

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**AVALIAÇÃO DE REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS
COM BIOMASSA IMOBILIZADA (AnSBBR) VISANDO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO
A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA**

CRISTIANE LURDES ANDREANI

Cascavel, fevereiro de 2017.

CRISTIANE LURDES ANDREANI

**AVALIAÇÃO DE REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS
COM BIOMASSA IMOBILIZADA (AnSBBR) VISANDO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO
A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola como cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, na Área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientação: Profa. Doutora Simone Damasceno Gomes

Coorientação: Prof. Doutor José Alberto Domingues Rodrigues

Cascavel, Paraná, Brasil

Fevereiro de 2017

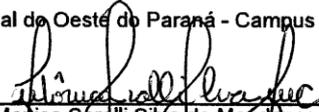
CRISTIANE LURDES ANDREANI

Avaliação de Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais com Biomassa Imobilizada (AnSBBR) Visando à Produção de Hidrogênio a partir de Água Residuária de Fecularia de Mandioca

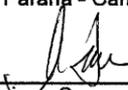
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Simone Damasceno Gomes

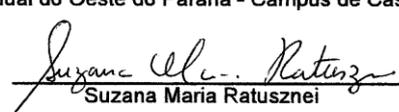
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Moníca Sardili Silva de Mendonça Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Suzana Maria Ratusznei

Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia (CEUN-IMT)


Roberta Albanez

Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia (CEUN-IMT)

Cascavel, 16 de fevereiro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A574a

Andreani, Cristiane Lurdes

Avaliação de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) visando à produção de hidrogênio a partir de água residuária de fecularia de mandioca. / Cristiane Lurdes Andreani. Cascavel, 2017.

106 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Damasceno Gomes

Coorientador: Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017.

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola

1. Águas residuais – Aspectos ambientais. I. Gomes, Simone Damasceno. II. Rodrigues, José Alberto Domingues. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed.628
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborado por Helena Soterio Bejio – CBR 9^a/965

Revisada por Ana Maria Martins Alves Vasconcellos em 31.05.2017

BIOGRAFIA

Cristiane Lurdes Andreani, filha de Izidoro e Lurdes Andreani, nasceu em Corbélia - PR, em maio de 1981. Em 2002, iniciou o Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura) na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, sendo diplomada em março de 2006.

Em 2009, iniciou o curso de especialização *lato sensu* em Educação e Gestão Ambiental pelo Instituto de Estudos Avançados e Pós-graduação, e o concluiu no mesmo ano.

Em 2011, ingressou no curso de mestrado *stricto sensu* do Programa de Pós-graduação de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e o concluiu em dezembro de 2012.

No ano de 2013, ingressou no curso de doutorado *stricto sensu* do Programa de Pós-graduação de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e o concluiu em fevereiro de 2017.

*“A boa madeira não cresce com facilidade,
quanto mais fortes os ventos,
mais fortes as árvores.”*

J. Willard Marriott

A Izidoro e Lurdes Andreani, meus amados pais,

dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, “Tudo posso Naquele que me fortalece” Fl.4,13.

Aos meus pais pelo amor, educação, incentivo e apoio incondicional.

À minha irmãzinha Carmem, mesmo longe, comigo em todos os momentos.

À minhas queridas primas Karin e Kamile, por me acolherem com tanto carinho.

À Flávia e Elisângela, minhas amigas de toda vida!

Aos meus grandes amigos do Pgeagri: Bruna, Carla, Davi e Rafaela, a vida fica mais fácil com vocês por perto! Quero vocês por perto sempre!

Aos incansáveis guerreiros e amigos do laboratório de reatores biológicos Ângelo, Tamiris, Luana, Zezão, Lucas, Aline e Ana Paula. Com vocês, o caminho foi mais leve e divertido! Obrigada pela dedicação e amizade! Parceria né Angelão!

Ao técnico e amigo, Euro Kava Kailer, pela disposição em solucionar todo e qualquer problema (e não foram poucos!). E você não mediu esforços para dar andamento ao projeto e ainda aguentar os chiliques!

Aos técnicos e amigos, Edison B. Cunha e Cris Paloschi, pela ajuda, dedicação e muita paciência.

À minha orientadora, Profa. Dra. Simone D. Gomes, pela confiança, dedicação e amizade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues, pela atenção, disponibilidade e gentileza em me receber no laboratório de biotecnologia do IMT.

À Profa. Dra. Sílvia R. M. Coelho, pelo carinho e amizade e pelas incansáveis (e intermináveis) orientações nas análises cromatográficas.

À equipe dedicada e aos amigos do SENAI: Douglas, Enerdam, Murilo, Tonello e Fábio, sempre acessíveis e dispostos a nos ajudar.

Ao Senhor, Dal Pizol, da Centur Usinagem, pela sua disponibilidade em todos os momentos.

Às fecularias Fino Amidos, Subida e Cassava, por possibilitarem a coleta da água residuária.

À Equipe do Pgeagri, Vera e Jefferson.

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

Ao Sistema Meteorológico do Paraná.

E a todos aqueles contribuíram para a realização desse projeto.

AVALIAÇÃO DE REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA (AnSBBR) VISANDO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA

RESUMO

Reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) têm sido utilizados com sucesso no tratamento de águas residuárias. Atualmente, essa configuração vem sendo utilizada para produção biológica de hidrogênio a partir de substratos sintéticos e complexos com bons resultados em termos de estabilidade e produtividade. Tendo em vista os bons desempenhos alcançados por tal configuração, foi realizada a avaliação de um reator AnSBBR, com capacidade total de 6,0 L e volume útil de 4,3 L (2,3 L volume residual e 2,0 L volume tratado por ciclo), destinado à produção de hidrogênio, cujo substrato foi água residuária de fecularia de mandioca. Foram avaliadas oito condições experimentais, nas quais foram aplicadas quatro cargas orgânicas volumétricas (5,0; 12,0; 14,0 e 18 gCarb.L⁻¹.d⁻¹), calculadas em função da concentração afluyente (2000; 3200; 4200; 4700 e 5000 mgCarb.L⁻¹) e do tempo de ciclo (4, 3 e 2 h). A alimentação do sistema foi realizada pela variação do tempo de enchimento do reator. Dessa forma, foram conduzidos ensaios em: i) batelada, em que a alimentação ocorre em 20 minutos; e ii) batelada alimentada, na qual, a alimentação ocorre durante 50% do tempo total de ciclo. Na inoculação do reator, foram utilizadas culturas mistas provenientes da água residuária autofermentada e do lodo anaeróbio termicamente tratado. Foram obtidas as maiores produtividade molar de 36 molH₂.m⁻³.d⁻¹, produção volumétrica de 2,2 LH₂. L⁻¹.d⁻¹ (carga orgânica volumétrica aplicada de 14 g.L⁻¹.d⁻¹) e rendimento molar de 4,9 molH₂.kg⁻¹Carb (carga orgânica volumétrica aplicada de 12 g.L⁻¹.d⁻¹) nos ensaios com os maiores tempos de ciclo (4 h) e inoculados com lodo anaeróbio e água residuária autofermentada. As presenças de ácido láctico e da bacteriocina nisina foram verificadas em todos os ensaios, logo, há indícios da existência de bactérias lácticas. Assim, é possível se justificar a total ausência de hidrogênio, verificada em dois dos ensaios, ambos inoculados com água residuária autofermentada.

Palavras-chave: biohidrogênio; resíduos agroindustriais, processos fermentativos; estratégia de alimentação.

EVALUATION OF AN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH BIOFILM REACTOR (AnSBBR) ON BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM CASSAVA PROCESSING WASTEWATER

ABSTRACT

Anaerobic sequencing batch biofilm reactors (AnSBBR) have been used successfully in wastewater treatment. Currently, this setting has been used for biological production of hydrogen from synthetic and complex substrates with reasonable results in stability and productivity. Considering the good performance achieved by such configuration, an AnSBBR reactor with a 6.0-L total capacity and a 4.3-L useful volume (2.3-L residual volume and 2.0-L treated volume by cycle) was evaluated, since its goal was hydrogen production, whose substrate was cassava wastewater. Eight experimental conditions were evaluated, in which four volumetric organic loads were applied (5.0; 12.0; 14 and 18 gCarb.L⁻¹ d⁻¹) calculated according to influent concentration (2,000; 3,200; 4,200; 4,700 and 5,000 mgCarb.L⁻¹) and cycle time (4; 3 and 2 h). The AnSBBR feeding of the system was carried out by varying the reactor filling time. Thus, assays were carried out in: i) batch, in which the reactor filling occurs in 20 minutes; and ii) fed- batch, in which the reactor filling occurs during 50% of the total cycle time. Reactor inoculation was carried out with mixed cultures from autofermentation of cassava wastewater and anaerobic sludge that was thermally treated. The highest molar productivities were 36 molH₂.m⁻³.d⁻¹, while volumetric productivity was 2.2 LH₂.L⁻¹.d⁻¹ (applied volumetric organic load of 14 g.L⁻¹.d⁻¹) and molar yield was 4.9 molH₂.kg⁻¹Carb (applied volumetric organic load of 12 g.L⁻¹.d⁻¹) in assays with the highest cycle times (4 h), inoculated with anaerobic sludge and autofermented cassava wastewater. Lactic acid and bacteriocin nisin were recorded in all the studied assays, consequently, it is evident the presence of lactic bacteria. Therefore, the total hydrogen absence can be explained in both assays, inoculated with autofermented cassava wastewater.

Keywords: biohydrogen; agroindustry residues; fermentation; feeding strategy.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
2.1 Objetivo geral.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 Panorama energético mundial.....	04
3.2 Hidrogênio como carreador energético.....	05
3.3 Digestão anaeróbia.....	06
3.4 Produção biológica de hidrogênio.....	07
3.4.1 Processos fermentativos.....	07
3.5 Reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais (ASBR)	10
3.5.1 Reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR)	10
3.6 Fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio e o desempenho do reator AnSBBR.....	11
3.6.1 Imobilização da biomassa.....	11
3.6.2 Mistura.....	12
3.6.3 Tempo de detenção hidráulica.....	13
3.6.4 Concentração do substrato.....	14
3.6.5 Estratégia de alimentação.....	14
3.6.6 pH.....	15
3.6.7 Temperatura.....	16
3.6.8 Tratamento do inóculo.....	18
3.7 Água residuária de fecularia de mandioca.....	19
3.7.1 Produtos intermediários associados ao metabolismo das bactérias láticas.....	20
3.8 Considerações finais.....	21

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Local de realização do experimento.....	22
4.2 Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada.....	22
4.3 Material suporte e inóculo.....	24
4.4 Água residuária de fecularia de mandioca.....	25
4.5 Condições experimentais.....	27
4.6 Quantificação da biomassa.....	29
4.7 Métodos analíticos.....	30
4.8 Fundamentos teóricos.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Ensaio inoculado com água residuária de fecularia autofermentada.....	37
5.1.1 Avaliação da estabilidade operacional do reator.....	37
5.1.2 Eficiência de remoção de matéria orgânica.....	43
5.1.3 Avaliação da produção de hidrogênio.....	45
5.2 Ensaio inoculado com lodo anaeróbio submetido a pré-tratamento térmico.....	50
5.2.1 Avaliação da estabilidade operacional do reator.....	50
5.2.2 Eficiência de remoção de matéria orgânica.....	59
5.2.3 Avaliação da produção de hidrogênio.....	61
6 CONCLUSÕES.....	70
7 CONSIDERAÇÃO FINAIS.....	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do reator AnSBBR. 1. Reator em acrílico; 2. Cesto para imobilização da biomassa; 3. Sistema de agitação; 4. Entrada do afluente; 5. Bomba de alimentação; 6. Saída do efluente; 7. Bomba de descarga; 8. Saída de gás; 9. Frasco Mariotte; 10. Temporizadores; 11. Câmara climatizada.	22
Figura 2 Imagens do reator AnSBBR a) Reator e sistema de agitação; b) Cesto para imobilização da biomassa; c) Material suporte (polietileno de baixa densidade) e biomassa.	23
Figura 3 A) Polietileno de baixa densidade (PEBD); B) Autofermentação da água residuária de fecularia de mandioca; C) Lodo anaeróbio em peças de bambu, utilizadas como meio suporte em reator anaeróbio piloto.	25
Figura 4 Fluxograma industrial simplificado das etapas de extração e purificação da fécula.	26
Figura 5 a) Calha de recirculação; b) Homogeneização do efluente coletado; c) Envase da água residuária para congelamento.	27
Figura 6 Valores de pH afluente e efluente nos ensaios E1, E2 e E3.	39
Figura 7 Valores de acidez volátil total no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.	40
Figura 8 Proporção de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.	41
Figura 9 Concentração de sólidos voláteis totais no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.	42
Figura 10 Concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.	43
Figura 11 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO nos ensaios E1, E2 e E3.	44
Figura 12 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de carboidratos nos ensaios E1, E2 e E3.	45
Figura 13 Vazão molar de hidrogênio nos ensaios E1, E2 e E3.	47
Figura 14 Rendimento molar de hidrogênio por cargas aplicada e removida, em termos de DQO e carboidratos nos ensaios E1, E2 e E3.	48
Figura 15 Variação da produção volumétrica de hidrogênio nos ensaios E1, E2 e E3.	49
Figura 16 Variação da produção volumétrica do biogás nos ensaios E1, E2 e E3.	49
Figura 17 Composição do biogás nos ensaios E1, E2 e E3.	50
Figura 18 Valores de pH afluente e efluente nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.	53
Figura 19 Valores de acidez volátil total nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.	54
Figura 20 Proporção de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.	55

Figura 21 Concentração de sólidos voláteis totais no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	57
Figura 22 Concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	58
Figura 23 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	59
Figura 24 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de carboidratos nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	60
Figura 25 Vazão molar de hidrogênio nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	62
Figura 26 Rendimento molar de hidrogênio por cargas aplicada e removida, em termos de DQO e carboidratos nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	64
Figura 27 Variação da produção volumétrica de hidrogênio nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	65
Figura 28 Variação da produção volumétrica de biogás nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	66
Figura 29 Composição do biogás nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resumo das condições experimentais dos ensaios inoculados com inóculo obtido por autofermentação.....	28
Tabela 2 Resumo das condições experimentais dos ensaios inoculados com lodo anaeróbio	28
Tabela 3 Parâmetros de monitoramento do reator AnSBBR.....	29
Tabela 4 Caracterização físico-química da água residuária de fecularia de mandioca.....	36
Tabela 5 Metabólitos solúveis quantificados na água residuária de fecularia de mandioca.....	37
Tabela 6 Indicadores de estabilidade operacional e de eficiência de remoção de matéria orgânica nos ensaios E1, E2 e E3.....	38
Tabela 7 Resumo dos indicadores de desempenho nos ensaios E1, E2 e E3.....	46
Tabela 8 Indicadores de estabilidade operacional e eficiência de remoção da matéria orgânica nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	51
Tabela 9 Resumo dos indicadores de desempenho nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.....	61
Tabela 10 Desempenho de diferentes configurações de reatores anaeróbios destinados a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias do processamento de mandioca.....	68
Tabela 11 Desempenho de reatores AnSBBR destinados à produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos.....	69

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AnSBBR	Reator Anaeróbio Operado em Batelada Sequencial com Biomassa Imobilizada em Suporte Inerte
ASBR	Reator Anaeróbio Operado em Batelada Sequencial
UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo
IEA	International Energy Agency
H₂	Hidrogênio
CO_x	Óxidos de carbono
NO_x	Óxidos de nitrogênio
SO_x	Óxidos de enxofre
CO₂	Dióxido de carbono
CH₄	Metano
CFC	Clorofluorcarbonetos
H₂S	Ácido sulfídrico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
NaCl	Cloreto de sódio
OD	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão (0 °C e 1 ATM)
Pa	Pascal (1Pa = 9,87.10 ⁻⁶ atm)
Acetil CoA	Acetil coenzima A
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PFL	Piruvato formato liase
PFOR	Piruvato ferredoxina oxidoreductase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

AB	Alcalinidade a bicarbonato ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)
AI	Alcalinidade intermediária ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)
AP	Alcalinidade parcial ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)
AT	Alcalinidade total ($\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)
AVT	Ácidos voláteis totais ($\text{mgHAC}\cdot\text{L}^{-1}$)
ST	Sólidos totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
SVT	Sólidos voláteis totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
SST	Sólidos suspensos totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
SSV	Sólidos suspensos voláteis ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
TDH	Tempo de detenção hidráulica (h)
AR	Ar de make-up ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
TCD	Detector de condutividade térmica
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μm	Micrometro
m^3	Metro cúbico
MJ	Mega Joule
m/v	Relação entre massa e volume
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
$M_{\text{T-SI+B}}$	Massa de suporte inerte e biomassa no reator (g)
$M_{\text{A-SI+B}}$	Massa de amostra de suporte inerte e biomassa do reator (g)
$M_{\text{A-ST}}$	Massa de sólidos totais (ST) da amostra de biomassa (g)

M_{A-SVT}	Massa de sólidos voláteis totais (SVT) da amostra de biomassa (g)
M_{SVT}	Massa de sólidos voláteis totais (SVT) no interior do reator (g)
C_X	Massa de sólidos voláteis totais (SVT) por volume de meio líquido (g.L ⁻¹)
C_{X'}	Massa de sólidos voláteis totais (SVT) por massa de material suporte (g.g ⁻¹)
P_r	Pressão atmosférica (mmHg)
V_r	Volume de gás nas condições do ensaio (mL)
T_r	Temperatura de operação (°C)
P_{CNTP}	Pressão atmosférica nas CNTP (760 mmHg)
V_{CNTP}	Volume de gás nas CNTP (mL)
T_{CNTP}	Temperatura nas CNTP (273 k – 0 °C)
n	Número de mols
R	Constante universal dos gases ideais (0,082 atm.L/mol.K)
T	Temperatura absoluta (K)
V_A	Volume de água residuária alimentada por ciclo (L)
V_R	Volume de meio líquido total no reator(L)
V_{RES}	Volume de meio líquido residual no reator após etapa de descarga (L)
V_U	Volume útil do reator (L)
F_{AFL}	Vazão de alimentação do período em batelada alimentada (L.h ⁻¹)
t_i	Tempo de alimentação percorrido (período em batelada alimentada, em h)
t_{BA}	Tempo de batelada alimentada (h)
N	Número de ciclos por dia (ciclos.d ⁻¹)
C_{SAFL}	Concentração de matéria orgânica não filtrada no afluente na forma de DQO (mgDQO.L ⁻¹)
C_{CAFL}	Concentração de matéria orgânica não filtrada no afluente na forma de carboidratos (mgCarb.L ⁻¹)

C_{ST}	Concentração de matéria orgânica não filtrada na forma de DQO (mgDQO.L ⁻¹)
C_{SF}	Concentração de matéria orgânica filtrada na forma de DQO (mgDQO.L ⁻¹)
C_{CT}	Concentração de matéria orgânica não filtrada na forma de carboidratos (mgCarb.L ⁻¹)
C_{CF}	Concentração de matéria orgânica filtrada na forma de carboidratos (mgCarb.L ⁻¹)
ε_{ST}	Eficiência de remoção de matéria orgânica não filtrada na forma de DQO (%)
ε_{SF}	Eficiência de remoção de matéria orgânica filtrada na forma de DQO (%)
ε_{CT}	Eficiência de remoção de matéria orgânica não filtrada na forma de carboidratos (%)
ε_{CF}	Eficiência de remoção de matéria orgânica filtrada na forma de carboidratos (%)
COVA_s	Carga orgânica volumétrica aplicada em termos de matéria orgânica na forma de DQO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
COVA_c	Carga orgânica volumétrica aplicada em termos de matéria orgânica na forma de carboidratos (gCarb.L ⁻¹ .d ⁻¹)
COEA_s	Carga orgânica específica aplicada em termos de matéria orgânica na forma de DQO (gDQO.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)
COEA_c	Carga orgânica específica aplicada em termos de matéria orgânica na forma de carboidratos (gCarb.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)
COVR_s	Carga orgânica volumétrica removida em termos de matéria orgânica na forma de DQO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
COVR_c	Carga orgânica volumétrica removida em termos de matéria orgânica na forma de carboidratos (gCarb.L ⁻¹ .d ⁻¹)
COER_s	Carga orgânica específica removida em termos de matéria orgânica na forma de DQO (gDQO.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)
COER_c	Carga orgânica específica removida em termos de matéria orgânica na forma de carboidratos (gCarb.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)

n_{H_2}	Vazão molar de hidrogênio diária ($\text{molH}_2 \cdot \text{d}^{-1}$)
PrM	Produtividade molar de hidrogênio volumétrica ($\text{molH}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)
PrME	Produtividade molar de hidrogênio específica ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{SVT} \cdot \text{d}^{-1}$)
RMCA_{S,m}	Rendimento entre hidrogênio produzido e matéria orgânica aplicada na forma de DQO ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{DQO}$)
RMCA_{C,m}	Rendimento entre hidrogênio produzido e matéria orgânica aplicada na forma de carboidratos ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Carb}$)
RMCA_{C,n}	Rendimento entre hidrogênio produzido e matéria orgânica aplicada na forma de carboidratos ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Carb}$)
RMCR_{S,m}	Rendimento entre hidrogênio produzido e matéria orgânica removida na forma de DQO ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{DQO}$)
RMCR_{C,m}	Rendimento entre hidrogênio produzido e matéria orgânica removida na forma de carboidratos ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Carb}$)
RMCR_{C,n}	Rendimento entre hidrogênio produzido e matéria orgânica removida na forma de carboidratos ($\text{molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Carb}$)
C_G	Concentração dos componentes do biogás da amostra retirada do “ <i>head-space</i> ” do reator (H_2 , CH_4 ou CO_2) ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
V_G	Volume de biogás total produzido por ciclo, nas CNTP ($\text{mL} \cdot \text{ciclo}^{-1}$)
V_{H_2}	Volume de hidrogênio produzido por ciclo, nas CNTP ($\text{mL} \cdot \text{ciclo}^{-1}$)
N_G	Vazão molar dos componentes do biogás produzidos durante o ciclo (H_2 , CH_4 ou CO_2) (mmol)

1 INTRODUÇÃO

A produção de biohidrogênio por processos fermentativos é amplamente abordada pela literatura em diferentes configurações, dentre elas estão os reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais (ASBR). Devido à necessidade de otimização dos sistemas já estabelecidos, o reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) surgiu como alternativa aos tradicionais ASBR, dessa forma, foram alcançados maiores desempenhos operacionais e custos de implantação reduzidos. A configuração, caracterizada pela imobilização da biomassa em suporte inerte, permite a manutenção da concentração celular, mesmo em condições operacionais adversas e tempos de detenção hidráulica reduzidos. A flexibilidade do reator AnSBBR permite ajustar as condições operacionais em função das características do substrato. Trata-se, portanto, de um sistema simples e robusto, ideal para o tratamento de águas residuárias agroindustriais. O reator AnSBBR tem sido aplicado no tratamento de águas residuárias com finalidades diversas, tais como remoção de matéria orgânica, remoção de compostos nitrogenados e sulfurosos. Recentemente, a configuração tem mostrado bons resultados em termos de rendimento, produtividade e estabilidade, sendo empregada na produção de metano e de hidrogênio a partir de águas residuárias sintéticas e de substratos complexos.

Nas últimas décadas, esforços consideráveis têm sido direcionados na busca por fontes energéticas eficientes, disponíveis e renováveis como alternativa aos combustíveis fósseis. A utilização de resíduos orgânicos para a produção biológica de hidrogênio é uma abordagem bastante promissora, uma vez que o tratamento das águas residuárias e a geração de energia limpa podem ocorrer simultaneamente e com baixos requerimentos energéticos. A possibilidade de utilizar resíduos orgânicos como substratos para produção de hidrogênio torna o processo biológico bastante atrativo, pois as fontes de carbono e nitrogênio podem responder por até 40% dos custos de produção dos biocombustíveis. Como os carboidratos são a principal fonte de carbono dos micro-organismos produtores de hidrogênio, a água residuária de fecularia é um substrato promissor para sua produção devido ao elevado teor de açúcares facilmente degradáveis.

O processamento das raízes de mandioca para extração de fécula é uma atividade expressiva no estado do Paraná. Segundo dados do CEPEA, somente no ano de 2015, foram produzidas 520 mil toneladas do produto, o equivalente a 69% da produção brasileira. Como o processo produtivo envolve a utilização de grandes volumes de água, o potencial de geração de resíduos da indústria feculeira pode alcançar de 5 a 7 m³.t⁻¹raiz processada. Além da fração orgânica, a água residuária pode incluir compostos de elevada toxicidade, como a linamarina, responsável por bloquear a cadeia respiratória de organismos aeróbios. Normalmente, os resíduos de fecularia são tratados em lagoas anaeróbias, o que implica na

liberação de gases de efeito estufa na atmosfera e amplos requisitos de área. Dessa forma, a presente pesquisa pretende contribuir com informações que sejam úteis ao setor, que é grande consumidor de recursos naturais e ainda carece de informações sobre o aproveitamento de seus resíduos na geração de energia. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de um reator AnSBBR na produção de biohidrogênio a partir da água residuária de fecularia de mandioca. Assim, foram avaliadas as influências do tempo de ciclo (4, 3 e 2 h), da concentração afluente (2000, 3200, 4200, 4700 e 5000 mgCarb.L⁻¹) e da carga orgânica volumétrica aplicada (5, 12, 14 e 18 g.L⁻¹.d⁻¹) para se determinar o melhor desempenho operacional em termos de rendimento e produtividade de hidrogênio. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da fonte de inóculo (lodo anaeróbico e água residuária autofermentada) e da estratégia de enchimento do reator (batelada e batelada alimentada).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) para a produção de hidrogênio a partir de água residuária de fecularia.

2.2 Objetivos específicos

O desempenho do reator AnSBBR foi avaliado quanto aos parâmetros estabilidade operacional, taxa de conversão de matéria orgânica, rendimento de hidrogênio e produtividade de hidrogênio a partir da variação das condições experimentais quanto:

- à estratégia de alimentação, conduzida em batelada e batelada alimentada;
- à carga orgânica volumétrica aplicada (5,0; 12,0; 14; e 18,0 gCarb.L⁻¹.d⁻¹);
- à concentração afluente (2000, 3200, 4200, 4700 e 5000 mgCarb.L⁻¹);
- ao tempo de ciclo (4; 3 e 2 horas);
- à utilização de lodo anaeróbio termicamente tratado e de água residuária autofermentada como fontes de inóculo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Panorama energético mundial

Desde o alvorecer da revolução industrial, os combustíveis fósseis tem sido a força propulsora da industrialização e do crescimento econômico e permanecem como espinha dorsal dos sistemas energéticos mundiais (HÖÖK e TANG, 2013). A *International Energy Agency* estima que 80% da energia primária mundial seja de origem fóssil, seguida pelos combustíveis derivados de biomassa e resíduos (10,2%), energia nuclear (5,8%) e de hidroelétricas (2,3%). Somente 0,8% da energia primária mundial é derivada de fontes alternativas como geotérmica, eólica e solar (IEA, 2011).

Durante o século XX e início do século XXI, o consumo mundial de energia teve um aumento constante devido ao crescimento da população e elevação dos padrões de consumo (ACAR E DINCER, 2014). Cerca de 70% de toda emissão antropogênica deriva do setor energético, com grande contribuição de CO₂ resultante da queima de combustíveis fósseis. Em 2008, aproximadamente 30 bilhões de toneladas de CO₂ foram liberadas na atmosfera, o dobro desde 1970 (HÖÖK e TANG, 2013).

No final do ano de 2012, as reservas mundiais totalizavam 187,3 trilhões de m³ de gás natural e 265,3 bilhões de m³ de petróleo. Com base no consumo atual, essas reservas são capazes de suportar a demanda energética por mais 56 e 51 anos, respectivamente. Prevê-se, que, com a redução das reservas, a ocorrência de uma crise energética seja inevitável (LIEW et al., 2014).

De acordo com a *International Energy Agency*, as mudanças climáticas são resultado da elevação na emissão de gases do efeito estufa, resultantes principalmente da produção e utilização de combustíveis fósseis (IEA, 2011). Constituídos principalmente por carbono e hidrogênio, os combustíveis de origem fóssil podem conter enxofre, chumbo e álcoois. Assim, gases como CO_x, SO_x, NO_x e CH podem ser gerados. Além disso fuligem, cinza, alcatrão e outros compostos podem ser convertidos em poluentes secundários como ozônio, aerossóis, nitrato de peroxiacetila e ácidos. Produtos remanescentes da combustão como CO₂, CH₄, óxidos de nitrogênio e CFC retêm o calor na atmosfera e elevam a temperatura global. O aumento da temperatura tem sido apontado como principal responsável pelo derretimento das calotas polares e aumento do nível dos mares e pelas mudanças climáticas (VEZIROGLU e SAHIM, 2008).

A bioenergia foi a principal fonte de energia e calor antes da revolução industrial. No cenário atual, o principal impulso para o seu desenvolvimento tem sido a busca por alternativas para a substituição dos combustíveis fósseis, particularmente, os utilizados no

transporte (POPP et al., 2014). Espera-se que a redução nas emissões tenha potencial para mitigar os efeitos da mudança climática, logo, é clara a necessidade de que se desenvolvam tecnologias limpas e renováveis (NOYAM, 2011).

3.2 Hidrogênio como carreador energético

O hidrogênio é leve, simples e o mais abundante de todos os elementos químicos do universo. Naturalmente, ele está combinado às moléculas de oxigênio, carbono e nitrogênio. Não é uma fonte primária de energia, mas torna-se um transportador atrativo quando separado desses elementos e pode ser convertido em calor ou eletricidade através de combustão ou reações eletroquímicas, além de ser flexível e eficiente (ACAR; DINCER, 2014; PUDUKUDY et al., 2014). Entre as vantagens, podem-se citar o excepcional potencial energético por conteúdo de massa de 143 MJ Kg^{-1} ; possibilidades de transporte e armazenagem; segurança e emissão de poluentes reduzida (MAZLOOMI e GOMES, 2012), uma vez que, a combustão gera água como único subproduto (ACAR e DINCER, 2014).

A primeira vez na história em que o hidrogênio foi utilizado como fonte de energia data do período entre 1920–1930, quando os alemães o utilizavam como combustível auxiliar nos Zepelins. Nas décadas seguintes, a Inglaterra e a Alemanha já o empregaram no setor de transporte e armamento (RIFKIN, 2003). A crise do petróleo, em 1973, motivou a busca por combustíveis alternativos, e nesse contexto, o hidrogênio surgiu como possível e promissor substituto (SACRAMENTO et al., 2013).

O uso do hidrogênio não se limita ao setor energético e é o gás amplamente utilizado na produção de metanol, amônia e nas refinarias de petróleo (BICÁKOVÁ e STRAKA, 2012). A produção anual de hidrogênio é de cerca de 50 milhões de toneladas, com crescimento estimado de 10% ao ano (HU et al., 2013). Em larga escala, 95% da produção é obtida a partir da reforma do metano (ABBAS e DAUD, 2010) e a porção remanescente é proveniente da eletrólise da água, com energia de origem fóssil empregada no processo (PUDUKUDY et al., 2014).

A alteração na estrutura básica do sistema energético pode levar décadas até que uma economia baseada no hidrogênio seja plenamente estabelecida. Dessa forma, mudanças estruturais e tendências de longo prazo são essenciais para se ter sucesso na implementação daquele (PUDUKUDY et al., 2014).

3.3 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é uma técnica forte e bem estabelecida para produção de energias renováveis. Quando aplicada ao gerenciamento de resíduos orgânicos, além de gerar energia, há o benefício de tratá-los. A técnica torna-se ainda mais atraente, uma vez que tem demonstrado capacidade de produzir hidrogênio (CHINELLATO et al., 2013).

Comparado aos métodos aeróbios convencionais, o tratamento anaeróbio oferece benefícios, uma vez que os reatores são tecnicamente simples, relativamente baratos e demandam baixo custo energético. O sistema proporciona a aplicação de cargas orgânicas elevadas e possibilita a recuperação do biogás como fonte de energia (LETTINGA et al., 1981).

A digestão anaeróbia envolve processos complexos e ocorre em etapas que dependem da atividade de três grupos de micro-organismos: as bactérias fermentativas (ou acidogênicas), as bactérias sintróficas (ou acetogênicas) e as arqueias metanogênicas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). Primeiramente, a matéria orgânica complexa é convertida em compostos mais simples por um grupo de bactérias anaeróbias ou facultativas (acidogênicas). O produto final dessa fase são açúcares livres, álcoois, ácidos voláteis, hidrogênio e dióxido de carbono. A fase intermediária do processo é caracterizada pela conversão de álcoois e ácidos graxos voláteis em acetato pelas bactérias acetogênicas. Durante a última etapa, um grupo especial de bactérias anaeróbias estritas (arqueias metanogênicas) gera metano a partir do acetato e do hidrogênio produzidos na fase anterior, promovendo a estabilização da matéria orgânica (MCCARTY, 1964; SPEECE, 1983).

O processo é interrompido durante a acidogênese para que o hidrogênio gerado durante a fase acidogênica não seja consumido nas etapas posteriores da digestão anaeróbia. Essa intervenção é possível devido às diferenças fisiológicas entre os micro-organismos produtores e os consumidores de hidrogênio. A partir de técnicas de tratamento, o inóculo é submetido a uma condição ambiental extrema, que estimula a formação de esporos de resistência por bactérias do gênero *Clostridium*, principais produtores de hidrogênio. Em contrapartida, os micro-organismos que consomem hidrogênio como as arqueias metanogênicas, bactérias homoacetogênicas e redutoras de sulfato (SHOW et al., 2012) são sensíveis às mudanças ambientais, e conseqüentemente são eliminadas.

3.4 Produção Biológica de Hidrogênio

Na última década, os processos biológicos têm demonstrado potencial para gerar biohidrogênio a partir de resíduos, ao aliar a geração de energia, estabilização da matéria orgânica e redução de custos com o tratamento (PERERA et al., 2012; SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011).

Processos biológicos, ao contrário da eletrólise e de processos termoquímicos, são catalisados por micro-organismos em meio aquoso em temperatura e pressão ambiente e, portanto, há menor gasto energético (BICÁKOVÁ e STRAKA, 2012). A fermentação e a fotofermentação são consideradas os processos mais viáveis para produção de biohidrogênio e com maiores benefícios ambientais porque promovem tratamento de resíduos e produção de hidrogênio simultaneamente. A fermentação é mais rápida que a fotofermentação e apresenta algumas vantagens como altas taxas de produção e a utilização de resíduos orgânicos e águas residuárias ricas em carboidratos como substrato (HU et al., 2013).

Apesar das tecnologias recentemente desenvolvidas e da gama de recursos renováveis disponíveis, ainda há necessidade de pesquisas aprofundadas para que os processos biológicos atinjam a escala comercial (BICÁKOVÁ e STRAKA, 2012).

3.4.1 Processos fermentativos

A fermentação é um processo de conversão de substratos orgânicos em condições anaeróbias e na ausência de luz para produzir uma mistura de gases contendo primariamente H_2 e dióxido de carbono (CO_2), mas que pode conter também pequenas quantidades de metano (CH_4) e gás sulfídrico (H_2S) (LEVIN et al., 2004). Além de hidrogênio, a quebra de substratos ricos em carboidratos gera ácidos e álcoois, substratos que fornecem energia metabólica para o crescimento bacteriano (HALLENBECK e GHOSH, 2009). Em escala industrial, os processos fermentativos são mais apropriados devido à operação relativamente simples e com custos minimizados, quando comparados a outros processos (AZWAR et al., 2014).

Em micro-organismos heterotróficos, o crescimento anaeróbio apresenta problemas para a célula com respeito à disposição de elétrons resultantes das reações de oxidação. Isso acontece quando a energia requerida pela atividade biossintética pode ser satisfeita apenas pela degradação de compostos orgânicos que servem como fonte de energia. Vários tipos de controle específicos são necessários para regular o fluxo de elétrons no metabolismo dos anaeróbios estritos e facultativos e isso se reflete na habilidade de muitos organismos em dispor o excesso de elétrons na forma de hidrogênio molecular (H_2) através da atividade da

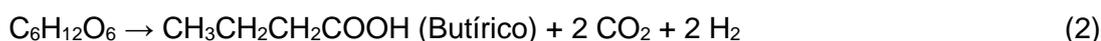
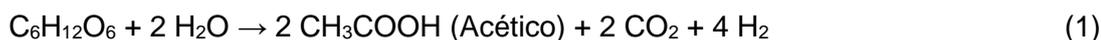
enzima hidrogenase (DAS e VEZIROGLU, 2001). As hidrogenases catalisam uma reação redox muito simples, que converte o hidrogênio em dois prótons e dois elétrons: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ (ADAM et al., 1981). Essas enzimas são agrupadas em duas famílias principais, de acordo com o metal existente em seu centro de ativação. As [FeFe]-hidrogenase contêm somente ferro, as [NiFe]-hidrogenase e [Ni-Fe-Se]-hidrogenase contêm níquel, ferro e, algumas vezes, selênio (SÁ et al., 2011).

A maioria do hidrogênio produzido biologicamente se origina do metabolismo anaeróbio do piruvato, formado durante o catabolismo de vários substratos. A quebra do piruvato é catalisada por dois sistemas de enzimas: i) Piruvato formato liase (PFL) e ii) Piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). Nesses dois sistemas, o piruvato gerado pela glicólise é usado, na ausência de oxigênio, para produzir Acetil CoA e a partir dele ATP, formato ou ferredoxina. Bactérias entéricas produzem H_2 a partir do formato e as anaeróbias estritas a partir da ferredoxina reduzida (HALLENBECK e BENEMANN, 2002).

Em anaeróbios estritos, como *Clostridium* sp., o piruvato é convertido a acetil CoA e CO_2 , e produz ferredoxina reduzida. Por sua vez, a redução da ferredoxina transfere elétrons à [FeFe]-hidrogenase, garantindo a produção de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose consumida. Adicionalmente, 2 mols de hidrogênio podem ser produzidos a partir do NADH gerado durante a glicólise pela ação da ferredoxina oxidoreductase, cujo resultado é o rendimento máximo teórico de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose. Na prática, os rendimentos são menores, uma vez que a oxidação de NADH pela ferredoxina oxidoreductase normalmente é inibida em condições normais, pois o rendimento teórico é alcançado em pressões parciais de hidrogênio muito baixas, menores que 60 Pa (HALLENBECK, 2009; VARDAR-SCHARA et al., 2008).

Os micro-organismos têm habilidade de produzir hidrogênio em condições ambientais diversas. Entre as opções para melhorar o desempenho dos micro-organismos, o uso de culturas mistas ou consórcios microbianos garante que aptidões diferentes estarão a serviço da produção (PATEL et al., 2012). Bactérias anaeróbias facultativas e estritas incluem espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*. As espécies de *Clostridium* utilizam diferentes vias metabólicas na geração de hidrogênio e são capazes de modificar seu metabolismo de acordo com as condições ambientais. Na etapa da acidogênese são produzidos principalmente acetato e butirato, e durante a solventogênese são gerados acetona e etanol (VASQUEZ; VARALDO, 2009). Bactérias do gênero *Enterobacter* sp. são anaeróbias facultativas e sobrevivem na presença de pequenas quantidades de oxigênio no meio, o que contribui para a manutenção da condição de anaerobiose nos reatores (KAPDAN; KARGI, 2006; BAGHCHEHSARAEI et al., 2010).

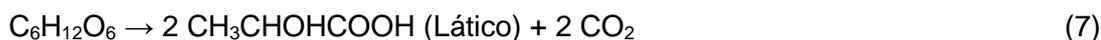
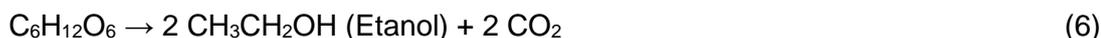
Glicose, isômeros de hexose ou polímeros em forma de amido e celulose rendem diferentes quantidades de hidrogênio, dependendo da via metabólica seguida ou inibida, e dos produtos finais da fermentação que incluem acetato, propionato, butirato, lactato e etanol. As vias que levam à produção de acetato envolvem a produção de 4 moles de hidrogênio por mol de glicose degradada (Equação 1). Metade do rendimento, 2 moles de hidrogênio por mol de glicose, é obtido quando o butirato é o produto final da fermentação (Equação 2) (HAWKES et al., 2002; LEVIN et al., 2004; GIOANNIS et al., 2013).



Teoricamente, os melhores resultados são associados ao acetato. Na prática, elevados rendimentos são obtidos quando o butirato é o produto final da fermentação (SHOW et al., 2012). Bactérias homoacetogênicas, principalmente do gênero *Clostridium*, são capazes de crescer heterotroficamente, pois convertem açúcares simples a acetato (Equação 3) e, autotroficamente, produzem ácido acético a partir de H_2 e CO_2 (Equação 4) (CHEN et al., 2009; GUO et al., 2010).



A cada mol de propionato gerado, um mol de hidrogênio é consumido (Equação 5), levando a baixos rendimentos (LEVIN et al., 2004; SHIDA et al., 2009). Produtos finais reduzidos, como álcoois e ácido láctico, indicam que o hidrogênio não foi gerado, nem consumido (Equações 6 e 7) (GUO et al., 2010).



O objetivo de alcançar rendimentos elevados a baixos custos está entre as principais questões técnicas a serem abordadas. Sobre essas considerações, o desenvolvimento de processos adequados, de reatores mais eficientes (SHOW et al., 2012) e o controle de parâmetros como pH, concentração do substrato, taxa de carregamento orgânico,

temperatura, tempo de retenção de sólidos, intensidade da mistura, concentração de nutrientes e pressão parcial de H_2 são fundamentais para garantir a eficiência do processo (KHANAL et al., 2004; GIOANNIS et al., 2013; AZWAR et al., 2014)

3.5 Reatores Anaeróbios Operados em Bateladas Sequenciais (ASBR)

Reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais têm sido largamente utilizados no tratamento de águas residuárias. Os sistemas contínuos apresentam elevada eficiência na remoção de matéria orgânica, melhor retenção de sólidos, controle de operação simples e eficiente (RATUSZNEI et al., 2000; VARGAS et al., 2013). De acordo com Zaiat et al. (2001), a configuração permite o controle estreito da qualidade do efluente, que pode ser descartado somente quando os padrões de emissão requeridos são atingidos. A operação intermitente do reator permite a aplicação de elevadas concentrações iniciais e resulta na geração de grandes volumes de biogás.

Os sistemas em batelada são particularmente úteis para o tratamento de resíduos agroindustriais. Desenvolvidos para atender aos efluentes com alto teor de sólidos suspensos, esses sistemas são capazes de aliar facilidade de operação e flexibilidade. Além disso, o sistema de operação em modo semi-contínuo é indicado para aplicações em escala plena, uma vez que muitos dos efluentes industriais são descarregados em períodos alternados (WU et al., 2009).

3.5.1 Reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR)

Pesquisas que envolvem projetos e a otimização de parâmetros operacionais de reatores anaeróbios se intensificaram nos últimos anos. Assim, há indícios de que não somente a necessidade de buscar novas alternativas para sistemas já estabelecidos, mas, principalmente, é possível o desenvolvimento de configurações que ofereçam máximo desempenho operacional, segurança e custos reduzidos (OLIVEIRA et al., 2009).

A otimização dos parâmetros operacionais do ASBR por Ratusznei et al. (2000) permitiu o desenvolvimento de um sistema caracterizado pela imobilização da biomassa em suporte inerte, em detrimento aos reatores com lodo granulado. Essa nova configuração melhora a retenção dos micro-organismos, mesmo em condições operacionais adversas, e elimina a etapa de sedimentação levando à redução do tempo de ciclo (RATUSZNEI et al., 2003).

A configuração idealizada por Ratusznei et al. (2000) tem sido estudada no tratamento de águas residuárias com finalidades diversas, tais como remoção de matéria orgânica (RODRIGUES et al., 2003; BEZERRA et al., 2009; NOVAES et al., 2010), remoção de compostos nitrogenados (ALBANEZ et al., 2009) e sulfurosos (MOCKAITIS et al., 2010). Recentemente, a configuração tem sido empregada na produção de metano (LOVATO et al., 2016; ALBANEZ et al., 2016b) e na produção de hidrogênio a partir de água residuária sintética (MANSSOURI et al., 2012; INOUE et al., 2014) e de substratos complexos (LIMA et al., 2015; LOVATO et al., 2015; ALBANEZ et al., 2016a; LOVATO et al., 2017).

3.6 Fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio e o desempenho do reator AnSBBR

3.6.1 Imobilização da biomassa

A imobilização da biomassa em suportes inertes proporciona elevada concentração e retenção celular, assim resolve-se o maior problema detectado em reatores ASBR, a permanência da biomassa no sistema. Há melhora no equilíbrio entre os micro-organismos devido à conformação espacial mais favorável, eliminação da incerteza da granulação e à possibilidade de utilizar suportes como meios para selecionar ou enriquecer organismos desejáveis e eliminar os indesejáveis. O uso de suportes inertes pode ainda resultar na supressão ou minimização do tempo de sedimentação, reduzindo, portanto, o ciclo (RODRIGUES et al., 2006).

O fluxo de massa entre as fases sólida e líquida pode ser um fator impeditivo no processo de conversão e causar considerável redução nas taxas de conversão (RODRIGUES et al., 2006). O uso de suporte atua como mecanismo separador de gases e sólidos, além de promover o fluxo uniforme no reator e melhor contato entre água residuária e a biomassa aderida (YOUNG, 1991). Devido ao aumento no tempo de retenção celular, sistemas com leitos fixos estruturados aumentam a resistência do reator aos choques de carga, à presença de compostos inibitórios e às mudanças na composição do substrato (SÁNCHEZ et al., 1994).

De acordo com Garcia et al. (2008), a aderência e a seletividade do material suporte são fatores determinantes na eficiência de reatores AnSBBR. Diversos materiais têm sido testados como meio suporte em reatores anaeróbios, tais como argila expandida (SHIDA et al., 2012), espuma de poliuretano (COSTABILE et al., 2011), polietileno de baixa densidade (LIMA et al., 2013), poliestireno (ROSA et al., 2014), politereftalato de etileno (PET) e tiras de pneu (BARROS et al., 2011).

3.6.2 Mistura

O movimento da massa líquida tornou-se um importante parâmetro de projeto e operação desses sistemas com a utilização de reatores em batelada no tratamento de efluentes com carga orgânica reduzida. A agitação pode ser realizada através da recirculação do biogás, recirculação do líquido e agitação mecânica. Sua implementação proporciona melhor contato entre substrato e micro-organismos durante a etapa de reação, melhorando os fluxos de transferência de massa, as taxas de reação e a eficiência do reator (MICHELAN et al., 2009).

A manutenção de baixas pressões parciais de hidrogênio através de sua remoção contínua é um dos pré-requisitos técnicos para produção estável e eficiente de hidrogênio (SHOW et al., 2012). A mistura vigorosa diminui tanto a saturação como as pressões parciais de hidrogênio no reator (JUNG et al., 2011). Elevadas pressões parciais de hidrogênio inibem a atividade da hidrogenase e fazem da produção de H₂ uma reação termodinamicamente desfavorável (BAHL e DÜRRE, 2001).

Cubas et al. (2011) avaliaram a influência do tipo de impelidor e da intensidade de agitação em reator AnSBBR com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, alimentado com água residuária sintética, com três ciclos diários de operação e a 30 °C. As análises dos quatro tipos de impelidor, em hélice, pá plana, pá curva e pá inclinada; e da intensidade de agitação, de 100 a 1100 rpm mostraram que a transferência de massa na fase líquida foi afetada por ambos os parâmetros. Os melhores resultados, em todas as frequências de agitação, foram obtidos no impelidor tipo pá plana. A constante cinética de primeira ordem (k_1) está diretamente relacionada ao coeficiente de transferência de massa na fase líquida; na faixa entre 300 e 900 rpm o valor de k_1 teve aumento proporcional ao da intensidade de agitação. Com a redução da camada limitante em torno das biopartículas, foi verificada a diminuição da resistência para transferência de massa, cujos valores para rotações de 300; 500; 700 e 900 rpm foram, respectivamente, de k_1 de 0,72; 1,07; 1,09 e 1,73 h⁻¹.

Em reator AnSBBR operado em escala piloto, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano no tratamento de esgoto doméstico, Novaes et al. (2010) avaliaram impelidores do tipo pás planas, pás inclinadas 45° e hélice. Os autores verificaram melhoria nos fluxos de transferência de massa e na velocidade de consumo do substrato quando a intensidade de agitação foi aumentada em 50%. Com a solubilização da matéria orgânica particulada, foi observado aumento na remoção de DQO de 14,7; 10,8 e 10,6% nos impelidores pá inclinada, hélice e pá plana, respectivamente. O acréscimo na intensidade de agitação resultou em valores elevados para a constante cinética de primeira ordem (k_1) de 1,02 e 1,05 h⁻¹ nos

impelidores pá plana e hélice, respectivamente. No impelidor tipo pá inclinada foi verificado o menor índice de k_1 , de $0,412 \text{ h}^{-1}$.

3.6.3 Tempo de detenção hidráulica

De acordo com Barros *et al.* (2010), o TDH mínimo para manter a produção específica de hidrogênio é relatado como aquele em que se possam manter adequadas concentrações de micro-organismos produtores, enquanto a predominância de organismos consumidores não seja favorecida. Nesse sentido, a aplicação de baixos tempos de detenção hidráulica pode ser estratégica, uma vez que elevadas taxas de diluição não são propícias à fixação de arqueias metanogênicas, que crescem a taxas muito lentas. Logo, baixos TDH podem afetar fortemente a produção de metano (VAZQUEZ e VARALDO, 2009).

Durante produção de biohidrogênio em ASBR em substrato à base de amido de milho, Arooj *et al.* (2008) observaram que os produtos do metabolismo e a população de micro-organismos foram afetados pela variação no tempo de ciclo. A máxima taxa de produção de $4,12 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e produção específica de $0,48 \text{ LH}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ foram alcançadas com 3 horas de ciclo. Nos ciclos mais longo e mais curto, de 18 e 2 horas, foram verificadas a menor produção volumétrica de $0,88 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e elevadas concentrações de ácido propiônico. Os melhores rendimentos de $0,51$ e $0,48 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de hexose foram obtidos nos ciclos de 6 e 7,5 horas, respectivamente, e são atribuídos a elevadas concentrações de butirato e redução do propionato.

Chen *et al.* (2009), ao avaliarem a dinâmica de duração dos ciclos sobre a produção de hidrogênio, investigaram intervalos de 4, 6 e 8 horas, em pH 4,9 e concentração inicial de $15 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Os autores verificaram que a concentração de SSV no líquido variou em função do tempo do ciclo, assim como a relação F/M (*Food/Microorganism*). A relação F/M diminuiu de $3,64 \text{ g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ em 4 horas, para $2,72$ e $2,65 \text{ g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ nos ciclos com 6 e 8 horas de duração, correspondendo a um aumento de $0,61$ para $0,88 \text{ g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{ciclo}$ de 4 para 8 horas de ciclo, respectivamente. O máximo rendimento de $1,86 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ sacarose consumida, a máxima eficiência de conversão de $1,18 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ sacarose e produção volumétrica de $388 \text{ mL de H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ foi obtida em ciclo de 4 horas e observados na maior relação F/M, em base diária, ou na menor relação F/M, em base cíclica. Ciclos de longa duração podem reduzir a produção de hidrogênio, devido às mudanças na população microbiana, uma vez que é favorecido o crescimento de micro-organismos não produtores.

Sreethawong *et al.* (2010) realizaram ensaios com 4 e 6 ciclos diários de operação para avaliar o efeito do número de ciclos em um reator ASBR utilizado na produção de hidrogênio. Para os respectivos ciclos, foram aplicadas cargas orgânicas de 10; 15; 20 e 25

$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e de 15, 22,5; 30 e 37,5 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Os autores observaram que a máxima taxa de produção ($0,63 \text{ L.h}^{-1}$), taxa de produção específica ($388 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1}\text{SSV}$) e rendimento ($186 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ removida) foram obtidas em carga orgânica de $30 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 6 ciclos diários de operação. A distribuição da concentração orgânica no reator ocorre de forma mais uniforme com maior número de ciclos, causando menos variações nas condições operacionais, o que afeta diretamente o desenvolvimento da biomassa microbiana. A maior concentração de SSV no líquido em operações com seis ciclos diários, em detrimento às de quatro ciclos, corrobora essas afirmações.

3.6.4 Concentração do substrato

Em reatores batelada, a concentração ótima do substrato varia e é profundamente influenciada por outros parâmetros operacionais, como pH. Quando o pH não é controlado, o rendimento usualmente diminui com o aumento da concentração do substrato. Elevadas concentrações de substrato permitem operações mais eficientes energeticamente, mas a inibição das vias metabólicas e da atividade microbiana por produtos do metabolismo são um fator limitante (JUNG et al., 2011).

Lee et al. (2008), em reatores batelada, avaliaram concentrações de amido que variaram entre 8 e 32 gDQO.L^{-1} . A produção e o rendimento aumentaram à medida que a concentração inicial aumentou, alcançando produção volumétrica de $1,069 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e rendimento de $11,25 \text{ mmol H}_2.\text{g}^{-1}\text{amido}$ na máxima concentração avaliada.

3.6.5 Estratégia de alimentação

Em termos de eficiência do ASBR, a estratégia de alimentação é reconhecidamente importante. O aumento do tempo de alimentação resulta em baixas concentrações do substrato dentro do reator, evita sobrecargas orgânicas (ZAIAT et al., 2001) e faz com que o processo seja equivalente a uma batelada alimentada (RATUSZNEI et al., 2003). A forma como o reator é alimentado influencia o desempenho e a estabilidade do sistema. Há três formas distintas de realizá-la: (i) em batelada, onde a alimentação é realizada de forma breve e anterior à agitação do meio. As etapas de alimentação e reação são realizadas separadamente; (ii) em batelada alimentada, realizada em intervalos longos em que a agitação do meio ocorre simultaneamente à alimentação; (iii) em sistemas mistos, em que o reator realiza uma parte do ciclo em batelada alimentada e outra em batelada (INOUE, 2012).

Geralmente, empregada em substratos com elevadas concentrações de matéria orgânica ou compostos tóxicos, a batelada alimentada é utilizada para ajustar as taxas metabólicas através da adequação do fluxo e da composição da alimentação, que é

adicionada lentamente e em pequenos volumes (KARGI; PAMUKOGLU, 2009). O aumento do tempo de alimentação resulta em baixas concentrações do substrato dentro do reator a fim de que se evitem sobrecargas orgânicas, inibição pelo substrato, por compostos químicos ou pelos produtos do metabolismo bacteriano (ZAIAT et al., 2001; KARGI; PAMUKOGLU, 2009).

Inoue (2012) avaliou a influência do tempo de enchimento em reator AnSBBR para produção de hidrogênio a partir de água residuária sintética. Foram aplicadas cargas orgânicas que variaram de 9,0 a 27,0 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, através do arranjo entre a concentração afluenta (3500 e 5400 mgDQO.L⁻¹) e o tempo de ciclo (4, 3 e 2 horas). Em todas as condições avaliadas, o tempo de enchimento correspondeu a 50% do tempo total de ciclo. O autor verificou rendimento de 1,48 molH₂.mol⁻¹sacarose removida para carga orgânica aplicada de 13,5 e 18 g.L⁻¹.d⁻¹ e ciclos de 4 e 3 horas, respectivamente. Manssouri (2012) trabalhou em condições operacionais idênticas, mas com tempo de enchimento do reator de 10 minutos e obteve 1,04 e 0,85 molH₂.mol⁻¹sacarose removida, para as respectivas cargas orgânicas e tempos de ciclo. Foi verificada redução nas concentrações de etanol com o aumento do tempo de enchimento, o que fez com que o rendimento na produção de hidrogênio aumentasse até 42,5%.

Além do tempo de enchimento, parâmetros como carga orgânica aplicada, retenção de biomassa, as concentrações do substrato e produto e duração dos ciclos de operação podem afetar a estratégia de alimentação em batelada alimentada bem como podem interferir diretamente no volume e nas taxas de produção de hidrogênio (KARGI; PAMUKOGLU, 2009).

3.6.6 pH

As condições ambientais estão entre os principais parâmetros a serem controlados durante a produção de hidrogênio. O pH tem implicações diretas no rendimento, nos ácidos orgânicos gerados durante o processo, na regulação da via metabólica, em direção à solventogênese (VASQUEZ; VARALDO, 2009), e na supressão de micro-organismos consumidores de hidrogênio (KHANAL et al., 2004). Além de prejudicar a atividade da enzima hidrogenase (AFSCHAR et al., 1986; SINHA; PANDEY, 2011), as variações no pH podem afetar a morfologia e a estrutura celular, e dessa forma, os fenômenos de floculação e adesão de micro-organismos (GOTTSCHALK, 1986).

Lee et al. (2008) avaliaram o efeito do pH sobre a produção de hidrogênio em substrato à base de amido em reatores batelada conduzidos a 37 °C. Os autores observaram rendimento e produção de hidrogênio superior no ensaio realizado em pH 5,5 (9,19 mmol H₂ g⁻¹ amido e 511 mL H₂) quando comparado ao pH 7,0 (0,996 mmol H₂ g⁻¹ amido e 396 mL H₂). Entre a faixa de pH de 5,5 e 7,0 houve predominância de butirato; em condições de pH inicial não controlado (8,5) etanol e butirato foram os principais metabólitos solúveis. Nos ensaios

conduzidos em pH 5,5 e 6,0 foram verificadas as melhores eficiências de utilização de substrato de 97 e 98% e rendimento celular de 0,260 e 0,218 gSSV.g⁻¹amido, respectivamente.

Sreethawong et al. (2010) conduziram um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais a partir de água residuária do processamento de mandioca e obtiveram produção específica de 5,6 LH₂.L⁻¹.d⁻¹ e rendimento de 438 mL H₂.g⁻¹ DQO cujo pH foi mantido constante em 5,5.

A avaliação da produção de hidrogênio em reator ASBR foi feita por Arooj et al. (2008), os quais utilizaram como substrato amido de milho na concentração de 20 g.L⁻¹. Os autores fixaram o pH em 5,3 e a temperatura em 35 °C. Nessa faixa de pH, foram obtidas a taxa de produção de 4,12 LH₂.L⁻¹.d⁻¹, a produção específica de 0,48 LH₂.gSSV.d⁻¹ e a eficiência de conversão de substrato de 97%.

Thanwised et al. (2012) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de água residuária da indústria de fécula de mandioca em reator anaeróbio compartimentado. Os autores fixaram o pH em 6,0 e 6,5 até o 28º dia de operação, e, a partir desse período o pH foi elevado a 9,0 e o valor mantido até o final do experimento. Foram obtidas taxa de produção de 0,9 LH₂.L⁻¹.d⁻¹ e eficiência de remoção de DQO de 29,3%.

Os valores de pH inicial na produção de hidrogênio variam entre 4,5 e 9,0 (JUNG et al., 2011). Em substratos à base de amido, o efeito do pH inicial é mais pronunciado que nas hexoses, uma vez que ele necessita ser hidrolisado para estar disponível. Em valores de pH mais elevado, entre 6,0 e 6,5, hidrogênio e ácidos são produzidos rapidamente, mas simultaneamente ocorre a depleção da capacidade de tamponamento, levando à inibição do processo ou a alteração da via metabólica. Em contrapartida, em pH inicial de 4,5, a produção de hidrogênio inicia-se de forma mais lenta, no entanto, estende-se por período superior, apesar dos riscos de supressão dos micro-organismos produtores de hidrogênio. Portanto, para se garantir a máxima produção, recomenda-se que o pH inicial seja fixado entre 5,5 e 5,7 (KHANAL et al., 2004).

3.6.7 Temperatura

A temperatura de operação afeta diretamente as taxas de crescimento dos micro-organismos e a conversão em produtos da fermentação (LEE et al., 2006; JUNG et al., 2011; SINHA; PANDEY, 2011). Juntamente com o pH, a temperatura é um fator determinante na produção de hidrogênio a partir de amido (LEE et al., 2008). A fermentação de carboidratos pode ser conduzida nas faixas mesofílica (25-40 °C); termofílica (40-65 °C); termofílica extrema (65-80 °C) ou hipertermofílica (>80 °C) (LEVIN et al., 2004).

O efeito da temperatura pode ser explicado termodinamicamente quando são consideradas as mudanças na energia livre de Gibbs e nas condições-padrão de entalpia e indicam como a reação pode ocorrer, se é espontânea e se sua natureza é endotérmica. Com o aumento da temperatura, o equilíbrio cinético aumenta devido à natureza endotérmica da reação (ΔH° is + ve). Assim, com aumento na temperatura, a concentração do reagente se mantém constante e pode melhorar a produção de H_2 (SINHA; PANDEY, 2011).

Temperaturas elevadas podem promover a hidrólise do substrato, no entanto, pode ocorrer a redução da diversidade microbiana, cujo resultado é a degradação incompleta, especialmente em águas residuárias. A operação, em temperaturas elevadas, aumenta os custos com energia e requer estruturas adaptadas, com rigoroso controle do reator. A escolha da faixa mais adequada deve basear-se não somente nos rendimentos na produção de hidrogênio, mas também deve-se levar em conta a eficiência na degradação do substrato e os fatores econômicos (JUNG et al., 2011).

Baghchehsaraee *et al.* (2010), ao avaliarem a produção biológica de hidrogênio em condições mesofílicas e termofílicas, obtiveram $2,18 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose quando o experimento foi conduzido a 37°C e $1,25 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose em cultivo a 55°C . Os autores verificaram que, a 37°C , a produção de hidrogênio não sofreu variações com a redução do pH e prosseguiu, mesmo com valores inferiores a 4,0. E, a 55°C , a produção de hidrogênio foi observada somente até o pH 4,0, indicando que temperaturas termofílicas tornam o inóculo mais susceptível à variação do pH.

Lee *et al.* (2008), ao utilizarem amido como substrato durante a produção fermentativa de hidrogênio em reatores batelada com microflora mista, obtiveram rendimento de $5,34 \text{ mmol } H_2 \cdot \text{g}^{-1}$ amido a 37°C . Esse resultado foi seis vezes superior ao do rendimento obtido a 55°C ($1,44 \text{ mmol } H_2 \cdot \text{g}^{-1}$ amido). Os autores verificaram rendimento celular de $0,204 \text{ g SSV/g}$ amido e eficiência de conversão de substrato de 82% no ensaio realizado a 37°C , resultados superiores aos obtidos à temperatura de 55°C , de $0,085 \text{ g SSV/g}$ amido e 51%, para os respectivos parâmetros.

Yossan et al. (2012) obtiveram máximo potencial de produção ($985 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), taxa de produção ($76 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e rendimento ($22,08 \text{ mL} \cdot \text{gDQO}$) nos ensaios conduzidos a 55, 45 e 37°C , respectivamente ao verificarem o efeito da temperatura de operação em reatores batelada alimentados com resíduos oleaginosos. E, quando o reator foi submetido à temperatura de 25°C , foram observadas a menor produção acumulada ($706,42 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), a taxa de produção foi de $22,52 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, o rendimento de $22,08 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ e o maior período de fase *lag*. A análise da comunidade microbiana revelou que nos cultivos a 25, 37, 45 e 55°C , espécies do gênero *Clostridium* foram dominantes, cobrindo 75, 89, 71 e 83% das bandas, respectivamente.

3.6.8 Tratamento do inóculo

O uso de microflora mista na produção biológica de hidrogênio é viável porque simplifica a operação e o controle do sistema. Micro-organismos isolados do solo, águas residuárias, lodo, composto, dentre outros, podem ser usados como fontes potenciais de inóculo em processos fermentativos (SINHA; PANDEY, 2011). Apesar dos benefícios das culturas mistas, há necessidade de suprimir a atividade de espécies consumidoras de hidrogênio. A seleção dos micro-organismos de interesse é realizada através do pré-tratamento ou enriquecimento do inóculo, que consiste na exposição da cultura a condições ambientais extremas (KAN, 2013; BAKONYI et al., 2014).

As diferenças fisiológicas entre micro-organismos produtores (bactérias acidogênicas) e consumidores de hidrogênio (arqueias metanogênicas, bactérias homoacetogênicas e redutoras de sulfato) servem de base para os diferentes métodos de enriquecimento. Bactérias acidogênicas, como as do gênero *Clostridium*, podem formar esporos de resistência quando submetidas a condições ambientais desfavoráveis, como altas temperaturas, acidez ou alcalinidade extremas (ZHU e BÉLAND, 2006).

Várias formas de pré-tratamento têm sido empregadas no enriquecimento de inóculos, dentre elas, o tratamento térmico (BAKONYI et al., 2014); ácido e alcalino (KAN, 2013); por inibidores químicos (ZHU e BÉLAND, 2006; WANG e WAN, 2008); por sonicação (ELBESHBISHY et al., 2011a); irradiação de micro-ondas (SINGHAL e SINGH, 2014) ou ainda através de métodos combinados (ELBESHBISHY et al., 2011b).

O enriquecimento térmico é uma técnica comum e efetiva para enriquecer inóculos, principalmente bactérias do gênero *Clostridium* (BAGHCHEHSARAEI et al., 2008; BAKONYI et al., 2014), além de um método fácil e prático (WANG e WAN, 2008).

Assim, a temperatura e o tempo de exposição podem variar sensivelmente de acordo com a fonte do inóculo. A maioria dos tratamentos térmicos reportados na literatura encontra-se em faixas de temperatura que variam de 75 a 100 °C. Arqueas metanogênicas não sobrevivem em temperaturas superiores a 70 °C, especialmente por tempos prolongados (BAKONYI et al., 2014). Comumente, os tempos de exposição podem variar de 15 a 180 minutos, ou mais (ASSAWAMONGKHOLSIRI et al., 2013; KAN, 2013).

Mu et al. (2007) avaliaram o enriquecimento de lodo anaeróbio de reator UASB, utilizado na geração de metano, através de pré-tratamento térmico, ácido e básico, e obtiveram rendimento de 2 mol H₂.mol⁻¹ glicose quando o lodo foi aquecido a 102 °C por 90 minutos; de 1,3 mol H₂.mol⁻¹ glicose, quando o inóculo foi submetido ao tratamento ácido e de 0,48 mol H₂.mol⁻¹ glicose quando o tratamento recebido foi o agente alcalinizante.

Em reator ASBR alimentado com água residuária do processamento de mandioca, Sreethawong et al. (2010) utilizaram como inóculo o lodo anaeróbio de lagoa anaeróbia submetido ao aquecimento a 95 °C por 15 minutos. E, com quatro horas de ciclo, foram obtidos produção de 5,6 $\text{LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e rendimento de 438 $\text{ml H}_2\cdot\text{g}^{-1}$ de DQO removida.

Thanwised et al. (2012) utilizaram como inóculo o lodo de reator UASB operado em escala plena, submetido a tratamento térmico de 105 °C por 2 horas. Em reator compartimentado de 14 L, operado a 32 °C e utilizado no tratamento de água residuária de indústria de fécula de mandioca, os autores obtiveram 883 $\text{mL H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ com carga orgânica aplicada de 65,92 $\text{g DQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

3.7 Água residuária de fecularia de mandioca

A possibilidade de se utilizarem resíduos orgânicos como substratos para produção de hidrogênio torna o processo biológico bastante atrativo (CASTELLÓ et al., 2009), pois as fontes de carbono e nitrogênio podem responder por até 40% dos custos de produção (WANG et al., 2008). Entre os principais critérios para escolha de substratos estão a disponibilidade, o custo e a biodegradabilidade do resíduo (BICÁKOVÁ e STRAKA, 2012; SHOW et al., 2012). A presença de amido e de açúcares prontamente disponíveis, como frutose e glicose, faz da água residuária de fecularia de mandioca um substrato promissor para produção de biohidrogênio, uma vez que as bactérias produtoras de hidrogênio utilizam carboidratos como principal fonte de carbono (GOMES et al., 2016).

No ano de 2015, o estado do Paraná produziu 520 mil toneladas de fécula de mandioca, o equivalente a 69% da produção brasileira (CEPEA, 2016). Os processos de extração e de purificação da fécula estão vinculados à geração de grande volume de resíduos líquidos, provenientes das operações de lavagem das raízes e da extração da fécula (CEREDA, 2001). O processamento de 1 kg de mandioca resulta na geração de 0,2 kg de fécula; de 0,4 a 0,9 kg de bagaço e de 5 a 7 L de água residuária (O-THONG et al., 2011; LEAÑO e BABEL, 2012). O resíduo líquido de fecularia possui carga orgânica elevada, com demanda química de oxigênio entre 3 e 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (TORRES et al., 2017) e concentração de açúcares totais de 2,5 a 4,6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ANDREANI et al., 2015). Aliado ao elevado conteúdo orgânico, o resíduo é potencialmente tóxico devido à presença do glicosídeo cianogênico linamarina, encontrado em concentrações que podem alcançar até 140 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (KAEWKANNETRA et al., 2011).

Além da elevada concentração de matéria orgânica, a água residuária de fecularia possui em sua composição nutrientes como nitrogênio (212 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); fósforo (31 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); cálcio

(33 mg.L⁻¹) e ferro (11 mg.L⁻¹) (TORRES et al., 2017). O nitrogênio, o fósforo e o ferro são alguns dos principais nutrientes requeridos para produção fermentativa de hidrogênio. O nitrogênio é essencial para o crescimento bacteriano. O fósforo é a principal fonte para formação do ATP e de enzimas e sua carência pode afetar as vias metabólicas em bactérias do gênero *Clostridium*, além de diminuir a produção potencial de H₂ (LIN e LAY, 2005). O ferro destaca-se por sua participação na formação da hidrogenase; essa enzima atua como carreadora de elétrons e está envolvida na oxidação do piruvato a acetil-CoA, gás carbônico e hidrogênio (SINHA; PANDEY, 2011).

Indústrias que exploram a extração de amido de mandioca comumente tratam seus efluentes em lagoas anaeróbias. Esse sistema requer áreas extensas, contribui com a liberação de gases para a atmosfera e com a geração de odores desagradáveis, que podem afetar a população local. Durante a produção de fécula, estima-se que cerca de 75% da energia consumida seja originária de fontes como petróleo e que 25% da demanda seja suprida pela energia elétrica. Nesse contexto, tecnologias que viabilizem o uso eficiente do biogás podem contribuir com a diminuição dos custos associados à secagem da fécula. De acordo com Kuczman (2012), em um fecularia que processa em média 135 t.d⁻¹ de raízes, são consumidos mensalmente 620 m³ de lenha na caldeira, para produzir vapor, e são gerados cerca de 800 m³ de água residuária diariamente. Estudos mostram que o tratamento anaeróbio de 1 m³ de água residuária de fecularia tem potencial para produzir até 10 m³ de biogás (THANWISED et al., 2012).

3.7.1 Produtos intermediários associados ao metabolismo das bactérias lácticas

Em resíduos do processamento da mandioca, os prejuízos à produção de hidrogênio têm sido associados à presença de bactérias lácticas. Além de competirem por substrato (FOOKS et al., 1999; SAADY, 2013), os produtos do metabolismo intermediário desses micro-organismos são potencialmente inibidores (NOIKE et al., 2002; ROSA et al., 2016; GOMES et al., 2016). As bactérias lácticas são micro-organismos gram-positivos que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação dos carboidratos e fazem parte da microflora autóctone da mandioca (AKINGBALA et al., 2005; ROSALES-SOTO et al., 2016). Nas raízes e nos resíduos do processamento, estima-se que a contagem de bactérias lácticas possa variar entre 10⁶ e 10⁹ UFC g⁻¹ (CRISPIM et al., 2013; ROSA et al., 2016), com crescimento em amplas faixas de pH (3.5 – 10.0) e temperatura (5 – 45 °C) (ABDEL-RAHMAN et al., 2013).

As bactérias lácticas podem inibir o crescimento e o metabolismo microbiano pela produção de intermediários potencialmente tóxicos (MCAULIFFE et al., 2001; WANG et al., 2015). A bacteriocina nisina é um lantibiótico de baixo peso molecular (<5KDa) produzido por culturas de *Lactococcus lactis lactis*. Seu mecanismo de ação está relacionado à formação de

poros na membrana plasmática, ocasionando alterações na permeabilidade seletiva, que levam ao efluxo de compostos essenciais e à morte celular (BREUKINK et al., 1999; MAZZOLI et al., 2014). O ácido láctico em sua forma não-dissociada também pode atuar como inibidor de diversas espécies do consórcio microbiano. Devido ao seu caráter lipofílico, ele pode se difundir livremente através da membrana celular e causar acidificação do citoplasma devido à dissociação e liberação de prótons no meio intracelular (ROSENGREN et al., 2013). Para restaurar o equilíbrio, os íons H^+ são bombeados para o meio extracelular, causam distúrbios na força próton motiva e prejuízos ao crescimento microbiano (MITCHELL, 1961). Outros produtos do metabolismo intermediário como peróxido de hidrogênio, ácido fórmico, acetoína, 2,3-butanodiol e diacetil também podem apresentar efeitos bactericida e bacteriostático (LINDGREEN; DOBROGOSZ, 1990).

3.8 Considerações Finais

Pesquisas que envolvem projetos e a otimização de parâmetros operacionais de reatores anaeróbios se intensificaram nos últimos anos bem como indicam que há necessidade de buscar novas alternativas para os sistemas já estabelecidos. O desenvolvimento de configurações que ofereçam, ao mesmo tempo, máximo desempenho operacional e custos reduzidos, são fatores-chave para consolidar o uso de reatores anaeróbios na produção de biocombustíveis. Nesse contexto, a contribuição científica desse trabalho se apoia no fato de que, é possível aliar uma configuração, operacionalmente simples, flexível e com possibilidades de aumento de escala (AnSBBR), a uma técnica amplamente explorada, como a fermentação anaeróbia, na produção biológica de hidrogênio, proporcionando a geração de produtos como elevado potencial energético, a partir de um resíduo rico em matéria orgânica e de baixo custo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reatores Anaeróbios, no Laboratório de Saneamento Ambiental e no Laboratório de Análises Agroambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel.

4.2 Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR)

O reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) utilizado no experimento foi confeccionado em acrílico transparente com 5 mm de espessura, 30 cm de altura, 15 cm de diâmetro, com capacidade total de 6,0 L e capacidade útil de 4,3 L (2,3 L de volume residual e 2,0 L de volume alimentado por ciclo), conforme sistema utilizado por Manssouri et al. (2013) e Inoue et al. (2014). O reator foi mantido em câmara de aquecimento à temperatura de 30 ± 1 °C. O material suporte foi acondicionado em um cesto de aço Inox perfurado de 20 cm de altura, 7 cm de diâmetro interno e 15 cm de diâmetro externo. Uma tampa do mesmo material foi fixada ao cesto para evitar a saída do suporte (Figuras 1 e 2).

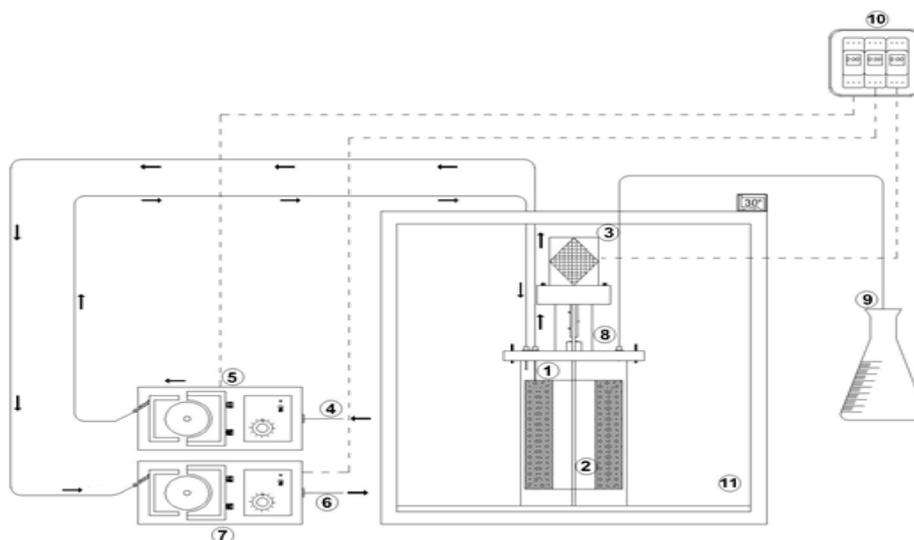


Figura 1 Representação esquemática do reator AnSBBR. 1. Reator em acrílico; 2. Cesto para imobilização da biomassa; 3. Sistema de agitação; 4. Entrada do afluente; 5. Bomba de alimentação; 6. Saída do efluente; 7. Bomba de descarga; 8. Saída de gás; 9. Frasco Mariotte; 10. Temporizadores; 11. Câmara climatizada.

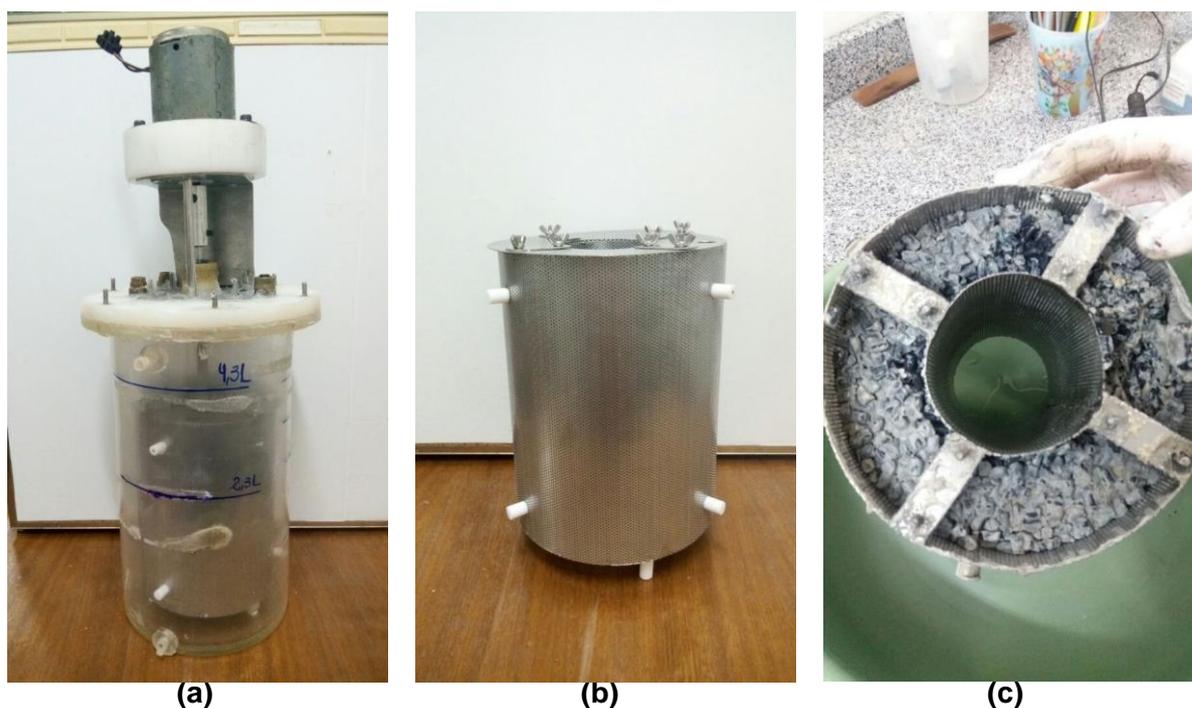


Figura 2 Imagens do reator AnSBBR. a) Reator e sistema de agitação; b) Cesto para imobilização da biomassa; c) Material suporte (polietileno de baixa densidade) e biomassa.

Foram utilizados impelidores do tipo turbina com 5 cm de diâmetro total, constituídos por quatro lâminas planas instaladas a 8 e 16 cm do fundo do tanque para garantir a agitação fixa de 300 rpm. As etapas de alimentação e descarga foram realizadas por bombas peristálticas dosadoras da marca Milan[®]. A autonomia do processo foi garantida pelo uso de temporizadores digitais (TH-857 Plus Kienzle[®]), responsáveis pelo acionamento/parada das bombas e do sistema de agitação para a realização das etapas da operação em batelada sequencial: alimentação, agitação e descarga.

A quantificação do volume de biogás gerado foi realizada em um frasco Mariotte conectado à saída de gás, localizada na parte superior do reator. O volume de gás gerado foi deduzido do volume de líquido alimentado no modo de operação em batelada-alimentada, uma vez que ambos ocorrem simultaneamente. O volume final foi obtido após a correção para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Os dados referentes à pressão atmosférica foram fornecidos pelo Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR).

4.3 Material suporte e inóculo

Polietileno de baixa densidade (PEBD) foi utilizado na imobilização da biomassa e a escolha deveu-se às características do material, que favorecem a colonização por bactérias hidrolíticas, fermentativas e não redutoras de sulfato, em detrimento às redutoras de sulfato e arqueias metanogênicas (SILVA et al., 2006), reconhecidas consumidoras de hidrogênio, além, de tratar-se de um material disponível e de baixo custo.

A inoculação do sistema foi realizada a partir de duas fontes:

- i) Inóculo obtido por autofermentação da água residuária de fecularia de mandioca. O procedimento consiste em manter o material a ser fermentado à temperatura ambiente durante 72 horas (LEITE et al., 2008);
- ii) Inóculo obtido de lodo anaeróbio, proveniente de um reator piloto utilizado no tratamento de água residuária de fecularia de mandioca.

O lodo anaeróbio foi aquecido a 95 °C durante 15 minutos para enriquecer o inóculo (SREETHAWONG et al., 2010). O enriquecimento de inóculos com micro-organismos produtores de hidrogênio consiste em sua exposição a condições ambientais extremas no intuito de induzir a formação de esporos. Além de selecionar bactérias do gênero *Clostridium*, principais micro-organismos produtores de hidrogênio a partir da fermentação de açúcares, possíveis competidores também são eliminados do consórcio, tais como as arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato. A concentração do lodo anaeróbio inserido no reator foi de 28 gSVT.L⁻¹.

Para melhorar a fixação da biomassa ao material suporte, durante a fermentação da água residuária de fecularia, o PEBD permaneceu em contato com o inóculo, para tornar a imobilização dos micro-organismos mais efetiva. No processo de inoculação do reator com o lodo anaeróbio, a mistura do material suporte ao inóculo foi realizada no momento em que o PEBD foi acondicionado no cesto. Em ambas as estratégias, após a inoculação, iniciou-se uma batelada de 24 horas com agitação lenta para melhorar a fixação da biomassa ao suporte inerte.

Na Figura 3 podem ser verificadas imagens do material suporte (PEBD) e das fontes de inóculo utilizadas no reator AnSBBR.

**(a)****(b)****(c)**

Figura 3 A) Polietileno de baixa densidade (PEBD); B) Autofermentação da água residuária de fecularia de mandioca; C) Lodo anaeróbio em peças de bambu, utilizadas como meio suporte em reator anaeróbio piloto.

4.4 Água residuária de fecularia de mandioca (ARF)

A água residuária do processo de extração e purificação da fécula de mandioca foi coletada em três indústrias localizadas nos municípios de Toledo, Maripá e Nova Santa Rosa, PR. No processo produtivo, a água gerada durante a extração do amido é reutilizada na lavagem das raízes e segue para o sistema de lagoas de tratamento. Na Figura 4 está apresentado o fluxograma industrial simplificado das etapas de extração e purificação da fécula de mandioca, bem como, do ponto de coleta da água residuária.

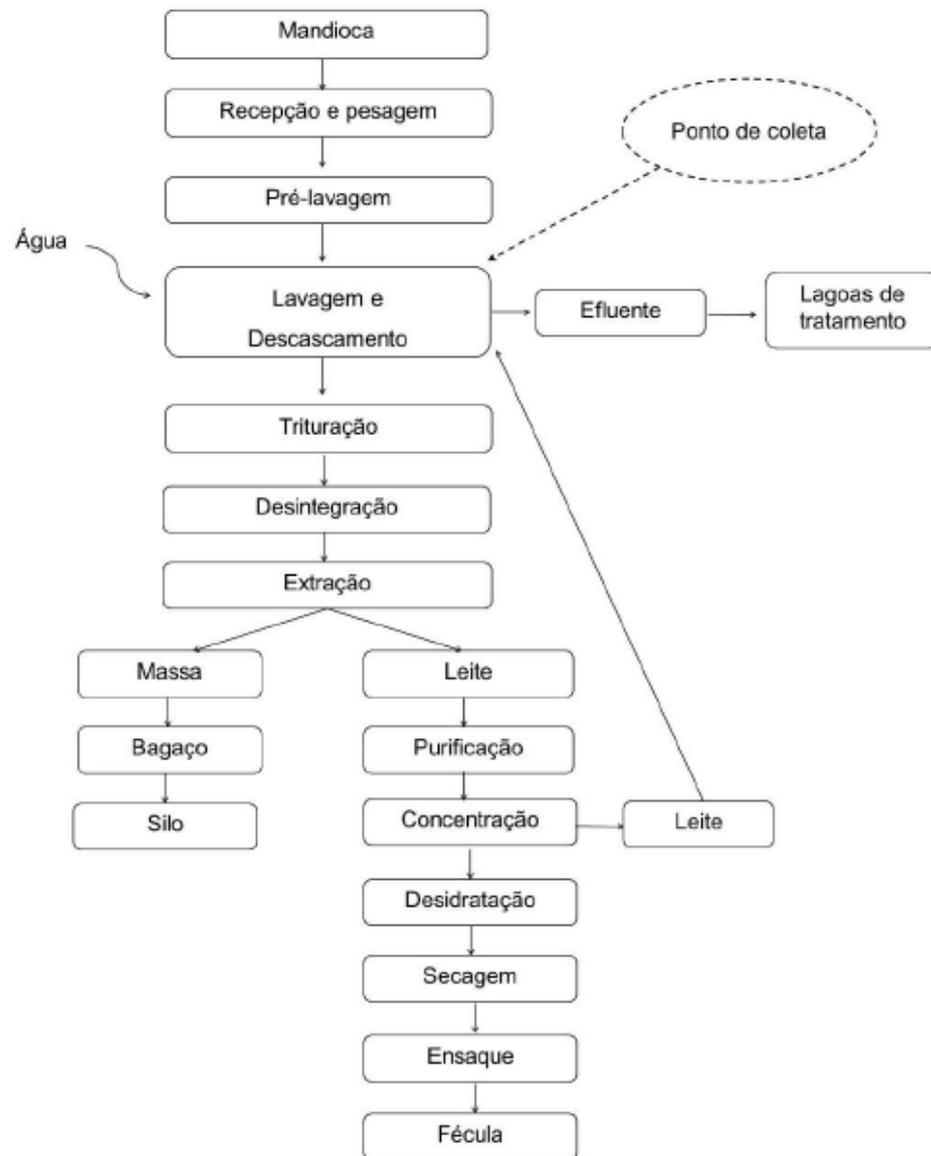


Figura 4 Fluxograma industrial simplificado das etapas de extração e purificação da fécula.

A água residuária foi coletada na calha de recirculação, local em que a água remanescente do processo de concentração é reutilizada durante os processos de lavagem e descascamento das raízes. Em seguida, o resíduo foi acondicionado em galões de 50 L e transportado ao laboratório de reatores biológicos. Todo o volume coletado foi homogeneizado em um tanque de 300 L. Após a decantação dos sólidos grosseiros (solo,

partes da raiz e cascas de mandioca), o efluente foi envasado em garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 2 L e congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a coleta, os lotes de água residuária foram caracterizados quanto aos seguintes parâmetros: pH, DQO, açúcares totais e sólidos. Em todos os ensaios, o pH afluente foi ajustado para 6,0 com bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Imagens do local de coleta e das etapas de homogeneização e envase da água residuária de fecularia de mandioca são apresentadas na Figura 5.



(a)

(b)

(c)

Figura 5 a) Calha de recirculação; b) Homogeneização do efluente coletado; c) Envase da água residuária para congelamento.

4.5 Condições experimentais

A operação do sistema foi realizada de acordo com os ciclos típicos da batelada sequencial: (i) alimentação, em que o reator é carregado com o líquido a ser tratado, iniciando-se simultaneamente a agitação; (ii) reação, período em que ocorrem as biotransformações do substrato; e (iii) descarga, ao término do ciclo, o líquido tratado é descarregado do reator, iniciando-se em seguida um novo ciclo. Foram avaliadas duas estratégias de alimentação durante a condução do experimento: (i) batelada, em que o tempo de enchimento do reator é de 20 min, e (ii) batelada alimentada/batelada, em que o tempo de alimentação consiste em 50% do tempo total de ciclo.

As cargas orgânicas foram aplicadas em função da concentração afluyente que variou de 2000 a 5000 mgCarb.L⁻¹ e do tempo de ciclo de 4, 3 e 2 horas, configurando 6, 8 e 12 ciclos diários. Ao término de cada condição experimental o reator foi desmontado, higienizado e um novo inóculo foi introduzido. O resumo das condições experimentais do reator AnSBBR operado em batelada e batelada alimentada é apresentado nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 Resumo das condições experimentais dos ensaios inoculados com inóculo obtido por autofermentação.

Condição	Tempo de ciclo (h)	Tempo de enchimento	Número de ciclos (d)	Concentração afluyente (mgCar.L ⁻¹)	COV _C (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo de operação (d)
E1	4,0	20 min	6	4200	12,0	23
E2	3,0	20 min	8	4700	18,0	14
E3	3,0	1,5 h	8	4700	18,0	10

Tabela 2 Resumo das condições experimentais dos ensaios inoculados com lodo anaeróbio.

Condição	Tempo de ciclo (h)	Tempo de enchimento	Número de ciclos (d)	Concentração afluyente (mgCar.L ⁻¹)	COV _C (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo de operação (d)
E4	4,0	20 min	6	2000	5,0	17
E5	4,0	2 h	6	4200	12,0	14
E6	4,0	2 h	6	5000	14,0	33
E7	2,0	20 min	12	3200	18,0	23
E8	2,0	1 h	12	3200	18,0	16

Foram verificados ainda os efeitos da concentração afluyente e do tempo de ciclo, variáveis intrínsecas à carga orgânica volumétrica aplicada, além do efeito da carga orgânica volumétrica aplicada. Foram avaliadas a estabilidade, a conversão de matéria orgânica e o rendimento molar de hidrogênio em função do substrato consumido e a produtividade molar para determinar a influência dessas variáveis sobre o reator.

O reator foi monitorado a partir de coletas do afluyente e efluyente durante quatro vezes por semana. Nessas amostras foram avaliados os parâmetros apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros de monitoramento do reator AnSBBR.

Parâmetros	Local da Coleta	Referências
Alcalinidade/AVT	Afluente e efluente	Ripley et al. (1986)
Carboidratos	Afluente e efluente	Dubois et al. (1956)
DQO	Afluente e efluente	APHA
pH	Afluente e efluente	APHA
Série de sólidos	Efluente	APHA
Ácidos orgânicos voláteis	Afluente e efluente	Lazaro et al. (2012) Penteado et al. (2013)
Volume de biogás	Saída de gás	
Composição do biogás	Saída de gás	Penteado et al. (2013)

4.6 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa aderida ao material suporte foi realizada após o término de cada condição experimental de acordo com a metodologia de Manssouri (2012) e Inoue (2013). Foram quantificados o volume de meio reacional (V_R) e a biomassa suspensa presente no líquido bem como a mistura suporte inerte mais biomassa (M_{T-SI+B}) e a biomassa aderida ao suporte (M_{A-SI+B}).

Após a completa mistura do suporte inerte mais biomassa (M_{T-SI+B}), foi coletada uma alíquota para determinação da quantidade de biomassa aderida ao suporte (M_{A-SI+B}). A amostra foi lavada com água destilada para remover todo o material aderido ao suporte. A partir das frações obtidas, foram determinados os sólidos totais (ST) da fase sólida, composta pelo material suporte (M_{A-SI}); e os sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT) da fase líquida, em que está contida a biomassa (M_{A-SVT}). A estimativa da quantidade de biomassa no reator foi realizada de três formas:

- i. Quantidade total de biomassa no reator (M_{SVT}), calculada de acordo com a Equação (7).

$$M_{SVT} = \frac{M_{A-SVT} \cdot M_{T-SI+B}}{M_{A-SI+B}} \quad (7)$$

- ii. Relação entre a quantidade de biomassa e o volume de meio líquido do reator (C_X), calculada conforme a Equação (8).

$$C_X = \frac{M_{SVT}}{V_R} \quad (8)$$

- iii. Relação entre a quantidade de biomassa e a quantidade de suporte inerte presente no reator ($C_{X'}$), conforme Equação 9.

$$C_{X'} = \frac{M_{A-SVT}}{M_{A-SI}} \quad (9)$$

A quantidade total de biomassa presente no reator (M_{SVT}) expressa a capacidade do sistema de reter biomassa, além de ser uma variável importante na determinação dos indicadores carga orgânica específica aplicada ($\text{gCarb.g}^{-1}\text{SVT.d}^{-1}$), carga orgânica específica removida ($\text{gCarb.g}^{-1}\text{SVT.d}^{-1}$) e produtividade molar específica ($\text{molH}_2.\text{kg}^{-1}\text{SVT.d}^{-1}$).

4.7 Métodos analíticos

As coletas do afluente e efluente foram realizadas no monitoramento do reator. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro de bancada Tec 3MP da marca Tecnal[®]. A demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e nitrogênio total Kjeldahl foram determinados pelos métodos preconizados pelo *Standards Methods for the Examination the Water and Wastewater* (EATON et al., 2005).

A concentração de açúcares totais (AT) foi quantificada de acordo com a metodologia de Dubois et al. (1956). A alcalinidade parcial (AP), alcalinidade intermediária (AI), alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP) e os ácidos voláteis totais (AVT) foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Ripley et al. (1986).

A quantificação dos ácidos orgânicos voláteis (acético, butírico, propiônico) e do ácido láctico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu[®] equipado com Coluna Aminex[®] HP-87H (300 mm x 7,8 mm Bio-Rad), forno CTO-20A a temperatura de 64 °C, controlador CBM-20A, detector UV com arranjo de diodos SPD-20A em comprimento de onda de 208 nm e bomba LC-20AT. A fase móvel foi composta por água ultrapura Milli-Q (Millipore[®]) acidificada com 0,005 M de H₂SO₄ em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20µL (LAZARO et al., 2012; PENTEADO et al., 2013). As amostras

que compunham o afluente e o efluente do reator AnSBBR foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μm e acidificadas com solução de H_2SO_4 (2 M).

Para a análise qualitativa do biogás, alíquotas do gás foram coletadas em seringa com dispositivo de trava (Sigma[®]), diretamente da mangueira que liga a saída de gás do reator ao gasômetro. Os constituintes do biogás (hidrogênio, dióxido de carbono e metano) foram determinados por cromatografia gasosa em sistema Shimadzu[®] 2010, equipado com coluna capilar Carboxen[®] 1010 plot (30 m x 0,53 mm x 0,30 μm). O argônio com vazão de ar de make-up de 8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi utilizado como gás de arraste. Foram injetados 500 μL de amostra e a temperatura do injetor foi ajustada para 200 °C. A detecção foi realizada em detector de condutividade térmica (TCD) à temperatura de 230 °C. O forno foi programado para operar à temperatura inicial de 130 °C e aquecido a 135 °C a uma taxa de 46 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ durante 6 minutos (PENTEADO et al., 2013).

Considerando-se que alguns trabalhos da literatura indicam que a presença da bacteriocina nisina, oriunda das bactérias lácticas, pode inibir a produção de hidrogênio e que os resíduos do processamento de mandioca, normalmente, apresentam grande relação com esses micro-organismos (GOMES et al., 2015), foi realizada a análise de nisina nos lotes do efluente coletado na indústria.

A quantificação da bacteriocina Nisina foi realizada de acordo com a metodologia de Smaoui et al. (2010) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu[®] equipado com Coluna de fase reversa C18 Gemini NX[®] (50 mm x 4,6 mm) Phenomenex, forno CTO-20A à temperatura de 30 °C; controlador CBM-20A; detector UV com arranjo de diodos SPD-20A em comprimento de onda de 280 nm e bomba LC-20AT com fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A fase móvel, composta pelas soluções A (99,9% H_2O e 0,1%TFA) e B (99,9% Acetonitrila e 0,1%TFA). Na eluição da amostra foi utilizado o seguinte gradiente: 0-5 min: 90% A e 10% B; 5-30 min: 50% A e 50% B; 30-35 min: 20% A e 80% B; 35-50 min: 10% A e 90% B e de 50-60 min: 90% A e 10% B. A curva de calibração foi construída a partir da diluição do padrão de Nisina 2,5% (Sigma-Aldrich) em solução de HCl 0,02 N. As amostras do afluente e efluente do reator AnSBBR foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μm e diluídas em solução de HCl 0,02 N.

4.8 Fundamentos teóricos

A fundamentação teórica para quantificação dos parâmetros de avaliação do reator AnSBBR tem como base os métodos propostos por Manssouri et al. (2013) e Inoue et al. (2014). A determinação da eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO e de carboidratos em amostras não filtradas (ϵ_{ST} e ϵ_{CT}) será calculada de acordo com as Equações

(10) e (11). Em que, C_{SAFL} e C_{CAFL} são as concentrações de DQO e carboidratos em amostras do afluente e C_{ST} e C_{CT} referem-se às concentrações de DQO e carboidratos em amostras do efluente.

$$\varepsilon_{ST}(\%) = \frac{C_{SAFL} - C_{ST}}{C_{SAFL}} \cdot 100 \quad (10)$$

$$\varepsilon_{CT}(\%) = \frac{C_{CAFL} - C_{CT}}{C_{CAFL}} \cdot 100 \quad (11)$$

A eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO e de carboidratos em amostras filtradas (ε_{SF} e ε_{CF}) será calculada de acordo com as Equações (12) e (13). Em que, C_{SF} e C_{CF} são as concentrações de DQO e carboidratos em amostras filtradas do efluente.

$$\varepsilon_{SF}(\%) = \frac{C_{SAFL} - C_{SF}}{C_{SAFL}} \cdot 100 \quad (12)$$

$$\varepsilon_{CF}(\%) = \frac{C_{CAFL} - C_{CF}}{C_{CAFL}} \cdot 100 \quad (13)$$

As Cargas orgânicas volumétricas aplicadas (COV_S e COV_C) são definidas como a quantidade de matéria orgânica, em termos de DQO ou de carboidratos, aplicadas ao reator em função do tempo e do volume de meio do reator, expressas por $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ ou $gCarb.L^{-1}.d^{-1}$. Em reatores operados em batelada, o cálculo da carga orgânica volumétrica aplicada é realizado de acordo com as Equações (14) e (15), em que, V_A corresponde ao volume de água residuária alimentado ao reator por ciclo, N é o número de ciclos por dia e V_R é o volume total de água residuária contida no reator por ciclo.

$$COV_S = \frac{(V_A \cdot N) \cdot C_{SAFL}}{V_R} \quad (14)$$

$$COV_C = \frac{(V_A \cdot N) \cdot C_{CAFL}}{V_R} \quad (15)$$

As cargas orgânicas específicas aplicadas (COE_S e COE_C) são definidas como a quantidade de matéria orgânica, em termos de DQO ou de carboidratos, aplicada ao reator

em função do tempo e da massa de sólidos totais voláteis no reator, expressas por $\text{gDQO.gSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ou $\text{gCarb.gSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Em reatores operados em batelada, o cálculo da carga orgânica específica aplicada é realizado de acordo com as Equações (16) e (17).

$$\text{COEA}_S = \frac{(V_A \cdot N) \cdot C_{\text{SAFL}}}{M_{\text{SVT}}} \quad (16)$$

$$\text{COEA}_C = \frac{(V_A \cdot N) \cdot C_{\text{CAFL}}}{M_{\text{SVT}}} \quad (17)$$

As cargas orgânicas volumétricas removidas de amostras filtradas, COVR_S e COVR_C , são definidas como a quantidade de matéria orgânica, em DQO ou carboidratos, removida no reator por unidade de tempo e por volume de reator ($\text{gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ou $\text{gCarb.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Para reatores operados em batelada são calculadas pelas Equações (18) e (19).

$$\text{COVR}_S = \frac{(V_A \cdot N) \cdot (C_{\text{SAFL}} - C_{\text{SF}})}{V_R} \quad (18)$$

$$\text{COVR}_C = \frac{(V_A \cdot N) \cdot (C_{\text{CAFL}} - C_{\text{CF}})}{V_R} \quad (19)$$

A carga orgânica específica removida de amostras filtradas, COER_S e COER_C , é definida como a quantidade de matéria orgânica, em DQO ou carboidratos, removida pelo reator por unidade de tempo e por massa de sólidos voláteis no reator ($\text{gDQO.gSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ou $\text{gCarb.gSVT}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Para reatores operados em batelada são calculadas pelas Equações (20) e (21).

$$\text{COER}_S = \frac{(V_A \cdot N) \cdot (C_{\text{SAFL}} - C_{\text{SF}})}{M_{\text{SVT}}} \quad (20)$$

$$\text{COER}_C = \frac{(V_A \cdot N) \cdot (C_{\text{CAFL}} - C_{\text{CF}})}{M_{\text{SVT}}} \quad (21)$$

A produtividade molar volumétrica (PrM) é definida como a quantidade de hidrogênio (H₂) gerada em função da unidade de tempo e volume útil do reator (molH₂.m⁻³.d⁻¹). É calculada pela Equação (22), na qual n_{H₂} é a quantidade molar de hidrogênio produzido por dia e V_R é o volume total de água residuária no reator por ciclo.

$$\text{PrM} = \frac{n_{\text{H}_2}}{V_R} \quad (22)$$

A produtividade molar específica (PrME) é definida como a quantidade de hidrogênio (H₂) gerada em função da unidade de tempo e por massa de sólidos voláteis totais no reator (molH₂.kgSVT⁻¹.d⁻¹), calculada pela Equação (23).

$$\text{PrME} = \frac{n_{\text{H}_2}}{M_{\text{SVT}}} \quad (23)$$

O rendimento entre hidrogênio (molar) produzido e matéria orgânica (massa) aplicada na forma de DQO (RMCA_{S,m}) é definido pela quantidade de hidrogênio (H₂) produzido (mol) pela quantidade de matéria orgânica aplicada (massa) e expressa em molH₂.kgDQO⁻¹, calculada de acordo com a Equação (24).

$$\text{RMCA}_{S,m} = \frac{n_{\text{H}_2}}{N \cdot V_A \cdot C_{\text{SAFL}}} \quad (24)$$

O rendimento entre hidrogênio (molar) produzido e matéria orgânica (molar ou massa) aplicada na forma de carboidratos (RMCA) é definido pela quantidade de hidrogênio (H₂) produzido (mol) pela quantidade de matéria orgânica aplicada (massa, em mol ou kg de AT), ou seja, RMCA_{C,m}, expressa em molH₂.kgCarb⁻¹ e RMCA_{C,n} em molH₂.molCarb⁻¹, calculada de acordo com a Equação (25).

$$\text{RMCA} = \frac{n_{\text{H}_2}}{N \cdot V_A \cdot C_{\text{CAFL}}} \quad (25)$$

O rendimento entre hidrogênio (molar) produzido e matéria orgânica (massa) removida na forma de DQO ($RMCR_{S,m}$) é definido pela quantidade de hidrogênio (H_2) produzida pela quantidade de matéria orgânica removida ($molH_2.kgDQO^{-1}$), calculada pela Equação (26).

$$RMCR_{S,m} = \frac{n_{H_2}}{N \cdot V_A (C_{SAFL} - C_{SF})} \quad (26)$$

O rendimento entre hidrogênio (molar) produzido e matéria orgânica (molar ou massa) removida na forma de carboidratos (RMCR) é definido pela quantidade de hidrogênio (H_2) produzida (mol) pela quantidade de matéria orgânica removida (em mol ou kg de AT), ou seja, $RMCR_{C,m}$ em $molH_2.kgCarb^{-1}$ e $RMCR_{C,n}$ em $molH_2.molCarb^{-1}$, calculado pela Equação (27).

$$RMCR = \frac{n_{H_2}}{N \cdot V_A (C_{CAFL} - C_{CF})} \quad (27)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como previamente descrito, oito ensaios foram conduzidos para avaliar a produção de biohidrogênio em reator AnSBBR a partir de água residuária de fecularia de mandioca, nos quais foram utilizados como inóculo a água residuária autofermentada (E1; E2 e E3) e lodo anaeróbio termicamente tratado (E4; E5; E6; E7 e E8). As cargas orgânicas aplicadas a cada ensaio (5; 12; 14 e 18 g.L⁻¹.d⁻¹) foram calculadas em função da concentração afluyente (2000; 3200; 4200; 4700 e 5000 mgCarb.L⁻¹) e do tempo de ciclo (4; 3 e 2 h). O tempo de enchimento do reator variou conforme a estratégia de alimentação adotada: batelada (20 min) ou batelada alimentada (2,0; 1,5 e 1,0 h).

A falta de estabilidade operacional verificada em todos os ensaios pode estar relacionada à grande variabilidade verificada na composição da água residuária de fecularia. As características do resíduo são afetadas pela origem e qualidade da mandioca, pelo tempo decorrido entre o transporte e o processamento da raiz e pela tecnologia empregada na extração da fécula. A caracterização físico-química da água residuária de fecularia de mandioca utilizada na alimentação do reator no decorrer do experimento está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 Caracterização físico-química da água residuária de fecularia de mandioca.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
pH (u)	4,9	1,0	4,1	6,1
DQO (mg.L ⁻¹)	11820	3927	7214	15951
Carboidratos totais (mg.L ⁻¹)	6428	3521	296	11816
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	8841	2421	6850	11617
Sólidos totais voláteis (mg.L ⁻¹)	7621	2004	5920	10340

A dificuldade para se atingir o estado estacionário também pode estar associada à presença de micro-organismos oriundos do próprio resíduo e, conseqüentemente, sua introdução no reator pela alimentação. Nos resíduos do processamento da mandioca, estima-se que a contagem de bactérias lácticas possa variar entre 10⁶ e 10⁹ UFC g⁻¹ (CRISPIM et al., 2013; ROSA et al., 2016). Possivelmente, sua persistência no reator se deve à capacidade de crescerem em amplas faixas de pH (3,5 – 10,0) e de temperatura (5 – 45 °C) (ABDEL-RAHMAN et al., 2013) e de se manterem viáveis mesmo após submetidas ao congelamento (LIU et al., 2009). As concentrações médias dos metabólitos solúveis quantificados no afluyente estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Metabólitos solúveis quantificados na água residuária de fecularia de mandioca.

Ensaio	Metabólitos			
	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Fórmico	Nisina
E1	1226±223 ⁽⁷⁾	237±42 ⁽⁶⁾	-	504±94 ⁽⁵⁾
E2	3420±418 ⁽⁹⁾	278±50 ⁽⁹⁾	-	517±46 ⁽⁴⁾
E3	1696±146 ⁽²⁾	194±10 ⁽²⁾	-	219±248 ⁽⁴⁾
E4	639±328 ⁽⁹⁾	271±149 ⁽⁷⁾	-	268±18 ⁽⁴⁾
E5	2600±778 ⁽⁷⁾	148±22 ⁽⁵⁾	-	554±72 ⁽⁴⁾
E6	2523±1254 ⁽⁹⁾	309±201 ⁽⁸⁾	-	611±270 ⁽⁶⁾
E7	755±340 ⁽¹¹⁾	114±22 ⁽⁹⁾	95±10 ⁽¹⁰⁾	398±89 ⁽⁵⁾
E8	1111±349 ⁽¹²⁾	198±29 ⁽⁶⁾	-	383±277 ⁽⁵⁾

Os valores entre parênteses indicam o número de amostras utilizadas no cálculo da média

5.1 Ensaio inoculados com água residuária de fecularia de mandioca autofermentada

5.1.1 Avaliação da estabilidade operacional do reator

Os indicadores de estabilidade operacional e de eficiência na remoção de matéria orgânica nos ensaios E1, E2 e E3 estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Indicadores de estabilidade operacional e de eficiência de remoção de matéria orgânica nos ensaios E1, E2 e E3.

Parâmetros	Ensaio			
	E1	E2	E3	
pH efluente (u)	3,9±0,3 ⁽¹²⁾	3,9±0,3 ⁽⁸⁾	4,7±0,7 ⁽⁷⁾	
Acidez volátil (mg HAc.L ⁻¹)	890±236 ⁽¹²⁾	940±397 ⁽⁸⁾	772±399 ⁽⁷⁾	
Metabólitos intermediários (mg.L ⁻¹)	HLa	2217±909 ⁽¹⁴⁾	2297±263 ⁽⁹⁾	1679±143 ⁽⁶⁾
	HAc	486±156 ⁽¹⁴⁾	297±57 ⁽⁹⁾	391±167 ⁽⁶⁾
	HPr	366±83 ⁽⁴⁾	-	-
	Nisina	587±145 ⁽⁴⁾	419±29 ⁽⁴⁾	207±182 ⁽⁵⁾
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	3831±1124 ⁽¹²⁾	3744±622 ⁽⁸⁾	3611±924 ⁽⁷⁾	
Sólidos totais voláteis (mg.L ⁻¹)	2707±1038 ⁽¹²⁾	2958±589 ⁽⁸⁾	2981±822 ⁽⁷⁾	
Sólidos suspensos totais (mg.L ⁻¹)	337±159 ⁽¹²⁾	442±328 ⁽⁷⁾	688 ⁽¹⁾	
Sólidos suspensos voláteis (mg.L ⁻¹)	291±152 ⁽¹²⁾	371±273 ⁽⁷⁾	572 ⁽¹⁾	
Remoção de DQO ($\epsilon_{SF}\%$)	19±11 ⁽⁶⁾	47±32 ⁽⁴⁾	7,0±8,0 ⁽⁴⁾	
Remoção Carboidratos ($\epsilon_{CF}\%$)	82±4,0 ⁽¹³⁾	79 ±11 ⁽⁶⁾	99 ±0,4 ⁽⁵⁾	
COVA _S (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	20,0	27,0	20,0	
COVR _S (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	2,6	8,0	1,4	
COVA _C (gCarb.L ⁻¹ .d ⁻¹)	12,0	18,0	18,0	
COVR _C (gCarb.L ⁻¹ .d ⁻¹)	7,5	16,0	11,0	
COEA _S (gDQO.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,3	0,3	0,3	
COER _S (gDQO.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,04	0,07	0,02	
COEA _C (gCarb.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,2	0,2	0,3	
COER _C (gCarb.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,1	0,1	0,2	

Os valores entre parênteses indicam o número de amostras utilizadas no cálculo da média; COVA - Carga orgânica volumétrica aplicada; COVR - Carga orgânica volumétrica removida; COEA - Carga orgânica específica aplicada; COER - Carga orgânica específica removida.

Nos ensaios E1, E2 e E3, verificou-se que os valores do pH do efluente estiveram diretamente relacionados à estratégia de alimentação adotada. Em E1 e E2, o tempo de enchimento do reator foi de 20 min, caracterizando-se uma batelada. Nesses ensaios, houve diminuição do tempo de ciclo (4 para 3 horas) e aumento da concentração afluyente (4200 para 4700 mg.L⁻¹) e da carga orgânica volumétrica aplicada (12 para 18 g.L⁻¹.d⁻¹) e, em ambos, foi observado pH médio de 3,9. Em E3, foram aplicadas as mesmas condições operacionais impostas a E2, no entanto, variou-se a estratégia de alimentação, que passou a ser realizada durante 50% do tempo total de ciclo (1,5 h). Houve aumento do pH efluente médio para 4,7 com o aumento do tempo de enchimento. Os valores de pH no afluyente e efluente dos ensaios E1, E2 e E3 estão apresentados na Figura 6.

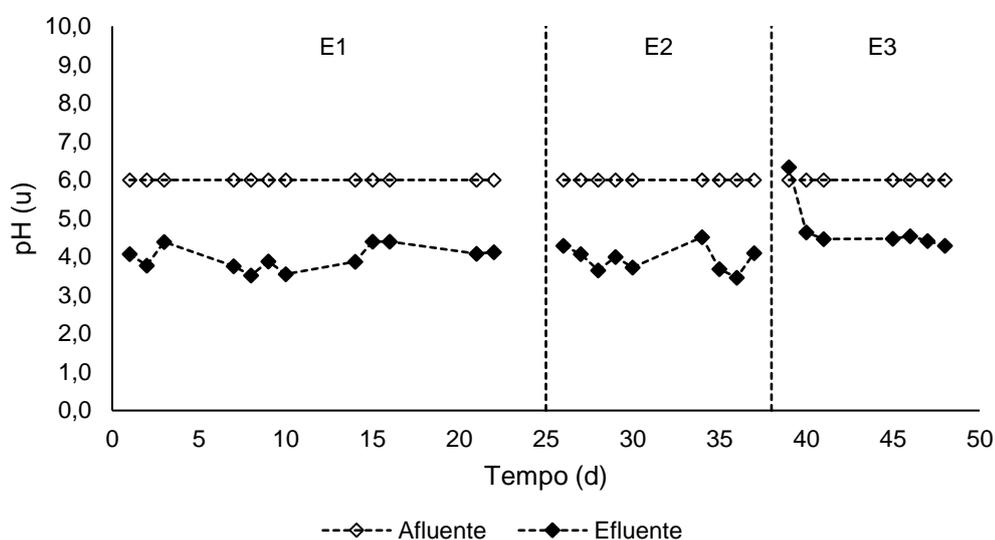


Figura 6 Valores de pH afluyente e efluente nos ensaios E1, E2 e E3.

O aumento da carga orgânica volumétrica de 12 g.L⁻¹.d⁻¹ (E1) para 18 g.L⁻¹.d⁻¹ (E2) ocasionou um ligeiro aumento da acidez volátil de 890 para 940 mgHAc.L⁻¹. No ensaio E3, a distribuição progressiva do substrato no reator, devido ao maior tempo de enchimento, acarretou na redução da concentração de ácidos voláteis para 772 mgHAc.L⁻¹. As oscilações mais significativas na concentração dos ácidos voláteis foram verificadas com a aplicação da carga orgânica de 18 g.L⁻¹.d⁻¹, e foram observadas variações, em torno dos valores médios, de 42 e 52% em E2 e E3, respectivamente. Os valores de acidez volátil total no efluente dos ensaios E1, E2 e E3 estão apresentados na Figura 7.

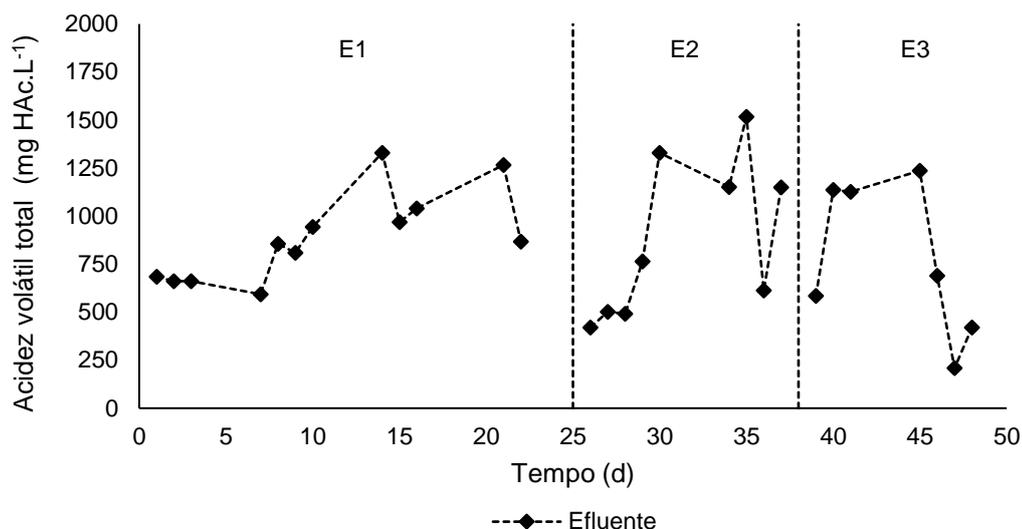


Figura 7 Valores de acidez volátil total no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.

Esses resultados sugerem que a conversão gradual do substrato, ocasionada pelo aumento do tempo de enchimento, tenha colaborado para minimizar o acúmulo de ácidos voláteis e a redução do pH. Em E1 e E2, ensaios com menor tempo de enchimento (20 min), houve decréscimo do pH para valores de até 3,5. No entanto, o maior tempo de enchimento e o aumento na oferta de substrato podem ter contribuído com o desenvolvimento de microorganismos competidores, levando à instabilidade operacional.

Os principais produtos do metabolismo fermentativo nos ensaios inoculados com o autofermentado foram os ácidos láctico, acético e propiônico. Durante o período de operação do ensaio E1, a proporção do ácido acético aumentou à medida que a de ácido láctico diminuiu, o que pode indicar o consumo desse metabólito e a conversão em outros produtos da fermentação. A presença do ácido propiônico foi verificada apenas ao término do período experimental. A distribuição dos metabólitos em E1 é consistente com o padrão de fermentação observado por Kandler et al. (1983). Esses autores verificaram que em culturas de *Lactobacillus bifermens*, o lactato foi convertido a ácido acético, ácido propiônico, CO₂ e H₂. Na literatura, há trabalhos que associam a produção de hidrogênio a algumas espécies do gênero *Lactobacillus* (YANG et al., 2007) bem como a coexistência desses microorganismos com bactérias do gênero *Clostridium sp.* em culturas mistas (KAWANO et al., 2004).

Em E2 e E3, o padrão de fermentação apresentou comportamento semelhante em ambos os ensaios, todavia, apenas os ácidos láctico e acético foram verificados no efluente. E houve discreta diminuição da concentração do ácido láctico (Figura 3) com o aumento do tempo de enchimento em E3. As bactérias lácticas compõem a microflora nativa da mandioca

(AKINGBALA et al., 2005; RAY; ROSALES-SOTO et al., 2016) e sua presença tem sido relacionada às reduções significativas ou, até mesmo, à inibição na produção de hidrogênio em culturas mistas (NOIKE et al., 2002; BAGHCHEHSARAEI, et al., 2008; CISNERO-PÉREZ, et al., 2015; GOMES et al., 2016). Além de competirem com os micro-organismos produtores de hidrogênio por substrato (SAADY, 2013), as bactérias lácticas inibem o desenvolvimento de outros micro-organismos pela produção de toxinas (ROGERS, 1928).

A presença da bacteriocina nisina foi verificada no afluente (Tabela 5) e efluente (Tabela 6) de todas as condições estudadas. No efluente dos ensaios E1, E2 e E3 foram verificadas concentrações de nisina de 587; 419 e 207 mg.L⁻¹, compondo 16; 14 e 9% do total dos metabólitos solúveis quantificados, respectivamente. A proporção de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 8.

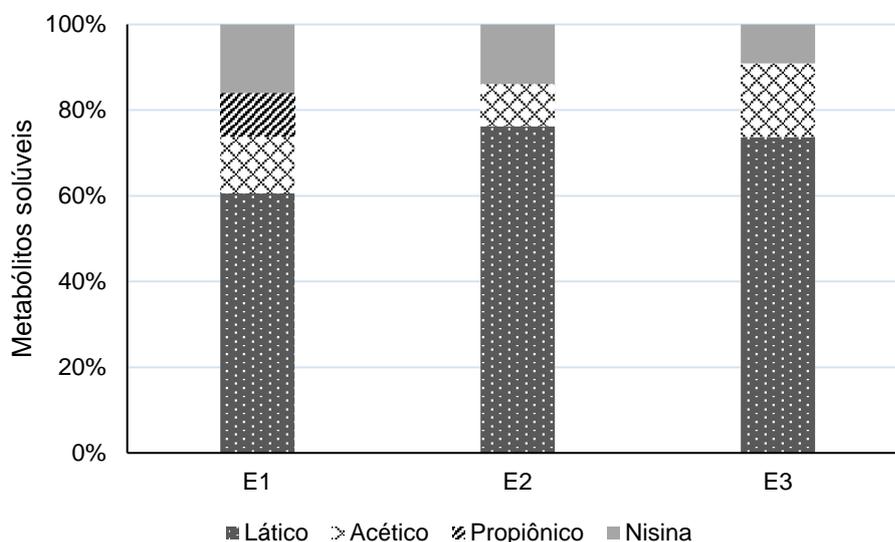


Figura 8 Proporção de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.

A produção de hidrogênio não foi inibida apesar das elevadas concentrações de nisina verificadas em E1. Além da possibilidade de uma rota alternativa, a produção de hidrogênio nesse ensaio pode ter sido favorecida pelas menores proporções de ácido láctico no efluente (60%). Em contrapartida, não foi observada a presença de hidrogênio no biogás em E2 e E3, porém, foram verificadas as menores concentrações de nisina. Esse comportamento sugere que a inibição possa estar relacionada às elevadas proporções de ácido láctico no efluente dos ensaios E2 (88%) e E3 (81%).

No efluente dos ensaios E1, E2 e E3, foram quantificadas concentrações de sólidos voláteis totais de 2707; 2958 e 2981 mgSTV.L⁻¹. Essa fração dos sólidos corresponde a todo material orgânico que compõe a amostra. Nos respectivos ensaios, a proporção de sólidos voláteis foi equivalente a 70; 79 e 82,5% dos sólidos totais. Tais valores indicam que, nos

ensaios E2 e E3 conduzidos no menor tempo de ciclo (3 h) e com maior carga orgânica aplicada ($18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), foi verificado maior arraste de material orgânico no efluente do reator. A concentração de sólidos voláteis totais no efluente dos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 9.

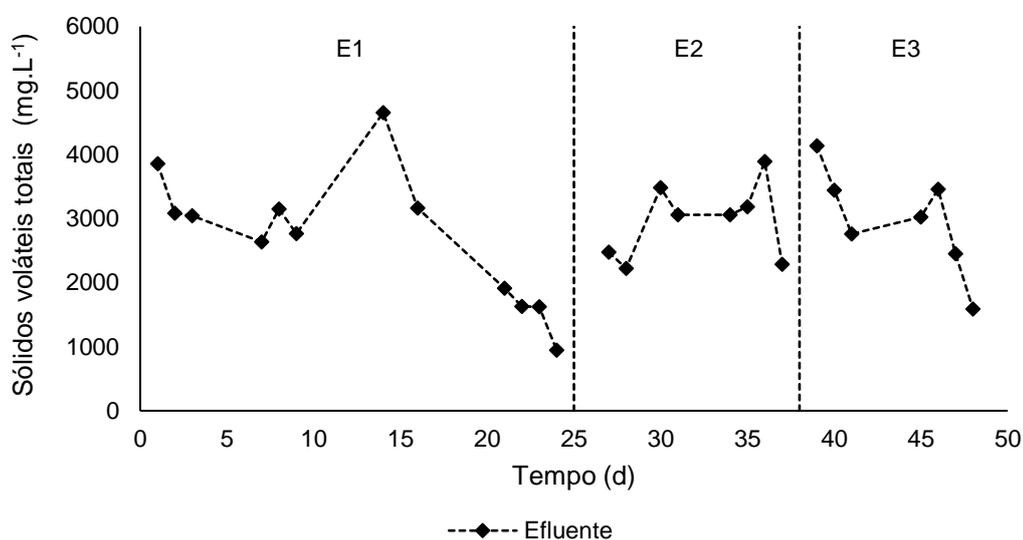


Figura 9 Concentração de sólidos voláteis totais no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.

A partir dos sólidos suspensos voláteis, é possível estimar a concentração de micro-organismos no efluente do reator. Nos ensaios E1, E2 e E3 foram verificadas concentrações médias de sólidos suspensos voláteis de 291; 371 e 572 gSSV.L^{-1} , respectivamente. A proporção de sólidos voláteis em relação aos totais foi superior a 83% em todas as condições estudadas. Em E1 e E2, o aumento da carga orgânica (de 12 para $18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e a diminuição do tempo de ciclo (de 4 para 3 h) ocasionou aumento de 20% na concentração de SSV no efluente do reator. O aumento do tempo de enchimento em E3 (de 20 min para 1,5 h) acarretou em acréscimos de 35 e 49% na concentração de SSV no efluente dos ensaios E2 e E3, respectivamente. A concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente dos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 10.

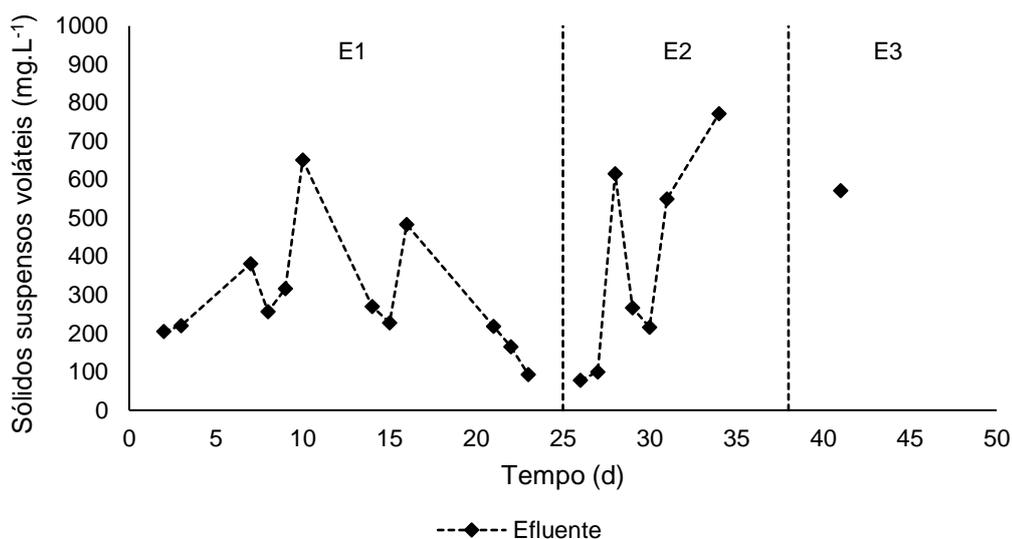


Figura 10 Concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente dos ensaios E1, E2 e E3.

Ao término de cada condição experimental foi mensurada a concentração da biomassa retida no reator. Nos ensaios E1, E2 e E3 foram verificadas relações biomassa/suporte de 0,2; 0,25 e 0,3 gSVT.g⁻¹suporte, indicando que o crescimento da biomassa esteve diretamente relacionado ao aumento da carga orgânica volumétrica aplicada e ao aumento do tempo de enchimento do reator. Manssouri et al. (2013) trabalharam em reator AnSBBR alimentado com água residuária sintética e submetido a condições operacionais semelhantes e observaram relações biomassa/suporte de 0,02 gSVT.g⁻¹suporte, ou seja, concentrações de 8 a 15 vezes menores do que as observadas em E1, E2 e E3. A concentração celular tem implicações diretas sobre a carga orgânica específica aplicada, ou seja, a oferta de substrato é diretamente proporcional à quantidade de biomassa no reator. A conversão da matéria orgânica é direcionada para o crescimento celular com a escassez de substrato, em detrimento dos produtos do metabolismo intermediário, entre eles o hidrogênio. As elevadas relações biomassa/suporte acarretaram em cargas orgânicas específicas aplicadas (COEA) de 0,3 gDQO.g⁻¹SVT.d⁻¹ (E1, E2 e E3); 0,2 gCarb.g⁻¹SVT.d⁻¹ (E1 e E2) e de 0,3 gCarb.g⁻¹SVT.d⁻¹ (E3).

5.1.2 Eficiência de remoção de matéria orgânica

Normalmente, baixas eficiências na remoção de DQO são observadas em reatores acidogênicos, uma vez que a matéria orgânica, convertida em produtos do metabolismo intermediário, como ácidos orgânicos voláteis e álcoois, permanece no sistema. Nos ensaios E1, E2 e E3, não foi possível determinar um padrão de comportamento quanto ao parâmetro eficiência de remoção de DQO, mas foram observadas grandes variações em torno dos

valores médios. No ensaio E1, foi verificada eficiência de remoção média de 19%. Esse valor é coerente com reatores AnSBBR operados sob as mesmas condições de carga orgânica aplicada e tempo de ciclo (MANSSOURI et al., 2013). Observou-se eficiência de remoção média de 47% em E2 (batelada) e de 7% em E3 (batelada alimentada) com o aumento da carga orgânica aplicada ($18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e a diminuição do tempo de ciclo (3 h). Conforme verificado por Inoue et al. (2014) em reatores AnSBBR operados sob as mesmas condições operacionais, variando-se, no entanto, a estratégia de alimentação, o tempo de enchimento não apresenta grandes efeitos sobre a remoção de DQO. Portanto, as elevadas eficiências na remoção de DQO verificadas em E2, pouco comuns em reatores destinados à produção de hidrogênio, podem estar relacionadas à ação de mecanismos não biológicos, como a incorporação da DQO solúvel ao lodo anaeróbio (CHERNICHARO, 2007). A eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO nos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 11.

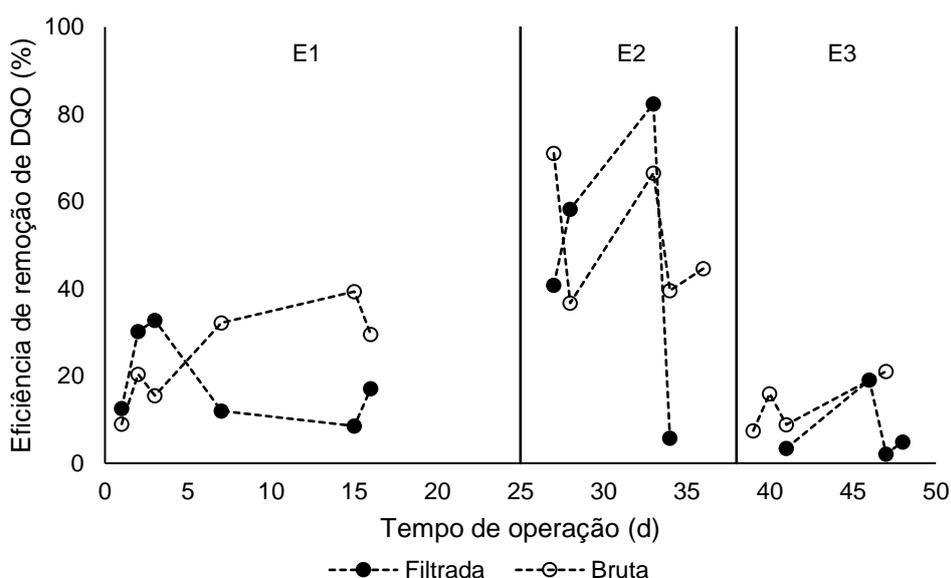


Figura 11 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO nos ensaios E1, E2 e E3.

Os açúcares são substratos preferenciais para o metabolismo bacteriano. Na água residuária de fecularia de mandioca, além de carboidratos complexos, há açúcares prontamente disponíveis, como glicose e frutose (DAMASCENO et al., 2003). Isso indica que a hidrólise do amido pode se iniciar antes da alimentação do reator, durante as etapas de coleta e armazenamento do resíduo. Ao serem comparados os ensaios E1 e E2, verifica-se que houve discreto aumento na conversão de carboidratos quando o reator foi operado no maior tempo de ciclo (4 h) e com menor carga orgânica aplicada ($12 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), cujas eficiências de remoção obtidas foram 82 e 79%, respectivamente. Em relação aos ensaios E2 e E3,

operados sob as mesmas condições operacionais, variando-se a estratégia de alimentação, observa-se que, em E3, o enchimento do reator durante um período equivalente a 50% do tempo total de ciclo (1,5 h) acarretou em eficiência de 99% na remoção de carboidratos. O aumento do tempo de enchimento do reator, mesmo com menor tempo de ciclo (3 h) e maior carga orgânica aplicada ($18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), pode ter proporcionado a degradação do amido de forma mais eficiente e estável, uma vez que sua disponibilidade está condicionada à quebra da molécula em açúcares menores. A eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de carboidratos nos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 12.

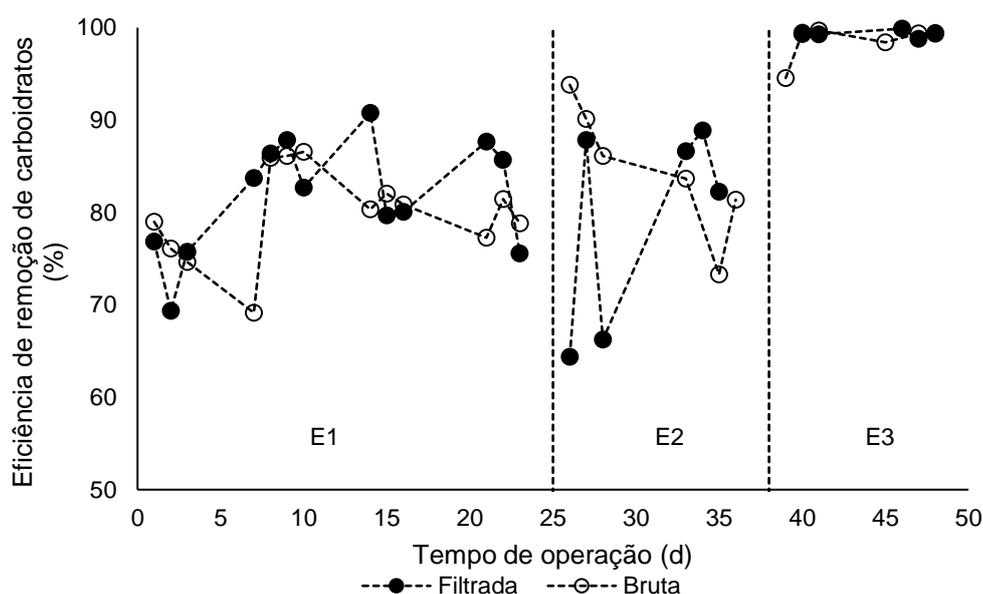


Figura 12 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de carboidratos nos ensaios E1, E2 e E3.

5.1.3 Avaliação da produção de hidrogênio

A presença de hidrogênio no biogás foi verificada apenas no ensaio E1. Nos ensaios E2 e E3, o biogás foi composto apenas por dióxido de carbono. A produção de metano no biogás não foi observada em quaisquer dos ensaios. Os indicadores de desempenho vazão molar, produtividade, rendimento, produção volumétrica e composição do biogás estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Resumo dos indicadores de desempenho nos ensaios E1, E2 e E3.

Parâmetros*	E1	E2	E3
n (mmolH ₂ .d ⁻¹)	47,0	-	-
PrM (molH ₂ .m ⁻³ .d ⁻¹)	11,0	-	-
PrME (molH ₂ .kgSVT.d ⁻¹)	0,2	-	-
RMCA _S (molH ₂ .kg ⁻¹ DQO)	1,9	-	-
RMCR _S (molH ₂ .kg ⁻¹ DQO)	0,1	-	-
RMCA _C (molH ₂ .kg ⁻¹ Carb)	4,9	-	-
RMCR _C (molH ₂ .kg ⁻¹ Carb)	11,7	-	-
PVH (LH ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	0,9	-	-
PVB (L _{biogás} .L ⁻¹ .d ⁻¹)	2,8	2,7	3,3
Composição do biogás	H ₂ (%)	35	-
	CO ₂ (%)	65	-

*Valores máximos; PrM - Produtividade molar volumétrica; PrME - Produtividade molar específica; RMCA - Rendimento molar por carga aplicada; RMCR - Rendimento molar por carga removida; PVH - Produção volumétrica de hidrogênio; PVB - Produção volumétrica de biogás.

A produção de biohidrogênio foi verificada apenas no ensaio E1, em que foi verificada vazão molar de hidrogênio máxima de 47 mmolH₂.d⁻¹. O parâmetro produtividade relaciona a vazão molar de hidrogênio diária (mmol.d⁻¹) e o volume útil total do reator, indicando-se a capacidade do sistema de converter o substrato em produto. No presente ensaio, foram verificadas produtividade molar máxima de 11 molH₂.m⁻³.d⁻¹ e produtividade molar específica de 0,2 molH₂.kgSVT.d⁻¹. Apesar do processo não sofrer completa inibição da produção de hidrogênio, como verificado nos ensaios E2 e E3, a presença de competidores no reator, oriundos tanto do inóculo quanto da alimentação, podem ter colaborado com a diminuição na oferta de substrato, e, conseqüentemente, reduzido a porção de matéria orgânica destinada a produção de hidrogênio. Os valores obtidos de produtividade molar específica apoiam essa hipótese, de que a elevada concentração celular no reator (0,2 g⁻¹SVT.g⁻¹suporte) ocasionou reduções significativas na concentração de substrato. E o resultado em cargas orgânicas específicas foram 0,3 gDQO.g⁻¹SVT.d⁻¹ e 0,2 gCarb.g⁻¹SVT.d⁻¹, os quais colaboraram, dessa

forma, para diminuir substancialmente a geração de hidrogênio. A vazão molar de hidrogênio nos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 13.

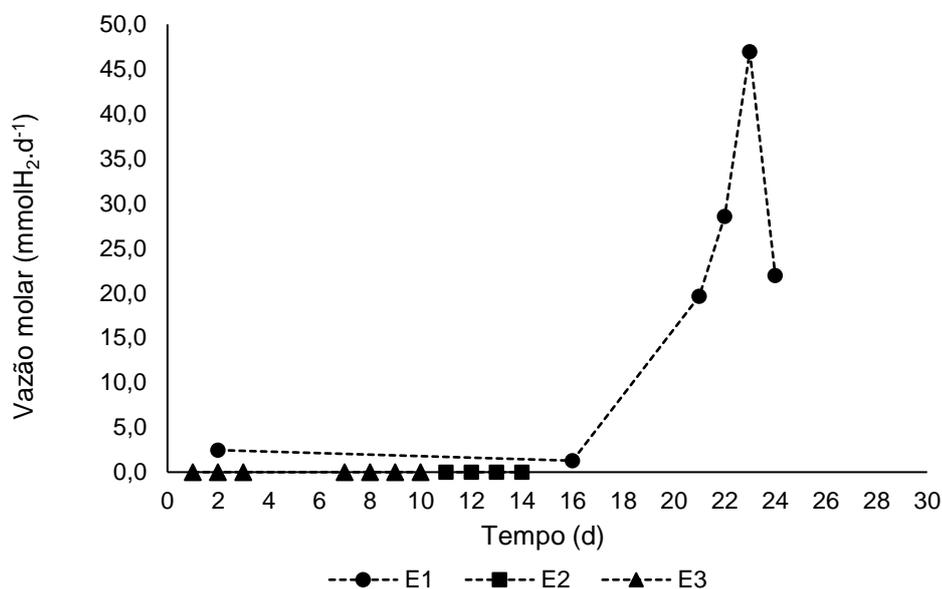


Figura 13 Vazão molar de hidrogênio nos ensaios E1, E2 e E3.

É possível estimar a produção molar de hidrogênio em razão das cargas orgânicas implementadas, na forma de DQO e carboidratos pelo indicador “rendimento”. Em função da carga orgânica aplicada, foram obtidos rendimentos de $1,9 \text{ molH}_2.\text{kg}^{-1}\text{DQO}$ e de $4,9 \text{ molH}_2.\text{kg}^{-1}\text{Carb}$. Com relação à carga orgânica removida, em que é considerado o substrato efetivamente consumido, foram obtidos rendimentos de $0,1 \text{ molH}_2.\text{kg}^{-1}\text{DQO}$ e de $11,7 \text{ molH}_2.\text{kg}^{-1}\text{Carb}$. Baixos rendimentos molares foram verificados em termos de DQO, tanto na carga orgânica aplicada como na removida. O rendimento molar inexpressivo obtido a partir da carga orgânica removida pode estar relacionado às baixas eficiências de remoção de DQO (19%) em reatores acidogênicos. A medida que apenas uma pequena fração da DQO é removida e a porção remanescente permanece no reator na forma de outros produtos, os carboidratos são prontamente convertidos a produtos do metabolismo intermediário, como ácidos orgânicos e hidrogênio. O rendimento molar em função das cargas orgânicas aplicada e removida, em termos de carboidratos, apresenta comportamento inverso ao verificado na forma de DQO, com rendimento molar por carga removida quase três vezes superior ao da carga aplicada. Como citado anteriormente, esse aumento no rendimento pode ser explicado pela dinâmica de conversão dos carboidratos, que no ensaio E1 alcançou eficiências de remoção de até 90%. O rendimento molar de hidrogênio por cargas aplicada e removida, em termos de DQO e carboidratos, está apresentada na Figura 14.

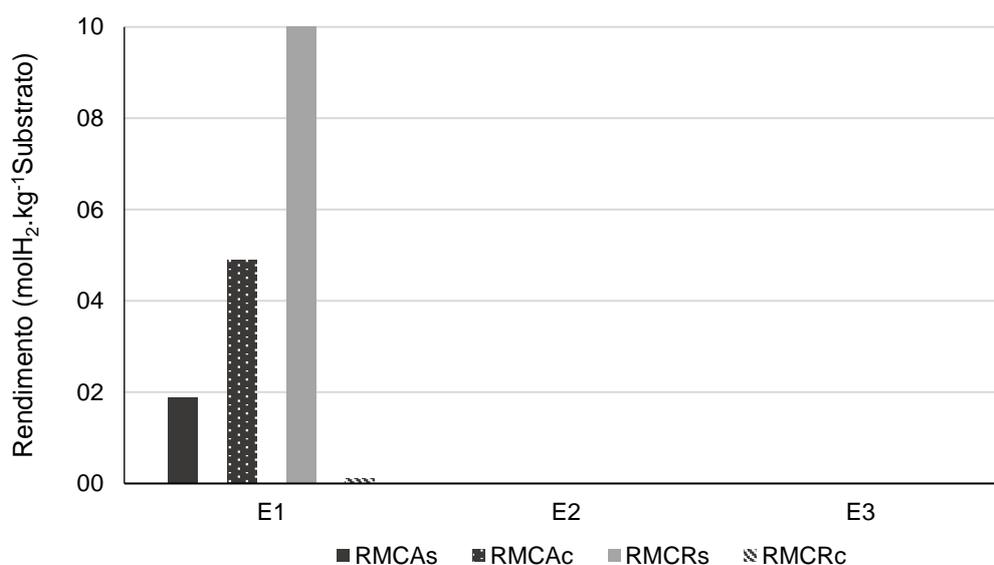


Figura 14 Rendimento molar de hidrogênio por cargas aplicada e removida, em termos de DQO e carboidratos nos ensaios E1, E2 e E3.

No ensaio E1, foram verificadas produções volumétricas de $0,9 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e de $2,8 \text{ L}_{\text{biogás}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, com percentuais máximos de hidrogênio no biogás de 35%. Apesar dos volumes de gás pouco expressivos, durante toda a condição experimental, os percentuais de hidrogênio no biogás não foram inferiores a 20%. Nos ensaios E1 e E2, foi observada discreta diminuição no volume de biogás gerado. A eficiência de conversão do substrato pode ter sido afetada pela redução no tempo de ciclo para 3 horas com o aumento da carga orgânica aplicada para $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, assim houve a produção de menores volumes de biogás. Nas condições em que foram aplicadas as mesmas condições operacionais (E2 e E3), o maior volume de biogás de $3,3 \text{ L}_{\text{biogás}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ foi observado quando o tempo de enchimento do reator aumentou de 20 min (E2) para 1,5 h (E3). A distribuição do substrato ao longo do ciclo pode ter colaborado com a degradação do amido, tornando-o disponível para ser metabolizado, e tal fato se refletiu em eficiências de remoção de carboidratos de 99%. A produção volumétrica de hidrogênio e de biogás nos ensaios E1, E2 e E3 estão apresentadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

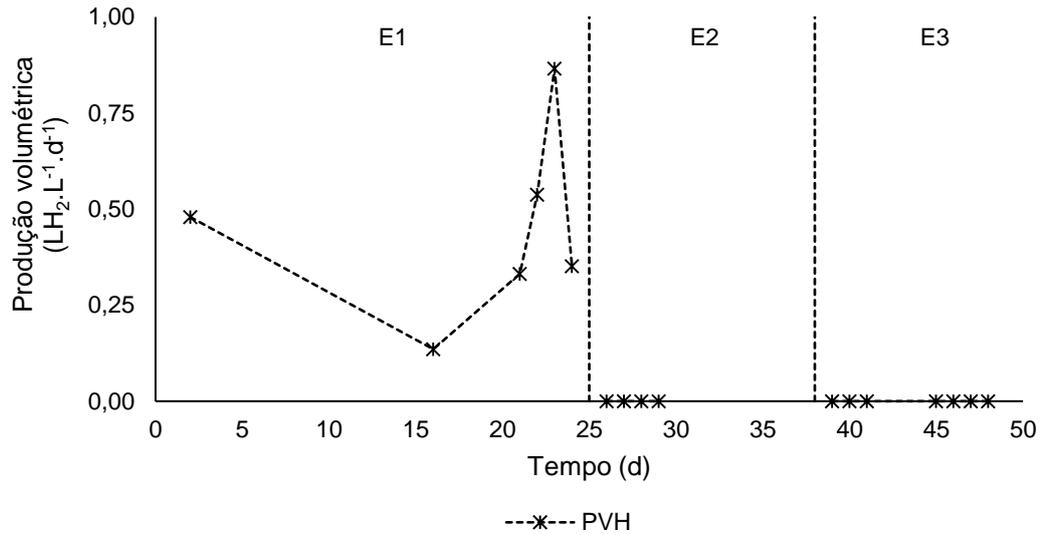


Figura 15 Variação da produção volumétrica de hidrogênio nos ensaios E1, E2 e E3.

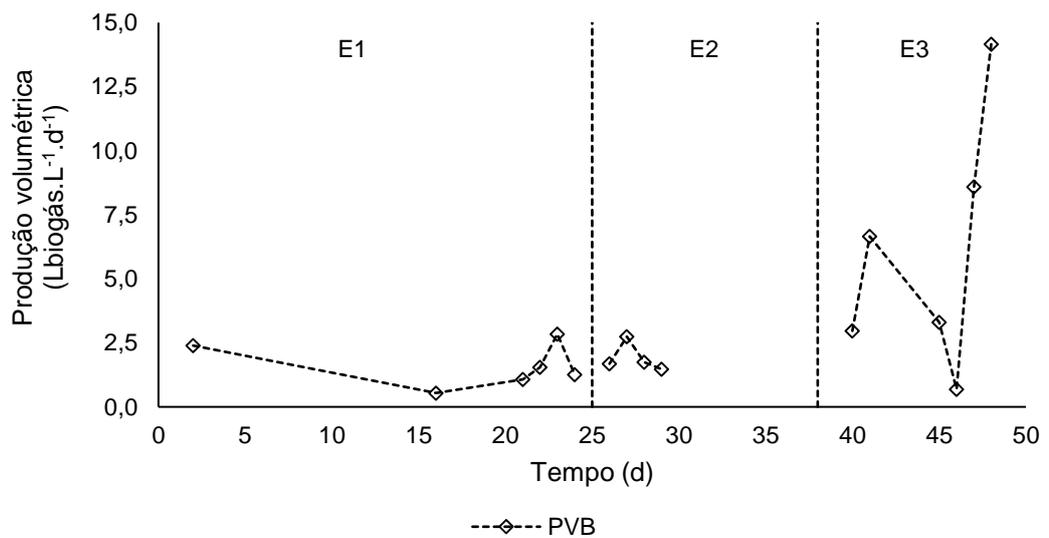


Figura 16 Variação da produção volumétrica do biogás nos ensaios E1, E2 e E3.

Em culturas mistas, a competição por substrato é um dos principais fatores associados ao baixo desempenho na produção de hidrogênio (NOIKE et al., 2002). A seleção de bactérias lácticas pode ter sido amplamente favorecida com o preparo do inóculo pela autofermentação da água residuária de fecularia. Isso prejudica o desenvolvimento de microorganismos produtores de hidrogênio, além do que a carga microbiana presente no afluente, principalmente em resíduos, pode gerar instabilidade no sistema devido às mudanças na dinâmica de colonização do reator (HUNG et al., 2011; CISNEROS-PÉREZ et al., 2015). O

consumo constante de carboidratos nos ensaios E2 (79%) e E3 (99%) e a ausência de hidrogênio no biogás são indicativos da presença de micro-organismos competidores. Diferentemente de E1, em ambos os ensaios, verificou-se que a concentração dos metabólitos solúveis no efluente manteve-se em níveis menores ou iguais aos do afluente. Portanto, as elevadas eficiências de remoção podem estar relacionadas à conversão do substrato em biomassa, uma vez que, nos respectivos ensaios, foram observadas concentrações celulares de 0,25 e 0,3 g⁻¹SVT.g⁻¹suporte e elevados teores de dióxido de carbono no biogás, condizentes com o crescimento celular. A composição do biogás nos ensaios E1, E2 e E3 está apresentada na Figura 17.

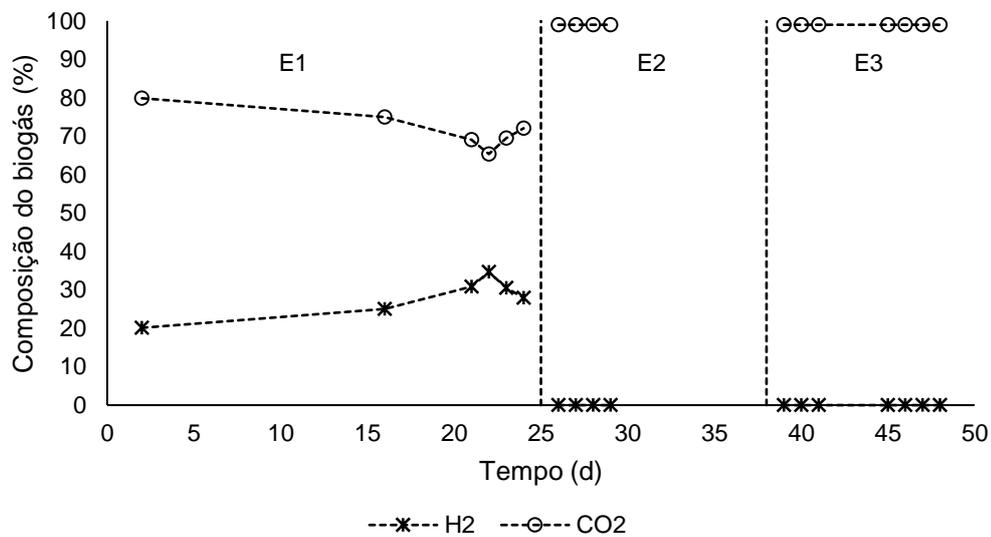


Figura 17 Composição do biogás nos ensaios E1, E2 e E3.

5.2 Ensaios inoculados com lodo anaeróbio submetido a pré-tratamento térmico

5.2.1 Avaliação da estabilidade operacional do reator

Os indicadores de estabilidade operacional e de eficiência na remoção de matéria orgânica estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 Indicadores de estabilidade operacional e eficiência de remoção da matéria orgânica nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Parâmetro	Ensaio				
	E4	E5	E6	E7	E8
pH efluente (u)	4,5±0,3 ⁽⁹⁾	4,6±0,2 ⁽⁷⁾	4,5±0,1 ⁽⁹⁾	4,6±0,4 ⁽¹²⁾	4,1±0,3 ⁽¹²⁾
Acidez volátil (mg HAc.L ⁻¹)	780±95 ⁽⁹⁾	1260±267 ⁽⁷⁾	2331±1132 ⁽⁹⁾	274±343 ⁽⁹⁾	1050±345 ⁽¹²⁾
HLa	1436±939 ⁽⁷⁾	1757±1290 ⁽⁶⁾	2435±1685 ⁽⁹⁾	1897±533 ⁽¹¹⁾	1883±585 ⁽¹²⁾
HAc	664±185 ⁽⁹⁾	715±174 ⁽⁵⁾	720±449 ⁽⁹⁾	358±137 ⁽¹¹⁾	490±176 ⁽¹²⁾
Metabólitos intermediários (mg.L ⁻¹)					
HBu	835±214 ⁽²⁾	856±166 ⁽⁴⁾	544±382 ⁽³⁾	339±76 ⁽⁵⁾	430±114 ⁽²⁾
HPr	460±105 ⁽⁵⁾	622±276 ⁽⁶⁾	535±272 ⁽⁵⁾	-	258±26 ⁽³⁾
Nisina	196±22 ⁽⁴⁾	411±43 ⁽⁴⁾	736±237 ⁽⁴⁾	398±89 ⁽⁵⁾	340±88 ⁽⁵⁾
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	1461±194 ⁽⁷⁾	2887±562 ⁽⁷⁾	5863±1748 ⁽⁸⁾	2601±499 ⁽¹²⁾	2598±625 ⁽⁹⁾
Sólidos voláteis totais (mg.L ⁻¹)	916±179 ⁽⁷⁾	1957±468 ⁽⁷⁾	3937±1179 ⁽⁸⁾	1779±394 ⁽¹²⁾	1992±586 ⁽⁹⁾
Sólidos suspensos totais (mg.L ⁻¹)	127±59 ⁽⁶⁾	366±381 ⁽⁶⁾	347±101 ⁽⁴⁾	70±33 ⁽⁷⁾	181±55 ⁽¹⁰⁾
Sólidos suspensos voláteis (mg.L ⁻¹)	117±55 ⁽⁶⁾	337±356 ⁽⁶⁾	319±96 ⁽⁴⁾	66±32 ⁽⁷⁾	166±45 ⁽¹⁰⁾
Remoção de DQO ($\epsilon_{SF}\%$)	16,5±13 ⁽⁴⁾	24±17 ⁽⁵⁾	35±20 ⁽⁶⁾	16,5±6,0 ⁽⁵⁾	24±16 ⁽⁷⁾
Remoção Carboidratos ($\epsilon_{CF}\%$)	94±4,0 ⁽⁸⁾	93±4,7 ⁽⁶⁾	88±7,5 ⁽⁸⁾	86±6,0 ⁽¹²⁾	81±12 ⁽⁹⁾
COVA _S (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	9,0	17,5	27,0	26,0	36,0
COVR _S (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	1,0	4,0	6,0	4,0	10,0
COVA _C (gCarb.L ⁻¹ .d ⁻¹)	5,0	12,0	14,0	18,0	18,0
COVR _C (gCarb.L ⁻¹ .d ⁻¹)	5,0	10,0	10,0	14,0	12,0
COEA _S (gDQO.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,09	0,2	0,8	0,1	0,2
COER _S (gDQO.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,01	0,04	0,2	0,02	0,05

Tabela 8 Indicadores de estabilidade operacional e eficiência de remoção da matéria orgânica (Continuação)

Parâmetro	Ensaio				
	E4	E5	E6	E7	E8
COEA _C (gCarb.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,05	0,1	0,3	0,08	0,09
COER _C (gCarb.g ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,05	0,1	0,2	0,07	0,06

Os valores entre parênteses indicam o número de amostras utilizadas no cálculo da média; COVA - Carga orgânica volumétrica aplicada; COVR - Carga orgânica volumétrica removida; COEA - Carga orgânica específica aplicada; COER - Carga orgânica específica removida.

Nos ensaios conduzidos com tempo de ciclo de 4 horas, foram avaliadas concentrações de carboidratos no afluente de 2000 mg.L⁻¹ (E4); 4200 mg.L⁻¹ (E5) e 5000 mg.L⁻¹ (E6); carga orgânica aplicada de 5,0 g.L⁻¹.d⁻¹ (E4); 12 g.L⁻¹.d⁻¹ (E5) e 14 g.L⁻¹.d⁻¹ (E6) e tempo de enchimento do reator de 20 min – batelada (E4) e 2 h – batelada alimentada (E5 e E6). Em relação a estratégia de alimentação, com o aumento do tempo de enchimento houve discreto aumento do pH efluente de 4,5 (E4) para 4,6 (E5). Nos ensaios com o mesmo tempo de enchimento (E5 e E6), o aumento da concentração afluente e da carga orgânica volumétrica levou a diminuição do pH de 4,6 (E5) para 4,5 (E6). Nos ensaios conduzidos com tempo de ciclo de 2 h, foram aplicadas as mesmas concentrações de carboidratos no afluente (3200 mg.L⁻¹) e carga orgânica volumétrica (18 g.L⁻¹.d⁻¹), variando-se o tempo de enchimento em 20 min (E7) e 1 h (E8). O aumento do tempo de enchimento pode ter proporcionado uma melhor distribuição do substrato durante o ciclo, levando a conversão mais equilibrada da matéria orgânica em ácidos voláteis e, dessa forma, minimizando possíveis reduções nos valores de pH. No efluente dos ensaios E7 e E8, foi verificado pH médio de 4,6 e 4,1, respectivamente. Apesar do aumento no tempo de ciclo, a diminuição do pH efluente em E8 pode estar relacionada a concentração de ácidos voláteis nesse ensaio, quase quatro vezes maior do que a observada em E7. Os valores de pH no afluente e efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 estão apresentados na Figura 18.

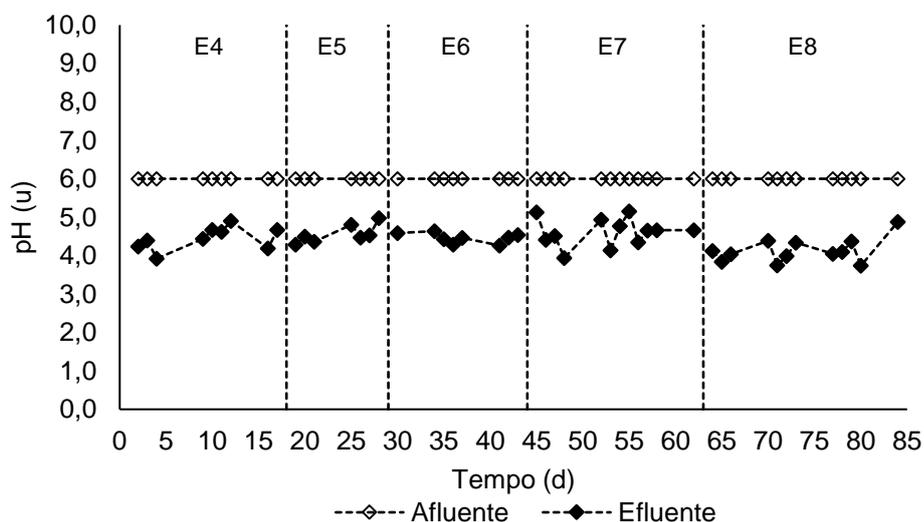


Figura 18 Valores de pH afluente e efluente nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Nos ensaios com tempo de ciclo de 4 h, houve aumento na concentração dos ácidos voláteis à medida em que a carga orgânica volumétrica foi incrementada, foram verificadas

concentrações de 780; 1260 e 2231 mgHAc.L⁻¹ em E4 (5 g.L⁻¹.d⁻¹); E5 (12 g.L⁻¹.d⁻¹) e E6 (14 g.L⁻¹.d⁻¹), respectivamente. A dinâmica de conversão do substrato em ácidos voláteis foi substancialmente afetada pela concentração de carboidratos no afluente, nos ensaios E4 (2000 mgCarb.L⁻¹), E5 (4200 mgCarb.L⁻¹) e E6 (5000 mgCarb.L⁻¹) foram observadas variações de 12; 21 e 75% na acidez volátil, indicando que, o aumento da concentração afluente influencia diretamente a estabilidade do sistema. Em relação ao tempo de enchimento, as maiores variações foram verificadas nos ensaios em batelada alimentada (2 h). A discreta variação durante o ensaio E4, em que a alimentação ocorreu brevemente (20min), pode ser atribuída a compensação do tempo de enchimento pela aplicação das menores carga orgânica e concentração afluente.

Nos ensaios em que houve diminuição do tempo de ciclo para 2 h, a aplicação da maior carga orgânica volumétrica (18 g.L⁻¹.d⁻¹) e de concentração afluente intermediária (3200 mgCarb.L⁻¹) acarretou no aumento da acidez volátil quando o tempo de enchimento do reator foi alterado de 20 min (E7) para 1 h (E8), resultando em concentrações de 274 mgHAc.L⁻¹ e 1050 mgHAc.L⁻¹, respectivamente. Em E7 apesar dos baixos valores médios de acidez volátil, foi verificada grande instabilidade operacional, com concentrações mínimas inferiores a 50 mgHAc.L⁻¹ e máximas de até 880 mgHAc.L⁻¹ (coeficiente de variação de 125%). A aplicação de maior carga orgânica em curto espaço de tempo pode ter ocasionado choques orgânicos e o desvio da rota metabólica para produção de intermediários neutros, justificando os valores de pH efluente (4,6) e as baixas concentrações de ácidos voláteis verificadas. No ensaio E8, a alimentação do reator em maior tempo de enchimento proporcionou maior estabilidade operacional em relação a E7, com variações de 33% em torno dos valores médios e aumento gradual da acidez volátil ao longo do tempo de operação. Os valores de acidez volátil total nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 estão apresentados na Figura 19.

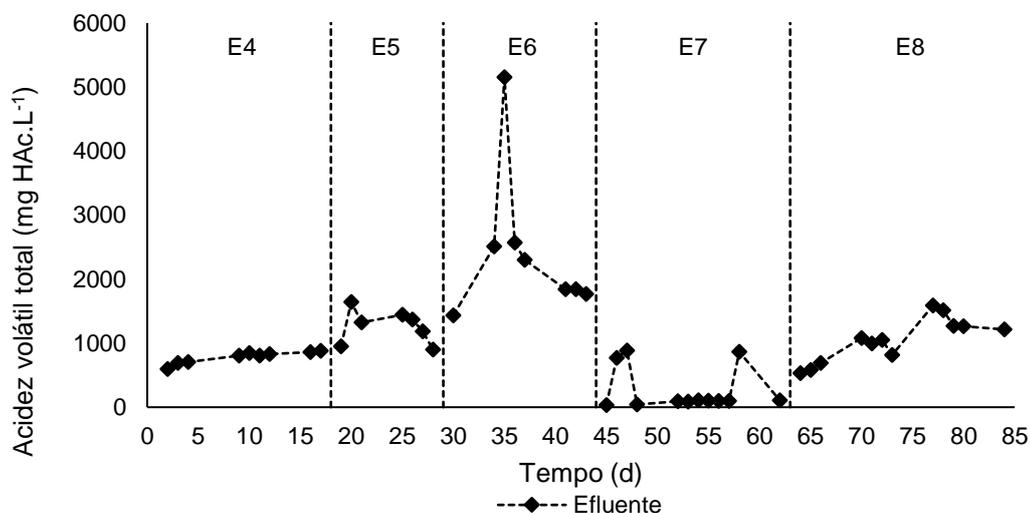


Figura 19 Valores de acidez volátil total nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

O perfil dos produtos intermediários no efluente do reator foi composto pelos ácidos láctico (44 – 63%); acético (12 – 18 %); propiônico (8 – 14%); butírico (11 – 23%) e pela bacteriocina nisina (5 – 15%). A proporção de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 20.

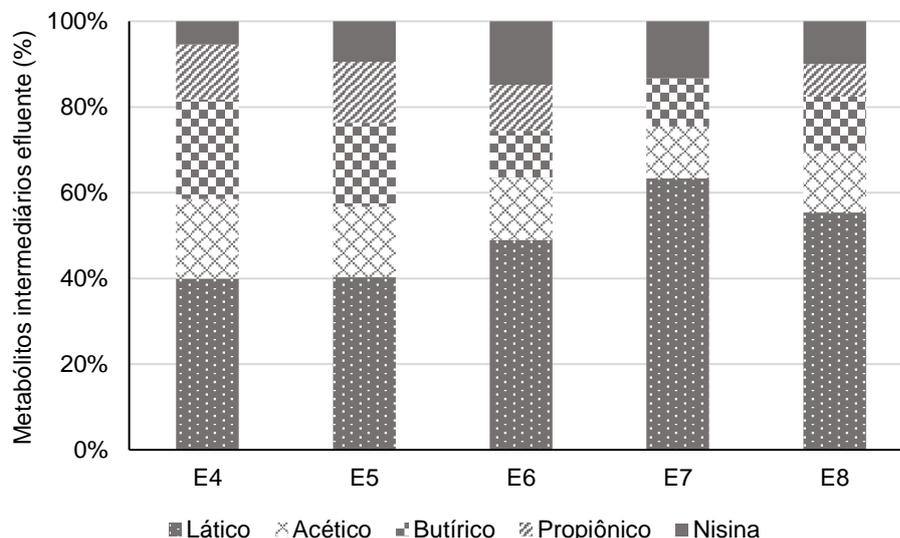


Figura 20 Proporção de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

No afluente, as concentrações de ácido láctico variaram de 54 a 78% dos metabólitos quantificados, sua presença está associada à origem do substrato, uma vez que, as bactérias lácticas fazem parte da microflora autóctone da mandioca e são comumente verificadas nos resíduos do processamento. Nos ensaios E4, E5, E6 e E8 foram verificadas reduções na concentração de ácido láctico no efluente, o que sugere sua conversão em outros produtos do metabolismo intermediário. O gênero *Clostridium* pode utilizar diferentes rotas metabólicas na conversão do substrato a produtos intermediários, sendo essas vias são favorecidas ou inibidas de acordo com as condições ambientais (MASSET et al, 2010; LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011). Diversas espécies do gênero *Clostridium* (e.g. *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutyricum*, *C. diolis*) tem demonstrado a capacidade de fermentar os ácidos láctico e acético e de convertê-los a ácido butírico, CO₂ e H₂ (CATO et al., 1986; BALOW et al., 1992; DIEZ-GONZALEZ et al., 1995; MATSUMOTO e NISHIMURA, 2007).

A dinâmica de conversão do ácido láctico a intermediários do metabolismo fermentativo foi favorecida pelo maior tempo de ciclo (4 h). No efluente dos ensaios E4, E5 e E6 foi observada diminuição na concentração de ácido láctico de 26; 49 e 33%, respectivamente. O maior consumo do metabólito foi verificado nos ensaios em que o tempo de enchimento foi de 2 h (E5 e E6). A diminuição na proporção de ácido láctico no efluente dos ensaios E5 e E6 acarretou nos melhores resultados em termos de produtividade e rendimento de hidrogênio. Em E4, E5, E6 e E8 o ácido propiônico foi verificado em menores

concentrações, após picos de produção de hidrogênio ou ao término da operação, indicando que sua geração pode estar relacionada a alterações das vias metabólicas para dispor o excesso de elétrons acumulados sob a forma de NADH (WANG et al., 2008).

Nos ensaios em que houve redução de 50% no tempo de ciclo (2 h) e aplicação das mesmas concentração afluente (3200 mg.L^{-1}) e carga orgânica volumétrica ($18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), o tempo de enchimento foi determinante no comportamento do reator quanto a distribuição dos metabólitos intermediários. Ao contrário dos demais ensaios, em que foi verificado consumo do ácido láctico, em E7 a diminuição do tempo de enchimento para 20 min acarretou em aumento de 14% na concentração de ácido láctico no efluente do reator. Alguns clostrídios (*C. butyricum*, *C. acetobutyricum*) podem converter piruvato a ácido láctico (HAWKES et al., 2002), no entanto, o elevado percentual de nisina no afluente de E7 (29%) sugere o aumento na concentração de ácido láctico pode estar relacionado a presença de bactérias lácticas no reator. Nos demais ensaios, foram verificadas concentrações de nisina no afluente equivalentes a 17% (E5 e E6) e 23% (E4 e E8) dos produtos do metabolismo intermediário. A presença da bacteriocina não inibiu a produção de hidrogênio, no entanto, a produtividade e o rendimento foram menores nos ensaios em que foi verificada maior proporção de nisina no afluente.

Estudos demonstram que a adição de ácido láctico em concentrações moderadas pode aumentar o rendimento e a produtividade de hidrogênio em sistemas fermentativos (MATSUMOTO; NISHIMURA, 2007; KIM et al., 2012; WU et al., 2012). Em reatores alimentados com resíduos do processamento da mandioca, a metabolização do amido está condicionada a quebra em açúcares menores, nesse contexto, o ácido láctico representa uma fonte de carbono prontamente disponível. Além de atuar como co-substrato, o ácido láctico pode estar relacionado ao aumento das taxas de reoxidação do NADH residual, resultando na geração adicional de hidrogênio e, conseqüentemente, no aumento da produtividade (BAGHCHEHSARAEE et al., 2009).

A quantidade de sólidos totais no efluente do reator foi proporcional ao aumento da concentração de carboidratos no afluente. Em concentrações afluentes de $2000 \text{ mgCarb.L}^{-1}$ (E4); $3200 \text{ mgCarb.L}^{-1}$ (E7 e E8); $4200 \text{ mgCarb.L}^{-1}$ (E5) e $5000 \text{ mgCarb.L}^{-1}$ (E6) foram verificadas concentrações de sólidos totais no efluente de 1461 mg.L^{-1} ; 2600 mg.L^{-1} ; 2887 mg.L^{-1} e 5863 mg.L^{-1} , respectivamente. A diluição da água residuária de fecularia para atingir a concentração de carboidratos aplicada a cada ensaio, acarretou também na diluição dos sólidos totais na alimentação, o que justifica o aumento na proporção de sólidos no efluente do reator a medida em que houve o incremento da concentração afluente. Nos ensaios avaliados a fração volátil da amostra correspondeu a valores entre 63 e 77% dos sólidos totais quantificados no efluente. A concentração de sólidos voláteis totais no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 21.

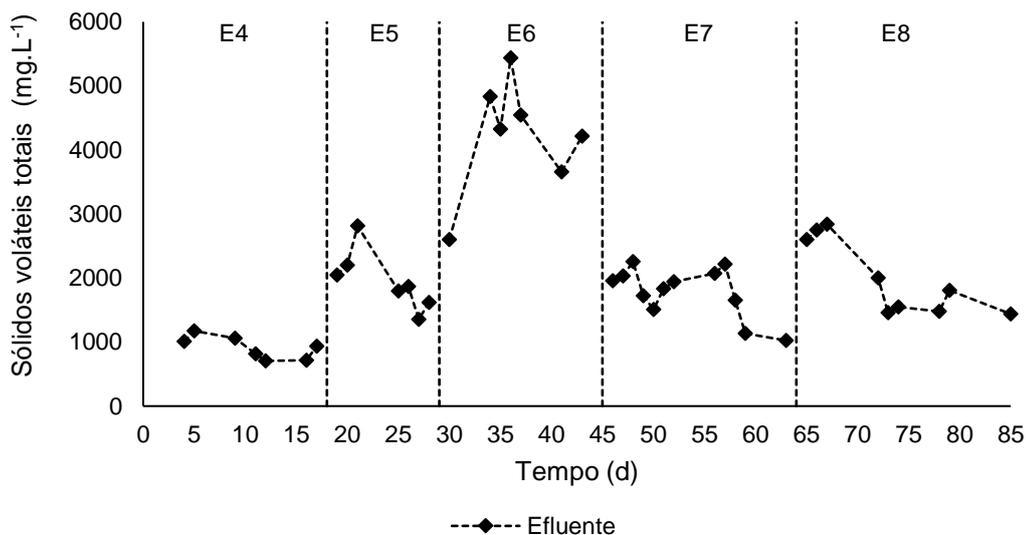


Figura 21 Concentração de sólidos voláteis totais no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Nos ensaios E4, E5 e E6 foram verificadas concentrações médias de sólidos suspensos voláteis de 117; 337 e 319 mgSSV.L⁻¹, respectivamente. A proporção de sólidos voláteis em relação aos totais foi superior a 90% nas condições estudadas. O menor tempo de enchimento do reator em E4 (20 min) e aplicação das menores concentração afluente (2000 mgCarb.L⁻¹) e carga orgânica volumétrica (5 g.L⁻¹.d⁻¹) acarretaram em decréscimo de até 65% na concentração de SSV no efluente. Em E5 e E6, o aumento do tempo de enchimento (2 h), da concentração afluente (de 4200 para 5000 mgCarb.L⁻¹) e da carga orgânica volumétrica (de 12 para 14 g.L⁻¹.d⁻¹) resultou em discreta redução na concentração de SSV no efluente do reator no ensaio E6. A aplicação da maior carga orgânica volumétrica (18 g.L⁻¹.d⁻¹), implementada pelo arranjo entre concentração afluente intermediária (3200 mgCarb.L⁻¹) e menor tempo de ciclo (2 h), resultou em aumento da concentração de SSV no efluente de 66 para 166 mgSSV.L⁻¹ quando o tempo de enchimento do reator foi aumentado de 20 min (E7) para 1 h (E8), respectivamente. A concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 22.

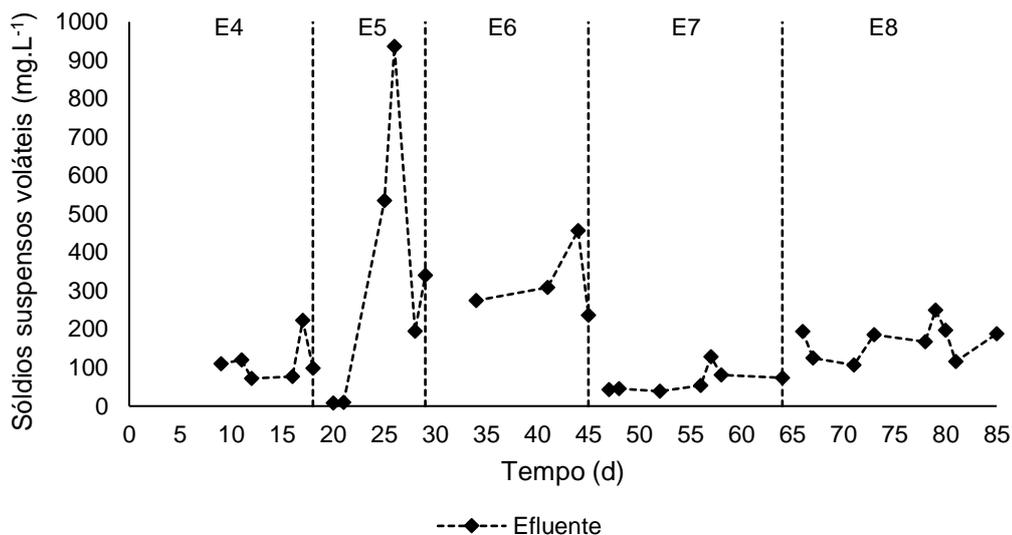


Figura 22 Concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente dos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Ao término de cada condição experimental foi quantificada a concentração de biomassa retida no reator. No tempo de ciclo de 4 h, o maior acúmulo de biomassa no reator foi verificado nos ensaios E4 e E5. Em E4, a aplicação das menores concentração afluente ($2000 \text{ mgCarb.L}^{-1}$) e carga orgânica volumétrica ($5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) podem ter ocasionado a escassez de substrato, direcionando a matéria orgânica para o crescimento e manutenção da concentração celular, em detrimento da produção de metabólitos secundários, o que justifica a concentração celular verificada nesse ensaio. Em E5 e E6 com o aumento da concentração afluente (4200 e $5000 \text{ mgCarb.L}^{-1}$) e da carga orgânica volumétrica (12 e $14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foram verificadas relações biomassa/suporte de $0,3$ e $0,2 \text{ gSVT.g}^{-1}\text{suporte}$, com o aumento na oferta de substrato e a alimentação do reator por longos períodos (2 h) podem ter equilibrado o crescimento celular e a produção de metabólitos, resultando em melhor desempenho na produção de hidrogênio. A aplicação de concentração afluente moderada ($3200 \text{ mgCarb.L}^{-1}$) e da maior carga orgânica volumétrica ($18 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) resultaram em relações biomassa/suporte de $0,6$ e $0,5 \text{ gSVT.g}^{-1}\text{suporte}$, com o aumento na oferta de substrato, foi verificado acréscimo de até 3 vezes na quantidade de biomassa acumulada no reator em relação aos ensaios E4, E5 e E6. Nos ensaios E4, E7 e E8, com aumento da concentração celular foi observada redução da disponibilidade de substrato em função da elevada quantidade de biomassa retida no reator, sendo verificadas cargas orgânicas específicas aplicadas (COEA) de $0,5$; $0,08$ e $0,09 \text{ gCarb.g}^{-1}\text{SVT.d}^{-1}$. Em E5 e E6 a aplicação de cargas orgânicas volumétricas intermediárias e de maior tempo de alimentação foram favoráveis para a manutenção de menores concentrações celulares no reator. Nesses ensaios, foram verificadas as maiores cargas orgânicas específicas aplicadas (COEA) de $0,1$ e $0,3 \text{ gCarb.g}^{-1}\text{SVT.d}^{-1}$. Além de diminuir a relação alimento/micro-organismo (*food/microorganism*), o acúmulo de biomassa no

leito pode ocasionar a formação de zonas mortas no reator e reduzir as taxas de transferência de massa entre micro-organismos e substrato, prejudicando o desempenho do sistema.

5.2.2 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO e carboidratos

Em reatores acidogênicos são esperadas eficiências de remoção de DQO entre 20 e 50%. Os valores reduzidos, se devem a conversão da matéria orgânica em outros produtos do metabolismo fermentativo, que permanecem no sistema (SREETHAWONG et al., 2010; THANWISED et al., 2012). O tempo de ciclo pode ser determinante na dinâmica de conversão do substrato e na eficiência de remoção de matéria orgânica tanto na forma de DQO, como na forma de carboidratos, principalmente quando o reator é alimentado com substratos complexos, que precisam ser hidrolisados antes se tornarem efetivamente disponíveis para o consumo dos micro-organismos. Em ambos os tempos de ciclo (4 e 2 h) a eficiência de remoção de DQO foi favorecida pelos maiores tempos de enchimento. Nos ensaios conduzidos em batelada alimentada (tempos de enchimento de 2 e 1 h) foram observadas eficiências de remoção de DQO de 24% (E5 e E8) e de 35% (E6). No tempo de ciclo de 4 h os maiores percentuais de remoção foram alcançados a medida em que houve o aumento da concentração afluyente e da carga orgânica volumétrica aplicada. A eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 23.

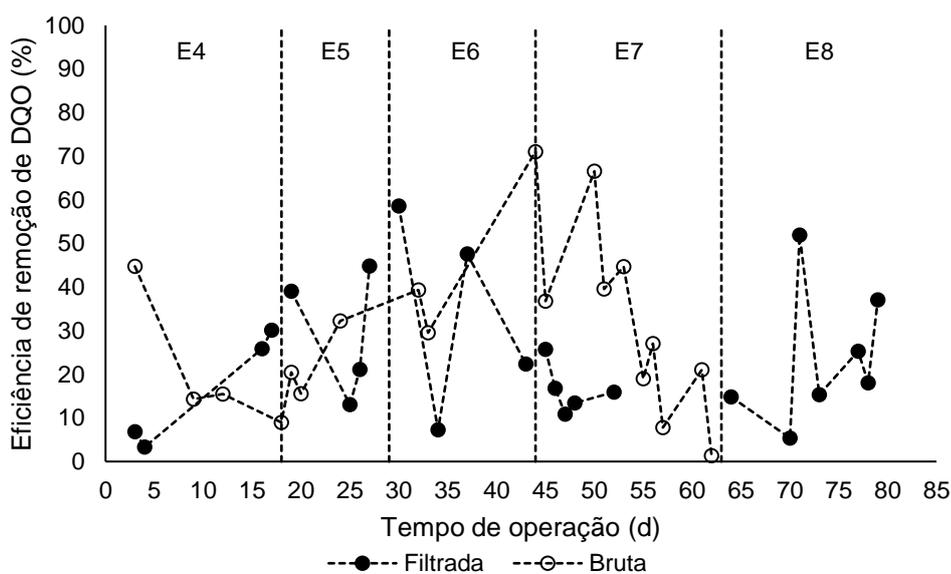


Figura 23 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de DQO nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Nos ensaios E4 e E8, conduzidos em batelada (tempo de enchimento de 20 min), foram verificados os menores percentuais de eficiência de remoção de DQO de 16,5%. Mesmo em concentrações afluentes elevadas (4200 e 5000 mgCarb.L⁻¹) e com cargas orgânicas aplicadas intermediárias (14 g.L⁻¹.d⁻¹) a eficiência de remoção de DQO parece estar diretamente relacionada aos maiores tempo de ciclo (4h) e de enchimento (2 h – batelada alimentada). A eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de carboidratos nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 24.

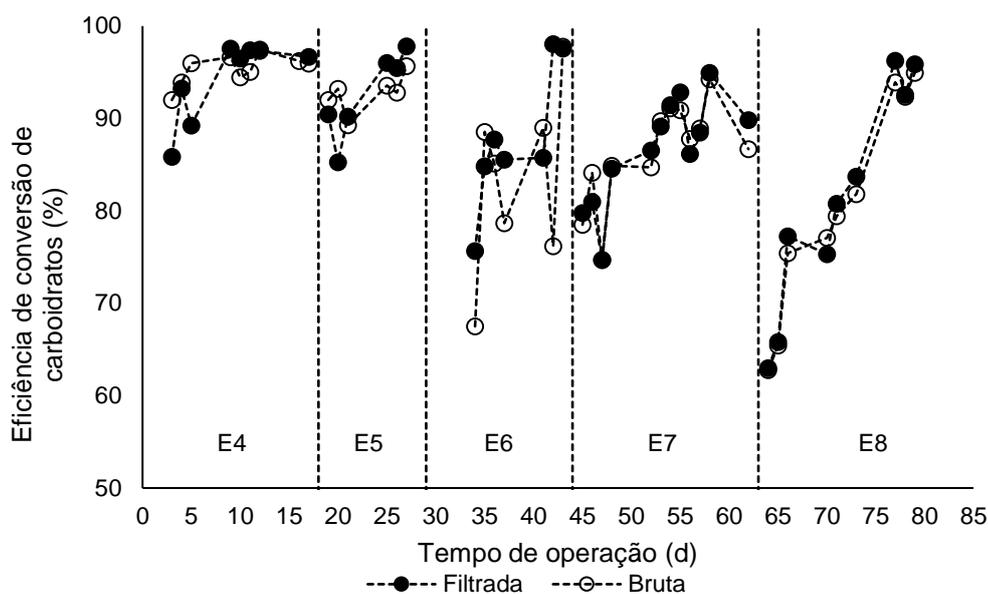


Figura 24 Eficiência de remoção de matéria orgânica na forma de carboidratos nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Em todos os ensaios foram verificadas eficiências médias de remoção de carboidratos superiores a 80%. Quando o reator foi operado com tempo de ciclo de 4 h, o aumento da concentração afluyente e da carga orgânica volumétrica ocasionou diminuição no consumo de carboidratos. Nos ensaios E4, E5 e E6 foram verificados percentuais de remoção de carboidratos de 94; 93 e 88%, respectivamente. Em E4, o maior tempo de permanência do substrato no reator (4 h) e a menor concentração afluyente (2000 mg.L⁻¹) acarretaram no consumo de 94% dos carboidratos e na obtenção de carga orgânica volumétrica, tanto aplicada, como removida, de 5 g.L⁻¹.d⁻¹. Com a redução do tempo de ciclo para 2 h e o aumento da carga orgânica volumétrica para 18 g.L⁻¹.d⁻¹ foram verificadas a diminuição das eficiências de remoção de carboidratos para valores de 86% (E7) e 81% (E8). Tratando-se de águas residuárias, o maior tempo de ciclo pode proporcionar o melhor aproveitamento do substrato, garantindo que os compostos complexos presentes na alimentação sejam hidrolisados a moléculas assimiláveis pelos micro-organismos. Em ambos os tempos de ciclo (4 e 2 h) o consumo de carboidratos foi favorecido pelo menor tempo de enchimento (20 min).

5.2.3 Avaliação da produção de hidrogênio

Nas condições experimentais em que o reator foi inoculado com lodo anaeróbio a produção de biohidrogênio foi verificada em todos os ensaios, sendo obtidas vazões molares de hidrogênio máximas de 55 mmolH₂.d⁻¹ (E4); 119 mmolH₂.d⁻¹ (E5); 154 mmolH₂.d⁻¹ (E6); 30 mmolH₂.d⁻¹ (E7) e 39,5 mmolH₂.d⁻¹ (E8). A presença de metano no biogás não foi observada em quaisquer dos ensaios. Os indicadores de desempenho vazão molar, produtividade, rendimento, produção volumétrica e a composição do biogás estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Resumo dos indicadores de desempenho nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Parâmetro	Ensaio					
	E4	E5	E6	E7	E8	
N (mmolH ₂ .d ⁻¹)	55	119	154	30	39,5	
PrM (molH ₂ .m ⁻³ .d ⁻¹)	13	28	36	7,0	10	
PrME (molH ₂ .kg ⁻¹ SVT.d ⁻¹)	0,15	0,3	0,9	0,03	0,05	
RMCA _S (molH ₂ .kg ⁻¹ DQO)	0,025	2,0	1,3	1,9	0,25	
RMCR _S (molH ₂ .kg ⁻¹ DQO)	5,5	14	7,8	0,15	0,8	
RMCA _C (molH ₂ .kg ⁻¹ Carb)	2,7	3,25	2,2	0,75	0,4	
RMCR _C (molH ₂ .kg ⁻¹ Carb)	1,8	2,0	3,7	0,9	0,5	
PVH (LH ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	0,7	1,2	2,4	0,45	0,5	
PVB (L _{biogás} .L ⁻¹ .d ⁻¹)	3,8	8,4	7,9	4,1	3,9	
Composição do biogás	H ₂ (%)	19	23	31	17	25
	CO ₂ (%)	81	77	69	83	75

*Valores máximos; PrM - Produtividade molar volumétrica; PrME - Produtividade molar específica; RMCA - Rendimento molar por carga aplicada; RMCR - Rendimento molar por carga removida; PVH - Produção volumétrica de hidrogênio; PVB - Produção volumétrica de biogás.

O parâmetro produtividade relaciona a vazão molar de hidrogênio diária (mmol.d⁻¹) e o volume útil do reator, indicando a eficácia do sistema de converter o substrato em produto. As maiores produtividades de 36 e 28 molH₂.m⁻³.d⁻¹ foram obtidas com a aplicação de cargas orgânicas moderadas (14 e 12 g.L⁻¹.d⁻¹) e concentração afluyente elevada (5000 e 4200

mgCarb.L⁻¹). Tendo em vista a complexidade do substrato, nos ensaios E5 e E6, o maior tempo de ciclo (4 h) e a estratégia de alimentação (50% do tempo total de ciclo – batelada alimentada) podem ter favorecido a conversão do substrato nos produtos da fermentação de forma mais balanceada, evitando a inibição pelos intermediários e proporcionando maiores vazões molares de hidrogênio. A vazão molar de hidrogênio nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 25.

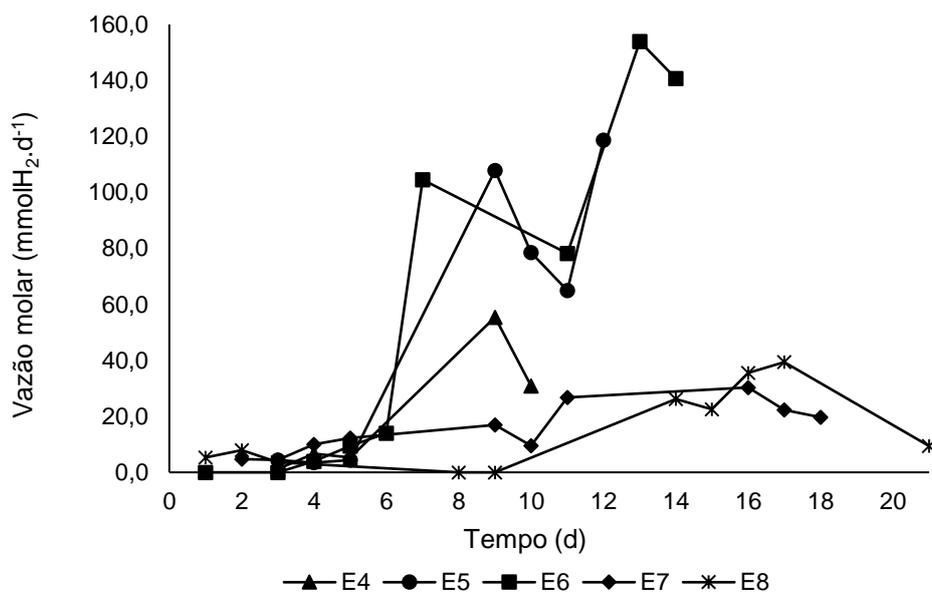


Figura 25 Vazão molar de hidrogênio nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Tanto a aplicação de baixa carga orgânica volumétrica (5 g.L⁻¹.d⁻¹) e baixa concentração afluenta (2000 mgCarb.L⁻¹), quanto a de maior carga orgânica volumétrica (18 g.L⁻¹.d⁻¹) e concentração afluenta moderada (3200 mgCarb.L⁻¹) resultaram em baixas produtividades molares de hidrogênio. A produtividade molar em E4 (13 molH₂.m⁻³.d⁻¹) pode ser ter sido afetada pela escassez de substrato ao longo do ciclo, ocasionada pelo menor tempo de enchimento do reator (20 min) e pelo menor conteúdo orgânico aplicado ao reator. Com a diminuição da oferta de substrato, o crescimento celular foi favorecido em detrimento da produção de intermediários, dentre eles, o hidrogênio. Nos ensaios E7 e E8 o aumento do tempo de enchimento do reator de 20 min (E7) para 1 h (E8) elevou a produtividade molar de 7,0 para 10 molH₂.m⁻³.d⁻¹, respectivamente. Mesmo com concentração afluenta intermediária, a aplicação da maior carga orgânica volumétrica em menores tempos de ciclo (2 h) e de enchimento (20min) pode ter dificultado a degradação e assimilação do substrato, acarretando em diminuição das taxas de bioconversão. O acúmulo de biomassa no sistema colaborou para a diminuição da produtividade molar específica, uma vez que, nos ensaios a produtividade específica foi inversamente proporcional a concentração celular verificada no reator. Além de

ocasionar a diminuição das taxas de transferência entre micro-organismo e matéria orgânica, o acúmulo de biomassa pode reduzir a disponibilidade de substrato e causar maior instabilidade operacional, comprometendo o desempenho do reator.

Nos ensaios E4, E5 e E6, em termos de DQO, foram verificados rendimentos de 0,025; 2,0 e 1,3 molH₂.kg⁻¹DQO por carga orgânica volumétrica aplicada; e de 5,5; 14 e 7,8 molH₂.kg⁻¹DQO por carga orgânica volumétrica removida, respectivamente. Nos ensaios E5 e E6 foram verificadas eficiências de remoção de DQO de 24 e 35%, sugerindo que, além do maior tempo de ciclo (4 h), o maior tempo de enchimento do reator (2 h) pode favorecer a melhor utilização do substrato. Dessa forma, verifica-se que o rendimento foi significativamente maior quando o reator foi operado com o maior tempo de ciclo e com concentração afluente (4200 mgCarb.L⁻¹) e carga orgânica volumétrica (12 g.L⁻¹.d⁻¹) intermediárias. Nos ensaios E7 e E8, com o aumento da carga orgânica aplicada (18 g.L⁻¹.d⁻¹) e a diminuição do tempo de ciclo (2 h), foram verificados rendimentos de 1,9 e 0,25 molH₂.kg⁻¹DQO por carga aplicada; e de 0,15 e 0,8 molH₂.kg⁻¹DQO por carga removida, respectivamente.

Nos ensaios E4, E5 e E6 foram observados rendimento por carga aplicada de 2,7; 3,25 e 2,2 molH₂.kg⁻¹Carb e rendimento molar por carga removida de 1,8; 2,0 e 3,7 molH₂.kg⁻¹Carb, respectivamente. Em tempo de ciclo de 4 h e considerando a carga orgânica volumétrica aplicada, os maiores rendimentos foram obtidos em cargas orgânicas baixa e intermediária (5 e 12 g.L⁻¹.d⁻¹) e, considerando a carga orgânica volumétrica removida, os maiores rendimentos foram obtidos em cargas orgânicas volumétricas intermediárias (12 e 14 g.L⁻¹.d⁻¹). Nos ensaios E7 e E8 foram verificados rendimento molar por carga aplicada de 0,75 e 0,4 molH₂.kg⁻¹Carb e rendimento molar por carga removida de 0,9 e 0,5 molH₂.kg⁻¹Carb, respectivamente. Com o aumento da carga orgânica (18 g.L⁻¹.d⁻¹) e a diminuição do tempo de ciclo (2 h) os maiores rendimentos foram verificados em função da carga orgânica volumétrica removida. O rendimento molar de hidrogênio por carga aplicada e removida, em termos de DQO e carboidratos, nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 26.

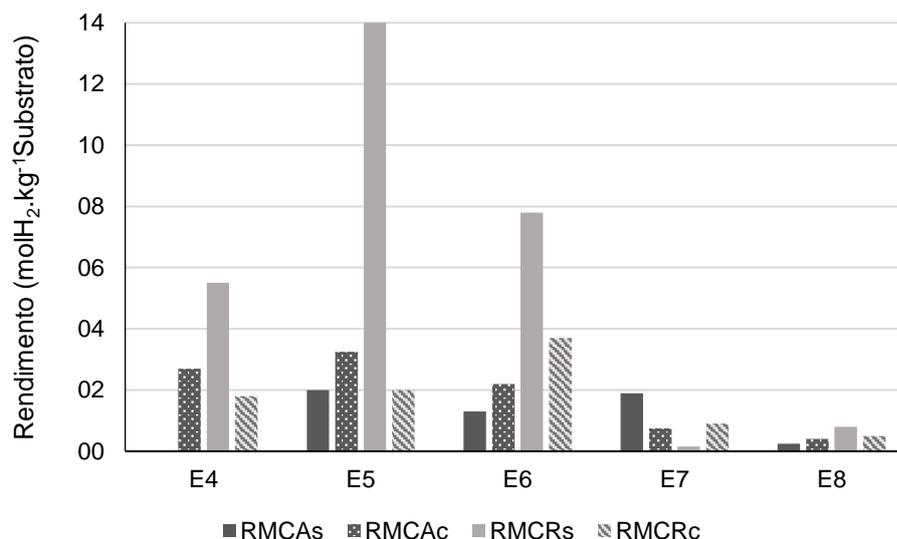


Figura 26 Rendimento molar de hidrogênio por cargas aplicada e removida, em termos de DQO e carboidratos nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Durante todo o período de monitoramento não foi observada a presença de metano no biogás em quaisquer dos ensaios. Avaliando-se a influência do tempo de ciclo, verifica-se que os maiores volumes de hidrogênio foram observados com a aplicação do maior tempo de ciclos (4 h). Em relação a carga orgânica volumétrica aplicada e a concentração afluenta, os maiores valores de produção volumétrica de $1,2$ e $2,4 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ foram obtidos nos ensaios E5 e E6, com cargas orgânicas intermediárias (12 e $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e elevada concentração afluenta (4200 e $5000 \text{ mgCarb} \cdot \text{L}^{-1}$), respectivamente. A aplicação das maiores concentrações afluentes, pode ter sido contrabalanceada pela estratégia de alimentação, na qual o reator foi alimentado durante um período de 2 h. No ensaio E4 a aplicação de baixa carga orgânica volumétrica ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e baixa concentração afluenta ($2000 \text{ mgCarb} \cdot \text{L}^{-1}$) acarretaram em diminuição significativa na produção volumétrica de hidrogênio para $0,7 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Nos ensaios E7 e E8, foram verificados os menores valores de produção volumétrica de hidrogênio de $0,45$ e $0,5 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Nesses ensaios, com o aumento da carga orgânica volumétrica aplicada ($18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e da concentração afluenta ($3200 \text{ mgCarb} \cdot \text{L}^{-1}$) o tempo de ciclo de 2 h pode ter sido insuficiente para promover a conversão do substrato a produtos do metabolismo intermediário de forma efetiva, reduzindo as taxas de produção de hidrogênio. A produção volumétrica de hidrogênio nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 27.

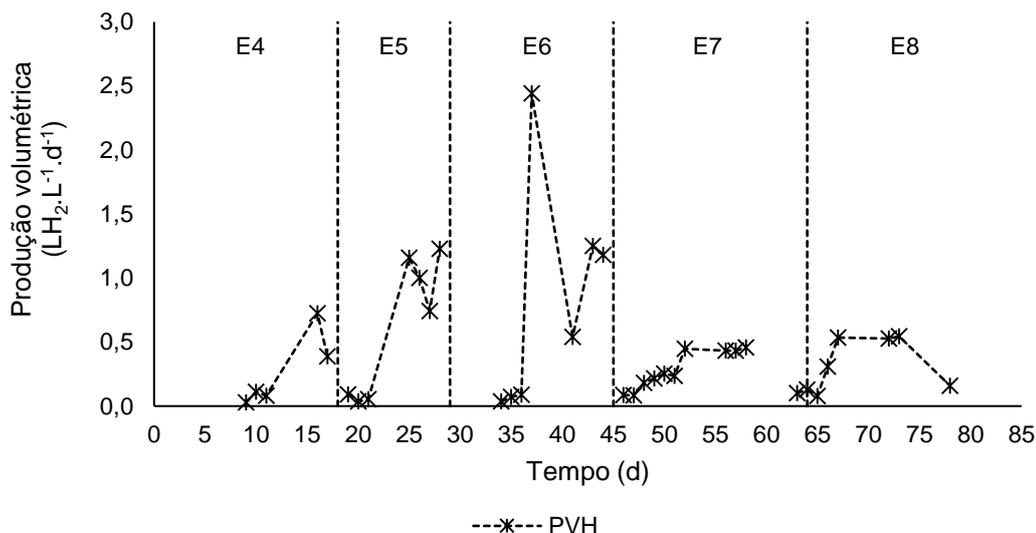


Figura 27 Variação da produção volumétrica de hidrogênio nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Avaliando-se a influência do tempo de ciclo, verifica-se que os maiores volumes de biogás foram observados com a aplicação do maior tempo de ciclo (4 h). Em relação a carga orgânica volumétrica aplicada e a concentração afluente, os maiores valores de produção volumétrica de 8,4 e 7,9 $L_{\text{biogás}}.L^{-1}.d^{-1}$ foram obtidos nos ensaios E5 e E6, nos quais foram aplicadas cargas orgânicas intermediárias (12 e 14 $g.L^{-1}.d^{-1}$) e elevadas concentrações afluentes (4200 e 5000 $mgCarb.L^{-1}$), respectivamente. A aplicação das maiores concentrações afluentes, pode ter sido contrabalanceada pela estratégia de alimentação, na qual o reator foi alimentado durante um período de 2 h. O enchimento progressivo do reator, pode ter proporcionado a melhor utilização do substrato e favorecido a produção de biogás. Apesar de conduzido com o mesmo tempo de ciclo, no ensaio E4 foi verificada uma diminuição significativa no volume de biogás produzido para 3,8 $L_{\text{biogás}}.L^{-1}.d^{-1}$. A aplicação de baixa carga orgânica (5 $g.L^{-1}.d^{-1}$) e baixa concentração afluente (2000 $mgCarb.L^{-1}$), aliado ao aumento da concentração celular no reator acarretaram na redução da COEA para valores de 0,05 $gCarb.g^{-1}SVT.d^{-1}$, diminuindo o substrato disponível para produção de biogás. Nos ensaios E7 e E8, apesar de maior carga orgânica volumétrica aplicada (18 $g.L^{-1}.d^{-1}$) foram verificadas produção volumétrica de biogás de 4,1 e 3,9 $L_{\text{biogás}}.L^{-1}.d^{-1}$, respectivamente, valores de muito próximos aos verificados em E4. A produção volumétrica de biogás nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 28.

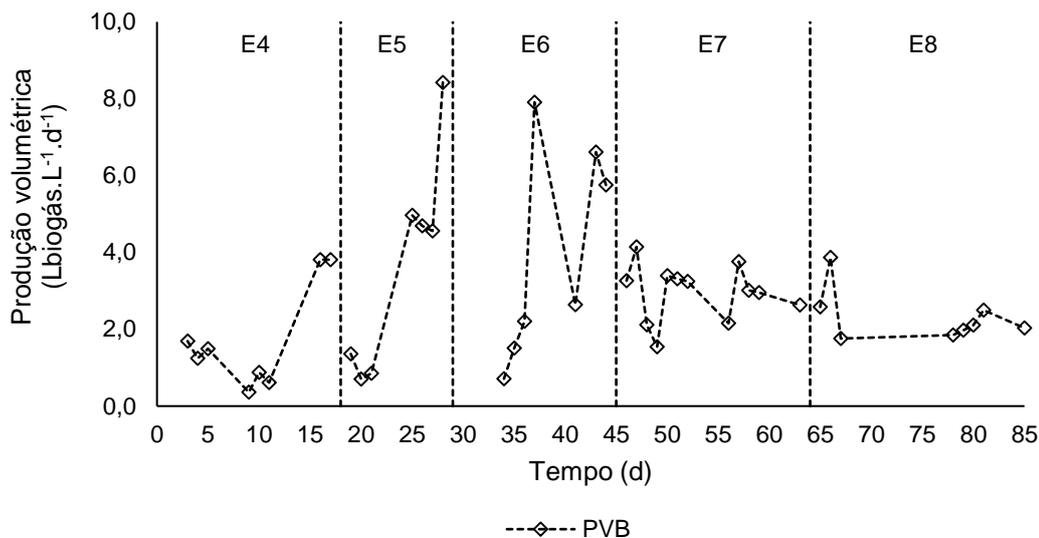


Figura 28 Variação da produção volumétrica de biogás nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

Nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 foram verificados percentuais de hidrogênio no biogás de 19; 23; 31; 17 e 25%, respectivamente. As maiores proporções de CO₂ no biogás de 81 e 83% foram verificadas nos ensaios E4 e E7, respectivamente, em ambos foi observada elevada concentração celular de 0,3 e 0,6 gSVT.g⁻¹biomassa. Em todos os ensaios, o acúmulo da biomassa pode ter sido um fator limitante na conversão do substrato a biohidrogênio. Analisando-se os ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 verificam-se que o desempenho do reator está intimamente relacionado as cargas orgânicas específicas aplicadas (COEA) de 0,05; 0,1; 0,3; 0,08 e 0,09 gCarb.g⁻¹SVT.d⁻¹, respectivamente. A redução na disponibilidade de substrato tem sido constantemente relacionada a diminuições da quantidade de hidrogênio produzido (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). Entre as estratégias para reduzir o acúmulo de biomassa, a lavagem sistemática do material suporte tem apresentado bons resultados, contribuindo com o aumento da carga orgânica específica e da estabilidade do reator (LIMA et al., 2015). A composição do biogás nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8 está apresentada na Figura 29.

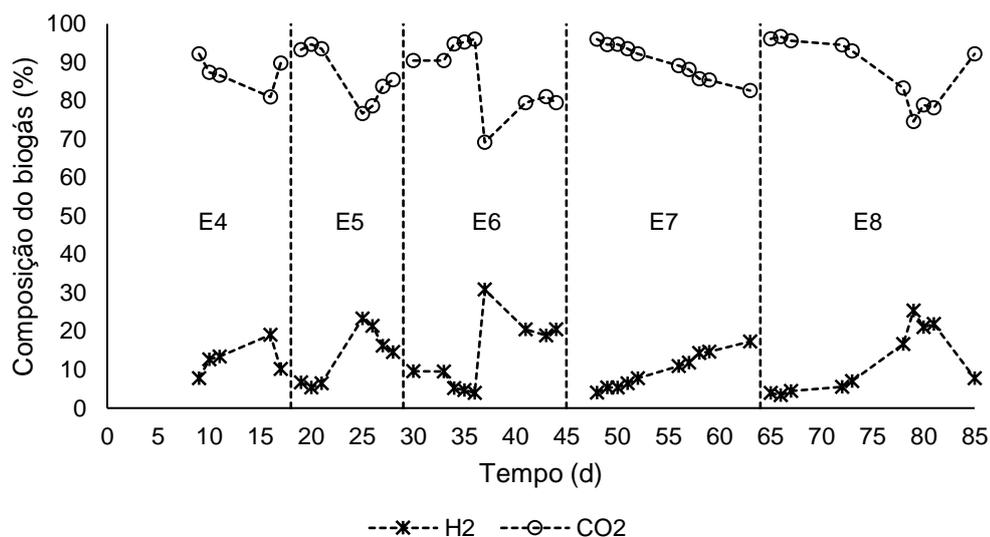


Figura 29 Composição do biogás nos ensaios E4, E5, E6, E7 e E8.

A partir da água residuária de fecularia de mandioca a produtividade e o rendimento de hidrogênio podem variar em função da configuração do reator e das condições operacionais impostas ao sistema (Tabela 10). Além disso, em reatores com a mesma configuração, a origem do substrato também pode influenciar os resultados (Tabela 11). Diminuições no rendimento em relação ao substrato sintético podem ser observadas quando resíduos são utilizados como substrato (TORRES et al 2017; LIMA et al., 2015; ROSA et al., 2016), principalmente quando são utilizadas águas residuárias do processamento da mandioca, devido à presença de compostos potencialmente tóxicos (GOMES et al., 2016). No presente trabalho, a composição da água residuária pode ter sido determinante no desempenho do sistema, uma vez que, além de rendimentos reduzidos foi observada total inibição na produção de hidrogênio (ensaios E2 e E3).

Tabela 10 Desempenho de diferentes configurações de reatores anaeróbios destinados a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias do processamento de mandioca.

Inóculo	Reator	Condições operacionais					Desempenho		Referência
		COV (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (h)	Temp. (°C)	pH	ε (%)	PVH (LH ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Rendimento	
AF	AnSBBR	12 ¹	4	30	6,0	91	0,9	4,9 mmol.g ⁻¹ Carb	E1*
LA	AnSBBR	14 ¹	4	30	6,0	98	2,4	2,2 mmol.g ⁻¹ Carb	E6*
LA	ASBR	30 ²	4	37	5,5	-	5,7	438 mLH ₂ .g ⁻¹ DQO	Sreethawong et al. (2010)
LA	ABR	66 ²	6	32	9,0	-	0,9	13,4 mLH ₂ .g ⁻¹ DQO	Thanwised et al. (2012)
LA	UAPBR	35 ¹	3	36	6,0	93	1,1	840 mLH ₂ .g ⁻¹ Carb	Andreani et al. (2015)
AF	RATM	24 ¹	4	25	6,5	96	0	0	Gomes et al. (2016)
LA	RALF	10 ²	12	30	5,0	-	1,7	2,0 mmol.g ⁻¹ DQO	Rosa et al. (2016)
LA	UAPBR	9,5 ¹	4	36	4,5	91	0,25	0,86mol.mol ⁻¹ Carb	Torres et al. (2017)

¹Valores máximos; ¹Em termos de carboidratos; ²Em termos de DQO; LA – Lodo anaeróbio; AF – Autofermentação; UAPBR – Reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente; RALF – Reator anaeróbio de leito fluidizado; RATM – Reator anaeróbio de tubos múltiplos; ε (%) – Eficiência de conversão de substrato, em termos de carboidratos.

Tabela 11 Desempenho de reatores AnSBBR destinados à produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos.

Substrato	Inóculo	Condições operacionais						Desempenho		Referência
		COV (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (h)	EA	Temp. (°C)	pH	ε (%)	PrM (molH ₂ .m ⁻³ .d ⁻¹)	RMCA (molH ₂ .Kg ⁻¹ Subst)	
ARF	LA	12 ¹	4	B	30	6,0	91	28	4,9	E1*
ARF	AF	14 ¹	4	BA	30	6,0	98	36	3,25	E5*
ARS	LA	12,2 ²	4	B	30	5,0	93	33,3	2,8	Manssouri et al. (2013)
ARS	LA	13,5 ³	4	BA	30	5,0	99	54,9	4,0	Inoue et al. (2014)
Soro de queijo	LA	14,6 ³	3	B	30	6,0	98	18,1	1,7	Lima et al. (2015)
Glicerina	LA	17,8 ³	3	BA	30	7,7	-	100,8	5,7	Lovato et al. (2015)

¹Valores máximos; ¹Em termos de carboidratos; ²Em termos de sacarose; ³Em termos de DQO; ARF - Água residuária de fecularia de mandioca; ARS - Água residuária sintética a base de sacarose; LA - Lodo anaeróbico; AF - Autofermentação; EA - Estratégia de alimentação; B - Batelada; BA - Batelada alimentada; ε (%) - Eficiência de conversão de substrato, em termos de carboidratos; PrM - Produtividade molar volumétrica; RMCA - Rendimento molar por carga aplicada.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi avaliada a produção de hidrogênio em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) a partir de água residuária de fecularia de mandioca. O desempenho do sistema foi analisado de acordo com os indicadores estabilidade, produtividade e rendimento de hidrogênio.

A carga de micro-organismos, presentes na água residuária de fecularia de mandioca, pode ter resultado na instabilidade operacional verificada em todas as condições experimentais. O aumento da retenção celular acarretou na redução da carga orgânica específica aplicada. Com a diminuição na oferta de substrato, a competição foi favorecida, ocasionando decréscimo na produção de hidrogênio. Além disso, a reinoculação sistemática do reator pode ter dificultado o desenvolvimento de uma comunidade estável, favorecendo a colonização do meio por micro-organismos competidores.

O melhor desempenho do reator, em termos de produtividade molar, foi verificado nos ensaios inoculados com lodo anaeróbio termicamente tratado. As maiores produtividade ($36 \text{ molH}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) e produção volumétrica de hidrogênio ($2,4 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) foram obtidas em tempo de ciclo de 4 h, concentração afluyente de $5000 \text{ mgCarb} \cdot \text{L}^{-1}$, carga orgânica volumétrica aplicada de $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e tempo de enchimento do reator de 2 h (batelada alimentada).

O melhor desempenho do reator, em termos de rendimento molar, foi verificado nos ensaios inoculados a partir da água residuária de fecularia de mandioca autofermentada. Os maiores rendimentos por carga orgânica volumétrica aplicada ($4,9 \text{ molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Carb}$) e removida ($11,7 \text{ molH}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Carb}$) foram obtidos em tempo de ciclo de 4 h, concentração afluyente de $4200 \text{ mgCarb} \cdot \text{L}^{-1}$, carga orgânica aplicada de $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e tempo de enchimento do reator de 20 min (batelada).

Nos demais ensaios inoculados a partir da água residuária de fecularia de mandioca autofermentada, em que foram aplicadas carga orgânica de $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e concentração afluyente de $4700 \text{ mgCarb} \cdot \text{L}^{-1}$, não foi verificada a produção de hidrogênio, mesmo como aumento do tempo de enchimento de 20 min (batelada) para 1,5 h (batelada alimentada). Nestes ensaios foram verificadas grandes concentrações de ácido láctico e da bacteriocina nisina, indicando a presença de bactérias lácticas. A inoculação com a água residuária de fecularia de mandioca autofermentada e a aplicação de carga orgânica maior ($18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), que possivelmente teve implicações diretas sobre a carga microbiana inserida no reator, podem ter favorecido a colonização por bactérias lácticas, inibindo a produção de hidrogênio.

O maior tempo de ciclo (4 h) foi benéfico para a produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária de fecularia de mandioca. Em ambas as estratégias de inoculação,

os melhores indicadores de desempenho foram verificados em cargas orgânicas volumétricas aplicadas (12 e 14 g.L⁻¹.d⁻¹) e concentrações afluentes (4200 e 5000 mg.L⁻¹) similares, com a produtividade sendo favorecida pelo maior tempo de enchimento (2 h – batelada alimentada) e o rendimento pelo menor tempo de enchimento (20 min – batelada).

O acúmulo de biomassa no sistema pode ter sido um fator limitante na conversão do substrato a biohidrogênio. Em todos os ensaios verifica-se que o desempenho do reator em termos de rendimento e produtividade está intimamente relacionado às baixas cargas orgânicas específicas aplicadas (COEA).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da avaliação do reator AnSBBR na produção de hidrogênio a partir de água residuária de fecularia de mandioca, algumas recomendações e sugestões para trabalhos futuros podem ser úteis, principalmente às relacionadas à operacionalização da etapa experimental.

- i. A exploração de tempos de ciclo superiores a 4 horas: devido à natureza da água residuária de fecularia de mandioca, em termos de compostos potencialmente inibidores e de açúcares complexos, acréscimos no tempo de ciclo podem colaborar com a redução dos efeitos tóxicos desses compostos e a degradação mais eficiente do substrato;
- ii. Controle da concentração de biomassa no reator: a adoção de estratégias como a disposição do material suporte de forma estruturada (em detrimento do leito empacotado) e a lavagem sistemática do meio suporte podem colaborar para a manutenção de concentrações celulares reduzidas no reator, minimizando o acúmulo de biomassa no leito e favorecendo a manutenção da carga orgânica específica aplicada;
- iii. Análise microbiológica do reator AnSBBR: investigar a dinâmica de colonização do reator, frente a diferentes estratégias de inoculação, e sua relação com a entrada constante de micro-organismos no sistema advindos da água residuária de fecularia de mandioca;
- iv. Análise do ácido láctico e da bacteriocina nisina por meio de ensaios microbiológicos na determinação das concentrações inibitórias mínimas: tendo em vista as implicações desses compostos, é de extremo interesse determinar em que concentrações a bacteriocina nisina e o ácido láctico passam a comprometer o desenvolvimento dos micro-organismos produtores de hidrogênio em sistemas fermentativos, bem como, investigar a possibilidade de sinergia entre estes compostos, o que pode potencializar seus efeitos;
- v. A utilização da água residuária de fecularia de mandioca na produção de outros produtos de valor agregado: além da produção de biohidrogênio e biometano, a água residuária de fecularia de mandioca demonstra potencial para ser empregada em processos fermentativos, tendo em vista que produtos do metabolismo intermediário, como o ácido láctico e a nisina, são de grande interesse comercial;
- vi. Avaliar um sistema de duas fases, composto por reatores acidogênico e metanogênico: Além de proporcionar o aproveitamento da matéria orgânica, remanescente do processo acidogênico, a adoção de reatores em série pode

promover a adequação ambiental do efluente e gerar um segundo produto de valor agregado, o biometano.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. F.; DAUD, W. M. A. W. Hydrogen production by methane decomposition: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p.1160-1190, 2010.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 877-902, 2013.

ACAR, C.; DINCER, I. Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p.1-12, 2014.

ADAMS, M. W. W.; MORTENSON, L. E.; CHEN, J. S. Hydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 594, p. 105-106, 1981.

AFSCHAR, A. S.; SCHALLER, K.; SCHURGERL, K. Continuous production of acetone and butanol with shear-activated *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.315-322, 1986.

AKINGBALA, J. O., OYEWOLE, O. B., UZO-PETERS, P. I., KARIM, R. O; BACCUS-TAYLOR, G. S. H. Evaluating stored cassava quality in gari production. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 3, p. 75-80, 2005.

ALBANEZ, R.; CANTO, C.S.A.; RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J.A.D.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Feasibility of a sequencing reactor operated in batch and fed-batch mode applied to nitrification and denitrification Processes. **Revista de Química Teórica Y Aplicada - Afinidad**, v.66, p.44-55, 2009.

ALBANEZ, R. ; LOVATO, G.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 20473-20484, 2016a.

ALBANEZ, R. ; CHIARANDA, B. C. ; FERREIRA, R. G. ; FRANÇA, A. L. P. ; HONÓRIO, C. D. ; RODRIGUES, J. A. D. ; RATUSZNEI, S. M. ; ZAIAT, M. . Anaerobic Biological Treatment of Vinasse for Environmental Compliance and Methane Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 21-43, 2016b.

ANDREANI, C. L.; TORRES, D. G. B.; SCHULTZ, L.; CARVALHO, K. Q.; GOMES, S. D. Hydrogen production from cassava processing wastewater in an anaerobic fixed bed reactor with bamboo as a support material. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.35, n.3, p.578-587, 2015.

ANZOLA-ROJAS, M. P.; FONSECA, S. G.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, V. M.; ZAIAT, M. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v.5, p.46-54, 2015.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.10, p.152-161, 2005.

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K.; OZTEKIN, R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.33, p.1813-1819, 2008.

AROOJ, M. F.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 3289-3294, 2008.

ASSAWAMONGKHOLSIRI, T.; REUNGSANG, A.; PATTRA, S. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p.6146-6153, 2013.

AZWAR, M. Y.; HUSSAIN, M. A.; ABDUL-WAHAB, A. K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 158–173, 2014.

BAGHCHEHSARAE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Fermentative hydrogen production by diverse microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 5021-5027, 2010.

BAGHCHEHSARAE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; REID, G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 4064-4073, 2008.

BAHL, H.; DÜRRE, P. **Clostridia: Biotechnology and Medical Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. p. 57–63, 2001.

BAKONYI, P.; BORZA, B.; ORLOVITS, K.; SIMON, N.; NEMESTÓTHY, K.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Fermentative hydrogen production by conventionally and unconventionally heat pretreated seed cultures: A comparative assessment. **International Journal of Hydrogen Energy** (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.110>.

BALOW, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. New York: Springer-Verlag, p. 1800–1839, 1992.

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

BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 3379-3388, 2010.

BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Effects of feed time, organic loading and shock loads in the anaerobic whey treatment by an AnSBBR with circulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.157, p.140-158, 2009.

BICÁCOVÁ, O.; STRAKA, P. Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p.11563-11578, 2012.

BREUKINK, E.; WIEDEMANN, I.; VAN KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; SAHL, H.G.; KRUIJF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, v. 286, p. 2361-2364, 1999.

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

CASTELLÓ, E.; SANTOS, C. G.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB

reactor: Links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 5674-5682, 2009.

CATO E.P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M. **Genus Clostridium**. Williams and Wilkins, Baltimore, p.1149–1152, 1986.

CEPEA. Produção de fécula ultrapassa 750 mil t em 2015. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP, 2016.

CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo. Fundação Cargill, 2001, v. 4, Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, São Paulo, v.34, p.156-159, 2011.

CHEN, W. H.; SUNG, S.; CHEN, S, Y. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.34, p.227-234, 2009.

CHEONG, D. Y.; HANSEN, C. L.; STEVENS, D. K. Production of bio-hydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 421-432, 2007.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, Reatores anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de engenharia sanitária e ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

CHIARI, L.; ZECCA, A. Constrains of fossil depletion on global warming projections. **Energy Policy**, v. 39, p. 5026-5034, 2011.

CHINELLATO, G.; CAVINATO, C.; BOLZONELLA, D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. 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**, v.38, p.4351-4360, 2013.

CISNEROS-PÉREZ, C.; ETCHEBEHERE, C.; CELIS, L. B.; CARRILLO-REYES, J.; ALATRISTE-MONDRAGON, F.; RAZO-FLORES, E. Effect of inoculum pretreatment on the microbial community structure and its performance during dark fermentation using anaerobic fluidized-bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy** (2017). Article in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.157>

COSTABILE, A. L. O.; CANTO, C. S. A.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M., FORESTI, E. Temperature and feed strategy effects on sulfate and organic matter removal in an AnSBBR. **Journal of Environmental Management**, v.92, p.1714-1723, 2011.

CRISPIM, S. M.; NASCIMENTO, A. M. A.; COSTA, P. S.; MOREIRA, J. L. S.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; LIMA, F. L.; MOTA, V. T.; NARDI, R. M. D. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with *puba*, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 15-21, 2013.

CUBAS, S. A.; FORESTI, E.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Effect of impeller type and stirring frequency on the behavior of an AnSBBR in the treatment of low-strength wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, p.889-893, 2011.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, p. 13-28, 2001.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M.P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava Wastewater as substrate. *Process Biochemistry*, v 39, p. 411-414, 2003.

DIEZ-GONZALEZ, F.; RUSSELL, J. B.; HUNTER, J. B. The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Archives of Microbiology*, v. 164, p. 32-42, 1995.

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

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21th. American Public Health Association. 2005. 1600 p.

ELSESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G. Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, Amsterdam, v.36, p.11379-11387, 2011a.

ELSESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. Viability of ultrasonication of food waste for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, Amsterdam, doi:10.1016/j.ijhydene.2011.01.008, 2011b.

FERNANDES, B. S.; SAAVEDRA, N. K.; MAINTINGUER, S. I.; SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 170, p. 1348-1366, 2013.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 53-61,1999.

GARCIA, M. L.; LAPA, K. R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage. *Journal of Environmental Management*, v. 88, p. 1471–1477, 2008.

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

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; PENTEADO, E. D.; LUCAS, S. D. M.; GOTARDO, J. T.; ZAIAT, M. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. *Bioresource Technology*, v. 197, p. 201-207, 2015.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, T.; GOMES, P. C. F. L.; ZAIAT, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour Wastewater in a continuous multiple tube reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, p.8120-8131, 2016.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. 2nd ed. New York: Springer-Verlog, 1986, 359 p.

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

HAFEZ, H.; BAGHCHEHSARAEI, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; NAGGAR, H. Comparative assessment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7603-7611, 2009.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p. 7379-7389, 2009.

HALLENBECK, P. C.; BENEMAN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1185-1193, 2002.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends Biotechnology**, v.27, p.287-297, 2008.

HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p.1339-1347, 2002.

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

HU, C. C.; GIANNIS, A.; CHEN, C. L.; QI, W.; WANG, J. Y. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, p.15686-15692, 2013.

HUNG, C. H.; CHENG, C.H.; GUAN, D. W.; WANG, S.T.; HSU, S.C.; LIANG, C. M.; CHIU, Y. L. Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p.8704-8711, 2011.

IEA Bioenergy. **A sustainable and reliable energy source**. Main Report. Paris: International Energy Agency, 2009. Acesso em: 20/03/14 http://www.globalbioenergy.org/uploads/media/0912_IEA_Bioenergy_MAIN_REPO RTBioenergy_a_sustainable_and_reliable_energy_source._A_review_of_status_and_prospe cts.pdf

IEA, 2011. **Key World Energy Statistics 2011**. Available from <http://www.iea.org>>

INOUE, R. K. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento na produção de biohidrogênio em ANSBBR com agitação tratando água residuária sintética**. 2013. 221 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2013.

INOUE, R. K. ; LIMA, D. M. F. ; RODRIGUES, J. A. D. ; RATUSZNEI, S. M. ; ZAIAT, M. . Effect of Organic Loading Rate and Fill Time on the Biohydrogen Production in a Mechanically Stirred AnSBBR Treating Synthetic Sucrose-Based Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 2326-2349, 2014.

JUNG, K. W.; KIM, D. H.; KIM, S. H.; SHIN, H. S. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v.102, p.8612-8620, 2011.

KAEWKANNETRA, P.; CHIWES, W.; CHIU, T. Y. Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology. **Fuel**, v.90, p. 2746-2750, 2011.

KAN, E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. **Renewable Energy**, v.49, p.227-231, 2013.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 49, p. 209-224, 1983.

KAPDAN I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.569-528, 2006.

KARGI, F.; PAUKOGLU, M. Y. Dark fermentation of ground wheat starch for bio-hydrogen production by fed-batch operation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 2940-2946, 2009.

KHANAL, S. K.; CHEN, W-H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 29, p. 1123-1131, 2004.

KAWANO, T.; WADA, K.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. Effect of substrate concentration and pH on hydrogen fermentation of mixed substrate by microflora. *Water Environment*, v. 27, p. 473-479, 2004.

KIM, T. H.; LEE, Y.; CHANG, K. H.; HWANG, S. J. Effects of initial lactic acid concentration, HTRs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, New York, v.103, p.136-141, 2012.

KUCZMAN, O. **Tratamento de efluente de fecularia em reator anaeróbio tubular horizontal piloto de uma fase com meio suporte e agitação**. 2012. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2012.

LAZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototropic microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 11691-11700, 2012.

LEAÑO, E. P.; BABEL, S. Effects of pretreatment methods on cassava wastewater for biohydrogen production optimization. **Renewable Energy**, v. 39, p. 339-346, 2012.

LEE, H. S., RITTMANN, B. E. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 749-758, 2009.

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

LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 465-472, 2006.

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 579-586, 2008.

LETTINGA, A. F. M.; VAN VELSEN, S. H.; ZEEUW, W. Feasibility of anaerobic digestion for the direct treatment of, and the energy recovery from urban wastes. **Studies in Environmental Sciences**, v.9, p. 97-108, 1981.

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

LIEW, W. H.; HASSIM, M. H.; NG, D. K. S. Review of evolution, technology and sustainability assessment of biofuel production. **Journal of Cleaner Production** (2014). Article in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.006>.

LIMA, D. M. F.; MOREIRA, W. K.; ZAIAT, M. Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, p.15074-15083, 2013.

LIMA, D. M. F. ; INOUE, R. K. ; RODRIGUES, J. A. D. ; RATUSZNEI, S. M. ; ZAIAT, M. . Biohydrogen from cheese whey treatment in an AnSBBR: achieving process stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 397-408, 2015.

LIN, C.Y., LAY, C.H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 285-292, 2005.

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 149-164, 1990.

LIU, H.; WANG, G.; ZHU, D.; PAN, G. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 9696-9701, 2009.

LOVATO, G. ; BRAVO, I. S. M. ; RODRIGUES, J. A. D. ; RATUSZNEI, S. M. ; ZAIAT, M. . The effect of organic load and feed strategy on biohydrogen production in an AnSBBR treating glycerin-based wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 128-137, 2015.

LOVATO, G. ; RATUSZNEI, S. M. ; RODRIGUES, J. A. D. Co-Digestion Approach in Anaerobic Processes for Biomethane Production. **Current Biochemical Engineering**, v. 3, p. 200-209, 2016.

LOVATO, G.; ALBANEZ, R. ; STRACIERI, L.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Design study of an AnSBBR for hydrogen production by co-digestion of whey with glycerin: Interaction effects of organic load, cycle time and feed strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 9567-9576, 2017.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; ZHOU, Q.; WONG, J. Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. **Applied Energy**, v.87, p.3719-3717, 2010.

MCAULIFFE, O.; ROSS, P. R.; HILL, C. Lantabiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285-308, 2001.

MANSSOURI, E. M. **Influência da carga orgânica na produção de biohidrogênio em ASBBR com agitação tratando água residuária sintética**. 2012. 209 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2012.

MANSSOURI, M.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M. ; ZAIAT, M. Effects of Organic Loading, Influent Concentration, and Feed Time on Biohydrogen Production in a Mechanically Stirred AnSBBR Treating Sucrose-Based Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1832-1854, 2013.

MASSET, J.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; BECKERS, L.; FRANCK, F.; THONART, P. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 3771-3778, 2010.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, p.236-241, 2007.

MAZLOOMI, K.; GOMES, C. Hydrogen as an energy carrier: Prospects and Challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p.3024-3033, 2012.

MAZZOLI, R.; BOSCO, F.; MIZRAHI, I.; BAYER, E. A.; PESSIONE, E. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. **Biotechnology Advances**, v.32, p. 1216-1236, 2014.

MCCARTY, P. L. **Anaerobic waste treatment fundamentals – I chemistry and microbiology**. Public Works.p.107-112, 1964.

MICHELAN, R.; ZIMMER, T. R.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; MORAES, D.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Effect of impeller type and mechanical agitation on the mass transfer and power consumption aspects of ASBR operation treating synthetic wastewater. **Journal of environmental management**, v.90, p.1357-64, 2009.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.

MOCKAITIS, G.; FRIEDL, G. F.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Influence of feed time and sulfate load on the organic and sulfate removal in an ASBR. **Bioresource technology**, v. 101, p. 6642–50, 2010.

MU, Y.; YU, H-Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.947-953, 2007.

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

NOVAES, L.F.; BORGES, L.O.; RODRIGUES, J.A.D.; RATUSZNEI, S.M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Effect of fill time on the performance of pilot-scale ASBR and AnSBBR applied to sanitary wastewater treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 885-899, 2010.

NOYAM, O. F. Some approach to possible atmospheric impacts of a hydrogen energy system in the light of the geological past and present-day. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p.11216-11228, 2011.

OLIVEIRA, D. S.; PRINHOLATO, A. C.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. R.; ZAIT, M.; FORESTI, E. AnSBBR applied to the treatment of wastewater from a personal care industry: Effect of organic load and fill time. **Journal of Environmental Management**, v. 90 p. 3070–3081, 2009.

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, P. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.36, p.3409-316, 2011.

PATEL, S. K.; KUMAR, P.; KALIA, V. C. Enhancing biological hydrogen production through complementary microbial metabolism. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p.10590-10603, 2012.

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

PENTEADO, E. D. LAZARO, C.Z., SAKAMOTO, I.K., ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen Production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, n. 14, p. 6137-6145, 2013.

PERERA, K. R. J.; KETHEESAN, B.; ARUDCHELVAM, Y.; NIRMALAKHANDAN, N. Fermentative biohydrogen production II: Net energy gain from organic wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 167-178, 2012.

POPP, J.; LAKNER, Z.; HARANGI-RAKÓCS, M.; FÁRI, M. The effect of Bioenergy expansion: Food, energy and environment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.32, p.559-578, 2014.

PUDUKUDY, M.; YAAKOB, Z.; MOHAMMAD, M.; NARAYANAN, B.; SOPIAN, K. Renewable hydrogen economy in Asia – Opportunities and challenges: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p.743-757, 2014.

RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; CAMARGO, E. F. M.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M. Effect of feeding strategy on a stirred anaerobic sequencing fed-batch reactor containing immobilized biomass. **Bioresource Technology**, v. 90, p.199-205, 2003.

RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; CAMARGO, E. F. M.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 127-132, 2000.

RAY, R. C., SIVAKUMAR, P. S. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1073–1087, 2009.

RIBAS, M. M. F.; CEREDA, M. P.; VILLAS BÔAS, R. L. Use of cassava wastewater treated anaerobically with alkaline agents as fertilizer for maize (*Zea mays L.*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 35, p.55-62, 2010.

RIFKIN, J. **The hydrogen economy: creating a new source of energy and the redistribution of power Earth**. M Books do Brasil: São Paulo, 2003.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digester of High-Strength Wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 58, p. 406-411, 1986.

RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Fed-batch and batch operating mode analysis of a stirred anaerobic sequencing reactor with self-immobilized biomass treating low-strength wastewater. **Journal of Environmental Management**, v.69, p. 193–200, 2003.

RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CAMARGO, E. F. M.; BORZANI, W. Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater: a developing technology. **Applied Microbial Biotechnology**, v.55, p.29-35, 2001.

RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. **New configurations and operations strategies of anaerobic biofilm reactors**. Focus on Biotechnology Research. Nova Science Publishers, Inc. p.1-58, 2006.

ROGERS, L. A. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Bacteriol.**, v. 16, p. 321-325, 1928.

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

ROSALES-SOTO, M.; GRAY, P. M.; FELLMAN, J. K.; MATTINSON, D. S.; ÜNLÜ, G.; HUBER, K.; POWERS, J. R. Microbiological and physical-chemical analysis of fermented protein-fortified cassava (*Manihot esculenta Crantz*) flour. **Food Science and Technology**, v. 66, p. 355-360, 2016.

ROSENGREN, A.; LINDBLAD, M.; LINDQVIST, R. The effect of undissociated lactic acid on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p. 159-166, 2013.

SÁ, L. R. V.; OLIVEIRA, T. C.; SANTOS, T. F.; MATOS, A.; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities' performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7543-7549,

2011.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 13172-13191, 2011.

SACRAMENTO, E. M.; CARVALHO, P. C. M.; LIMA, L. C.; VERIZOGLU, T. N. Feasibility study for the transition towards a hydrogen economy: A case study in Brazil. **Energy Policy**, v.62, p.3-9, 2013.

SÁNCHEZ, E.; WEILAND, P.; TRAVIESO, L. Effect of the organic volumetric loading rate on soluble COD removal in down flow anaerobic fixed bed reactors. **Bioresource Technology**, v. 47, p. 173-176, 1994.

SANTOS, D. A. **Estudo da produção de biohidrogênio em AnSBBR com recirculação da fase líquida tratando água residuária sintética – Efeito da carga orgânica**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2012.

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

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

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

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

SILVA, A. J.; HIRASAWA, M. B.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v.12, p.93-98, 2006.

SINGHAL, Y.; SINGH, R. Effect of microwave pretreatment of mixed culture on biohydrogen production from waste of sweet produced from *Benincasa hispida*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p.7534-7540, 2014.

SINHA, P., PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p.7460-7478, 2011.

SMAOUI, S.; ELLEUCH, L.; BEJAR, W.; REBAI, I. K.; AYADI, I.; JAOUADI, B.; MATHIEU, F.; CHOUAYEKH, H.; BEJAR, S.; MELLOULI, L. Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 162, p. 1132-1146, 2010.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, v.17, p.416a-427a, 1983.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADY, S. Hydrogen production from cassava wastewater using a anaerobic sequencing batch reactor: Effects of

operational parameters, COD: N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 4092-4102, 2010.

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

TORRES, D. G.B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q.; COELHO, S. R. M.; GOMES, S. D. hydrogen production and performance of anaerobic fixed-bed reactors using three support arrangements from cassava starch wastewater. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.160-172, 2017.

TROMP, T. K.; SHIA, R. L. M.; ALLEN, M.; EILER, J. M.; YUNG, Y. L. Potential environmental impact of a hydrogen economy on the stratosphere. **Science**, v. 300, p. 1740-1742, 2003.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, v.2, p.107-125, 2008.

VARGAS, J. A.; CELIS, L. B.; BUITRÓN, G.; FLORES, E. R.; MONDRAGON, F. A. Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, p.13884-13894, 2013.

VASQUEZ, I. V.; VARALDO, H. M. P. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

VEZIROGLU, N. T.; SAHIN, S. 21st Century's energy: Hydrogen energy system. **Energy Conversion and Management**, v.49, p.1820-1831, 2008.

VICENZINI, M.; MATERASSI, R.; SILI, C.; FLORENZANO, G. Hydrogen production by immobilized cells III: prolonged and stable H₂ photoevolution by *Rhodospesudomonas palaustris* in light -dark-cycles. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 11, p. 623-623, 1986.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p. 799-811, 2009.

WANG, X.; JIN, B.; MULCAHY, D. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.4998-5005, 2008.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials; recent achievements, prospects and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p.10-18, 2015.

WEI, J.; LIU, Z. T.; ZHANG, X. Biohydrogen production from starch wastewater and application in fuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.2949-2952, 2010.

WU, S. Y.; HUNG, C. H.; LIN, C. Y.; LIN, P. L.; LEE, K. S.; LIN, C. N.; CHANG, F. Y.; CHANG, K. S. HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.1542-1549, 2008.

WU, C. W.; WHANG, L. M.; CHENG, H. H.; CHAN, K. C. Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 30-36, 2012.

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

YOSSAN, S.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p.13806-13814, 2012.

YOUNG, J. C. Factors affecting the design and performance of up flow anaerobic filters. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 133-155, 1991.

ZAIAT, M.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CAMARGO, E. F. M.; BORZANI, W. Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater: a developing technology. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 55, p. 29-35, 2001.

ZHU, H.; BÉLAND, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1980-1988, 2006.