produtos lácteos**. São Paulo: CETESB, 2008. (Série P+L).

MAIA, G. B. da S. *et al.* Produção leiteira no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 37, p. 371-398, 2013.

MAINTINGUER, S. I. *et al.* Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, n. 21, p. 13508-13517, 2011.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science & Technology**, London, v. 15, n. 8-9, p. 209-232, 1983.

NASR, N. *et al.* Biohydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, 12761- 12769, 2011.

NOIKE, T. Biological hydrogen production of organic wastes: development of the two-phase hydrogen production process. *In* INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HYDROGEN AND METHANE FERMENTATION OF ORGANIC WASTE, 2002, Tokyo. **Proceedings** [...]. Tokyo: [s.n.], 2002. p. 31-39.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 41, n. 40, p. 17884–17895, 2016.

OTTAVIANO, L. M. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leiteo fluidificado a partir de água residuária de soro de queijo em condição termófila**. 2014. 120 f. Orientador: Edson Luiz Silva. Dissertação de Mestrado- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OTTAVIANO, L. M. *et al.* Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 4848-4860, 2017.

PATEL, A. K. *et al.* Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 98, p. 221-225, 2016.

PERNA, V. *et al.* Hydrogen production in naupflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 38, 54-62, 2013.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, London, v. 110, p. 48-68, 2012.

REIS, C.M. **Avaliação da vinhaça de cana-de-açúcar para produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leiteo fluidizado em condição mesófila**: efeito de co-substrato, TDH e concentração. 2015. 141 f. Orientador: Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

REIS, C.M. **Efeito da velocidade ascensional na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado.** 2010. 97 f. Orientador: Edson Luiz Silva. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)– Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

REN, N. Q. *et al.* Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, p. 2807-2813, 2010.

ROSA, P. R. F. **Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação acidogênica de resíduos agroindustriais em reator anaeróbico de leito fluidificado.** 2014. 165 f. Orientador: Edson Luiz Silva. Tese (Doutorado em Engenharia Química)– Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

ROSA P. R. F. *et al.* Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. **Bioresource Technology**, Barking, v. 161, p. 10–19, 2014.

SÁ, L.R.V. **Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato.** 2011. 131 f. Orientadoras: Magali Christie Cammarota e Viridiana Santana Ferreira-Leitão. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbico de leito fluidificado.** 2008. 105 f. Orientador: Edson Luiz Silva. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SHIDA, G. M. *et al.* Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 37, n. 22, p. 16925-16934, 2012.

SHOW, K. Y. *et al.* Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 37, p. 15616-15631, 2012.

SILVA, A. N. **Produção de hidrogênio a partir de efluentes de laticínios.** 2019. 94 f. Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

SILVA-ILLANES F. *et al.* Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol, **Energy**, Amsterdam, v. 141, p.358-367, 2017.

TORRES FILHO A. *et al.* **Guia técnico ambiental da indústria de laticínio.** Belo Horizonte: FIEMG: FEAM, 2014.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 799-811, 2009.

YOUN, J.; SHIN, H. Comparative performance between temperature-phased and conventional mesophilic two-phased processes in terms of anaerobically produced bioenergy from food waste. **Waste Management and Research**, London, v. 23, n. 1, p. 32-38, 2005.