

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM
BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA (AnSBBR) A
PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE CERVEJARIA**

MABEL KARINA ARANTES

Toledo – PR – Brasil

Setembro de 2018

MABEL KARINA ARANTES

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO OPERADO
EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA
(AnSBBR) A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE CERVEJARIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sequinel

Toledo – PR – Brasil

Setembro de 2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Arantes, Mabel Karina

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA (AnSBBR) A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE CERVEJARIA / Mabel Karina Arantes; orientador(a), Edson Antonio da Silva; coorientador(a), Rodrigo Sequinel, 2018.

116 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

1. Biohidrogênio. 2. Klebsiella pneumoniae. 3. Fermentação natural. 4. Água residuária de cervejaria. I. da Silva, Edson Antonio. II. Sequinel, Rodrigo. III. Título.

Agradecimentos

A Deus pela saúde e disposição para me dedicar a este trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e torcida.

Ao meu esposo, professor e pesquisador Helton José Alves pelo apoio incondicional.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Unioeste pela oportunidade de capacitação.

Ao Professor da Unioeste Edson Antonio da Silva pela orientação, cordialidade e boa disposição para auxiliar na resolução dos problemas.

Ao Professor da UFPR Rodrigo Sequinel pela coorientação e pelo empenho no desenvolvimento de metodologias analíticas empregadas neste trabalho.

Aos técnicos de laboratório da UFPR, Lázaro e Carine, pela colaboração na rotina do laboratório com agilidade e eficiência.

À estudante de graduação Bruna Machado pela participação no projeto com comprometimento, seriedade e competência.

Ao estudante de graduação João Vitor S. Ferreira e ao técnico de laboratório Guilherme Lenz pela colaboração em análises cromatográficas.

À professora da UFPR Adriana Fiorini pelo auxílio na caracterização molecular de microrganismos.

À Professora da Unioeste Simone D. Gomes e a seus orientados pelas conversas, trocas de experiências e dicas valiosas no início do trabalho.

À empresa que permitiu a coleta da água residuária para os trabalhos.

À UFPR pela concessão do afastamento para capacitação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Objetivos específicos	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 H ₂ : produção e uso	3
2.2 Produção biológica de hidrogênio: biohidrogênio (bioH ₂)	5
2.2.1 Inóculos produtores de hidrogênio.....	7
2.2.2 Rotas metabólicas e reações envolvidas na produção de bioH ₂ ..	15
2.2.3 Substratos para a produção biológica de hidrogênio	19
2.2.4 Biorreatores para a produção de bioH ₂	20
2.2.5 Suportes para imobilização de biomassa nos biorreatores	21
2.2.6 Efeito de parâmetros diversos sobre a produção de bioH ₂	22
2.3 Água residuária de cervejaria: geração, tratamento e aproveitamento convencionais	25
2.4 Composição e características físico-químicas de águas residuárias de cervejaria	28
2.5 Produção de biogás a partir de águas residuárias de cervejaria	34
2.6 Produção de biohidrogênio a partir de água residuária de cervejaria e inóculos mistos	38
2.7 Biohidrogênio a partir de água residuária de cervejaria usando como inóculo <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
2.8 Considerações finais da revisão bibliográfica.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Água residuária de cervejaria	44
3.2 Ensaios preliminares em batelada	45

3.3	Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR).....	46
3.4	Suportes para imobilização da biomassa.....	47
3.5	Inóculos.....	49
3.5.1	Inóculo misto gerado por fermentação natural	49
3.5.2	Inóculo isolado (cultura pura).....	49
3.6	Métodos analíticos	50
3.7	Descrição dos ensaios realizados.....	52
3.7.1	FASE I: Avaliação da fermentação natural como fonte de inóculo .	52
3.7.2	FASE II: Avaliação do inóculo puro, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
3.8	Indicadores de produção de bioH ₂	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Composição da água residuária de cervejaria e correlação com o potencial para a produção de biohidrogênio	60
4.1.1	Parâmetros determinados por análises físico-químicas.....	60
4.1.2	Elementos químicos determinados por ICP-OES na água de produção de cerveja e em águas residuárias	64
4.2	Resultados obtidos na FASE I: Avaliação da fermentação natural como fonte de inóculo.....	67
4.2.1	Características do inóculo.....	67
4.2.2	Características do suporte selecionado para adesão da biomassa	69
4.2.3	Ensaio de produção de bioH ₂ em pequena escala	71
4.2.4	Produção de bioH ₂ em reator anaeróbio com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica – Ensaio R1 a R3.....	72
4.3	Fase II: utilização de uma <i>Klebsiella pneumoniae</i> como inóculo para produção de bioH ₂ com água residuária de cervejaria.....	76
4.3.1	Confirmação da espécie <i>Klebsiella pneumoniae</i>	77
4.3.2	Avaliação do inóculo frente a água residuária sintética – Ensaio R4.....	78
4.3.3	Produção de bioH ₂ a partir de água residuária de cervejaria: efeito da concentração de substrato, da carga orgânica volumétrica aplicada e do tempo de ciclo.....	79

4.3.3.1	Ensaio R5: C_{carb} de 2,8 g L ⁻¹ , COV_c de 2,6 g (L dia) ⁻¹ e tempo de ciclo de 24h	80
4.3.3.2	Ensaio R4 e R5: água residuária sintética X água residuária de cervejaria	84
4.3.3.3	Ensaio R6 e R7: efeitos de C_{carb} , COV_c e do tempo de ciclo	85
4.4	Avaliação dos metabólitos solúveis: correlações com a produção de H ₂ e com as rotas metabólicas	88
4.5	Caracterização da biomassa ao final dos ensaios	97
4.6	Comparações com a literatura	99
5.	CONCLUSÃO	104
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

Lista de Figuras

Figura 2.1 :Rotas da digestão anaeróbia.....	7
Figura 2.2: Degradação do formato para geração de H ₂ e CO ₂ por <i>K. pneumoniae</i>	18
Figura 2.3: Setores responsáveis pela geração de água residuária em uma cervejaria	26
Figura 2.4: Formas de amido presentes no malte.	31
Figura 3.1: Aparato experimental para os ensaios preliminares de pequena escala.....	45
Figura 3.2: Ilustração do reator anaeróbio (AnSBBR) com agitação mecânica e biomassa imobilizada	47
Figura 3.3: Suportes para imobilização do inóculo	48
Figura 3.4 : Ativação e cultivo de <i>K. pneumoniae</i> para posterior imobilização em suporte.	54
Figura 4.1: Concentração de elementos químicos na água de produção e em dois lotes de água residuária de cervejaria	66
Figura 4.2: Imagem da suspensão obtida por fermentação natural e coloração de Gram típica.....	71
Figura 4.3: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para argila expandida	70
Figura 4.4: Produção volumétrica de H ₂ , variação do pH e consumo de ART para inóculo de fermentação natural imobilizado em diferentes suportes.....	71
Figura 4.5: Volume e produtividade volumétrica de H ₂ para ensaios empregando inóculo de fermentação natural (R1, R2 e R3) em reator AnSBBR.	73

Figura 4.6: Variação da concentração e eficiência de remoção de açúcares para ensaios empregando inóculo de fermentação natural em reator anaeróbio (R1, R2 e R3).	75
Figura 4.7: Produto de PCR para a cepa isolada e cepas controle	77
Figura 4.8: Volume de H ₂ , produtividade volumétrica de H ₂ , variação do pH e teor de H ₂ no biogás, para ensaio de produção de H ₂ empregando <i>K. pneumoniae</i> e água residuária sintética (R4).	78
Figura 4.9. Volume de H ₂ , produtividade volumétrica de H ₂ , variação do pH e teor de H ₂ no biogás para ensaio R5.	81
Figura 4.10: Consumo e eficiência de remoção de açúcares e rendimento de H ₂ , para o ensaio R5.	82
Figura 4.11: Variação da DQO e eficiência de remoção de DQO para o ensaio R5.	83
Figura 4.12: Produção de H ₂ em AnSBBR inoculado com <i>K. pneumoniae</i> e alimentado com ARS (sacarose) ou ARC (cervejaria)	84
Figura 4.13: Produtividade volumétrica de H ₂ e vazão molar de H ₂ para reator AnSBBR inoculado com <i>K. pneumoniae</i> : efeito da concentração de carboidratos, do tempo de ciclo e da carga orgânica volumétrica aplicada	86
Figura 4.14: Proporção e concentração dos ácidos orgânicos voláteis nas águas residuárias e nas bateladas sequenciais dos ensaios R5 , R6 e R7, associado ao PVH.	90
Figura 4.15: Concentrações dos ácidos acético e butírico e relação ácido butírico / ácido acético para os ensaios R5, R6 e R7	92
Figura 4. 16: Concentração dos álcoois detectados nos efluentes dos ensaios R5, R6 e R7.	93
Figura 4.17: Concentração dos ácidos orgânicos associado ao PVH e concentração de etanol nos ensaios R5, R6 e R7.	95
Figura 4.18: Variação do pH nos ensaios R5, R6 e R7.	96

Figura 4.19: Colônias obtidas após cultivo ao final dos ensaios R5 e R7 e produto de PCR amplificado a partir de colônias isoladas 98

Figura 4.20: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura para fragmentos de argila expandida com inóculo aderido, bacilos de *K. pneumoniae*, ao final do ensaio R5 99

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Condições experimentais e principais resultados para trabalhos de produção de biohidrogênio utilizando <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
Tabela 2.2: Condições experimentais e principais resultados para trabalhos de produção de biohidrogênio para diversas águas residuárias e inóculos.	12
Tabela 2.3: Reações metabólicas e enzimas relacionadas com a produção de H ₂ por <i>K. pneumoniae</i>	19
Tabela 2.4: Características físico-químicas de água residuária de cervejaria.	30
Tabela 2.5: Composição do malte com relação aos principais elementos químicos.....	33
Tabela 2.6: Pesquisas recentes sobre produção de CH ₄ a partir de água residuária de cervejaria.	35
Tabela 2.7: Produção biológica de H ₂ utilizando água residuária de cervejaria	39
Tabela 3.1: Caracterização físico-química dos lotes de ARC coletados.....	44
Tabela 3.2: Condições experimentais para os ensaios com inóculo obtido por fermentação natural em reator AnSBBR.	53
Tabela 3.3: Descrição dos ensaios de produção de bioH ₂ com inóculo <i>K. pneumoniae</i> em reator AnSBBR.....	56
Tabela 4.1: Composição dos diferentes lotes de água residuária de cervejaria empregados neste trabalho.....	61
Tabela 4.2: Elementos químicos determinados por ICP-OES na água de produção e em lotes de água residuária de cervejaria.....	65
Tabela 4.3: Indicadores da produção de bioH ₂ em reator AnSBBR inoculado por fermentação natural (R1, R2 e R3) e comparações com a literatura..	74
Tabela 4.4: Indicadores da produção de bioH ₂ em reator AnSBBR inoculado com <i>Klebsiella pneumoniae</i> , empregando ARC como substrato.....	88

Tabela 4.5: Indicadores de produção de bioH₂ no presente trabalho (R6 e R7) e comparações com a literatura, para reator AnSBBR e diferentes substratos.....101

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviatura / Sigla	Denominação
APBR	<i>Acidogenic Packed Bed Reactor</i>
AOV	Ácidos Orgânicos Voláteis
ART	Açúcares Redutores Totais
AR	Água residuária
ARC	Água residuária de cervejaria
ARS	Água Residuária sintética
AFBR	<i>Anaerobic Fluidized Bed Reactor</i>
AnSBBR	<i>Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor</i>
BioH ₂	Biohidrogênio
C _{carb}	Concentração de carboidratos
COV	Carga Orgânica Volumétrica aplicada
COV _c	Carga Orgânica Volumétrica aplicada, em termos de carboidratos
COV _D	Carga Orgânica Volumétrica aplicada, em termos de DQO
[ART]	Concentração de Açúcares Redutores Totais
DQO	Demanda Química De Oxigênio
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
DA	Digestão Anaeróbia
CO ₂	Dióxido de Carbono
ER _{ART}	Eficiência de Remoção de ART
ER _{DQO}	Eficiência de Remoção de DQO
FN	Fermentação Natural

H_2	Gás Hidrogênio
CH_4	Gás Metano
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
PVH	Produtividade Volumétrica de Hidrogênio
Y_{H_2}	Rendimento de Hidrogênio
TDH	Tempo De Detenção Hidráulica
t_{ciclo}	Tempo de ciclo
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
Q_g	Vazão de biogás
Q_{H_2}	Vazão de Hidrogênio
U_{H_2}	Vazão molar de Hidrogênio

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO OPERADO EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM BIOMASSA IMOBILIZADA (AnSBBR) A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE CERVEJARIA

Resumo

A produção biológica de hidrogênio (bioH_2) por meio de fermentação anaeróbia de fontes de carbono residuais é uma forma interessante de aliar a adequação ambiental de efluentes agroindustriais à geração de produto de valor agregado. Águas residuárias que possuam fontes de carbono fermentescíveis apresentam alto potencial para a produção de bioH_2 , o que é possível com diferentes inóculos e reatores biológicos. É o caso da água residuária de cervejaria, gerada em grandes quantidades no Brasil e no mundo e para a qual poucos estudos foram realizados até o momento. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a produção de biohidrogênio em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada, *AnSBBR*, a partir de água residuária de cervejaria, empregando dois inóculos: cultura mista proveniente da fermentação natural de meio sintético à base de sacarose e cultura pura de *Klebsiella pneumoniae*, suportados em argila expandida. Foram avaliados os efeitos da concentração afluente (2,8 a 7,2 $\text{g}_{\text{ART}} \text{L}^{-1}$), da carga orgânica volumétrica aplicada (2,6 a 12,6 $\text{g}_{\text{ART}} (\text{L dia})^{-1}$) e do tempo de ciclo (12 h e 24 h) em ensaios com duração entre 9 e 16 ciclos. O inóculo obtido por fermentação natural apresentou potencial para produção de bioH_2 em ensaios preliminares (frascos agitados, 0,5 L) mas na avaliação em reator a produção foi baixa, instável e breve (período inferior a 7 dias). Já o inóculo puro, *K. pneumoniae* apresentou boa adaptação ao resíduo e atividade durante todo o período avaliado. O aumento da carga orgânica volumétrica aplicada (COV_c) até 12,6 $\text{g}_{\text{ART}} (\text{L dia})^{-1}$ e a redução do tempo ciclo de 24 h para 12 h tiveram um efeito positivo sobre a produção e nestas condições foram obtidos os melhores valores para os parâmetros de avaliação: produtividade volumétrica de H_2 média de 0,9 $\text{L}_{\text{H}_2} (\text{L dia})^{-1}$, vazão molar de H_2 máxima de 10,8 $\text{mmol}_{\text{H}_2} \text{h}^{-1}$, rendimento de H_2 médio de 3,9 $\text{mol}_{\text{H}_2} \text{Kg}_{\text{ART}}^{-1}$, com teor de H_2 no biogás entre 18 e 42% e eficiência média de remoção de ART e de DQO de 89% e 23%, respectivamente, com predomínio das rotas metabólicas acética e butírica. Estes resultados indicam uma produção promissora de H_2 a partir de água residuária de cervejaria empregando *K. pneumoniae* como inóculo em reator *AnSBBR*, contribuindo para o desenvolvimento da tecnologia do bioH_2 ao propor um novo inóculo para o aproveitamento do potencial de uso desta água residuária.

Palavras-chave: biohidrogênio; inóculos; *Klebsiella pneumoniae*; fermentação natural; água residuária de cervejaria.

BIOHYDROGEN PRODUCTION IN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH BIOFILM REACTOR (AnSBBR) FROM BREWERY WASTEWATER

Abstract

The biological production of hydrogen (bioH₂) through anaerobic fermentation of residual carbon sources is an interesting way to combine the environmental adequation of agro-industrial wastewaters to the generation of value-added products. Wastewaters with fermentable carbon sources have high potential to produce bioH₂, being possible using different inoculum and biological reactors. It is the case found in brewery wastewater, generated in large amount at Brazil and around the world, and there are only few studies about it. In this context, this work studied the production of bioH₂ by an anaerobic reactor operated in sequencing batch with immobilized biomass, *AnSBBR*, from brewery wastewater, using two inocula: mixed culture from the natural fermentation of synthetic wastewater based on sucrose and pure culture of *Klebsiella pneumoniae*, immobilized in expanded clay. Were evaluated the effects of influent concentration (2,8 a 7,2 g_{TRS} L⁻¹), volumetric organic load (2,6 a 12,6 g_{TRS} (L day)⁻¹) and cycle time (12 h e 24 h), in assays taking from 9 to 16 cycles. The inocula gotten through natural fermentation showed potential to produce bioH₂ in preliminary experiments (shaken bottles, 0,5 L) but, in the tests on the reactor the production was low, instable and brief (less than 7 days). The pure inocula *K. pneumoniae* showed a good adaptability to the residue, in activity through the whole experiment. The raise in the volumetric organic load (VOL_C) up to 12,6 g_{TRS} (L day)⁻¹ and the reduction of the cycle from 24 h to 12 h had a positive effect in the production and, under those conditions, the best values for the evaluation parameters ahead were obtained: volumetric productivity average of 0,9 L_{H₂} (L day)⁻¹, molar flow rate up to 10,8 mmol_{H₂} h⁻¹, molar yield average de 3,9 mol_{H₂} Kg_{TRS}⁻¹, with H₂ content in biogas between 18 and 42% and TRS and COD removal efficiency of 89% and 23%, respectively, with a predominance of acetic and butyric pathways. Those results indicate a promising production of H₂ from brewery wastewater using *K. pneumoniae* as inocula in *AnSBBR* reactor, contributing to the development of the bioH₂ technology by the proposal of a new inocula to achieve a higher use of this wastewater potential.

Keywords: biohydrogen; inocula; *Klebsiella pneumoniae*; natural fermentation; brewery wastewater.

1. INTRODUÇÃO

Uma das razões para o interesse pela produção de H_2 é seu alto valor agregado, uma vez que é insumo para diversos processos nas indústrias química, petroquímica, alimentícia, dentre outras. O H_2 também possui potencial promissor para o uso no setor energético, sendo que rendimentos elevados são observados nas células a combustível para a geração de energia elétrica, o que é ambientalmente interessante, pois o produto resultante deste processo é apenas a água. Rotas termoquímicas são os processos mais comuns para produção de H_2 , entretanto, são altamente endotérmicos e dependentes do aprimoramento de catalisadores. Sendo assim, a produção biológica de H_2 (biohidrogênio) por fermentação anaeróbia se apresenta como uma via interessante pois acontece em condições de temperatura e pressão similares à ambiente além de permitir o uso de águas residuárias como substrato para a fermentação.

Estudos de produção de biohidrogênio ($bioH_2$) por fermentação abordam, em geral, aspectos como origem do inóculo, métodos de inativação de bactérias metanogênicas, configurações de reator anaeróbio e condições como relação C/N, alcalinidade, pH, tempo de detenção hidráulico, temperatura, dentre outros. Dentre as fontes de inóculos avaliadas destacam-se as culturas mistas, como lodos anaeróbios pré tratados ou culturas geradas por fermentação natural ou culturas puras anaeróbias estritas ou facultativas, com a possibilidade de serem isoladas de fontes já adaptadas ao resíduo que se deseja tratar. Uma diversidade de efluentes líquidos tem sido avaliados como substratos como por exemplo águas residuárias de indústrias de laticínios, cítrica, de biodiesel (glicerol), de celulose, sucroalcooleira, de fecularia, dentre outras.

No âmbito dos efluentes líquidos gerados em grandes quantidades e com potencial para produção de H_2 , a água residuária de cervejaria se apresenta como importante objeto de pesquisa por vários motivos: é gerada em grande quantidade no Brasil e no mundo, uma vez que para cada litro de cerveja produzida são gastos entre 4,5 e 10 litros de água; possui alta carga orgânica requerendo processos de tratamento para adequação ambiental antes do despejo em corpos hídricos; é rica em açúcares remanescentes do processo de fabricação de cervejas, o que significa substrato fermentescível para a atividade microbiana.

Além disso, deve-se considerar o fato de que há poucos trabalhos na literatura que utilizam esse efluente para a produção de H₂, os quais apresentam, em sua maioria, resultados de experimentos em frascos de pequeno volume, avaliados por um curto período de tempo, utilizando inóculos provenientes de biodigestores e sem controle dos parâmetros operacionais ao longo da reação, o que só é possível quando se utiliza reatores anaeróbios.

Tendo em vista este cenário, nota-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o potencial da água residuária de cervejaria como substrato para a produção de H₂, avaliando também a estabilidade operacional e a reprodutibilidade do processo ao longo do tempo, além da proposição de inóculos diversificados.

1.1 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo a produção biológica de hidrogênio em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) utilizando dois tipos de inóculo, de fermentação natural de meio sintético e cultura pura de *Klebsiella pneumoniae*, empregando como substrato água residuária de cervejaria.

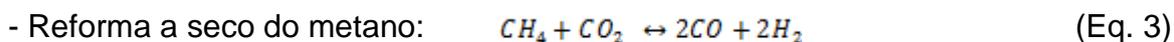
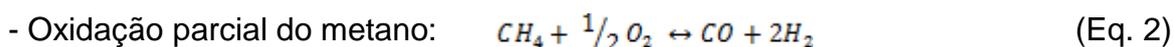
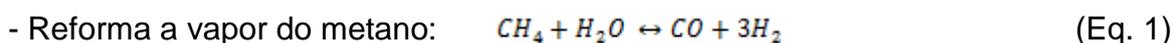
1.2 Objetivos específicos

- Avaliação de inóculo gerado por fermentação natural de meio sintético à base de sacarose;
- Avaliação de um inóculo isolado previamente, cepa pura de *Klebsiella pneumoniae*, na forma de biofilme (suportado);
- Avaliação dos materiais suporte para fixação de microrganismos para uso em reatores operados em bateladas sequenciais: argila expandida e mídias biológicas cerâmica e plástica;
- Avaliação do efeito da concentração afluyente, da carga orgânica volumétrica aplicada e do tempo de ciclo sobre a produção de bioH₂;
- Avaliação das rotas metabólicas predominantes para o inóculo *Klebsiella pneumoniae* por meio da caracterização dos ácidos orgânicos voláteis e álcoois.

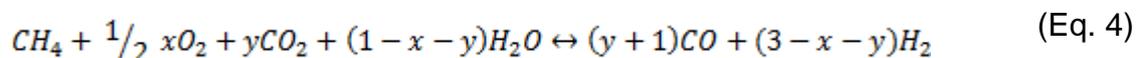
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrogênio (H₂): produção e uso

No campo das técnicas de produção de H₂, comumente são empregados os processos de reforma ou oxidação do gás natural, com cerca de 90% de CH₄, e do biogás, com composição variável de CH₄, dependendo do processo de purificação. Cada uma destas matérias primas apresenta restrições tais como a dependência de combustíveis fósseis (gás natural) ou a necessidade de remoção do H₂S (corrosivo) do biogás, mas são a fonte de CH₄ em processos de reforma química para obtenção de H₂. Normalmente as reações ocorrem em temperaturas entre 600 e 1000 °C com uso de catalisadores (ALVES *et al.*, 2013). As principais rotas químicas de produção de hidrogênio são as seguintes:



- Reforma autotérmica do metano:



De acordo com as particularidades da matéria prima, especialmente no caso do biogás, cuja presença de H₂S é um dos principais problemas, cada método poderá ser indicado. Outros processos de obtenção química do H₂ são utilizados como o tratamento da biomassa em condições supercríticas, pirólise ou gaseificação, gaseificação do carvão, reforma do bioetanol e eletrólise da água. No entanto a reforma química do gás natural corresponde a cerca de 48% dos processos (METCALF & EDDY, 2016; LORA & VENTURINI, 2012).

Já a produção biológica de H₂ refere-se a processos que utilizam matérias primas renováveis e processos bioquímicos (metabólicos) para geração de H₂, como a biofotólise da água por microalgas fotossintetizantes, fotofermentação de substratos por microrganismos fotoheterotróficos (dependentes de luz) e

fermentação anaeróbia não dependente de luz, desempenhada por microrganismos heterotróficos.

Na produção biológica de H₂ (biohidrogênio, bioH₂), uma grande vantagem é que o processo pode ser direcionado para produção seletiva de H₂ e o CO₂, podendo-se inibir a produção de CH₄ por exemplo. Isso é um diferencial em relação às rotas termoquímicas que, por sua vez, dependendo do substrato empregado (gás natural, biogás, etanol, glicerol, etc) e tipo de reação envolvida (reforma a vapor, reforma a seco, reforma oxidativa parcial, reforma autotérmica, etc) podem levar à obtenção de H₂ e CO (gás de síntese) em diferentes razões exigindo etapas posteriores para: i) conversão do CO em CO₂ (reação de *Shift*); ii) separação do CO ou do CO₂ convertido *por Shift*; iii) enriquecimento do produto em H₂ obtendo elevada pureza (> 99,9%, ou seja, H₂ > 3.0) (ALVES *et al.*, 2013).

No âmbito da purificação de gases, as tecnologias PSA - Pressure Swing Adsorption e de membranas seletivas, podem ser escolhidas individualmente ou combinadas, dependendo do grau de pureza requerido para o H₂ (SUN *et al.*, 2015; AUGELLETTI; CONTI; ANNESINI, 2017). Vale destacar que estas técnicas de purificação e/ou de tratamento do hidrogênio estão disponíveis no mercado a muitos anos, e portanto, são consideradas consolidadas.

O H₂ purificado é utilizado como insumo para processos da indústria petroquímica (hidrodesalquilação, hidrodessulfurização e hidrocraqueamento), de alimentos (hidrogenação de óleos), química (produção de metanol e ácido clorídrico) e em outros processos como agente redutor de minérios metálicos e *cooler* de geradores em usinas. Além disso, uma forte atenção é dada ao seu uso em células a combustível (CaC) que são dispositivos eletroquímicos de alta eficiência que convertem energia química diretamente em energia elétrica, onde o combustível, que pode ser hidrogênio ou hidrocarbonetos, é oxidado eletroquimicamente no ânodo gerando apenas vapor de água (se combustível H₂) e/ou CO₂ (se hidrocarbonetos são utilizados) e o oxidante, O₂, é reduzido no cátodo. Neste sentido, muitas pesquisas têm focado no desenvolvimento de células a combustível com membrana trocadora de prótons para viabilizar a geração de energia limpa (ALVES *et al.*, 2013).

Se o fator custo for considerado, levando-se em conta que as tecnologias que envolvem a obtenção de H₂ de elevada pureza são caras e

exigem elevados investimentos, uma alternativa interessante para o uso do bioH₂ seria em misturas de hidrometano, ou *hythane*, que consiste na mistura de bioH₂ (CO₂ + H₂) com o biogás (CH₄ + CO₂), levando a um produto gasoso com poder calorífico superior ao do biogás. O uso de misturas de hidrometano estimula a produção biológica de H₂ e de CH₄ de forma sequencial (em dois estágios) com integração dos reatores anaeróbios acidogênico e metanogênico.

Tal alternativa potencializa a geração de energia térmica a partir deste combustível gasoso pelo aumento do percentual de biogás rico em H₂, à medida que haja disponibilidade do mesmo. Esta alternativa pode ser viabilizada pois não exige elevados investimentos adicionais e não requer medidas mais rigorosas com relação à segurança, além daquelas já praticáveis pelo uso de combustíveis gasosos tradicionais (como o gás natural ou GLP), uma vez que o teor de H₂ no *hythane* normalmente não são elevados (OTHONG *et al.*, 2016) mas geram ganhos energéticos em relação ao uso de CH₄-CO₂ (ZHONG; STEVENS; HANSEN, 2015; RAFIEENIA *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2017).

2.2 Produção biológica de hidrogênio: biohidrogênio (bioH₂)

Uma das formas de produção biológica de H₂ envolve o emprego de inoculos mistos oriundos de reatores metanogênicos conhecidos como lodo anaeróbio, o qual requer pré tratamentos para inativação de bactérias metanogênicas e enriquecimento de microrganismos produtores de H₂, além de estratégias de produção que condicionem a manutenção do processo na fase acidogênica, onde há acúmulo de CO₂ e H₂, sem que ocorra seu consumo para geração de CH₄. Deste modo, se faz pertinente a compreensão da digestão anaeróbia em suas quatro fases, passando pela geração de H₂ e se encerrando no seu consumo para geração de CH₄. Essas fases podem ser descritas como a seguir: (METCALF; EDDY, 2016)

- Hidrólise: etapa básica, em que a complexidade do resíduo é reduzida envolvendo conversão de sólidos suspensos em solúveis para posterior hidrólise a moléculas simples que sejam fermentescíveis (monossacarídeos, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta). É efetivada por enzimas hidrolíticas extracelulares

de microrganismos anaeróbios e celulases extracelulares de algumas espécies de bactérias;

- Acidogênese: também pode ser denominada fermentação e é a etapa em que os substratos fermentescíveis são metabolizados por bactérias acidogênicas gerando acetato, butirato, propionato (dos ácidos acético, butírico e propiônico);

- Acetogênese: nesta etapa os substratos da fermentação são oriundos da acidogênese (propionato e butirato) e os produtos são acetato, H_2 e CO_2 ; a produção de ácidos (propiônico e acético) leva à acidificação do meio. Na presença de CO_2 e H_2 , um terceiro processo da acetogênese pode se desenvolver: a homoacetogênese, ou seja, a redução de CO_2 para ácido acético pelo H_2 ; mas no caso de reator metanogênico é baixa esta probabilidade pois as populações das bactérias metanogênicas são muito superiores às das bactérias acetogênicas consumidoras de H_2 ;

- Metanogênese: pode ocorrer por duas rotas predominantes, a acetotrófica e a hidrogenotrófica, na presença de microrganismos metanogênicos, compreendidos no grupo *Archea* (*Arquea*). Na primeira rota, acetato é convertido a CH_4 e CO_2 e na segunda H_2 é consumido reagindo com CO_2 , para formar CH_4 .

Nas etapas de acidogênese e acetogênese, muitas rotas metabólicas podem ser adotadas para gerar os produtos característicos e isso depende fortemente da composição do resíduo em termos de carboidratos, lipídeos e proteínas, o que pode ser observado na Figura 2.1 através de rotas predominantes (seta contínua) e secundárias (tracejado), para um resíduo de baixa complexidade.

A visão geral sobre o processo de digestão anaeróbia é necessária mesmo quando o bioprocessamento de interesse é a obtenção de H_2 pois ao observar as quatro fases ficam evidentes as etapas que antecedem a formação de CH_4 nas quais ocorre a produção de H_2 (hidrogenogênese); isso explica que este mesmo tipo de processo possa ser aplicado à produção de biohidrogênio, desde que a etapa de consumo de H_2 (produção de CH_4) seja evitada.

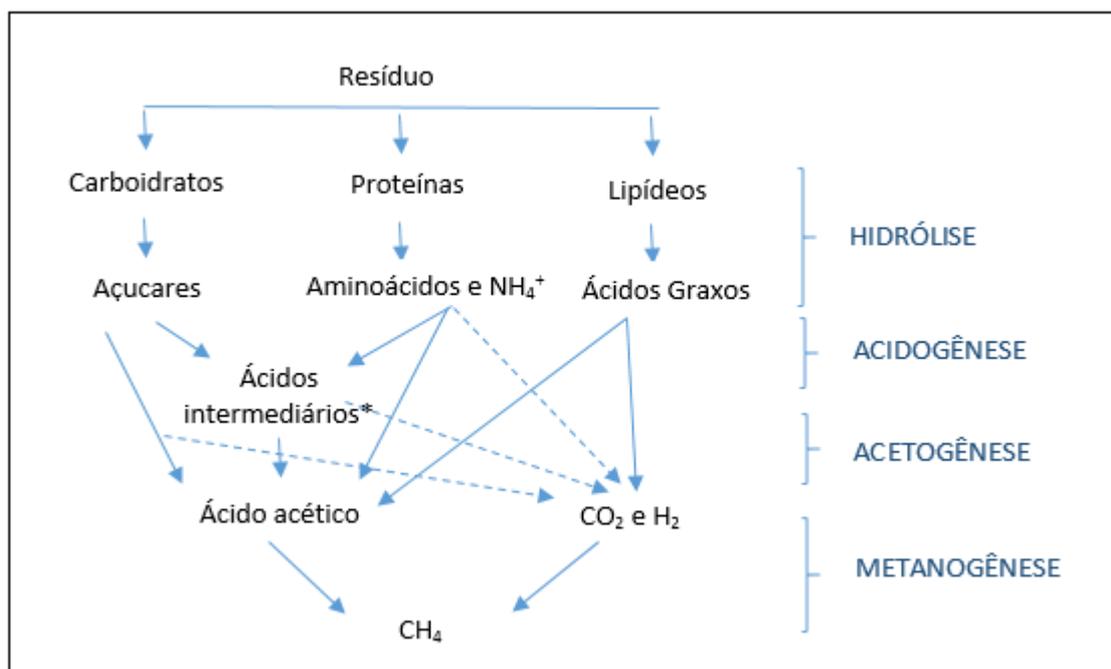


Figura 2.1 :Rotas da digestão anaeróbia (Adaptado de METCALF & EDDY, 2016).

Além dos inóculos obtidos de lodos anaeróbios, em que os processos de produção de bioH₂ são voltados para o favorecimento do acúmulo de H₂ e a inibição da produção de CH₄, outros tipos de inóculos podem ser empregados envolvendo conhecimentos próprios dos processos fermentativos, de forma desvinculada da digestão anaeróbia. Neste sentido, são apresentados a seguir os aspectos próprios da fermentação anaeróbia voltada para a produção de bioH₂, envolvendo diferentes microrganismos produtores.

2.2.1 Inóculos produtores de hidrogênio

Tanto consórcios microbianos (inóculos mistos) quanto microrganismos obtidos por isolamento têm sido aplicados à produção de bioH₂:

Bactérias isoladas: diversas espécies de microrganismos capazes de produzir H₂ por meio da *dark fermentation*, divididos em anaeróbios estritos (representados principalmente pelo gênero *Clostridium*), anaeróbios facultativos (como *Enterobacter* e *Klebsiella*) e com menor frequência aeróbios (como *Bacillus*), tem sido relatados na literatura (LEE; SHOW; SU, 2011; (SHOW *et al.*, 2012).

Considerando-se que a operação de reator é mais simples em condições mesófilas, muitos trabalhos dedicam-se a isolar bactérias de lodo aclimatado de biodigestor anaeróbio operado por longos períodos, o que tem sido relatado como boa estratégia para obtenção de bactérias produtoras de H₂ (BADIEI *et al.*, 2012), sendo a maior produção atribuída à presença de *Clostridium butyricum*. Estratégias interessantes podem ser o isolamento a partir de ambientes tipicamente anaeróbios, como no trabalho de POLETO *et al.* (2016) em que bactérias isoladas de diferentes sistemas de tratamento foram hábeis para a produção de H₂, e no trabalho de MAINTINGUER *et al.* (2017) em que bactérias do gênero *Enterobacter sp.* isoladas de lodo anaeróbio do tratamento de ARC foi hábil a produzir H₂ em condições mesófilas, empregando diferentes fontes de carbono.

Devido à facilidade de crescimento e isolamento de microrganismos anaeróbios facultativos a partir do meio ambiente, os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* vem sendo empregados visando encontrar representantes capazes de tornar a produção de H₂ descentralizada, mais acessível e expressiva (LEE *et al.*, 2014). Tratando especificamente da utilização de isolados ambientais de *Klebsiella pneumoniae* na produção de bioH₂ alguns estudos merecem destaque (Tabela 2.1). Nota-se nos estudos publicados empregando *Klebsiella pneumoniae* como inóculo o predomínio de água residuária sintética como substrato, ou seja meios sintéticos a base de glicose, fontes de proteínas, micronutrientes e elementos traço enquanto glicerol oriundo da produção de biodiesel é empregado como água residuária real. Ao mesmo tempo, os trabalhos empregando ARC como substrato empregam, em sua maioria, inóculos mistos provenientes de lodo anaeróbio pré tratado. Isto sugere que o uso de *Klebsiella pneumoniae* para produção de bioH₂ com ARC é uma estratégia nova.

Tabela 2. 1: Condições experimentais e principais resultados para trabalhos de produção de biohidrogênio utilizando *Klebsiella pneumoniae*.

Cepa	Objetivos do estudo	Condições experimentais	Observações/ Resultados	Referência
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026 (comercial)	Testar uma cepa comercial de <i>K. pneumoniae</i> na produção de bioH ₂ usando glicerol residual do biodiesel.	Como substrato glicerol, extrato de levedura e micronutrientes; batelada de 24h a 37°C em frascos de 100 mL e fermentador de 5L.	<i>K. pneumoniae</i> foi apta a metabolizar glicerol e produzir H ₂ com rendimento de até 0,53 mol mol ⁻¹ _{glic} e 118 mmol L ⁻¹ _{substrato}	(LIU; FANG, 2007)
<i>K. pneumoniae</i> BLb01 isolada de reator UASB	Isolar bactérias produtoras de H ₂ e avaliara uso do glicerol residual como substrato.	Meio sintético contendo glicerol, extrato de levedura e micronutrientes; frascos de 60 mL, a 39°C, duração não informada.	Dentre as cepas isoladas <i>K. pneumoniae</i> produziu biogás com 45 % de H ₂ e degradação do glicerol de até 98 %	COSTA, et al. 2011
<i>K. pneumoniae</i> ECU-15 isolada de planta de tratamento de esgoto	Isolar e caracterizar cepas produtoras de H ₂ ; avaliar as melhores condições de cultivo (T, pH) e a capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono.	Meios sintéticos com diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, celobiose) além de micronutrientes, peptona, extratos de levedura e de carne; bateladas de 12 h em frascos de 1L, T entre 26 e 45°C e pH entre 4,0 e 9,0	<i>K. pneumoniae</i> foi capaz de utilizar os diversos sacarídeos testados e a máxima produção ocorreu para glicose (2,1 mol _{H2} mol _{glic} ⁻¹ e 482 mL H ₂ (L h) ⁻¹ , a 37°C e pH 6,0	(NIU et al., 2010)

Tabela 2.1: Continuação

Cepa	Objetivos do estudo	Condições experimentais	Observações/ Resultados	Referência
<i>K. pneumoniae</i> ECU-15 (NIU <i>et al.</i> , 2010)	Aplicar o método de análise de fluxo metabólico para prever os mecanismos de produção de H ₂ e as melhores condições experimentais para <i>K. pneumoniae</i> ECU-15	Meio sintético com concentração de glicose entre 5 e 30 g L ⁻¹ ; bateladas em frasco de 1 L, com pH de 5 a 7,5 e T de 26 a 37°C	A análise de fluxo metabólico revelou que o fluxo de produção de H ₂ é resultado da interação de diferentes hidrogenases funcionais e que a concentração de glicose e pH tem influência direta sobre os fluxos de consumo de glicose e produção de H ₂ (ótimo: 5g L ⁻¹ glicose e pH 6)	(NIU <i>et al.</i> , 2011)
<i>K. pneumoniae</i> ECU-15 isolada anteriormente (NIU <i>et al.</i> , 2010)	Avaliar o efeito da composição de meio de cultivo (macro e micronutrientes) sobre a expressão e atividade de hidrogenases pela <i>K. pneumoniae</i> ECU-15	Meio sintético à base de glicose, extrato de levedura e micronutrientes; bateladas de 12h em frascos de 1L, T entre 30 e 40°C	Produção de H ₂ de até 5368 mL L ⁻¹ nas melhores condições de pH, temperatura e nutrientes o que tem relação com as condições favoráveis para expressão e atividade das hidrogenases	(XIAO <i>et al.</i> , 2013)

Inóculos mistos: uma fonte bastante usual é o lodo proveniente de biodigestores anaeróbios de tratamento de diversos tipos de resíduos como os de abatedouro de aves, resíduos da suinocultura, dentre outros (Tabela 2.2). Estes inóculos apresentam a vantagem de estarem aclimatados às condições anaeróbias, entretanto, requerem o uso de pré-tratamentos para inibição de bactérias produtoras de CH₄ (arqueas metanogênicas). Os autores que fazem uso deste tipo de inóculo empregam pré tratamento do mesmo, que normalmente é feito por choque térmico, uso de ácidos ou de agentes químicos como o clorofórmio com a finalidade de inativação de arqueas metanogênicas, que consomem H₂ (AMORIM *et al.*, 2009; PENTEADO *et al.*, 2013). No caso do choque térmico, os rendimentos de H₂ podem ser reduzidos devido à ineficiência da inibição de bactérias homoacetogênicas, consumidoras de H₂.

Fermentação natural: outra fonte de inóculo utilizada em diversos estudos é a fermentação natural ou autofermentação de resíduos, um modo de multiplicar microrganismos do ambiente por meio da exposição e contaminação de substratos, sejam águas residuárias sintéticas ou reais . Diversos trabalhos que relatam o emprego de fermentação natural de resíduo sintético ou de água residuária, como por exemplo o soro de queijo, são tidos como exemplos de sucesso (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Condições experimentais e principais resultados para trabalhos de produção de biohidrogênio para diversas águas residuárias e inóculos.

Inóculo	Pré tratamento	Substrato	Resultados/Observações	Referência
Lodo de reator UASB do tratamento de efluente de abatedouro de aves	do de Térmico	Sintético (sacarose), Fecularia, Indústria de produtos cítricos, laticínios	Houve produção H ₂ em todos os efluentes; produção 2X maior com sacarose.	(LUCAS <i>et al.</i> , 2015)
Lodo de reator UASB do tratamento de efluente de abatedouro de aves	do de 1.Térmico 2.Sem tratamento	Sintético - Glicerina Pura Sintético- Glicerina Bruta (biodiesel)	1,19 molH ₂ mol glicerina ⁻¹ versus 0,119molH ₂ mol glicerina ⁻¹	(LOVATO <i>et al.</i> , 2015)
Lodo de reator UASB do tratamento de efluente de indústria de tabaco	do de Sem	Sintético- Glicose com substituição gradativa por Glicerol	Decréscimo da produção ao aumentar concentração de glicerol	(TAPIA-VENEGAS <i>et al.</i> , 2015)
Lodo de reator UASB do tratamento de efluente de indústria cervejeira	do de Diversos: térmico, pH, congelamento e clorofórmio	Sintético –Glicose e ARC	Houve produção de H ₂ para o substrato sintético mas para ARC houve apenas CH ₄ , apesar dos pré tratamentos.	(SINBUATHONG; SOMJIT; LEUNGPRASERT, 2015)
Lodo de lagoa anaeróbia do tratamento de efluente contendo óleo de palma	do de Térmico	Efluente contendo óleo de palma	Realizado a aclimatação do inóculo ao substrato. Produziu H ₂	(BADIEI <i>et al.</i> , 2012)

na: não se aplica. Fonte: ARANTES *et al.*, 2017.

Tabela 2.2: Continuação

Inóculo	Pré tratamento	Substrato	Resultados/Observações	Referência
Amostras de inóculos mistos provenientes de indústria cervejeira e de reator metanogênico	Térmico, ácido, ultrassom e combinação destes.	Sintético - glicose (3,7g L ⁻¹)	Melhor produção de H ₂ para o inóculo de cervejaria, previamente enriquecido com glicose.	(BOBOESCU, I.Z. <i>et al.</i> , 2014)
1- Lodo granular de UASB do tratamento de AR de abatedouro de aves (A) e AR de atividade de suínos (B)	1A e 1B - térmico e ácido	Sintético - sacarose	Para os inóculos 1A e 1B - térmico maior Y _{H2} ; trat. ácido resultou em produção de H ₂ mais estável.	(PENTEADO <i>et al.</i> , 2013)
2- Fermentação Natural (FN) de ARS-sacarose	2 - na		A FN levou a valores de Y _{H2} similares aos obtidos com lodo.	
Isolados de lodo de estação de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo e da agroindústria	Térmico	Glicerol residual (biodiesel)	O microrganismos identificado, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , exibiu altos valores de Y _{H2} utilizando glicerol cru como fonte de Carbono	(POLETO <i>et al.</i> , 2016)
<i>Enterobacter sp</i> isolados de lodo de UASB do tratamento de ARC	*na	Meio complexo PYG	Isolados <i>Enterobacter sp</i> foram produtores de H ₂ a partir de fontes de Carbono variadas com Y _{H2} de 0.8 mol H ₂ mol ⁻¹ glucose	(MAINTINGUER <i>et al.</i> , 2017)

*na: não se aplica. Fonte: ARANTES *et al.*, 2017.

Tabela 2.2: Conclusão

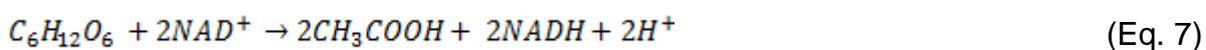
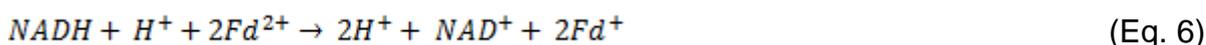
Inóculo	Pré tratamento	Substrato	Resultados/Observações	Referência
Fermentação Natural (FN) de ARS-sacarose	*na	Água residuária sintética - sacarose	Utilizou reator de tubos múltiplos; melhor produção de H ₂ foi 1,87 mmol H ₂ h ⁻¹	(GOMES <i>et al.</i> , 2015)
Fermentação Natural (FN) de ARS-sacarose	*na	Água residuária sintética - sacarose	Avaliou a influência da razão C/N sobre a produção de H ₂ obtendo o valor de 137 como ideal (10,3 mmol H ₂ h ⁻¹)	(ANZOLA-ROJAS <i>et al.</i> , 2015)
Fermentação Natural (FN) de ARS-sacarose	*na	Água residuária sintética - sacarose	Avaliou a influência da razão de recirculação sobre a produção de H ₂ ; Em R=0,6 a produção foi favorecida alcançando 4,22 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	(FONTES LIMA; ZAIAT, 2012)
Fermentação Natural de soro de queijo	*na	Soro de queijo	A comunidade microbiana apresentou <i>Klebsiella</i> e <i>Clostridium</i> , dentre outros microrganismos e a produção de H ₂ chegou a 1.1 mol H ₂ mol lactose ⁻¹	(PERNA <i>et al.</i> , 2013)

*na: não se aplica. Fonte: ARANTES *et al.*, 2017.

2.2.2 Rotas metabólicas e reações envolvidas na produção de bioH₂

A) Aspectos gerais

De acordo com LEE e colaboradores (2011) pode-se dizer que a produção de H₂ por fermentação anaeróbia é devida à capacidade de muitos microrganismos de reduzir prótons (H⁺) a hidrogênio molecular (H₂) por meio de suas enzimas hidrogenases, num processo que envolve redução/oxidação de transportadores de elétrons de modo a manter a neutralidade elétrica do meio e suprir o processo com ATP, bem como redução e oxidação das coenzimas NAD e NADH, conforme apresentado nas Equações 5 a 7.

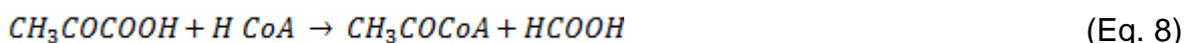


Em que:

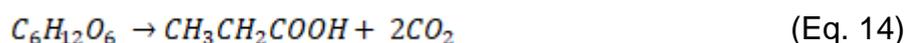
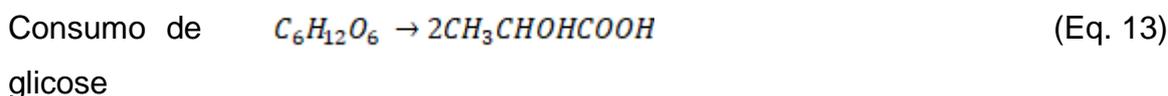
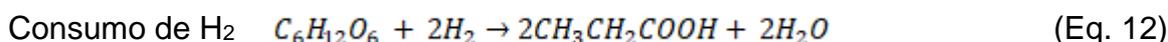
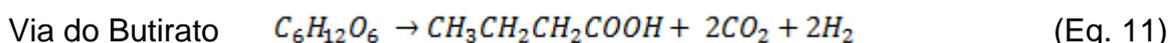
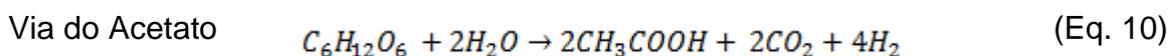
Fd: Ferredoxina Oxidoreductase

NAD⁺/NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma oxidada/ forma reduzida

Este processo é o predominante no caso de bactérias anaeróbias obrigatórias do gênero *Clostridium*, especialmente por expressarem coenzimas específicas como a Ferredoxina oxirredutase. No entanto, para bactérias anaeróbias facultativas da família *Enterobacteriaceae*, carentes destas coenzimas específicas mas capazes de metabolizar piruvato a acetil- CoA e ácido fórmico, este último é degradado a H₂ e CO₂ (Equações 8 e 9).



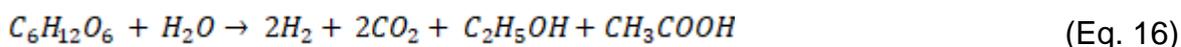
Mesmo neste tipo de processo um equilíbrio entre as concentrações de NADH/NAD⁺ deve ser mantido; em função disso, as enterobactérias costumam utilizar piruvato e seus derivados como receptores de elétrons e hidrogênio, o que leva à formação de álcoois e ácidos, os quais estão relacionados a rotas de produção de H₂ (ácidos acético e butírico, Eq. 10 e 11), de consumo de H₂ produzindo ácido propiônico (Eq. 12) ou ainda de competição por glicose diminuindo os rendimentos de H₂ e produzido ácido láctico, propiônico e etanol (Eq 13, 14, 15) (ANTONOPOULOU *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2015; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015)



Como não é possível que o processo aconteça seguindo exclusivamente uma via metabólica, ao mesmo tempo em que as duas vias (do acetato e do butirato) levam à produção de bioH₂, a relação acetato/butirato pode ser correlacionada ao rendimento de H₂, juntamente com a quantificação de álcoois e com os níveis de expressão de enzimas hidrogenases (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014). Neste caso, processos favoráveis à produção de H₂ devem apresentar alta

relação acetato/butirato (ou baixa relação butirato/acetato) e menor presença de álcoois

O etanol, geralmente associado a menores rendimentos de H₂ por competição pela glicose (Eq. 15) pode também ser gerado por uma rota fermentativa etanólica favorável à produção de H₂ que produz também ácido acético (Eq. 16); mas para que isto ocorra deve haver alta relação acetato/butirato, na presença de etanol, com boa produção de H₂, ou seja, não se deve estabelecer a relação direta entre produção de etanol e produção de H₂ mas ele também não deve ser associado exclusivamente a prejuízos na produção de H₂.



Também é possível favorecer as reações de produção de H₂ nos processos biológicos por meio da manipulação das condições experimentais no reator biológico (MANSSOURI *et al.*, 2013);(SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014); (LOVATO *et al.*, 2015). As principais estratégias adotadas para este fim na operação dos reatores são descritas na seção 2.2.4 referente a “biorreatores para a produção de Bio- H₂”.

B) Aspectos específicos para *Klebsiella pneumoniae*

Abordando especificamente os fluxos metabólicos de *K. pneumoniae* para a produção de biohidrogênio, autores tem detalhado rotas e metabólitos solúveis que estão presentes quando esta bactéria utiliza glicose como substrato (LEONHARTSBERGER; KORSA; BÖCK, 2002; CHEN *et al.*, 2009; NIU *et al.*, 2010; NIU *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013) ou ainda glicerol (COSTA *et al.*, 2011).

Duas rotas principais de produção de H₂ podem ser seguidas por essa enterobactéria: a rota de oxidação do NADH (2NADH ↔ H₂ + 2NAD⁺) e a rota do formato operada pelo complexo formato hidrogênio liase ou ‘*formate hydrogen lyase*’, FHL. Na Figura 2.2, a porção destacada expressa a via do formato em que o aumento da concentração de formato (na degradação de glicose a piruvato e formato) ativa o regulador FhlA, responsável pela expressão de enzimas que irão compor o complexo FHL, que degrada o formato em H₂ e CO₂; isso se dá na ausência de nitrato e sob pH ácido.

Sob o ponto de vista das diversas reações metabólicas que estão no envolvidas no complexo sistema de metabolismo da glicose por *K. pneumoniae* para geração de H₂ e CO₂, Niu e colaboradores (2011) propuseram 30 reações que envolvem tanto geração como consumo de H₂ ou ainda competição por reagentes; destas destaca-se aqui as reações da Tabela 2.3. O conhecimento das reações envolvidas no processo permitiu o ajuste das condições experimentais visando a redução de reações desfavoráveis; como exemplo pode-se citar o efeito positivo do aumento da temperatura (de 34 a 37°C) sobre a diminuição da reação de consumo de NADH para geração de etanol, de modo a manter os níveis de NADH cuja oxidação leva a H₂.

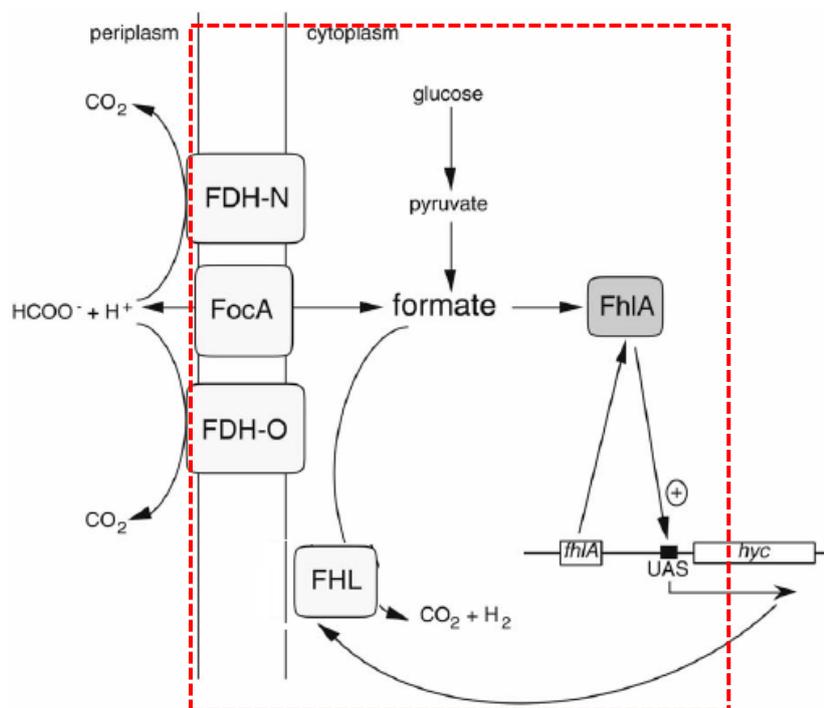


Figura 2.2: Degradação do formato para geração de H₂ e CO₂ por *K. pneumoniae*. Fonte: LEONHARTSBERGER; KORSÄ; BÖCK (2002).

Tabela 2. 3: Reações metabólicas e enzimas relacionadas com a produção de H₂ por *K. pneumoniae*

Descrição	Reação	Enzima
Metabolismo do Piruvato na geração de H ₂	$PYR + COA \rightarrow ACCOA + HCOOH$	Piruvato formato liase
	$HCOOH \rightarrow H_2 + CO_2$	Formato hidrogênio liase
Metabolismo do piruvato com consumo de NADH	$PYR + NADH \leftrightarrow NAD^+ + \text{Ác. láctico}$	Lactato desidrogenase
	$2 PYR \rightarrow AC + 2CO_2$	Acetolactato sintase
	$AC + NADH \rightarrow NAD^+ + 2,3 \text{ Butanodiol}$	Butanodiol desidrogenase
	$ACCOA + 2NADH \rightarrow COA + 2NAD^+ + \text{Etanol}$	Alcool desidrogenase

PYR, piruvato; COA, Coenzima A; ACCOA, acetil coenzima A; NADH/NAD⁺, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, reduzida/oxidada; AC, acetoína ((NIU et al., 2011)).

Na Tabela 2.3 pode-se observar o papel das desidrogenases na diminuição dos rendimentos de H₂ (lactato, butanodiol e álcool desidrogenases), mas além destas as próprias hidrogenases podem ser bidirecionais no processo, ou seja, atuar tanto na produção como no consumo de H₂. Para contornar este tipo de problema propõe-se a manipulação genética de microrganismos como forma de barrar a expressão destas enzimas (NIU et al., 2011).

2.2.3 Substratos para a produção biológica de hidrogênio

Diversos substratos têm sido testados no Brasil e no mundo em pesquisas visando a obtenção de bioH₂ a partir de efluentes agroindustriais com elevada carga orgânica. A vantagem de utilizar resíduos como substrato é aliar a adequação ambiental ao seu aproveitamento como matéria prima para obtenção de produto de valor agregado. De um modo geral, a característica central para que águas residuárias sejam adequadas para a produção de bioH₂ é a presença de carboidratos fermentescíveis. No caso de carboidratos de cadeia longa, como o amido, a etapa inicial da biodigestão, a hidrólise, é responsável por tornar

disponíveis os carboidratos em suas formas fermentescíveis. Uma característica comum de águas residuárias agroindustriais é a elevada carga orgânica (elevada DQO) e em alguns casos, elevado teor de sólidos; já as características tais como pH, alcalinidade, teores de nitrogênio e fósforo são muito variáveis de acordo com o tipo de efluente.

Diferentes águas residuárias tem sido avaliadas como substrato para a produção de H₂ como vinhaça (FERNANDES, *et al.*, 2010; SYDNEY *et al.*, 2014), efluente contendo óleo de palma (BADIEI *et al.*, 2012), destilaria (WICHER *et al.*, 2013), soro de queijo (PERNA *et al.*, 2013), manipueira, laticíneos e indústria cítrica (LUCAS *et al.*, 2015), efluente da produção do biodiesel (FERNANDES, BRUNA SOARES *et al.*, 2010; LOVATO *et al.*, 2015; TAPIA-VENEGAS *et al.*, 2015; POLETO *et al.*, 2016), além de diversos trabalhos baseados em águas residuárias sintéticas, com características controladas (MANSSOURI *et al.*, 2013; ANZOLAROJAS *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2015).

No caso do efluente de cervejaria, matéria-prima empregada neste estudo, será apresentado na seção 2.4. uma descrição da composição e características físico-químicas típicas, além do perfil de açúcares, que tornam esse resíduo um bom substrato para a produção de bioH₂.

2.2.4 Biorreatores para a produção de bioH₂

Um reator biológico, também denominado biorreator, deve propiciar condições favoráveis para que o bioprocessamento desejado ocorra num certo intervalo de tempo. Basicamente deve proporcionar homogeneidade do meio reacional (por mistura ou recirculação), manutenção da biomassa no reator (aderida ou em suspensão), controle das condições físico-químicas para que a reação principal ocorra (temperatura, pH, etc), além de aspectos construtivos como sistema para alimentação e descarga do reator, pontos de amostragem de meio reacional e de produtos (líquidos ou gasosos), dentre outros requisitos.

Tais necessidades podem ser proporcionadas por diferentes configurações de reatores como: reatores anaeróbios com mistura por recirculação de fase líquida em que o meio reacional recircula diversas vezes, durante o tempo de detenção hidráulico (TDH) estabelecido para a reação, e este movimento é responsável pela mistura e homogeneidade da fase líquida; reatores anaeróbios com mistura por

agitação mecânica em que a mistura é promovida por meio de impelidores de fluxo radial, o que pode ser considerado operacionalmente mais simples do que o de recirculação. A operação dos reatores pode se dar por modo contínuo ou por bateladas; o reator AnSBBR (*Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor*) refere-se a operação por bateladas sequenciais e biomassa imobilizada.

Diferentes tipos de reatores têm sido testados para a produção de bioH₂: PENTEADO *et al.* (2013) e ANZOLA-ROJAS *et al.* (2015) empregaram reator de leito fixo e fluxo ascendente para fermentação de água residuária sintética; MANSSOURI *et al.* (2013) e LOVATO *et al.* (2015) avaliaram um reator AnSBBR utilizando como substrato água residuária sintética e glicerina residual, respectivamente; GOMES *et al.* (2015) utilizaram reator de tubos múltiplos e fluxo contínuo para água residuária sintética; AROOJ *et al.* (2008) utilizaram reator de tanque agitado no modo contínuo visando degradação do amido, mesmo configuração empregada por TAPIA-VENEGAS *et al.* (2015) que utilizaram glicerol residual como substrato.

2.2.5 Suportes para imobilização de biomassa nos biorreatores

Um dos suportes comumente empregados para imobilização da biomassa em reatores acidogênicos é o polietileno de baixa densidade, tanto para inóculos provenientes de fermentação natural como lodo anaeróbio (FONTES LIMA & ZAIAT, 2012; MANSSOURI *et al.*, 2013; FERRAZ JÚNIOR, ETCHEBEHERE & ZAIAT, 2015; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015; LOVATO *et al.*, 2015, dentre outros); este suporte é relatado como favorável para proliferação de bactérias acidogênicas em detrimento de arqueas metanogênicas, além de ter boa disponibilidade e baixo custo.

A argila expandida também foi avaliada como suporte para produção biológica de H₂ por alguns autores: BARROS *et al.* (2010) avaliaram argila expandida e poliestireno para adesão de microrganismos de lodo anaeróbio e obteve melhor proliferação de biomassa em argila expandida, suporte no qual ocorreu maior produção de polissacarídeos extracelulares considerados chaves para a adesão celular; FERRAZ JÚNIOR, ETCHEBEHERE & ZAIAT (2015) avaliaram argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa e polietileno e obtiveram bons resultados para a produção de H₂ com inóculo de fermentação

natural e de lodo anaeróbio; no entanto foi escolhido polietileno devido a questões de entupimento da saída e rebaixamento do leito em reatores do tipo APBR; FERNANDES *et al.* (2013) avaliaram argila expandida, carvão vegetal e polietileno e concluíram que o tipo de suporte não afetou a produção de H₂, já que os indicadores de produção obtidos foram semelhantes para os três suportes; o potencial de uso da argila expandida como suporte também foi apontado por AMORIM *et al.* (2009) que empregou lodo anaeróbio como inóculo em reator AFBR e observaram que este suporte foi adequado por facilitar o movimento do leito devido à sua densidade próxima à da água, além de propiciar a adesão da biomassa e a produção de bioH₂.

Estes estudos somados às características da argila expandida como o fato de ser inerte em soluções aquosas inclusive ácidas, ser estável a altas temperaturas permitindo sua esterilização por calor de necessário, ter área superficial e porosidade, mesmo baixa, propiciando adesão microbiana, possuir baixo custo e boa disponibilidade, a tornam um suporte com bom potencial para uso na produção biológica de H₂.

2.2.6 Efeito de parâmetros diversos sobre a produção de bioH₂

- Temperatura e pH: A temperatura de trabalho na fermentação visando a produção de bioH₂ depende do tipo de inóculo, que pode ser adaptado a condições mesofílicas (30-39 °C), termofílicas (50-64 °C) e hipertermofílicas (> 65 °C) (LEE; SHOW; SU, 2011); uma vez que as fontes onde se coletam inóculos mistos para uso direto ou para isolamento estão, em sua maioria, em condições ambiente de temperatura, a condição mesofílica prevalece nos trabalhos de produção de bioH₂. Contudo alguns estudos abordam também o uso de microrganismos termofílicos, sendo que os mais recentes enfatizam os aspectos moleculares/proteômicos destas bactérias (ROY *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Com relação ao pH, uma vez que a produção de H₂ está associada à formação de ácidos orgânicos, subentende-se que um reator acidogênico pode ser considerado com condições favoráveis à produção deste gás. A partir de certos valores de pH ácido, algumas enzimas podem ser inativadas e as rotas metabólicas do bioprocessamento podem ser alterados, além de outros fatores que

podem desfavorecer a atividade enzimática, como a necessidade de manutenção da neutralidade da célula, à custa de energia (ATP). Comumente são utilizados valores de pH entre 5,0 e 6,0, que aliam uma condição para atividade de hidrogenases com a inibição de bactérias consumidoras de H₂; além disso nesta faixa de pH é encontrada maior variedade de microrganismos enquanto nos extremos de pH ocorre seleção de espécies (CHOI; AHN, 2015). Para o inóculo de *Klebsiella pneumoniae* os efeitos da temperatura e o pH sobre os fluxos metabólicos de produção e consumo de H₂ tem sido estudados visando otimização da produção de H₂ (seção 2.2.2).

- Pressão parcial de H₂: a concentração de H₂ tem sido apontada como uma variável importante na otimização da produção de H₂ uma vez que sob elevadas concentrações de H₂ no meio fermentativo as vias metabólicas podem ser direcionadas para solvatogênese, onde são gerados metabólitos como ácido láctico, etanol, butanol e acetona, com diminuição da geração de H₂ (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Para avaliar o efeito deste parâmetro sobre a produção de bioH₂ diferentes estudos tem sido relatadas: ESQUIVEL-ELIZONDO *et al.*, (2014) demonstraram que a remoção de H₂ por diferentes meios em reator com água residuária sintética (glicose) e inóculo de biodigestor de rejeitos vegetais pré tratado, levou ao aumento da produção de H₂, o que os autores atribuem ao deslocamento de equilíbrio no sentido da produção de H₂ e à inibição de bactérias homoacetogênicas por meio da remoção de CO₂; (KISIELEWSKA; DEBOWSKI; ZIELIŃSKI, 2015) empregaram pressão reduzida no reator de modo a remover H₂ do meio, em ensaios cujo substrato foi efluente sintético de laticínios e inóculo lodo de UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) pré tratado; os autores observaram que a remoção do H₂ contribui para a produção volumétrica deste gás por duas hipóteses, o aumento da eficiência da transferência de massa do H₂ da fase líquida para a fase gasosa e o desfavorecimento da ação de bactérias homoacetogênicas, consumidoras de H₂.

Podem ser encontrados na literatura outras estratégias de remoção do H₂ do meio fermentativo como por exemplo a estratégia descrita por (BECKERS *et al.*, 2015) em que o uso de uma alta velocidade de agitação (440 rpm) combinado com o arraste por gás N₂ levou a um aumento de cerca de 2 vezes

na produção de H₂, o que os autores atribuíram ao aumento da transferência líquido-gás e à remoção do fração gasosa, respectivamente.

- Relações nutricionais: estudos apontam que a relação C/N do resíduo que se deseja utilizar como substrato pode ser manipulada de modo a favorecer a produção de H₂. ANZOLA-ROJAS *et al.* (2015), utilizaram inóculo de autofermentação e resíduo sintético em reator com recirculação de fase e manipularam as fontes de carbono (sacarose) e nitrogênio (ureia) de modo a abranger a faixa de 40 a 190 C/N (m/m), obtendo a relação C/N de 137 como ideal para uma produção otimizada de bioH₂; para inóculo proveniente de biodigestor, fermentando resíduo de laticínios em ensaios em frascos de 2L, pesquisadores encontraram a razão C/N de 21 como melhor condição para favorecer a produção de bioH₂, que alcançou 450 mL_{H₂} g_{DQO}⁻¹ (GOMEZ-ROMERO *et al.*, 2014); já para culturas puras (*Clostridium acetobutylicum* e *Ethanoigenens harbinense*) em ensaios de 100 mL em frascos de vidro, com substrato sintético encontrou-se como melhor proporção a relação C/N igual a 4 (BAO *et al.*, 2016)).

Além da relação C/N, a composição do resíduo em termos de micronutrientes pode ser um diferencial para o rendimento do processo: Fósforo participa do tamponamento e da formação de ATP das enzimas; Fe²⁺ influencia na atividade das hidrogenases e no transporte de elétrons na oxidação de piruvato a acetil CoA e H₂; Mg²⁺, Na⁺ e Zn²⁺ são cofatores de enzimas (SINHA; PANDEY, 2011). Nota-se certas relações nutricionais, envolvendo macro e micronutrientes podem ser estratégias para otimização da produção de H₂ e devem ser estudadas para cada inóculo e substrato, uma vez que a concentração ótima de cada nutriente varia em função das condições operacionais.

- Alcalinidade: A alcalinidade de água residuária reflete sua capacidade de tamponamento, ou seja, de neutralizar ácidos produzidos durante o bioprocessamento de modo a evitar oscilações de pH (redução) que possam prejudicar o metabolismo dos microrganismos. Alguns ânions presentes nas águas residuárias como HCO₃⁻, CO₃²⁻, H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ e OH⁻ exercem um tamponamento natural, mas esse parâmetro deve ser ajustado caso este tamponamento natural seja insuficiente para manter os níveis de acidez no

reator dentro das faixas desejáveis. Na produção de bioH₂ este é um parâmetro importante sendo que a diminuição da alcalinidade do meio durante o bioprocessamento é indicativo da geração de ácidos orgânicos, já que os íons H⁺ gerados consomem estes ânions alcalinos.

Autores relatam a variação e o controle da alcalinidade durante o processo de diferentes formas: ZHU *et al.* (2010), monitoraram a atividade de um reator de agitação mecânica por 50 dias e correlacionaram a produção de biogás (contendo CO₂) com a alcalinidade a HCO₃⁻ onde com uma maior produção de CO₂ após 15 dias de reação, a alcalinidade se manteve em níveis maiores que os iniciais e o rendimento de H₂ também aumentou; não foi utilizado nenhum controle externo do tamponamento. Em trabalho diferente, realizando controle de pH em 4,9 por adição de NaOH ou NaHCO₃, os autores verificaram que o NaOH tem efeito negativo sobre a produção de H₂, comparado ao efeito do bicarbonato; o motivo para tal efeito não é claro e os autores atribuem simplesmente à melhor capacidade tamponante do HCO₃⁻ (LUO *et al.*, 2010). É usual a adição de NaHCO₃ à água residuária e o monitoramento da eficiência do tamponamento por meio da determinação do pH e da alcalinidade ao longo do tempo (PERNA *et al.*, 2013; LOVATO *et al.*, 2015).

Dos parâmetros apontados acima, as condições de pH e temperatura nas reações seguem uma tendência e não requerem estudos em todos os casos de produção de bioH₂: se inóculos mesofílicos são utilizados, temperaturas de trabalho entre 30 e 39°C são usuais e se termofílicos, temperaturas entre 50 e 64°C; valores de pH entre 5,0 e 6,0 no início da reação e sua manutenção acima de 4,0 durante a operação são usualmente associados a bons resultados de produção de H₂. Já para os demais parâmetros percebe-se que estudos são necessários para cada tipo de substrato e de inóculo.

2.3 Água residuária de cervejaria: geração, tratamento e aproveitamento convencionais

De acordo com estatísticas da 'Food and Agriculture Organization' (FAO, 2017) a fabricação de cerveja nos 10 países que constituem os maiores produtores mundiais de cerveja de cevada alcançou em 2014 o volume de 119 milhões de quilolitros, sendo que o Brasil contribuiu com mais de 10% deste

valor (14 milhões de quilolitros). Cerca de 95% da composição de cerveja é água e para o provimento deste insumo grande parte das fábricas estão instaladas em áreas que possuem poços artesianos com amplos lençóis freáticos ou rios; no entanto, isto não minimiza a preocupação com os recursos hídricos já que são gastos, em média, 4,5 L de água para cada litro de cerveja produzida sendo que esta proporção pode chegar até 10 L para 1 L (SIMATE *et al.*, 2011; CHEN, H. *et al.*, 2015).

A água residuária de cervejaria é resultado das diversas etapas da produção que geram efluentes contendo resíduos das matérias primas como sólidos, açúcares, leveduras, etc além de resíduos de operações da fabricação como a filtração, descarga dos equipamentos, lavagem de vasilhames e higienização de dornas, cubas, tubulações, pisos, etc (Figura 2.3). Como resultado destas etapas de processamento tem-se grande quantidade de efluente líquido com elevada carga orgânica e teor de sólidos em suspensão, que irá requerer tratamento para adequação antes do despejo nos corpos hídricos. Na seção 2.4 é apresentada a composição físico-química deste efluente industrial, descrita por autores que estudaram seu tratamento.

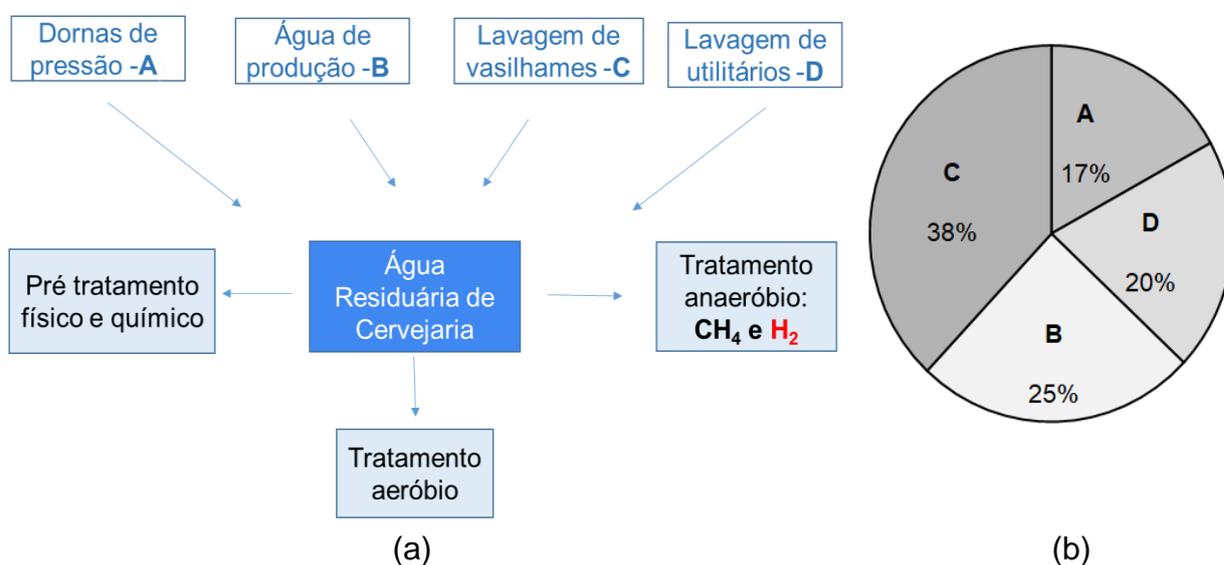


Figura 2.3: Setores responsáveis pela geração água residuária em uma cervejaria (a) e proporção em que cada um contribuiu (b). ARANTES *et al.*, 2017.

Como formas de tratamento destes efluentes nas instalações industriais cervejeiras normalmente observa-se processos básicos aplicados aos efluentes líquidos industriais:

- Pré tratamento: pode ser físico (cominuição, filtração, flotação ou sedimentação), químico (ajuste de pH através do próprio CO₂ gerado na fermentação ou uso de ácidos e bases empregados na desinfecção, adsorção, etc) e biológico (considerado pré tratamento pelo curto tempo de residência) (SIMATE *et al.*, 2011).

- Tratamento aeróbio: sistemas de tratamento onde microrganismos aeróbios degradam os nutrientes em processo mais rápido e mais eficiente que o anaeróbio (METCALF & EDDY, 2016). Três opções de tratamento aeróbio são mais comuns: lodos ativados aeróbios, onde consórcios microbianos (bactérias, fungos, protozoários e outros microrganismos aeróbios) em suspensão fazem a biodigestão; biofilmes, onde os microrganismos crescem aderidos a um suporte e ainda filtros biológicos, onde o material suporte é fixo e a biodigestão ocorre no escoamento do efluente (SIMATE *et al.*, 2011). Como desvantagens pode-se citar de modo geral dificuldades de aplicação dos métodos aeróbios devido à variabilidade físico-química do efluente (em termos de DQO, pH e demais nutrientes) (AGLER *et al.*, 2010) e no caso particular de lodos ativados a proliferação de microrganismos gerando excesso de lodo que deverá ser tratado periodicamente, gerando custos consideráveis.

- Tratamento anaeróbio: a degradação da matéria orgânica se dá em sistemas anaeróbios (lagoas ou reatores) com as vantagens de dispensarem o uso de aeradores, apresentarem baixos consumo de energia e geração de lodo (CHEN, H. *et al.*, 2015); entretanto são processos lentos e muitas vezes incapazes de reduzir carga orgânica de maneira isolada, sendo necessário um processo aeróbio posterior (METCALF & EDDY, 2016). Os sistemas mais comuns nas indústrias cervejeiras são: reatores verticais do tipo UASB nos quais o lodo anaeróbio encontra-se na forma granulada (1-4 mm) e o afluente é bombeado de baixo para cima; reator de leiteo fluidizado, onde a água residuária segue fluxo ascendente e entra em contato com a biomassa.

O tratamento biológico de resíduos apresenta como fator interessante para a indústria de qualquer natureza, incluindo a cervejeira, a possibilidade de

aliar o tratamento e adequação de seus efluentes líquidos com o aproveitamento destes para a geração de recursos, como por exemplo a geração de energia química que pode ser utilizada na própria indústria. Trata-se da geração de combustível gasoso, o biogás, resultado do processo de digestão anaeróbia que numa produção típica pode gerar cerca de 0,75 a 1,12 m³ de gás por kg de sólidos voláteis processados. Tipicamente o gás contém de 55 a 70% de CH₄, 30 a 40% de CO₂ e pequenas quantidades de H₂S, N₂, H₂, vapor d'água e outros gases (METCALF & EDDY, 2016); como alguns destes gases pode causar danos no sistema de combustão, é necessário a purificação para que o biogás possa ser usado como combustível em motores de combustão interna, turbinas a gás, microturbinas ou células a combustível. Já para a queima em caldeiras, em geral, não é necessário a purificação (METCALF & EDDY, 2016).

Outra possibilidade de aproveitamento do lodo geado no sistema de digestão anaeróbia na geração de energia é o uso de sólidos em processos de incineração. Constituído de lodo primário, excesso de lodo secundário e biosólidos estabilizados este material pode ser usado como fonte de energia nos processos de incineração, com poder calorífico típico entre 12000 e 25000 kJ kg⁻¹ de sólidos totais, de acordo com a origem do material.

No caso de tratamento de água para reuso na indústria cervejeira, outros sistemas entram em cena como membranas filtrantes, adsorventes, métodos eletroquímicos, etc. Dentro do contexto do uso de resíduo de cervejaria, especificamente, para a geração de biogás por meio de digestão anaeróbia, encontra-se na literatura trabalhos de longa data bem como estudos recentes (seção 2.5).

2.4 Composição e características físico-químicas de águas residuárias de cervejaria

As principais características físico-químicas de ARC relatadas na literatura são apresentadas na Tabela 2.4. Pode-se notar uma ampla faixa de variação de alguns parâmetros: a DQO por exemplo varia de 2.000 a 32.500 mgO₂ L⁻¹ e varia linearmente com a concentração de sólidos, ou seja, em razão de maior presença de sólidos a DQO é maior. Uma razão para a grande diferença entre os mínimos e os máximos para DQO, Nitrogênio, Fósforo é a diluição do

efluente, ou seja, o volume de água de lavagem utilizado. De modo geral, os parâmetros registrados para a ARC, apresentados na Tabela 2.4, indicam a necessidade de processos de tratamento bem como o potencial para o tratamento biológico especialmente devido à elevada carga de Carbono e Nitrogênio.

Além das informações apresentada na Tabela 2.4 para os principais parâmetros (DQO, P, N, sólidos, pH, dentre outros) é necessário considerar pelo menos mais dois parâmetros desta água residuária, importantes para a produção biológica de H₂: a composição dos açúcares presentes na ARC e de metais e elementos traço, o que é abordado a seguir.

Açúcares presentes na água residuária de cervejaria:

Tratando especificamente dos açúcares presentes ARC e considerando-se que ela contém as águas de lavagem dos tanques, dornas, tubulações do processo é natural que a composição seja similar à do mosto e do fermentado, porém muito diluída. Sabendo-se que a principal matéria prima da indústria cervejeira é o malte, que fornece os açúcares para a fermentação deve-se examinar sua composição e processamento como forma de compreender a composição de açúcares na ARC. O malte, composto basicamente de amido, tanto na forma de amilose como na de amilopectina e requer na indústria cervejeira a etapa conhecida como mosturação, onde pela ação de enzimas α e β -amilases, além de dextrinases, o amido é convertido em glicose, maltose (e isomaltose), maltotriose (fermentescíveis) e dextrinas, oligossacarídeos com mais de 3 moléculas de glicose possuindo tanto ligações 1-4 como 1-6 (não fermentescíveis) (Figura 2.4).

Tabela 2. 4: Características físico-químicas de água residuária de cervejaria.

Referência	DQO total*	N Total *	N-NH ₄ ⁺ *	P-Total*	P- PO ₄ ³⁻ *	ST *	STV *	DBO*	DBO/DQO	C/N	C/P	pH	Alcalinidade (CaCO ₃) *
SIMATE <i>et al.</i> , 2011	2.000 - 6.000	25 -80		10 – 50		2.900-3.000		1.200 – 3.600	0,2 -0,6			3 -12	
CHEN, H. <i>et al.</i> ,2015	8.000 – 14.000	80-280	5-11	20-90	5-35	500-1.300	380-1100		0.50- 0,77	62.5	200	5,2-6,2	190-350
SINBUATHON <i>et al</i> , 2015	6.000	90		0,5				2.350	0,40	66.7	12	6,3	
BOBOESCU, <i>et al.</i> , 2014	6.558	76		58									
SHAO <i>et al.</i> , 2008	22.500-32.500	320-450		144-216			1400-4800					3,2 – 3,9	
ENITAN, <i>et al.</i> , 2015	2.000		21.6	21.25		2.449		1.877				6,9	3.173
GOLUB <i>et al</i> , 2014	3.000 6.000	50-100			2 -10	200-600						4,5 – 11,0	
SHI <i>et al.</i> , 2010	2.400	90	9.4	3.2		620							

* Unidade de concentração: mg L⁻¹; ST = sólidos totais; STV = sólidos totais voláteis; DQO = Demanda química de oxigênio; DBO = demanda biológica de oxigênio (ARANTES *et al.*, 2017)

A proporção entre os açúcares produtos da ação enzimática bem como a concentração de cada um deles varia de acordo com o processo, dependendo de pH, temperatura e tempo de mosturação, mas é usual obter neste processo entre 8-10% de glicose, 50-56% de maltose, 12-28% de maltotriose sendo o restante dextrinas (ESTRACANHOLLI, S., 2012).

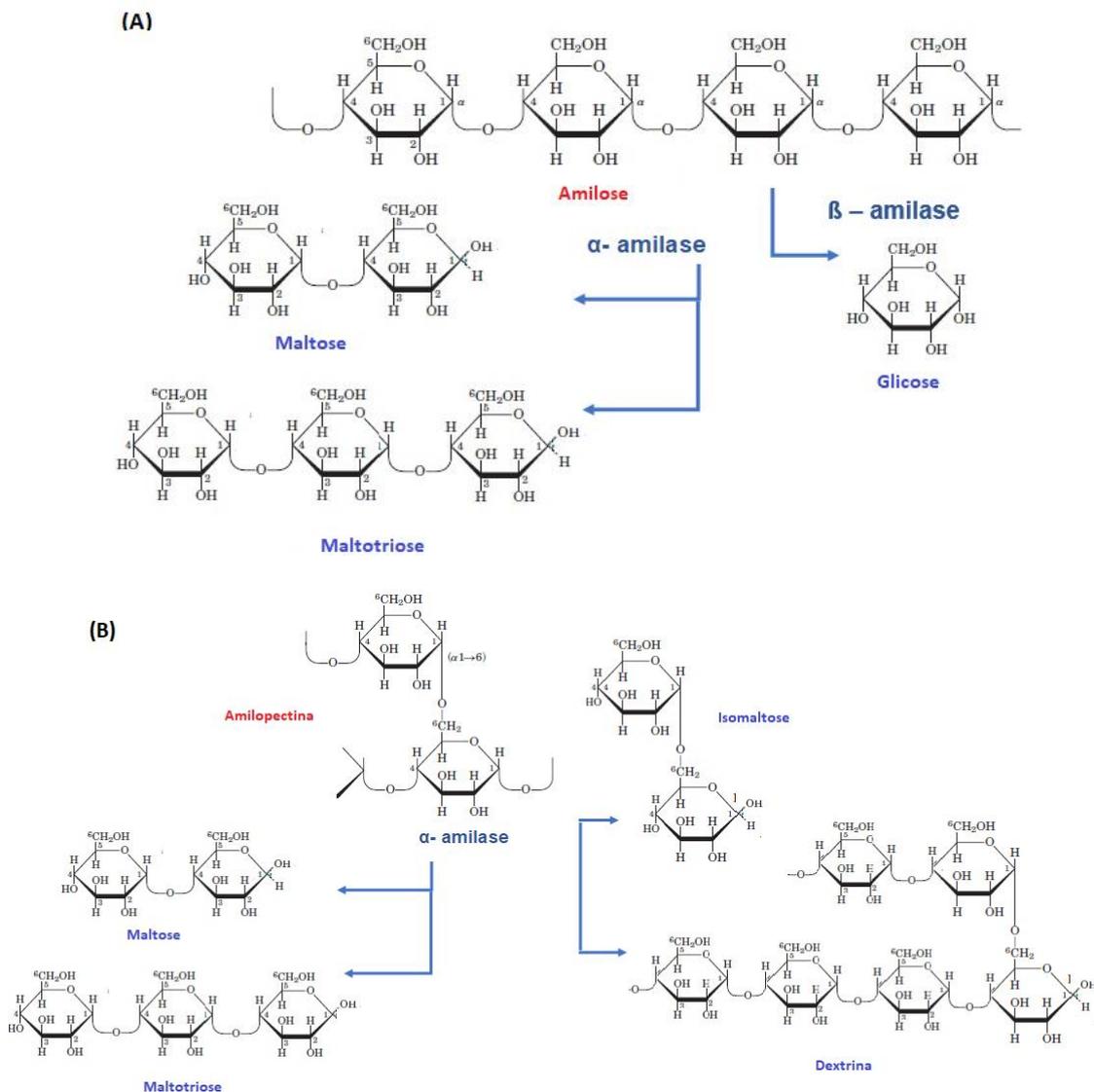


Figura 2.4: Formas de amido presentes no malte, Amilose (A) e Amilopectina (B) e produtos da ação enzimática de α e β -amilases após mosturação. (Adaptado de COX, 2004).

O monitoramento do perfil de açúcares disponíveis após a mosturação e após o consumo dos mesmos na fermentação pode ser feito por análise

cromatográfica - CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) ou por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (ESTRACANHOLLI, S., 2012)

Metais e elementos traço na água residuária de cervejaria:

Diversas são as fontes dos metais que podem estar presentes na ARC, passando pela composição mineral da água de produção, dos insumos principais, aditivos e até mesmo dos agentes saneantes empregados na limpeza das instalações. No caso da água de produção, além dos requisitos de potabilidade (microbiológicos e físico-químicos) padrões de qualidade referentes à composição mineral também são necessários já que os metais presentes e suas concentrações têm influência direta sobre a atividade enzimática envolvida em alguns processos bem como nas características sensoriais do produto final (dulçor, amargor, adstringência, etc). Dentre os metais presentes na água de produção e relacionados diretamente à qualidade do produto final monitora-se principalmente os seguintes (ROSA & AFONSO, 2015):

- Cálcio - elemento que atua na estabilidade e paladar da cerveja bem como na proteção da amilase quanto à desativação térmica durante a sacarificação (hidrólise) do amido contido no malte. Além disso favorece a coagulação proteica durante a fervura do mosto e precipitação de oxalatos, na forma de CaC_2O_4) o que previne a turvação da bebida; concentrações entre 50 e 150 ppm são consideradas ideais.

- Magnésio – elemento essencial no processo de fermentação relacionado à atividade de certas enzimas das leveduras. Porém em concentrações superiores a 30 ppm acarreta sabor amargo e adstringente à cerveja.

- Zinco – atua na ativação da fermentação já que está envolvido com a síntese proteica favorecendo o crescimento de leveduras; no entanto acima de 0,6 ppm passa a ter ação inibidora sobre a fermentação.

- Sódio – contribui para características sensoriais da cerveja, realçando corpo e dulçor em concentrações entre 10 e 150 ppm; no entanto acima de 200 ppm pode acarretar em sabores desagradáveis.

Outra forma de inserção de metais no processo de produção de cerveja é por meio dos insumos como malte e lúpulo; o malte por exemplo apresenta em sua constituição elevados teores relativos de P e K, seguidos de Mg, Ca e Na

(composição da farinha de malte (USDA, 2017; TBCA, 2017) (Tabela 2.5), de modo que estes metais podem ser encontrados na cerveja (POHL, 2008; LEÃO *et al.*, 2018) e conseqüentemente nas águas residuárias de cervejaria.

Tabela 2. 5: Composição do malte com relação aos principais elementos químicos.

Elemento	Concentrações em ppm	
	USDA*	TCBA#
Ca	3,7	2,7
Fe	0,47	0,24
Mg	9,7	6,7
P	30,3	24,8
K	22,4	33,1
Na	1,1	0,35
Zn	0,21	-
Mn	-	0,13

*USDA: United States Department of Agriculture (USDA, 2017)

#TBCA: Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (TBCA, 2017)

Além dos minerais típicos da constituição desta e de outras matérias primas, existe a preocupação de que metais pesados usados na agricultura (herbicidas, agrotóxicos, bactericidas) possam ser encontrados no produto final e conseqüentemente, na ARCs. Em um trabalho de monitoramento das fontes de metais pesados na cerveja durante seu processamento, PASSAGHE *et al.* (2015), investigaram a presença de metais na água, malte, cereais, lúpulo, leveduras em diferentes etapas (trituração, aquecimento, resfriamento, fermentação, maturação, filtração) para os metais Cr, Cd, Zn, Cu, Fe, As, Ni e Pb. Amostras das frações líquidas (*brewing waters*) foram analisadas em cada etapa por Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS) e os resultados indicaram que apenas para Cu e Zn as concentrações identificadas na cerveja são determinadas pelas matéria primas (malte e lúpulo); já outros

metais tóxicos (Cr, Cd, As, Fe, Cu, Ni e Pb), se presentes nas matérias primas distribuem-se nos resíduos sólidos e líquidos durante o processamento da cerveja, não oferecendo riscos ao consumidor.

2.5 Produção de biogás a partir de águas residuárias de cervejaria

A biodigestão anaeróbia com produção de biogás é um processo bem caracterizado quanto à aplicação voltada ao tratamento de efluentes agroindustriais, com boa disponibilidade de artigos, livros, etc no tema (NIGAM; PANDEY, 2009; MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014; AJEEJ *et al.*, 2015; ADEKUNLE; OKOLIE, 2015; ZHEN *et al.*, 2017). No caso de ARC a digestão anaeróbia (D.A.) tem sido aplicada em escala industrial tendo como base trabalhos de pesquisa descritos na literatura de longa data, de modo que os estudos atuais tratam da otimização deste processo sob diferentes enfoques. Trabalhos publicados nos últimos anos utilizando D.A. no tratamento de ARC são apresentados na Tabela 2.6. Em todos os casos o inóculo utilizado foi biomassa anaeróbia condicionada em biodigestores metanogênicos.

É possível notar por meio destes trabalhos uma alta eficiência de remoção de DQO, entre 78 e 98% nos reatores utilizados, sejam eles comuns como os UASB ou de configurações diferentes como CSAD ou de membrana (AnMBR). Foram relatados teores de CH₄ entre 59-69%, composição teórica típica deste bioprocessos, e rendimentos de até 0,53 L biogás g DQO⁻¹). Uma vez que o processo de produção de CH₄ para ARC é bem caracterizado, estudos que buscam a influência de variáveis específicas têm sido conduzidos como os efeitos de particularidades do inóculo, da presença de sanitizantes, da presença de cianeto, dentre outros. Uma vez que cada tipo de inóculo e de reator tem uma condição favorável de produção distinta, estudos específicos são necessários para cada sistema a fim de determinar as condições ótimas de produção do biogás.

Tabela 2. 6: Pesquisas recentes sobre produção de CH₄ a partir de água residuária de cervejaria.

Reator	Características do efluente (mg L ⁻¹)	Objetivo do trabalho	Condições de operação	Resultados obtidos	Refer.
Reator tipo UASB escala industrial (1700 m ³)	DQO 2.005; ST 4.520; Proteína total 134,40; PO ₄ ³⁻ 21,25; SO ₄ ²⁻ 178,25; Alcal. (CaCO ₃) 2.880	Compreender a composição microbiológica de um UASB e a biocinética de degradação dos substratos da ARC usando um modelo cinético	37±2 °C; pH entre 6,5 e 7,2; Tempo de retenção entre 8 e 12 h; alimentação intermitente	ER _{DQO} de 79 % e biogás com 66–69 % de CH ₄ ; Presença de <i>Methanosaeta</i> sp., <i>Methanosarcina</i> sp., família <i>Ethanobacteriales</i> e <i>Methanobacterium formicicum</i>	ENITAN <i>et al.</i> , 2014
Reator tipo UASB escala industrial (1700 m ³)	DQO 2.005; ST 2.449; PO ₄ ³⁻ P 21,25, SO ₄ ²⁻ 178,25; Alcalinidade (CaCO ₃) 3.172	Desenvolver um modelo aplicável a um reator UASB a fim de elevar a recuperação de energia com relação à degradação de substratos e ao efeito do decaimento endógeno da velocidade de produção de CH ₄	26-32 °C; pH 6,9; Tempo de retenção entre 8 e 13h h	ER _{DQO} de 79 % , biogás com 65,9% de CH ₄ , 30,7% CO ₂ e 3,4 % N ₂ , vazão de até 291.34 L CH ₄ h ⁻¹ e de 0,32 L CH ₄ g ⁻¹ DQO alimentado. O modelo desenvolvido (MMGM) previu a produção de CH ₄ a diferentes temperaturas e cargas orgânicas	ENITAN <i>et al.</i> , 2015
Biorreator anaeróbio de Membrana (AnMBR) (15 L)	DQO 10.200 ± 2.300; N total 180 ± 100; PO ₄ ³⁻ P 26 ± 19; ST 1720 ± 42; , Alcalinidade (CaCO ₃) 270 ± 80	Estudar a aplicação de um AnMBR para o tratamento de ARC em termos de remoção de DQO, produção de biogás, crescimento de biomassa, consumo de alcalinidade e estabilidade da membrana filtrante	35 °C; pH 6,8-7,3, fluxo de operação da membrana 8 L m ⁻² h ⁻¹ ; alimentação contínua de: carga orgânica de 2,0, 5,0, 7,5 and 10,0 gDQO (L dia) ⁻¹ por 12, 25, 15 and 68 dias	ER _{DQO} de 98% com 0,53 L biogás gDQO ⁻¹ . Composição do biogás de 59% CH ₄ ,31% CO ₂ , 10% N ₂ . Uma limpeza química para recuperação da membrana é necessário para a estabilidade da operação	CHEN <i>et al.</i> , 2015

Legenda: ER_{DQO}, eficiência de remoção de DQO; ST, sólidos totais; PO₄³⁻P , fósforo inorgânico; N total , nitrogênio total; STV, sólidos totais voláteis. Fonte: ARANTES *et al.*, 2017.

Tabela 2.6: Continuação

Reator	Características do efluente (mg L ⁻¹)	Objetivo do trabalho	Condições de operação	Resultados obtidos	Referência
Digestor anaeróbio continuamente e agitado (CSAD) e Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (ASBR)	DQO 36.000 – 110.000; STV 40.000; ST 53.500 – 151.800	Estudar se a DA de alta taxa é um sistema de tratamento vantajoso para ARC com alto teor de sólidos (lixo primário) sem acumulação excessiva de ST a longo prazo, usando um CSAD e um ASBR, em paralelo	22–43 °C; pH 5,3 – 7,8; operação dos reatores em paralelo, em 4 fases que variaram de 15 a 50 dias cada, com diferentes teores de STV, ST e DQO.	A fração de sólidos da AR também deve ser tratada com digestão anaeróbia para aumentar a geração de CH ₄ e reduzir a carga orgânica para sistemas de pós-tratamento. O ASBR teve maior eficiência do que o reator CSAD	AGLER <i>et al.</i> , 2010
Reator anaeróbio do tipo 'biogas lift' (BLR)	DQO 2324; NT 26; PO ₄ ³⁻ -P 9; SS 565	Comparar diferentes tipos de lodo anaeróbio para avaliar condições de operação, características do lodo e modelos cinéticos visando a cinética de crescimento de microrganismos e de remoção de substratos	35 ± 5 °C; pH 6,8 - 7,2; 2 reatores de 883,1 m ³ , alimentados com DQO entre 2.100-2.400 mg L ⁻¹ , operados por 30 semanas. Inóculo: lodo granular anaeróbio e lodo ativado residual	Lodo ativado teve maior eficiência de remoção de carga orgânica do que lodo granular. Eficiência de remoção de DQO de 90% e Máx produção de biogás 370 m ³ h ⁻¹	XU <i>et al.</i> , 2013

Legenda: ER_{DQO}, eficiência de remoção de DQO; ST, sólidos totais; PO₄³⁻-P, fósforo inorgânico; N total, nitrogênio total; STV, sólidos totais voláteis. Fonte: ARANTES *et al.*, 2017.

Tabela 2.6: Conclusão

Reator	Características do efluente (mg L ⁻¹)	Objetivo do trabalho	Condições de operação	Resultados obtidos	Referência
Reator UASB – escala laboratorial (3L)	DQO 4.000; outros componentes não descritos	Avaliar o efeito tóxico de dois sanitizantes utilizados na indústria cervejeira sobre a produção de CH ₄ na DA: um contendo ésteres de ácido graxo (Tipo A) e outro contendo álcool etoxilado (Tipo B); avaliar também a biodegradabilidade destes aditivos	35 °C; pH 7,2 – 7,7; DQO 4.000 mg L ⁻¹ ; TRH 24 h; diferentes concentrações de sanitizantes. Lodo granular como inóculo	O sanitizante Tipo A é tóxico para o inóculo e prejudica a produção de CH ₄ a partir de 500 mg L ⁻¹ e o Tipo B não apresentou interferência até 1.000 mg L ⁻¹ . A redução da produção de CH ₄ foi de 60%.	RODRIGUEZ; <i>et al</i> , 2013
Frascos de vidro (1 L) equipadas com sensores de pressão	DQO 360; outros componentes não descritos	Avaliar o efeito da concentração de cianeto sobre a atividade de bactérias chave e da comunidade de arqueas sobre a produção de CH ₄ e as características moleculares dos microrganismos	Ensaios padronizados (biomassa e AR) com [cianeto] entre 1 and 8,5 mg L ⁻¹ ; 60 dias de incubação; Ensaios com inóculo natural e esterilizado (efeitos abióticos)	Cianeto aumenta a fase lag mas não inibe a produção de CH ₄ em ARC. Processos abióticos são responsáveis pela degradação de cianeto. Remoção de DQO de 78,4% com cianeto (5 mg L ⁻¹) similar à observada para o ensaio controle (68,9 %)	NOVAK <i>et al.</i> , 2013

Legenda: ER_{DQO}, eficiência de remoção de DQO; ST, sólidos totais; PO₄³⁻P, fósforo inorgânico; N total, nitrogênio total; STV, sólidos totais voláteis. Fonte: ARANTES *et al.*, 2017.

2.6 Produção de biohidrogênio a partir de água residuária de cervejaria e inóculos mistos

Efluente líquido gerado em grandes quantidades e com potencial para produção de H₂, a ARC se apresenta como importante objeto de pesquisa por sua elevada DQO, presença de açúcares e necessidade de tratamento, dentre outros fatores. Apesar disto, embora o conhecimento referente à produção de CH₄ por digestão anaeróbia deste resíduo seja avançado, para a produção biológica de H₂ poucos estudos são disponíveis e os que podem ser encontrados na literatura tem como ponto comum a pequena escala, baixa variedade de inóculo (comum lodo anaeróbio pré tratado) e na maioria das vezes curto tempo de avaliação. As condições empregadas em tais estudos são descritas resumidamente na Tabela 2.7.

Destes trabalhos vale a pena destacar as observações descritas por SINBUATHONG, SOMJIT e LEUNGPRASERT (2015) que avaliaram a possibilidade de produção de H₂ utilizando como substrato ARC e substrato ideal (meio de cultivo formulado com glicose, extrato de carne, extrato de levedura e digestão péptica de tecido animal) e obtiveram produção de H₂ em substrato sintético a base de glicose, mas não na presença da AR.

Um dos possíveis motivos para este resultado foi a ineficiência do tratamento aplicado ao inóculo em inativar metanogênese já que o teor de H₂ produzido para o substrato sintético, sempre inferior a 40%, teve sua queda coincidente com a produção de CH₄, indicando rotas metabólicas de consumo de H₂ por bactérias metanogênicas. Os autores apontaram como um dos possíveis motivos a escassez de nutrientes, como o fósforo por exemplo, implicando em baixa relação C/P.

Nos resultados apresentados por GOLUB e colaboradores (2014) que testaram o uso de lodo granulado de reator metanogênico, inativado termicamente, para a produção de H₂ utilizando como substrato ARC os resultados apresentados tratam de apenas 7 horas de avaliação, período para o qual foi observado composição de biogás com 55-65% de H₂ remoção de DQO de 40%. Este trabalho mostrou a potencialidade de produção de H₂ a partir deste substrato e deste tipo de inóculo.

Tabela 2. 7: Produção biológica de H₂ utilizando água residuária de cervejaria

Referência	Inóculo	Pré tratamento do inóculo	Reator	Condições	Teor H ₂ no biogás	Rendimento
SINBUATHONG <i>et al</i> , 2015	Líquor de reator UASB de indústria cervejeira	Térmico, pH, agente químico	Garrafas de 120 mL	20% de inóculo; mistura entre AR e meio sintético com glicose; 35 °C, pH 4 a 7, 50 dias, com alimentação dos reatores	0	ARC não foi adequada para a produção de H ₂
GOLUB <i>et al</i> , 2014	Lodo de reator metanogênico de indústria cervejeira	Térmico	Garrafas de 1L	8-10 g L ⁻¹ de inóculo, AR sem suplementação, pH 4,5 – 5,5, 35 °C, 8 horas	55-65%	0,22 L H ₂ L ⁻¹ de água residuaria na fermentação e 7-9 mol H ₂ mol ⁻¹ glicose quando combinado fermentação e método bioeletroquímico
SHI <i>et al.</i> , 2010	Lodo de reator UASB	Térmico	Garrafas de 300 mL	AR sem filtração, suplementado com micronutrientes, pH 4, 6 e 8; T 25, 35 e 45 °C	Não informado	149,6 mL H ₂ g ⁻¹ DQO e vazão volumétrica máxima de 53,6 mL H ₂ h ⁻¹
RAJHI <i>et al.</i> , 2016	Lodo granular de um reator UASB de tratamento de ARC	Não realizou	Garrafas de 1,2 L	AR sem suplementação, 30 °C, pH 7,1, 30 dias, 0,1 g L ⁻¹ de inóculo	0	Não houve produção de H ₂ mas somente de CH ₄

Legenda: T, temperatura. Adaptado de ARANTES *et al.*, 2017.

Em trabalho empregando metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção de H₂ por digestão anaeróbia de ARC (SHI *et al.*, 2010) foi adicionada uma mistura contendo 13 tipos de sais visando uma adequação de micronutrientes; o tempo de avaliação não foi informado, bem como o método de medida de volume de biogás produzido. O principal objetivo do deste trabalho foi avaliar a influência de pH, temperatura e concentração de água residuária sobre o rendimento (Y_{H₂} – mL de H₂ g⁻¹ de DQO) e sobre a taxa máxima de produção de H₂ (R_{máx} - mL de H₂ h⁻¹). A condição ótima de produção de H₂ (pH 5,95, temperatura de 35,9°C e carga orgânica de 6,05 g L⁻¹) estimada a partir do modelo foi validada por meio de ensaio de verificação e houve boa concordância entre os valores previstos pelo modelo obtido e os resultados experimentais.

De um modo geral, os resultados obtidos por SHI *et al.* (2010) oferecem informações comuns, haja visto que: consórcios microbianos de reatores UASB trabalham em condições mesofílicas, o que torna previsível que as bactérias produtoras de H₂ destes inóculos tendem a agir do mesmo modo; valores de pHs ácidos favorecem as reações de produção de H₂ enquanto valores acima de 6,0 favorecem metanogênese; a composição de ARC (em termos de DQO) varia muito de um resíduo para outro, da mesma cervejaria ou de unidades diferentes (Tabela 2.4), de modo que o fator de diluição ótimo depende do tipo de resíduo e da sua procedência. Assim como nos outros estudos citados, os resultados obtidos por SHI *et al.* (2010) mostram o potencial de produção de H₂ para o inóculo testado e para a AR, embora tenha sido feita a complementação do resíduo com outros nutrientes.

Em ensaios de pequena escala e batelada de 120 horas, BOBOESCU *et al.* (2014), avaliaram o uso de inóculo de estação de tratamento de esgoto municipal para produção de H₂ utilizando ARC. Os autores observaram que este bioprocessos é viável para a produção de H₂ em condições específicas de pH e temperatura (26°C e pH 6,65) e também com adição de glicose ao efluente; no entanto, tal suplementação torna o resultado previsível pois glicose é substrato ideal para produção de H₂.

De um modo geral os trabalhos de pesquisa publicados mostram que existe viabilidade e potencial para utilização de ARC para fins de produção de

biohidrogênio, no entanto, para aplicações em escala industrial são requeridos estudos deste bioprocesso em maior escala utilizando diferentes configurações de reatores, avaliação deste processo períodos de tempo mais prolongados a fim de obter informações sobre volume e pureza do H₂, eficiência na redução da carga orgânica no tratamento do resíduo e estabilidade do processo ao longo do tempo.

2.7 Biohidrogênio a partir de ARC usando como inóculo *Klebsiella pneumoniae*

Dentro do contexto da potencialidade da ARC para a produção de biohidrogênio e da baixa diversidade de inóculos estudados para este fim, em estudo anterior ao presente trabalho pesquisadores realizaram o isolamento caracterização de enterobactérias e testes de produção de biohidrogênio empregando ARC (ESTEVAM *et al.*, 2018). A cepa que apresentou melhor performance para produção de bioH₂ em ensaios preliminares (frascos agitados de 0,5 L), caracterizada como *Klebsiella pneumoniae*, foi avaliada em ensaios de produção de H₂ em reator agitado mecanicamente nas seguintes condições: bateladas de 72h, inóculo em suspensão, agitação de 20 rpm, 3,5 L de volume reacional e 2 L de *headspace*, água residuária com pH ajustado para 5,5 e [ART] entre 3,0 e 4,0 g L⁻¹, com incubação a 35°C.

Os resultados obtidos demonstraram que:

- *K. pneumoniae* exibiu habilidade para metabolizar os açúcares presentes na ARC sob rotas metabólicas de produção de H₂ e CO₂;

- Os melhores resultados foram obtidos sob anaerobiose parcial, o que é coerente com o fato de tratar-se de uma bactéria anaeróbia facultativa e simplifica o processo dispensando o uso de fluxo de N₂ para garantia de anaerobiose;

- Houve produção de biogás com composição de H₂ entre 30-40%, rendimento de H₂ (Y_{H2}) entre 0,80 – 1,67 mol H₂ mol⁻¹ de glicose, valores comparáveis aos obtidos por outros autores com culturas puras, para substratos diferentes de ARC;

- O inóculo manteve-se ativo durante as 72h de bateladas, mesmo em pH acidificado entre 3,0 e 4,0, produzindo H₂ enquanto havia açúcares (ART) disponíveis;

- Os parâmetros de produção de H₂ com relação ao tempo (vazão de biogás, fluxo molar de H₂) foram baixos, comparados à literatura, devido ao uso de tempo prolongado de batelada, de 72h, já que em reatores e inóculos mistos é usual tempos de ciclo de poucas horas;

- As melhores produções de bioH₂ ocorreram em torno de 30h de reação, tempo em que ocorreu predomínio dos metabólitos solúveis ácido acético e butírico, indicando ocorrência de rotas metabólicas favoráveis à produção de H₂.

Com tais características, o uso de inóculo puro de *Klebsiella pneumoniae* para o substrato ARC mostrou-se oportuno. No entanto, ainda são necessários estudos para otimização do tempo de ciclo, imobilização do inóculo em suporte e avaliação da estabilidade ao longo do tempo.

A habilidade do inóculo em metabolizar os açúcares da ARC demonstra uma característica bioquímica interessante das enterobactérias que são capazes de metabolizar uma variedade de substratos, com algumas especificades que permitem inclusive a diferenciação entre elas. *Klebsiella pneumoniae* é capaz de fermentar uma variedade de açúcares: glicose, maltose, glicerol, lactose, sacarose, trealose, xilose, manose, celobiose, manitol, sorbitol, arabinose, dentre outros.

Especificamente para a produção de biohidrogênio empregando *K. pneumoniae* são relatados na literatura o uso de glicerol (LIU & FANG, 2007), (COSTA *et al.*, 2011) dos monossacarídeos glicose (NIU *et al.*, 2010; NIU *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013), frutose e D-xilose e dissacarídeos sacarose, maltose e lactose e de hidrolisados de hastes de milho e celulose (NIU *et al.*, 2010); destes trabalhos só não houve produção de hidrogênio para o hidrolisado de celulose enquanto as melhores produtividades de H₂ foram identificadas para glicose, frutose e sacarose, nesta ordem. Estes resultados dão ciência de que a maior parte dos açúcares presentes na AR podem ser fermentados para a produção biológica de H₂ (glicose e maltose) e dão indícios de que maltotriose e até mesmo dextrinas possam ser fermentadas.

2.8 Considerações finais da revisão bibliográfica

Após realizar a revisão da literatura atualizada sobre o tema “produção de bioH₂ a partir de fermentação de resíduos agroindustriais” pode-se dizer que:

- O uso de diversos resíduos e águas residuárias como substrato para a produção de biohidrogênio por fermentação é tema de estudos atuais com muitas publicações em revistas científicas específicas; o tema é de interesse internacional ao permitir aliar a produção de hidrogênio à redução de carga orgânica de efluentes, que são utilizados como substrato para o bioprocessos;

- O uso de resíduo de cervejaria como fonte de substrato para a produção de bioH₂ tem referência escassa na literatura sendo que os trabalhos discutidos nesta revisão foram conduzidos em pequena escala (menor que 1L), com inóculos em suspensão e não foram realizados ensaios em reatores de qualquer tipo. Tais trabalhos não avaliam a reprodutibilidade e estabilidade da produção ao longo do tempo, mas descrevem resultados de ensaios de curta duração (horas a dias). Em nenhum dos trabalhos consultados foi verificado o uso de fermentação natural ou cultura pura de *Klebsiella pneumoniae* como fonte de inóculo;

- Há maior disponibilidade de publicações onde se fez uso de inóculos oriundos de reator metanogênico UASB, submetidos a pré tratamentos para enriquecimento de microrganismos produtores de H₂;

- O efeito das variáveis normalmente estudadas neste tipo de bioprocessos sobre diferentes inóculos e substratos pode ser muito distinto, de modo que se faz necessário o estudo de algumas destas variáveis cada vez que se trabalha com substrato ou inóculo diferente, bem como diferentes configurações experimentais (uso de reator *versus* uso de frascos).

Neste contexto, o presente trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento da tecnologia do biohidrogenio ao avaliar uma água residuária industrial pouco estudada até o momento e inóculos diferentes daqueles já descritos na literatura, em ensaios em reator do tipo *AnSBBR*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Água residuária de cervejaria

Seis lotes de água residuária foram coletados em uma microcervejaria localizada na região Oeste do Paraná entre 2016 e 2017, sendo o volume coletado de cada lote de aproximadamente 120 – 140 litros. O ponto de coleta da água residuária foi a saída do tanque de filtração, após a etapam de filtração do mosto. Cada lote foi homogeneizado, fracionado e armazenado a -20°C no mesmo dia da coleta até o momento da utilização. A caracterização da água residuária foi realizada de acordo com a Tabela 3.1, cujas metodologias são descritas na seção 3.6.

Tabela 3.1: Caracterização físico-química dos lotes de ARC coletados.

Parâmetro	Frequência	Método	Referência
pH	Todos os lotes	Potenciométrico	
DQO	Todos os lotes	Espectrofotométrico	
PO ₄ ³⁻ -P	Todos os lotes	Espectrofotométrico	APHA, 2012
ST, STF, STV	Todos os lotes	Gravimétrico	
Alcalinidade (CaCO ₃)	Todos os lotes	Titulométrico /condutimétrico	
Nitrogênio total	Cinco lotes	Kjeldahl	AOAC, 2012
ART	Todos os lotes	Espectrofotométrico	MILLER, 1959
Ácidos orgânicos voláteis e solventes	Três lotes	Cromatografia Gasosa	*
Elementos traço e metais	Dois lotes	ICP-OES	*

DQO: demanda química de oxigênio; PO₄³⁻-P: fósforo inorgânico; ST, STV, STF: sólidos totais, totais voláteis e totais fixos; ART: açúcares redutores totais.

3.2 Ensaio preliminares em batelada

Foram conduzidos ensaios preliminares em pequena escala (frascos *Schott* de 500 mL) para avaliar o potencial de produção de H₂ com inóculo de fermentação natural e ARC (Figura 3.1), com as seguintes características: razão volume reacional/headspace de 1,5:1; 200 mL de AR e volume total (AR + suporte pré inoculado) de 350 mL; AR com pH 5,5 e concentração de açúcares entre 11,8 e 12,9 g L⁻¹ (ART), DQO entre 16,0 e 16,9 g O₂ L⁻¹ e sólidos totais entre 17,1 e 20,2 mg L⁻¹. Os frascos foram purgados com N₂ por 3 min e incubados a 90 rpm e 35°C por 7 dias, em triplicata; ensaios denominados 'Branco' foram conduzidos da mesma forma, em duplicata, porém sem inóculo, com a finalidade de identificar se a autofermentação da própria ARC gera H₂.

Para todos os ensaios avaliou-se o volume de biogás produzido (por deslocamento de água), a composição do biogás, as características da fração líquida (pH, ART), com intervalos de 24 horas até o 4º dia. No 7º dia além destas análises realizou-se também DQO e sólidos (ST, STF e STV).



Figura 3.1: Aparato experimental para os ensaios preliminares de pequena escala.

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

O reator AnSBBR empregado neste trabalho foi construído utilizando-se jarro de vidro com capacidade total de 5,5 L (volume útil de 5,2 L e volume residual de 0,2 L) com tampa de aço inox 316L adaptada com sistema de agitação mecânica (20 -100 rpm) com rotor acoplado a impeditores do tipo pás verticais (6 cm de diâmetro); a tampa possuía tubos para alimentação, descarga, amostragem líquida e gasosa, bem como saída de gás para sistema de medição de volume produzido (Figura 3.2).

Para contenção da biomassa imobilizada foi utilizado cesto de aço inox perfurado com 6 cm de altura e 8,5 cm e 18,5 cm de diâmetros interno e externo, respectivamente. As etapas de alimentação e descarga do reator foram realizadas através de bomba peristáltica DMC 100 (MS TecnoPON) com vazão de 0,6 L min⁻¹, de forma que o tempo de enchimento e de descarga (cerca de 5 min) foi desprezível em relação aos tempos de ciclo empregados. A quantificação do volume de gás produzido se deu por sistema de deslocamento de líquido em frasco Mariotte (saída com oliva) de 2 L.

O cesto para contenção da biomassa tinha capacidade para 500 g de argila expandida (massa seca, antes da imobilização do inóculo). O volume de água residuária abastecido em cada batelada foi de 3,0 L e o volume residual (não removido na descarga do reator) de 0,2 L, de modo que o volume do *headspace* foi de 2,0 L; a velocidade de agitação empregada foi de 70 rpm e o reator permaneceu em uma câmara com temperatura controlada a 35 ± 0,5 °C.

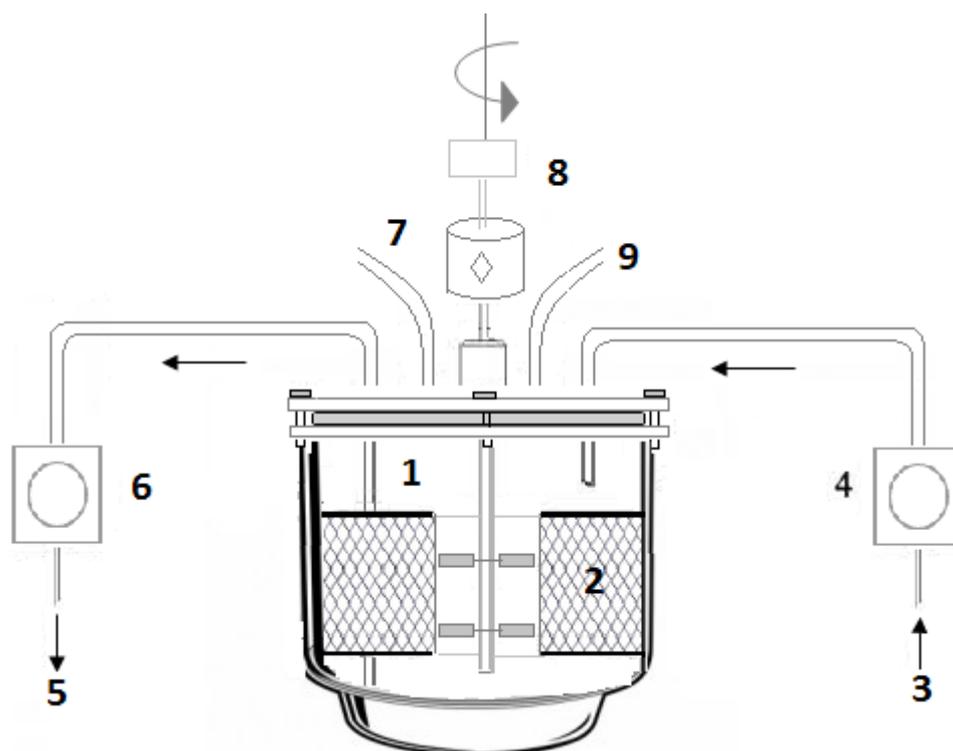


Figura 3. 2: Ilustração do reator anaeróbico (AnSBBR) com agitação mecânica e biomassa imobilizada. 1. Reator de Vidro; 2. Cesto para contenção da biomassa suportada; 3. Reservatório com afluente; 4. Bomba peristáltica de alimentação do reator; 5. Descarte do efluente; 6. Bomba peristáltica de descarga do reator; 7. Ponto de coleta do gás; 8. Sistema de agitação mecânica; 9. Saída do biogás.

3.4 Suportes para imobilização da biomassa

Os suportes avaliados para adesão de inóculo foram: argila expandida (Fig 3.3.a), que tem formato circular (1 – 2 cm de diâmetro), é leve, porosa, insolúvel em soluções aquosas e termicamente estável; mídias biológicas comercializadas para filtragem biológica em aquários ou tanques de peixes, constituídas de superfície favorável para colonização de bactérias consumidoras de NH_3 , apresentadas na forma esférica (Fig 3.3.b) que são material plástico atóxico de cerca de 2 cm de diâmetro e anéis cerâmicos, que apresentam elevada porosidade, visando propiciar a colonização de bactérias e dimensões de cerca de 1 x 1 cm (Figura 3.3.c) com

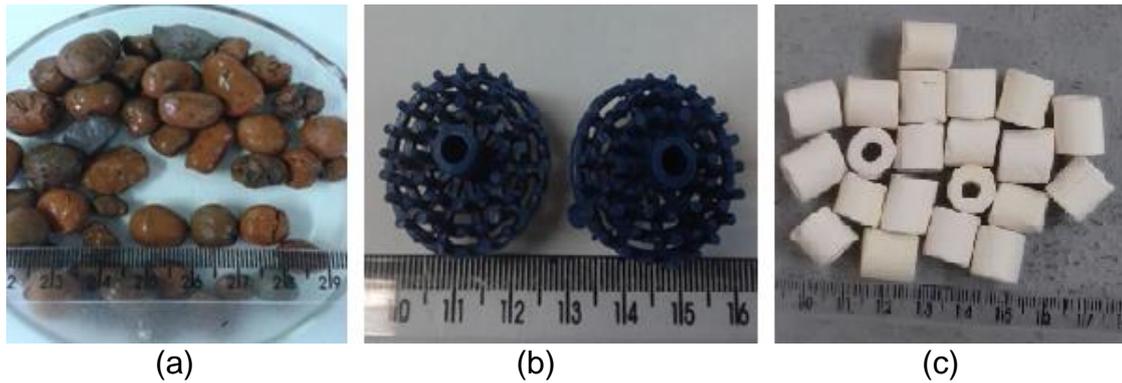


Figura 3.3: Suportes avaliados para adesão de inóculo; (a) argila expandida, (b) 'Bioball', (c) anéis cerâmicos.

A caracterização do suporte quanto à área superficial e porosidade foi realizada por fisissorção de N₂ em analisador automático BET. As amostras foram preparadas por secagem em estufa por 24 horas a 100°C e submetidas a um pré tratamento a 150°C por 3 h, sob vácuo para retirar toda umidade e espécies adsorvidas da superfície do material; as isotermas de adsorção/dessorção foram registradas na temperatura do nitrogênio líquido utilizando o equipamento Nova 2000e, Quantachrome.

As características morfológicas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): após secagem da amostra a 100°C fragmentos da amostra foram espalhados no porta amostra e metalizados com uma fina camada (5 nm) de ouro na superfície ("*sputtering*"). As micrografias foram obtidas em diversos aumentos em módulo "SE" com detector de elétrons secundários, em equipamento Tescan Vega 3 . Foi realizada também a medida da densidade aparente média, por deslocamento de volume. Estas caracterizações foram realizadas apenas para o suporte argila expandida.

Os métodos empregados para promover a adesão dos microrganismos provenientes da fermentação natural nos suportes foram divididos em dois tipos: a) para os ensaios em pequena escala e frascos agitados, após decorrido o tempo de fermentação natural para geração de inóculo, a suspensão resultante foi mantida em contato com os suportes escolhidos para adesão da biomassa por 3 dias, sob temperatura ambiente, por meio da imersão de cada suporte no meio auto fermentado. Ao final deste período, o meio líquido foi descartado e os suportes contendo a biomassa imobilizada seguiram para os ensaios de produção

de H₂; (b) para os ensaios em reator anaeróbio, 3,5 L do meio autofermentado foi colocado em contato com 500g de argila expandida (massa seca) no reator, em câmara com temperatura controlada de $35 \pm 0,5$ °C, com agitação intermitente de 20 rpm, por 3 dias. Após este tempo, a biomassa imobilizada (suporte + inóculo) foi acomodada no cesto do reator e a fração líquida foi descartada.

3.5 Inóculos

3.5.1 Inóculo misto gerado por fermentação natural

Para a geração de inóculo por fermentação natural utilizou-se água residuária sintética à base de sacarose e composta por: 2 g L⁻¹ de sacarose, 125 - 1 - 5 - 0,5- 0,08 -47 -0,07 -85 - 21,7 - 33,4 mg L⁻¹ de ureia, NiSO₄, FeSO₄, FeCl₃, CoCl₂, CaCl₂, SeO₂, KH₂PO₄, K₂HPO₄ e Na₂HPO₄, respectivamente (LEITE *et al.*, 2008). Para cada preparo de inóculo foram formulados 10 L de meio em um balde e expostos ao ambiente para contaminação por 3 dias, cobrindo com uma tela para prevenção contra insetos. Ao final deste período foi determinado o pH, a densidade óptica (DO_{600nm}) e realizado Coloração de Gram do sobrenadante (kit para coloração de Gram Laborclin®).

3.5.2 Inóculo isolado (cultura pura)

O DNA do isolado previamente caracterizado como *Klebsiella pneumoniae* (Estevam *et al.*, 2018) foi extraído utilizando o kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), e a confirmação da espécie foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento. Os *primers* utilizados na PCR foram Khe forward (5'-GATGAAACGACCTGATTGCATTC-3') e Khe reverse (5'-CCGGGCTGTCGGGATAAG-3'), gerando um amplicon de 77pb (HARTMAN *et al.*, 2009). Como controle positivo foi utilizada a cepa ATCC 13883 de *K. pneumoniae*. As condições de amplificação foram: 5 min iniciais a 95°C, 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C, como extensão final de 5 minutos a 72°C. Para o sequenciamento, a região

rDNA 16S foi amplificada por PCR utilizando os *primers* Y1 *forward* (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991) e Y3 *reverse* (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (CRUZ *et al.*, 2001) produzindo um *amplicon* de aproximadamente 1500 pb. As condições de amplificação foram: 5 minutos iniciais a 94°C, e 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C e 45 segundos a 72°C, como extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram purificados por eluição em gel de agarose, usando o kit de extração Easypure e enviado para sequenciamento usando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e os resultados de cada amostra foram analisados utilizando o BLASTn (Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico - versão 2.215 do BLAST 2.0).

3.6 Métodos analíticos

Análises físico-químicas de água residuária e efluente do reator AnSBBR: foram realizados conforme metodologias estabelecidas em 'Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater' (APHA 2012): pH (potenciometria), DQO e fósforo inorgânico, PO₄³⁻P (espectrofotometria), Sólidos Totais, totais fixos e totais Voláteis, ST, STF, STV (gravimetria) e alcalinidade a CaCO₃ (titulometria condutimétrica). A determinação da concentração de Açúcares Redutores Totais (ART) foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico e espectrofotometria (MILLER, 1959); N- total foi determinado pelo método Kjeldah (AOAC, 2012). Tanto amostras de água residuária como de efluente dos reatores foram armazenadas a -20 °C e descongeladas no momento da análise.

Análise elementar de água de fabricação e água residuária de cervejaria: foram determinadas as concentrações totais dos elementos Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Ti, V e Zn, em equipamento de espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) marca Thermo Scientific, modelo iCAP 6000 Series. Os analitos foram determinados simultaneamente para as amostras (água de produção da cerveja e águas residuárias), curva analítica e os padrões de conferência da curva analítica

(QSC). Em todos os preparos de amostra e padrões utilizou-se água ultra pura com resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm (a 25°C). A curva analítica foi preparada a partir do padrão multi elementar Fluka – TraceCert Multielementar Standard Solution for ICP nas concentrações 0,10; 0,50; 2,00; 5,00 e 10,00 mg L⁻¹ (equivalente a ppm) em solução de HNO₃. Para a conferência da precisão da curva analítica foram preparados soluções QSC (AccuStandard) nas concentrações de 0,200 mg L⁻¹ (Ba, Ca, Mg, Zn); 1,000 mg L⁻¹ (Al, Cu, Mn, Co, Cr, Fe, Li, Mo, Na, Pb, Sb, Ti, V); 5,000 mg L⁻¹ (K, Ni) e 10,000 mg L⁻¹ (P). Para determinação da concentração dos elementos na água de produção da cerveja foi analisado uma amostra da água in natura, sem procedimentos de digestão. As amostras de água residuária (lotes 3 e 6) foram filtradas e passaram por digestão ácida para eliminação de compostos orgânicos (interferentes). Para obtenção de uma solução de referência (branco) nas mesmas condições de preparo da amostra, este mesmo procedimento foi aplicado a uma alíquota de água de produção da cerveja, coletada na unidade produtora. Em todos os casos as análises foram realizadas em duplicata.

Análise da composição do biogás: as amostras gasosas foram coletadas em seringa de vidro (entre 5 e 20 mL) e transferidas para ampolas gasométricas de 37 mL, dotadas de pistão e válvula, até o momento da análise. A composição do biogás foi determinada por cromatografia gasosa um Micro GC modelo C2V-200, Thermo Scientific, com um nano detector TCD e colunas do tipo Plot - MS5A (Molecular Sieve 5A) e do tipo Bond -U (divinylbenzene type U). Foi empregada uma mistura padrão contendo H₂, CO₂, N₂, CO, CH₄, C₂H₄ e C₂H₂ e gás de arraste Argônio; a metodologia de separação e identificação dos analitos foi desenvolvida neste trabalho.

Análise dos ácidos orgânicos voláteis e álcoois: amostras do afluente e efluente dos reatores foram analisadas quanto à presença e concentração dos ácidos orgânicos voláteis e de álcoois, produzidos pelas rotas metabólicas de produção e consumo de H₂. Foram investigados os ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico e os álcoois metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol e álcool isoamílico. Para a extração dos ácidos e álcoois da fase aquosa de cada amostra, foi empregado

procedimento de extração adaptado de PAVINI (2017), no qual os ácidos foram extraídos com éter etílico e os álcoois com 1-octanol, separadamente.

As configurações de separação cromatográfica também foram adaptadas do método desenvolvido por Pavini: a programação do forno iniciou em 40°C (1 min), seguido de aquecimento a taxa de 20 °C min⁻¹ até 60 °C (1 min), taxa de 50 °C min⁻¹ até 115 °C (3 min), taxa de 10 °C min⁻¹ até 140 °C (0 min) e taxa de 30 °C min⁻¹ até 240 °C (5 min), perfazendo um tempo total de 17,93 min. Detector FID a 245 °C. Foi utilizado um equipamento de cromatografia em fase gasosa da Thermo Electron Corporation (Thermo Scientific), modelo Trace 1310, acoplado com sistema de amostragem automática TriPlus RSH (Thermo Scientific), software Chromeleon versão, e a coluna cromatográfica foi ZB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Phenomenex). A injeção foi realizada no modo *split* (razão 1:20), injetor a 240 °C, com nitrogênio como gás de arraste a 1mL min⁻¹ (fluxo constante).

3.7 Descrição dos ensaios realizados

3.7.1 FASE I: Avaliação da fermentação natural como fonte de inóculo

Após os ensaios preliminares para avaliação do potencial do inóculo de fermentação natural e da ARC para a produção de bioH₂, realizados em frascos agitados conforme descrito na seção 3.2, foram conduzidos os ensaios em reator (AnSBBR) cujas condições experimentais são apresentadas na Tabela 3.2. Estes ensaios tiveram como características comuns: volume de água residuária, V_{AR} , de 3,2 L, volume de *headspace*, $V_{headspace}$, de 2,0 L, massa de suporte (seco) de 500g, agitação mecânica fixa de 70 rpm, temperatura de incubação de 35 ± 0,5 °C, pH inicial da água residuária de 5,5 (ajustado com NaOH ou HCl), tempo de ciclo de 24h e as caracterizações que foram feitas quanto a pH, volume e composição do biogás, [ART] e DQO, para cada ciclo.

Após 2 ensaios com ARC (R1 e R2) foi realizado um ensaio (R3) com água residuária sintética, descrita em 3.5.1, para avaliação da performance do inóculo frente a um substrato à base de sacarose. Para cada ensaio foi gerado um novo inóculo e o mesmo foi imobilizado em argila expandida limpa e seca.

Tabela 3.2 : Condições experimentais para os ensaios com inóculo obtido por fermentação natural em reator AnSBBR.

Ensaio	Água Residuária	[ART] (g L ⁻¹)	DQO (g _{o2} L ⁻¹)	COV _c (g (L dia) ⁻¹)	COV _D (g (L dia) ⁻¹)
R1	ARC Lotes 1 e 2	5,8 e 2,8	7,4 e 4,7	5,4 e 2,6 g	7,0 e 4,4
R2	ARC Lote 2	2,8	4,7	2,6	4,4
R3	ARS	2,0 *	2,5	1,9	2,3

* Sacarose 2 g L⁻¹

Os valores de carga orgânica volumétrica (COV) nos ensaios foram estabelecidos de acordo com a concentração de matéria orgânica, em termos de DQO, ou a concentração de carboidratos, em termos de ART, conforme as Equações 17 e 18.

$$COV_D(g\ DQO\ L^{-1}d^{-1}) = \frac{(V_A * N) * DQO_{af}}{V_R} \quad (\text{Eq. 17})$$

$$COV_C(g\ ART\ L^{-1}d^{-1}) = \frac{(V_A * N) * [ART]_{af}}{V_R} \quad (\text{Eq. 18})$$

Em que:

COV_D e COV_C referem-se à Carga Orgânica Aplicada em termos de DQO e de carboidratos, respectivamente; V_A é o volume de água residuária alimentado ao reator em cada ciclo; N é o número de ciclos por dia; V_R é o volume de trabalho do reator (fração líquida) e **af** refere-se ao afluente (água residuária).

3.7.2 FASE II: avaliação do inóculo puro, *Klebsiella pneumoniae*

a) Ativação, cultivo e imobilização em suporte da cepa de *K. pneumoniae*

Ativação e cultivo: culturas estoque de *K. pneumoniae* foram preparadas inoculando uma colônia isolada para cada 10 mL de meio LB (Luria Bertani) estéril e incubando 37± 0,5 °C até fase exponencial de crescimento. Em seguida, alíquotas de 0,85 mL da suspensão bacteriana foram adicionadas a

0,15 mL de glicerol estéril e armazenadas a -20°C . Para a ativação da bactéria, alíquotas de 0,1 mL de cultura estoque foram inoculadas em frações de 10 mL de caldo LB estéril e incubados $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; ao atingirem fase exponencial de crescimento (cerca de 15 h) estas culturas foram reunidas de modo que um volume de 50 mL foi inoculado em 200 mL de meio LB estéril. Após nova incubação (por 24 h), frações de 800 mL de inóculo foram empregadas para inoculação de 4 L de meio LB estéril, o qual foi novamente incubado por 24 h para seguir para fase de imobilização em suporte (Figura 3.4). Toda esta seqüência foi feita assepticamente até a etapa de imobilização.

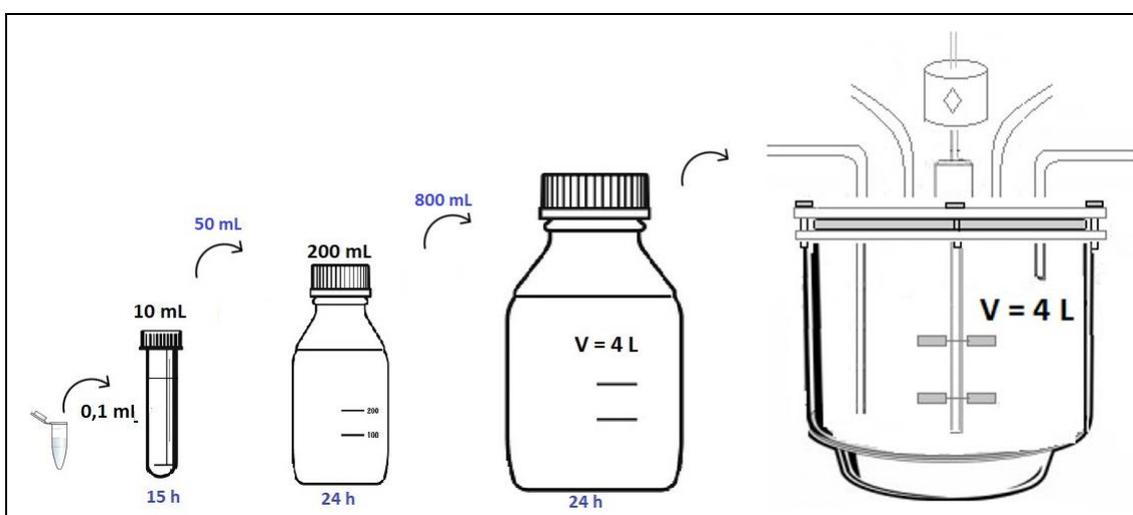


Figura 3.4 : Ativação e cultivo de *K. pneumoniae* para posterior imobilização em suporte.

Imobilização: 500 g de argila expandida previamente lavada, seca a 110°C e esterilizada (autoclave 121°C e 1,1 atm por 20 min) foram submersas no reator com 4L de cultura de *K. pneumoniae* sendo a cultura sob condições assépticas até este momento mas o reator não estéril. Suporte e cultura ficaram em contato por 2 ou 3 dias, a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com agitação intermitente de 30 rpm. Após este período o sobrenadante foi descartado e o suporte com a biomassa imobilizada foi acondicionado no cesto para montagem do reator e início de cada condição experimental.

b) Avaliação do reator AnSBBR inoculado com *Klebsiella pneumoniae*

Todos os ensaios no reator AnSBBR tiveram como condições comuns: $V_{AR} = 3,2$ L, $V_{headspace} = 2,0$ L, massa de suporte (seco) de 500g, agitação mecânica fixa de 70 rpm, temperatura de incubação de $35 \pm 0,5$ °C e pH inicial da água residuária de 5,5. Os tempos de ciclo e duração dos ensaios variaram. Para todos eles foram avaliados em cada batelada volume e composição do biogás além de pH, DQO, ART e teor de sólidos (ST, STF e STV) do efluente. Para ensaios selecionados (R5, R6 e R7) quantificou-se os ácidos orgânicos voláteis e álcoois presentes no efluente.

Os ensaios inoculados com *Klebsiella pneumoniae* foram identificados de R4 a R7 e são listados na Tabela 3.3. O primeiro ensaio (R4) foi realizado com água residuária sintética, à base de sacarose para fins de comparação de um substrato ideal, a sacarose, com ARC. Os demais tiveram a finalidade de avaliar a produção de H_2 em função da concentração de substrato (concentração de açúcares e DQO), da carga orgânica volumétrica aplicada (COV) e do tempo de ciclo. A carga orgânica volumétrica aplicada (COV) foi calculada tanto com base na DQO, COV_D , como na concentração de carboidratos (ART), COV_C (Seção 3.7.1, Eq. 17 e 18).

Nos ensaios alguns parâmetros foram avaliados com menores intervalos de tempo do que o tempo de ciclo total estabelecido para a reação; isto se aplicou aos parâmetros de produção volumétrica de biogás e do H_2 ($V_{biogás}$, $Q_{biogás}$, % H_2 no biogás) enquanto os parâmetros relacionados à caracterização físico-química da fração líquida foram avaliados no tempo final do tempo de ciclo estabelecido.

Tabela 3.3: Descrição dos ensaios de produção de bioH₂ com inóculo *K. pneumoniae* em reator AnSBBR.

Ensaio	Água Residuária	Condições experimentais					
		[ART] (g L ⁻¹)	DQO (g _{O2} L ⁻¹)	COV _C (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	COV _D (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	t _{ciclo} (h)	Nº de ciclos
R4	ARS	5,0*	5,3	4,7	5,0	24	09
R5	ARC Lote 2	2,8	4,7	2,6	4,4	24	10
R6	ARC Lote 3	7,2	10,0	6,8	9,4	24	8
R7	ARC Lote 6	6,7	9,9	12,6	18,6	12	16

*Legenda: ARC, água residuária de cervejaria; ARS, água residuária sintética; [ART], concentração de açúcares redutores totais; DQO, demanda química de oxigênio; COV_C, carga orgânica volumétrica aplicada (carboidratos); COV_D, carga orgânica volumétrica aplicada (DQO); * sacarose 5,0 g L⁻¹.*

Para verificar a adesão de bactérias a fragmentos da argila expandida, tanto internamente como externamente a este suporte, uma análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada. Para tanto, amostras do suporte (argila contendo a biomassa) coletadas ao final de reação (R5) foram fixadas por 12h a 4°C, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) contendo 2,5% de glutaraldeído; em seguida as amostras foram lavadas três vezes com este tampão e desidratadas gradualmente por imersões sucessivas em soluções de etanol com concentração crescente (50, 70, 80, 90 e 95%). Cada ciclo de desidratação durou 10 min ao final do processo as amostras foram lavadas com etanol 100% (metodologia adaptada de BARROS *et al.* (2010)). Após secagem a 60°C por 2 horas as partículas foram espalhadas no porta amostra e metalizadas com uma fina camada (5 nm) de ouro na superfície ("sputtering"). As micrografias foram obtidas em diversos aumentos em módulo 'SE', em equipamento Tescan Vega 3.

3.8 Indicadores de produção de bioH₂

Os resultados obtidos nas medidas e determinações analíticas dos ensaios de produção de bioH₂ em reator anaeróbio foram processados de forma a se obter os indicadores de produção de bioH₂ por meio das Equações 19 - 28, apresentadas a seguir:

- Vazão de biogás (Q_g):

$$Q_g [mL h^{-1}] = \frac{V_g}{t} \quad (\text{Eq. 19})$$

Em que:

V_g é o volume de biogás (mL) medido durante o intervalo de tempo t (h).

- Volume de H₂ (V_{H2}):

$$V_{H_2} [mL] = V_g * C_{H_2} \quad (\text{Eq. 20})$$

Em que:

V_g é o volume de biogás (mL) e C_{H2} é a concentração de H₂ (%) no biogás, determinada por cromatografia gasosa.

- Vazão de H₂ (Q_{H2}):

$$Q_{H_2} [mL h^{-1}] = \frac{V_{H_2}}{t} \quad (\text{Eq. 21})$$

Em que:

V_{H2} é o volume de H₂ (mL) medido durante o intervalo de tempo tempo t (h).

- Quantidade de matéria de H₂ (n_{H2}):

$$n_{H_2} [mol] = \frac{PV_{H_2}}{RT} \quad (\text{Eq. 22})$$

Em que:

R é a constante universal dos gases (0,082 L atm K⁻¹ mol⁻¹), T é a temperatura absoluta (neste trabalho 35°C ou 308 K), P é a pressão de gás (1 atm) e V_{H2} o volume de H₂ (L).

- Vazão molar de H₂ (v_{H2}):

$$v_{H_2} [mol\ h^{-1}] = \frac{n_{H_2}}{t} \quad (\text{Eq. 23})$$

Em que:

n_{H2} é a quantidade de matéria de H₂ (mol) e t o intervalo de tempo avaliado tempo t (h).

- Rendimento de Hidrogênio (Y_{H2}):

$$Y_{H_2} [mol\ H_2\ mol^{-1}\ substrato] = \frac{n_{H_2}}{n_{substrato}} \quad (\text{Eq. 24})$$

Em que:

n_{H2} é a quantidade de matéria de H₂ (mol) e n_{substrato} é a quantidade de matéria da fonte de Carbono consumida (mol) (neste trabalho trata-se do consumo de açúcares redutores totais, expressos em termos de glicose)

- Produtividade Volumetrica de H₂ PVH (ou VHPR - Volumetric Hydrogen Production Rate):

$$PVH [L\ H_2\ L^{-1}\ d^{-1}] = \frac{V_{H_2}}{t * V_{UR}} \quad (\text{Eq. 25})$$

Em que:

V_{H2} é Volume de H₂ (L) produzido num intervalo de tempo t (dia) e V_{UR} é o volume útil do reator (L).

- Taxa de conversão do substrato:

Reflete o % de conversão do substrato em H₂ em comparação com as conversões teóricas previstas para a glicose, pelas vias metabólicas do acetato e do butirato.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{n_{H_2 \text{ teórico}}}{n_{H_2 \text{ produzido}}} * 100 \quad (\text{Eq. 26})$$

Sendo que:

$$n_{H_2 \text{ teórico (mol)}} - \text{via do acetato} = n_{\text{glicose consumida}} * 4$$

$$n_{H_2 \text{ teórico (mol)}} - \text{via do butirato} = n_{\text{glicose consumida}} * 2$$

E $n_{H_2 \text{ produzido}}$ é calculado pela Eq. 18

- Eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO}):

$$ER_{DQO} (\%) = \frac{(DQO_{af} - DQO_{ef})}{DQO_{af}} * 100 \quad (\text{Eq. 27})$$

Em que:

DQO_{af} refere-se à concentração de DQO no afluente e DQO_{ef} à concentração de DQO no efluente do reator.

- Eficiência de remoção de carboidratos (ER_{ART}):

$$ER_{ART} (\%) = \frac{([ART]_{af} - [ART]_{ef})}{[ART]_{af}} * 100 \quad (\text{Eq. 28})$$

Em que:

$[ART]_{af}$ é a concentração de carboidratos no afluente e $[ART]_{ef}$ é a concentração de carboidratos no efluente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição da água residuária de cervejaria e correlação com o potencial para a produção de biohidrogênio

As análises físico-químicas, cromatográfica e elementar dos diversos lotes de ARC coletados na unidade produtora permitiram a identificação do perfil de composição deste tipo de água residuária e são tratadas em detalhes a seguir.

4.1.1 Parâmetros determinados por análises físico-químicas

No que se refere aos parâmetros avaliados por análises físico-químicas, na Tabela 4.1 são apresentados os valores encontrados para DQO, ART, N-total, fósforo inorgânico, sólidos (totais, fixos e voláteis), alcalinidade e pH, além das relações C/N e C/P. Nota-se que as variáveis cujas faixas de variação são mais amplas são DQO, ART e N-total, sendo que a variação de DQO acompanha a de ART e variação de N-Total acompanha a de DQO e ART. Em geral, os valores observados encontram-se dentro das faixas de concentração relatadas na literatura para águas residuárias de cervejaria (seção 2.4, Tabela 2.4).

A composição de ARC pode ser avaliada sob o ponto de vista do potencial para produção biológica de hidrogênio, com destaque para os seguintes aspectos:

- *Demanda química de oxigênio*: a DQO é proporcional à concentração de ART na água residuária, de modo que para lotes com maiores concentrações de ART (lotes 3 e 6) foram observadas também os maiores valores de DQO, chegando a $10 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$, o que indica a necessidade de tratamento deste tipo de água residuária. Além dos açúcares presentes na AR, são contabilizados como DQO resíduos de leveduras da fermentação, lúpulo, etanol e outros aditivos.

Tabela 4.1: Composição dos diferentes lotes de água residuária de cervejaria empregados neste trabalho.

Identificação	DQO _{solúvel} (g O ₂ L ⁻¹)	[ART] (g L ⁻¹)	N -Total (mgN-NH ₄ ⁺ L ⁻¹)	P- PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	ST (mg mL ⁻¹)	STV (mg mL ⁻¹)	STF (mg mL ⁻¹)	C/N*	C/P*	pH	Alcalinidade (CaCO ₃) (mg L ⁻¹)
Lote 1	7,40 ± 0,12	5,80 ± 0,01	nd	20,4	17,58 ± 0,22	17,05 ± 0,22	0,52 ± 0,00	-	116	4,4	105
Lote 2	4,71 ± 0,11	2,79 ± 0,11	138 ± 5	8,0	3,85 ± 0,03	3,67 ± 0,02	0,18 ± 0,01	8	140	6,5	102
Lote 3	10,01 ± 0,14	7,22 ± 0,01	230 ± 2	16,2	9,52 ± 0,09	9,34 ± 0,08	0,18 ± 0,01	13	181	5,7	191
Lote 4	8,51 ± 0,28	6,35 ± 0,02	198 ± 2	14,8	8,68 ± 0,19	8,50 ± 0,18	0,18 ± 0,02	13	171	6,6	246
Lote 5	7,19 ± 0,10	4,55 ± 0,03	150 ± 5	12,1	5,98 ±0,02	5,75 ± 0,01	0,23 ± 0,00	12	153	6,2	174
Lote 6	9,85 ± 0,10	6,69 ± 0,01	240 ± 2	14,7	8,71 ±0,03	8,48 ± 0,03	0,23 ± 0,00	11	181	5,0	292

*C/N e C/P calculados de acordo com o percentual de C na glicose ([ART]=g_{glicose} L⁻¹) (adaptado de ANZOLA ROJAS, 2010).

- Disponibilidade de carboidratos: A concentração de carboidratos nas águas residuárias de cervejaria, expressos aqui na forma de açúcares redutores totais (ART) é elevada, variando de 5,80 a 7,22 g L⁻¹, o que sugere que esta água residuária seja um ótimo substrato para a produção de biohidrogênio, a depender do caráter fermentescível destes açúcares. A literatura consultada neste trabalho não apresenta a carga orgânica das ARC em função de açúcares mas somente de DQO, de modo que comparações são dificultadas, mas em trabalhos da área de química analítica é possível encontrar o perfil de açúcares deste tipo de água residuária: ESTRACANHOLLI, S. (2012) identificou que após a mosturação é usual obter entre 8-10% de glicose, 50-56% de maltose, 12-28% de maltotriose sendo o restante dextrinas; logo na ARC é razoável esperar que estejam presentes estes mesmos açúcares, porém em concentrações diferentes daquelas encontradas no mosto já que a etapa de fermentação envolve o consumo de açúcares fermentescíveis (glicose, maltose, maltotrioses).

- Teor de Nitrogênio: a quantificação do Nitrogênio amoniacal nos diferentes lotes de ARC revelou a presença de uma faixa de concentração variando entre 138 e 240 mg_{N-NH₄⁺} L⁻¹ e conforme a variação da DQO (> DQO : > N_{total}). Os valores observados neste trabalho são compreendidos nas faixas apresentadas para ARC na literatura onde relata-se concentrações de N entre 25-80, 80-120, 50-100 e 320-450 mgN L⁻¹ (seção 2.4, Tabela 2.4).

A importância do Nitrogênio para a produção biológica de H₂ está relacionada com o crescimento celular, expressão genética e atividade enzimática, com destaque para expressão e atividade das hidrogenases, o que tem relação direta com a velocidade e rendimentos da produção de H₂. Estas enzimas atuam em fluxo bidirecional, tanto de redução de H⁺ e formação de H₂ como de clivagem do H₂ e este balanço pode ser favorecido ou prejudicado por fatores nutricionais como a disponibilidade de N e de elementos traço (XIAO *et al.*, 2013). Em águas residuárias, a referência ao teor de N é comumente feita na forma de relação C/N, tanto para substratos ideais por meio de água residuária sintética, como para AR reais e tem valores ótimos diferentes em cada caso, variando para diferentes inóculos e águas residuárias. Os valores de C/N observados calculados para os diferentes lotes de AR deste trabalho ficaram entre 8 e 13 e não é possível afirmar com base na literatura se é uma faixa ideal,

já que a variação apresentada nos trabalhos é muito grande: C/N de 21 para AR de laticíneos e inóculo misto de biodigestor (GOMEZ-ROMERO *et al.*, 2014); C/N de 137 para ARS e inóculo de fermentação natural (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015); C/N de 22,4 para ARS e inóculo puro *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 (ZHANG *et al.*, 2015), dentre outros exemplos.

Especificamente para *Klebsiella pneumoniae* Liu e Fang (2007) estudaram a otimização de um meio de cultura e propuseram a adição de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura como fonte de N, além de 1,5 g L⁻¹ de NH₄Cl, com efeito positivo sobre a produção de H₂; Costa e colaboradores (2011) identificaram efeito negativo do extrato de levedura ao testar este composto, peptona e NH₄Cl como fontes de N enquanto que Xiao *et al.* (2013), propuseram um valor ótimo de 2,78 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ em meio sintético contendo glicose e elementos traço para a melhor produção de H₂. Logo, é possível observar que trata-se de um parâmetro empírico, que deve ser estudado para cada sistema inóculo-AR em busca de valores ótimos e da elaboração de estratégias de suplementação de N, caso necessário.

- Teor de Fósforo: a concentração de fósforo nos diferentes lotes de AR variou entre 8,0 e 20,4 mg L⁻¹, implicando em relações C/P entre 116 e 181 (Tabela 4.1). O fósforo é importante para as rotas metabólicas pois participa do tamponamento do meio e da formação de ATP das enzimas, mas baixas concentrações são suficientes para efeitos positivos sobre a produção de H₂, como demonstrado por ARGUN *et al.* (2008) que apontaram C/P ideal de 1000, ou seja, baixíssima concentração de fósforo frente à de carboidrato para inóculo de biodigestor e AR sintética. Em trabalho posterior, foi indicada a relação C/P de 25,4 para AR de produção de suco de pêssigo como substrato e inoculação natural (ARGUN e DAO, 2016). Espcificamente para ARC, uma baixa concentração de fósforo, de 0,5 mg L⁻¹, foi apontada como possível causa da não produção de H₂ a partir desta AR (SINBUATHONG; SOMJIT; LEUNGPRASERT, 2015). Infere-se que nos lotes de ARC utilizados no presente trabalho a concentração de fósforo não seja limitante já que foram encontrados valores muito superiores a 0,5 mg L⁻¹.

- Demais parâmetros: os valores de alcalinidade não são relatados em todos os trabalhos empregando ARC; na Tabela 2.4 apenas dois dos trabalhos

consultados apresentam este parâmetro e os valores obtidos no presente trabalho, entre 105 e 292 mg_{CaCO₃} L⁻¹, enquadram-se na faixa apresentada por um deles. A alcalinidade da AR é um indicador da capacidade de tamponamento natural da AR e pode ser ajustada no tempo zero (com NaHCO₃ por exemplo) bem como monitorada ao longo do tempo para correlações com a produção de ácidos orgânicos e H₂. A faixa de pH observada nos lotes de ARC coletados (4,4 - 6,6) é típica desta AR e facilmente ajustável para o pH empregado nos ensaios (5,5). As concentrações de sólidos totais são relativamente baixas em todos os lotes (menor que 20 mg mL⁻¹) mas este parâmetro é muito dependente do processos de decantação e separação empregados na indústria e podem variar amplamente como visto na Tabela 2.4.

4.1.2 Elementos químicos determinados por ICP-OES na água de produção de cerveja e em ARC

A determinação dos elementos químicos presentes na água de produção de cerveja e em lotes de água residuária levou à identificação dos metais nas concentrações expressas na Tabela 4.2. Dentre todos os elementos investigados (Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Ti, V, Zn), foram detectadas concentrações em escala decrescente de Na, Ca, Mg, K e Ba na água de produção de cerveja enquanto para a ARC esta sequência é K, P, Mg e Na.

Os elementos Mn e V estavam presentes em baixíssimas concentrações, abaixo do limite de detecção (LD) tanto na água de produção como na ARC; já o Zn, abaixo do LD na água de produção foi detectado nas águas residuárias.

Estes resultados podem ser visualizados também na Figura 4.1 onde percebe-se que a elevada concentração relativa de alguns elementos tem pouca ligação com a composição da água de produção (K, Mg, P) enquanto outros elementos presentes nesta água encontram-se em menor concentração ou ausentes nas águas residuárias (Ca, Na). A concentração de fósforo encontrada pela análise por ICP-OES (lotes 3 e 6) foi maior do que a encontrada por método espectrofotométrico que determina P- PO₄³⁻, o que é esperado já que por ICP-OES determina-se fósforo total.

Tabela 4.2: Elementos químicos determinados por ICP-OES na água de produção e em lotes de água residuária de cervejaria.

Elemento	Água de produção	Água Residuária - Lote 3	Água Residuária - Lote 6
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Ba	0,18 ± 0,01	0	0
Ca	7,44 ± 0,23	0	0
K	1,19 ± 0,06	89,58 ± 0,05	62,40 ± 0,03
Mg	3,63 ± 0,01	13,25 ± 0,08	0
Mn*	< LD	< LD	< LD
Na	16,99 ± 0,79	7,08 ± 0,23	5,40 ± 0,28
P	0	41,64 ± 0,15	31,68 ± 0,07
V*	< LD	< LD	< LD
Zn*	< LD	0,36 ± 0,01	0,81 ± 0,03

* LD: 0,10 ppm

As concentrações de K e P nas águas residuárias, muito superiores às observadas na água de produção tem relação direta com as matérias primas empregadas na produção de cerveja. O malte por exemplo, principal matéria prima na produção de cerveja apresenta em sua composição maiores concentrações dos elementos P (24,8 - 30,3 ppm) e K (22,4 - 33,1 ppm), seguidos de Mg (6,7 - 9,7 ppm), Ca (2,7 - 3,7 ppm) e Na (0,35 - 1,1 ppm) (composição da farinha de malte, USDA (2017) e TBCA (2017)). Assim sendo, a transferência destes elementos para a cerveja e conseqüentemente sua detecção nas águas residuárias está intimamente ligado ao uso do malte.

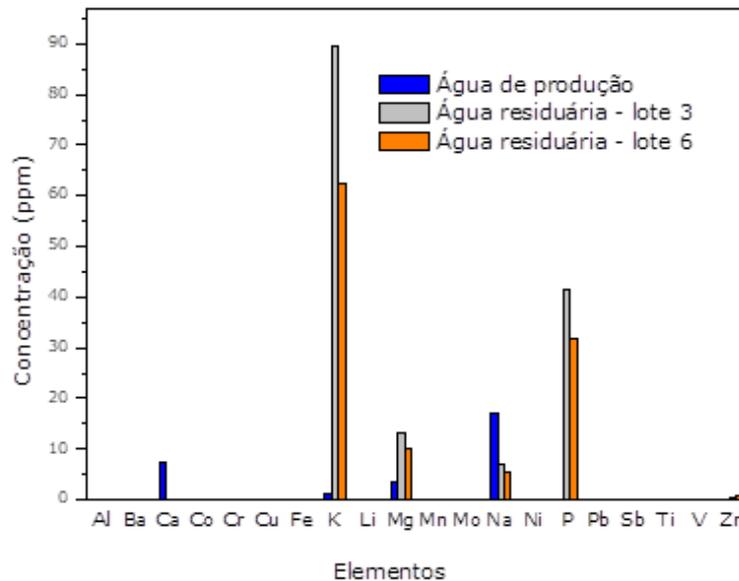


Figura 4.1: Concentração de elementos químicos na água de produção e em dois lotes de água residuária de cervejaria.

Relação com a produção de biohidrogênio: fósforo participa do tamponamento e da formação de ATP das enzimas; Fe^{2+} influencia na atividade das hidrogenases e no transporte de elétrons na oxidação de piruvato a acetil CoA e H_2 ; Mg^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} são cofatores de enzimas (SINHA; PANDEY, 2011). De modo geral nota-se certas relações nutricionais, envolvendo macro e micronutrientes podem ser estratégias para otimização da produção de H_2 e devem ser estudadas para cada inóculo e substrato, pois variações principalmente na concentração ideal de um elemento são observadas: Sinha e Pandey (2011) identificaram que enquanto a concentração ótima de Fe^{2+} para inóculo lodo granular variou entre 150 e 350 $mg L^{-1}$, para duas cepas puras de *Clostridium sp* este valor foi 25 $mg L^{-1}$, tendência observada também para o Mg^{2+} . Sendo assim, embora se conheça a importância da presença de alguns elementos, para cada tipo de inóculo e condição de produção deve ser avaliada a concentração ideal de cada um deles.

Especificamente para a cepa pura *Klebsiella pneumoniae*, estudos empregando glicerol como substrato identificaram os efeitos de alguns

elementos sobre a produção de bioH₂: efeito positivo dos íons K⁺, Ca²⁺ e do íon NH₄⁺ e efeito negativo para Fe²⁺ (LIU; FANG, 2007) e efeito positivo de NH₄⁺ e K⁺ e negativo de Fe²⁺ e Mg²⁺ (Costa *et al.*, 2011). Em ambos os estudos os valores de concentração dos íons não foram apresentados. Posteriormente, XIAO e colaboradores (2013), buscando avaliar as condições otimizadas de meio de cultura, pH e temperatura para a atividade das hidrogenases e produção de bioH₂ identificaram que um meio otimizado contendo 35,6 g L⁻¹ de glicose, 2,8 g L⁻¹ de sulfato de amônio e as seguintes concentrações de elementos traço favoreceram a produção de bioH₂ em ensaios em frascos agitados mecanicamente, a 37°C e pH 6,0: 2,3 ppm de Mn²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Al³⁺ e Cu²⁺; 11,5 ppm de Zn²⁺; 23 ppm de Ni²⁺ e Mg²⁺ e 46 ppm de Fe²⁺.

Particularmente para o fósforo, foi realizada no presente trabalho a determinação da concentração de fósforo inorgânico (P-PO₄³⁻) para todos os ciclos (efluente do reator), de todos os ensaios com ARC e as concentrações obtidas foram muito próximas àquelas detectadas nos respectivos lotes de água residuária (afluente do reator) empregados nos ensaios. As concentrações de fósforo inorgânico obtidas para os ensaios R5, R6 e R7 demonstram esta afirmação: ensaio R5 – [P-PO₄³⁻] afluente entre 15 e 16 mg L⁻¹ e efluente entre 9 e 16 mg L⁻¹; ensaio R6 - [P-PO₄³⁻] afluente entre 16 e 21 mg L⁻¹ e efluente entre 15 e 21 mg L⁻¹; ensaio R7 - [P-PO₄³⁻] afluente entre 16 e 18 mg L⁻¹ e efluente entre 9 e 16 mg L⁻¹. Nota-se que não houve consumo significativo de fósforo do início ao fim de cada ciclo, indicando que este fator não foi limitante para o bioprocessamento.

4.2 Resultados obtidos na FASE I: Avaliação da fermentação natural como fonte de inóculo

4.2.1 Características do inóculo

A metodologia de exposição ao ambiente de um certo volume de água residuária sintética formulada com sacarose, uréia e micronutrientes, levou à contaminação da solução por microrganismos do ambiente, de modo que ao final de 3 dias observou-se sempre turvação (Figura 4.2.a), odor e

características típicas do crescimento de microrganismos. Foram avaliadas amostras de 20 lotes de fermentação natural (FN) e o pH médio foi de $5,9 \pm 0,5$, com densidade óptica em 600 nm (DO_{600}) de $0,3 \pm 0,1$. O valor de DO_{600} expressa a turbidez do meio que pode ser correlacionada com a densidade de microrganismos em suspensão, ou seja, a baixa turbidez do meio (baixa DO_{600}) identificada nos diferentes lotes de FN indicam uma baixa concentração de microrganismos neste inóculo. Para alguns lotes de FN foram avaliadas lâminas de coloração de Gram, onde observou-se predomínio de bacilos gram negativos, em baixa concentração de bactérias (inóculo bem diluído) (Figura 4.2.b).

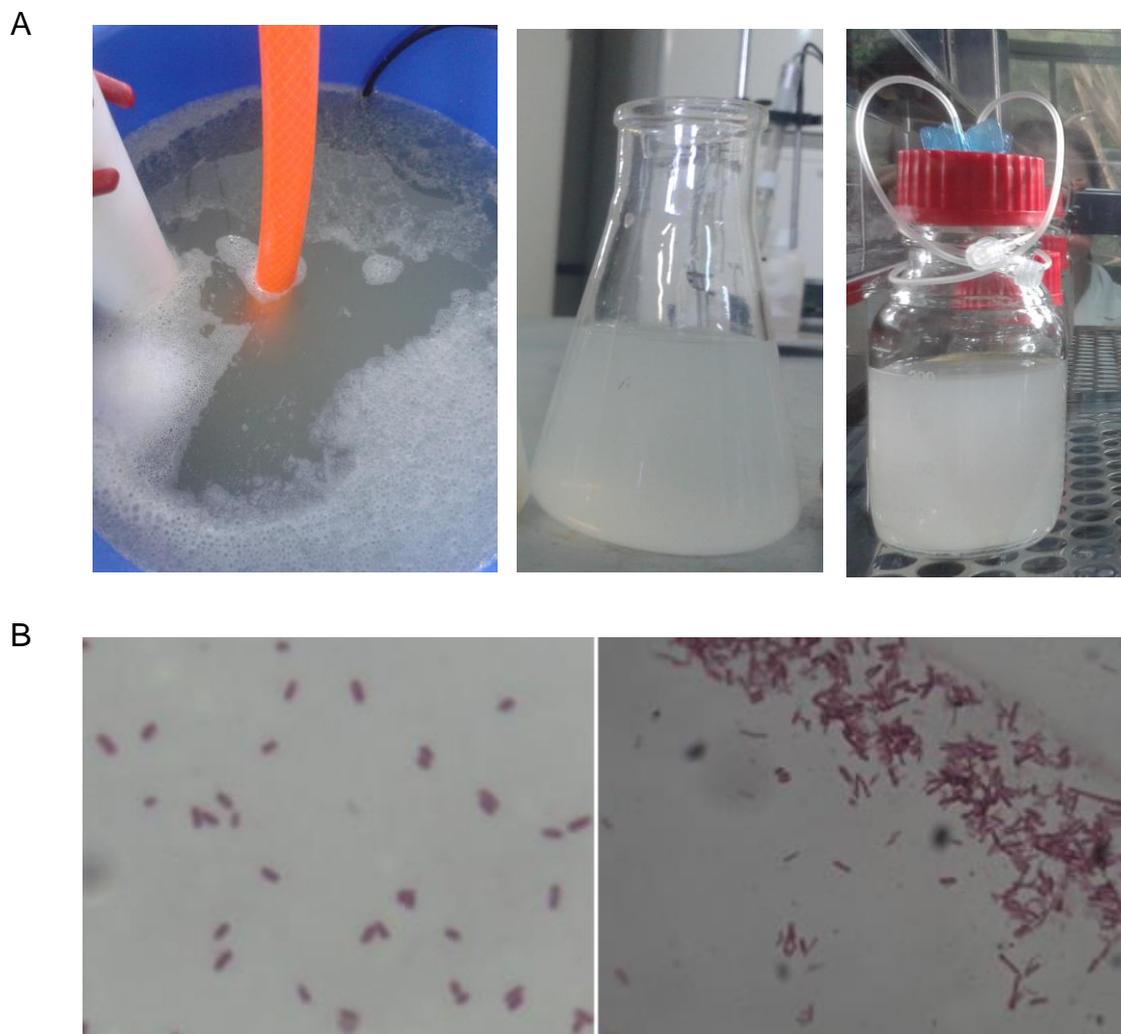


Figura 4.2: A) Imagem da suspensão obtida por FN (turbidez do meio); B) coloração de Gram típica observada para alguns lotes de inóculos gerados por FN.

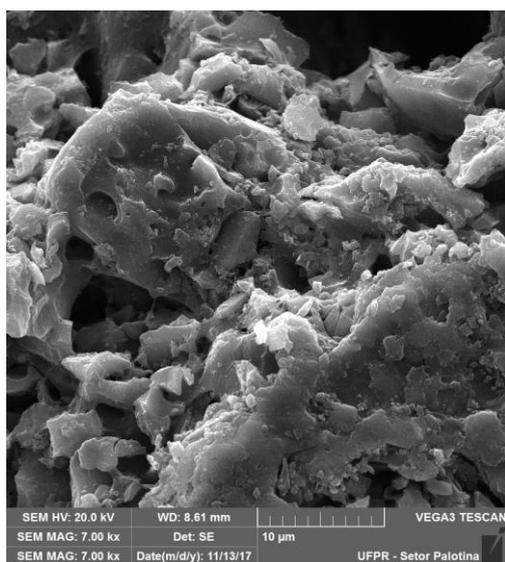
4.2.2 Características do suporte selecionado para adesão da biomassa

A argila expandida, selecionada como suporte para adesão da biomassa com base nos resultados apresentados anteriormente, foi caracterizada quanto a área superficial e porosidade bem como quanto à morfologia. O material apresentou uma área superficial de $3,41 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (método multi-point BET) com baixo volume de poros, de $3,83 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (método BHJ) e diâmetro de poros de $15,58 \text{ \AA}$ (método BHJ); esta área superficial pode ser considerada adequada para este tipo de aplicação e dentro das faixas apresentadas para este material suporte: $1,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (FERNANDES *et al.*, 2013) e $4,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (FERRAZ JÚNIOR, ETCHEBEHERE & ZAIAT, 2015). A densidade, medida por deslocamento de volume foi de $1,06 \text{ g cm}^{-3}$, coincidente com o obtido por AMORIM *et al.* (2009) enquanto alguns autores que empregaram este suporte relataram $1,50 \text{ g cm}^{-3}$ (BARROS *et al.*, 2010; SHIDA *et al.*, 2012), o que é normal devido aos diferentes tipos de argila expandida comercial.

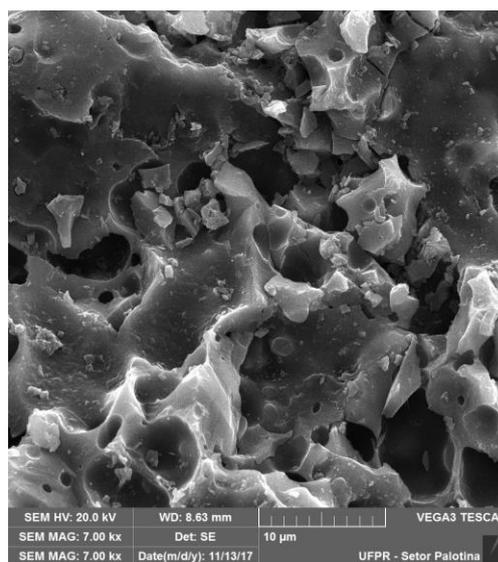
A análise superficial de fragmentos de argila expandida por MEV revelou uma superfície externa mais lisa e a presença de poros na matriz interna da argila, porém sem interconectividade entre eles (Figura 4.3 – a, b); esta porosidade está relacionada a bolhas de gases originados no processo de fabricação da argila expandida, que envolve fusão a altíssimas temperaturas. Apesar da baixa porosidade o material é propício para a colonização de bactérias, como exibido na Figura 4.3 (c,d) em que no presente trabalho uma enterobactéria foi cultivada na presença de argila expandida e as micrografias obtidas exibiram a colonização de bactérias. Este caráter propício para a colonização foi também identificado por BARROS *et al.* (2010), para inóculo misto (lodo anaeróbico), e por FERRAZ JÚNIOR (2015) para inóculo de fermentação natural de vinhaça.

Argila expandida foi empregada para produção de biohidrogênio em ensaios com as seguintes características: inóculo de fermentação natural da vinhaça, aderido à argila por recirculação, com bons resultados de produção de H_2 para este suporte em comparação com carvão vegetal, cerâmica porosa e polietileno de baixa densidade (FERRAZ JÚNIOR, ETCHEBEHERE & ZAIAT, 2015); inóculo de fermentação natural de ARS (sacarose) com

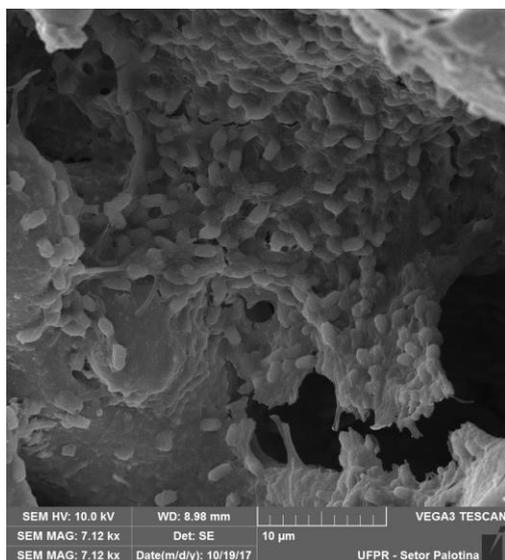
resultados similares de produção de H₂ e de ácidos orgânicos voláteis para argila expandida, carvão vegetal ou polietileno de baixa densidade (FERNANDES *et al.*, 2013); inóculo de reator UASB pré tratado e ARS (glicose) obtendo produção de biogás com 8-35 % e 16-52 % de H₂, sem metano, tendo os autores apontado a argila expandida como suporte promissor para este tipo de bioprocessos (AMORIM *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2010).



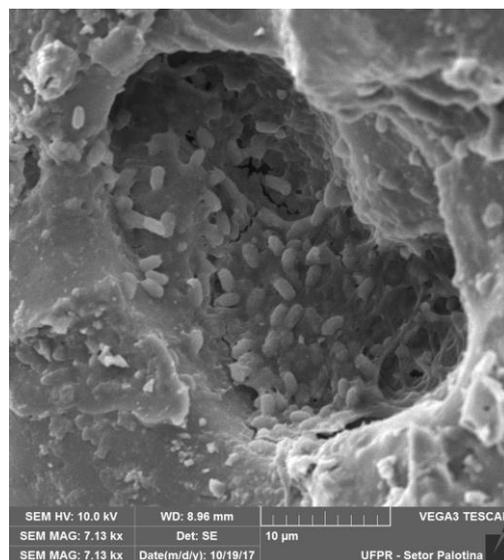
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.3: Micrografias obtidas por MEV para argila expandida: superfícies antes da colonização de bactérias (a, b) e colonização de bactérias nas superfícies e poros (c, d).

Neste trabalho a argila expandida mostrou-se um suporte viável, tanto por propiciar a adesão de inóculo e conseqüentemente a produção de bioH₂ como também pelas características de estabilidade física e química em experimentos prolongados, além de baixo custo e simplicidade para o reuso.

4.2.3 Ensaios de produção de bioH₂ em pequena escala

Estes ensaios tiveram o objetivo de verificar o potencial de produção de biohidrogênio pelo inóculo de fermentação natural de água residuária sintética empregando como substrato ARC, bem como a funcionalidade dos suportes pré selecionados em ensaios anteriores. Além disso avaliou-se se a fermentação da própria ARC em ensaio sem uso de inóculo seria capaz de gerar H₂. A produção volumétrica de H₂, variação do pH e da concentração de ART ao longo do tempo são apresentados na Figura 4.4.

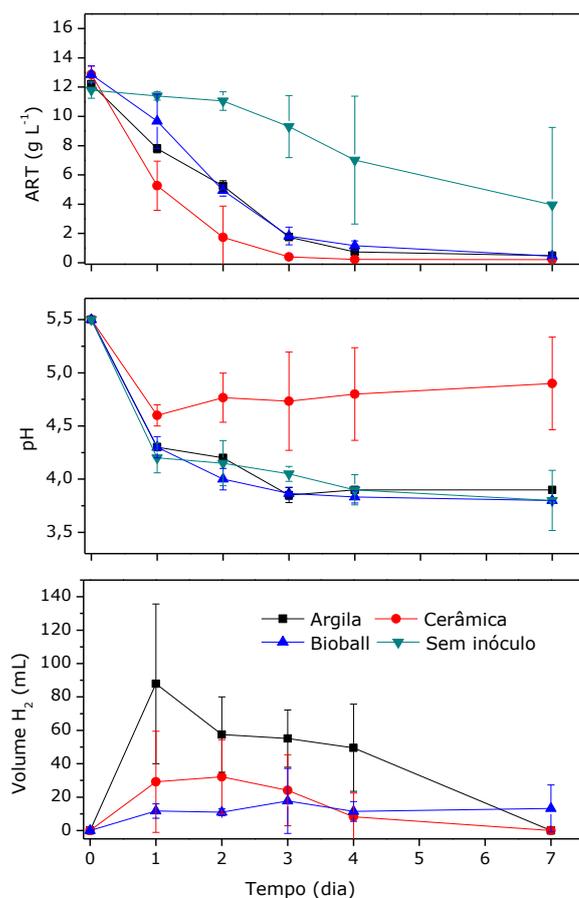


Figura 4.4: Produção volumétrica de H₂, variação do pH e consumo de ART para inóculo de FN imobilizado em diferentes suportes.

Para estes ensaios a análise do biogás indicou a presença de H₂ e CO₂, ausência de CH₄ e as seguintes faixas de concentração de H₂: 34,0 ± 1,4 a 51,2 ± 6,9% para argila expandida; 22,6 ± 7,4 a 37,9 ± 4,2% para cerâmica e 41,7 ± 3,2 a 45,9 ± 1,3% para bioball, ou seja, em termos de % de H₂ os suportes argila e cerâmica mostraram-se similares. No entanto este resultado isoladamente não é conclusivo pois deve ser associado à produção volumétrica de H₂ que por sua vez foi maior para argila expandida e similar para os outros dois suportes.

A concentração de açúcares tornou-se baixa após o 3º dia de ensaio, quando o volume de H₂ produzido caiu e cessou; já o pH, que teve uma queda acentuada já no 1º dia de reação, permaneceu no restante do tempo entre 3,5 e 4,0 e pode ser explicado nos processos acidogênicos pela produção de ácidos orgânicos voláteis, que acompanham a produção de H₂.

O ensaio realizado com ARC e sem inóculo demonstrou que a fermentação natural dos açúcares da AR, levaram à redução do pH e a um leve consumo de açúcares, porém gerando apenas CO₂. Com isto, demonstrou-se a não produção de H₂ pela fermentação natural da própria ARC, corroborando com outros experimentos de FN desta água residuária (dados não apresentados) que haviam demonstrado a não produção de H₂.

Com base nos resultados obtidos foi realizada a escolha da argila expandida como suporte, fundamentado também nas descrições da literatura, por autores que empregaram este material em reatores biológicos para produção de biohidrogênio a partir de diferentes águas residuárias (AMORIM *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2013; FERRAZ JÚNIOR, ETCHEBEHERE & ZAIAT, 2015).

4.2.4 Produção de bio H₂ em reator anaeróbico com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica – Ensaio R1 a R3

Uma vez observado o potencial de produção de H₂ nos ensaios inoculados com fermentação natural com biomassa suportada em argila expandida, foram realizados ensaios em reator AnSBBR com planejamento de duração por cerca de 15 dias. No entanto, os resultados obtidos na primeira semana de cada ensaio não foram promissores e levaram ao encerramento dos mesmos com 6 ou 9 dias de duração (Figura 4.5). Os dois primeiros ensaios (R1 e R2) foram realizados com ARC e para o ensaio R3 foi

utilizada ARS à base de sacarose, que pode ser considerado um substrato ideal e foi empregado em diversos trabalhos que utilizam inóculo de fermentação natural.

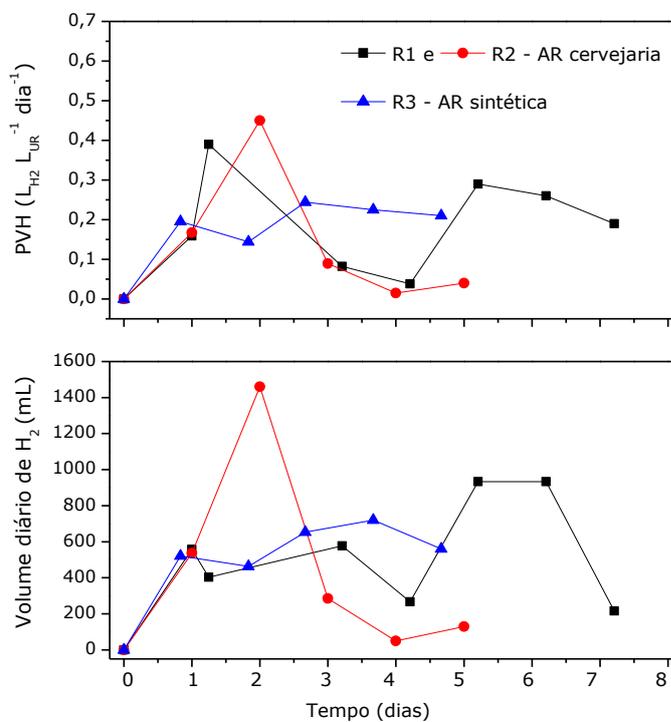


Figura 4.5: Volume de H₂ e produtividade volumétrica de H₂ (PVH) para ensaios empregando inóculo de fermentação natural (R1, R2 e R3) em reator AnSBBR.

A Figura 4.5 apresenta três ensaios selecionados dentre um número total de oito tentativas com a mesma metodologia, visando de produção de H₂ com ARC e inóculo obtido a partir de fermentação natural em reator AnSBBR; em todos os casos não foi possível obter produção de H₂ após 4 ou 5 ciclos. É possível notar na Figura 4.5 que os volumes de H₂ produzidos foram baixos e oscilaram bastante de um ciclo para outro, o que ocorreu também para o parâmetro produtividade volumétrica (PVH).

Comparando-se os valores de PVH dos três ensaios apresentados neste trabalho com aqueles obtidos por autores que empregaram este mesmo inóculo e águas residuárias diferentes (Tabela 4.3) é possível constatar esta baixa produção. Na Tabela 4.3 são apresentados alguns parâmetros de avaliação do desempenho de reatores: vazão de biogás (Q_{biogas}), vazão molar de H₂ (ν_{H_2}),

produtividade volumétrica de H₂ (PVH), rendimento de H₂ (Y_{H2}) e concentração de H₂ no biogás.

Tabela 4.3: Indicadores da produção de bioH₂ em reator AnSBBR inoculado por fermentação natural (R1, R2 e R3) e comparações com a literatura

Referência		PVH (L _{H2} (L dia) ⁻¹)	Y _{H2} (máximo) mol _{glicose} ⁻¹	Q _{biogás} (mL h ⁻¹)	H ₂ no biogás (%)	U _{H2} (mmol _{H2} h ⁻¹)
Este trabalho	R1	0,04 - 0,39	0,73 mol _{glicose} ⁻¹	16 - 147	22 - 47	0,40 - 2,57
	R2	0,01 - 0,45	1,09 mol _{glicose} ⁻¹	20 - 134	3 - 50	0,10 - 1,86
	R3	0,14 - 0,24	1,15 mol _{glicose} ⁻¹	29 - 93	28 - 42	0,75 - 1,45
Perna <i>et al.</i> (2013)		0,06 - 1,00	0,67 mol _{lactose} ⁻¹	—	5- 10	—
Gomes <i>et al.</i> (2015)		Máx 1,47	0,60 mol _{sacarose} ⁻¹	35 - 78	60 - 72	1,87
Anzola-Rojas <i>et al.</i> (2015)		—	0,60 mol _{sacarose} ⁻¹	131 - 423	49 - 61	10,3

Embora o planejamento para estes ensaios fosse de maior duração, a baixíssima produção observada ou mesmo o fim da produção após alguns dias de ensaio levaram à decisão de interrupção dos experimentos. Mesmo para o emprego de água residuária sintética como substrato (R3) foi obtido baixas produções de H₂ (máx 720 mL dia⁻¹) o que levou à conclusão de que o inóculo autofermentado suportado em argila expandida não apresentava potencial para produção biológica de H₂ em reator AnSBBR.

A variação da concentração de açúcares no início e fim de cada ciclo é apresentada na Figura 4.6, juntamente com a eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO}).

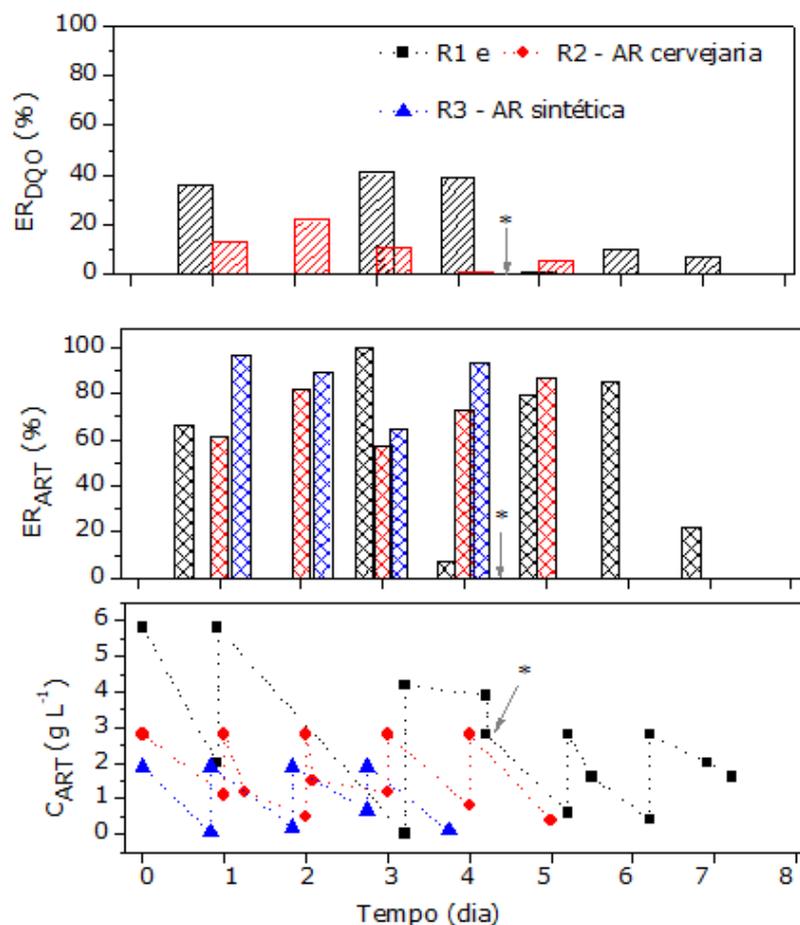


Figura 4.6: Variação da concentração de açúcares (ART) e eficiência de remoção de ART (ER_{ART}) e de DQO (ER_{DQO}) nos ensaios empregando inóculo de fermentação natural em reator anaeróbico (R1, R2 e R3). (*) indica a troca de lote de ARC (Lote 1 para Lote 2), no ensaio R1.

Para a ARC, cujas concentrações iniciais de ART eram cerca de 3 e 6 g L⁻¹ (R2, R1) nota-se que o consumo de açúcares não foi total até o final de cada ciclo, na maioria dos ciclos, e as eficiências de remoção de DQO e de ART não foram reprodutíveis, entre os ciclos e entre os ensaios. Isto indica que embora os açúcares não estivessem exauridos, outros fatores atuaram na limitação da produção de H₂ para o inóculo, suporte, reator e água residuária estudados.

Comparando os resultados observados nas Figuras 4.5 e 4.6 e as faixas de valores obtidos no presente trabalho para os parâmetros da Tabela 4.3, é

possível perceber que os resultados obtidos no presente trabalho foram compreendidos entre as faixas apresentadas mas indicam necessidade de otimizações. O único parâmetro que mostrou valores superiores aos relatados na literatura é Y_{H_2} , no entanto, isso ocorreu pelo fato de que o tempo de ciclo não é considerado neste cálculo, ou seja, o consumo de glicose para geração de H_2 ocorreu em 24 horas.

Considerando-se a baixa produção de H_2 , a instabilidade da produção e o curto período de atividade do inóculo (cerca de 1 semana apenas) pode-se dizer que este inóculo, suportado em argila expandida e empregado em reator AnSBBR para fermentação de ARC não foi apropriado para uma produção viável de bio H_2 . Dentre as possíveis hipóteses para tais resultados podem ser citados a baixa densidade de microrganismos no inóculo, indicando a necessidade de uma fase de enriquecimento do inóculo antes do experimento de produção propriamente dito; o tempo de ciclo muito longo, podendo implicar no acúmulo de metabólitos tóxicos que atrapalham o bioprocessos; o desprendimento da biomassa do suporte, de modo que na descarga do reator tenha ocorrido também a lavagem do inóculo, implicando em resultados piores com o decorrer dos dias de ensaio.

Com base nos resultados obtidos nesta fase do trabalho pode-se perceber a importância da avaliação performance do inóculo em reatores, em ensaios prolongados, pois o potencial aparentemente promissor de um dado inóculo, com base em experimentos curtos em pequena escala (batelada) pode não ser real para a aplicação no aumento de escala, que é o foco quando se pretende o tratamento e aproveitamento de águas residuárias.

Uma vez verificados estes aspectos optou-se pela não continuidade dos trabalhos com inóculo obtido por fermentação natural.

4.3 Fase II: utilização de uma *Klebsiella pneumoniae* como inóculo para produção de bio H_2 com água residuária de cervejaria

Nesta fase do trabalho são apresentados os resultados obtidos para os ensaios com a cepa isolada, *Klebsiella pneumoniae*, na forma de biofilme, ou seja, imobilizada em argila expandida para adesão de biomassa e avaliada em

reator anaeróbico operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (*AnSBBR*), com água residuária de cervejaria.

4.3.1 Confirmação da espécie *Klebsiella pneumoniae*

A caracterização molecular por PCR com *primers* para o gene da hemolisina *Khe* foi realizada com base nos relatos da literatura de que este gene, que codifica um único peptídeo de 20 KDa está presente em todas as cepas de *K. pneumoniae*, conforme apresentado por HARTMAN *et al.* (2009), que se baseou em estudos anteriores que detectaram este mesmo fato. O resultado foi positivo e obteve-se o produto de PCR de 77 pb tanto para a cepa controle de *K. pneumoniae* (ATCC) como para o isolado (Figura 4.7).

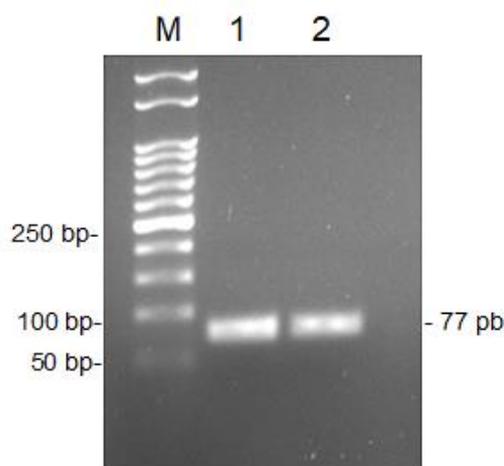


Figura 4.7: Produto de PCR de 77 pb da região do gene da Hemolisina de (1) *K. pneumoniae* ATCC 13883 (controle positivo) e (2) cepa utilizada neste trabalho. Fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose a 3%. M. 50 bp DNA Ladder (*Ludwig Biotec*).

A identidade do isolado também foi confirmada pelo sequenciamento da região rDNA 16s, permitindo a obtenção de uma sequência de 676 pb com o *primer reverse* e de 908 pb com o *primer forward* com similiaridades de 97% e 98% respectivamente com sequências depositadas no Genbank, com menores E-values.

4.3.2 Avaliação do inóculo frente a água residuária sintética – Ensaio R4

O reator AnSBBR, inoculado com *Klebsiella pneumoniae* suportada em argila expandida foi alimentado com ARS com concentração de sacarose de 5,0 g L⁻¹, de modo a se aproximar das concentrações de açúcares observadas para os lotes de ARC usados no trabalho. A carga orgânica volumétrica aplicada (COV_c) foi fixada em 4,7 g (L dia)⁻¹ e o tempo de ciclo de 24 horas. Neste ensaio foram avaliados somente parâmetros volume e vazão de biogás, concentração de H₂ no biogás, variação do pH e da concentração de açúcares (ART), cujos principais resultados são apresentados na Figura 4.8.

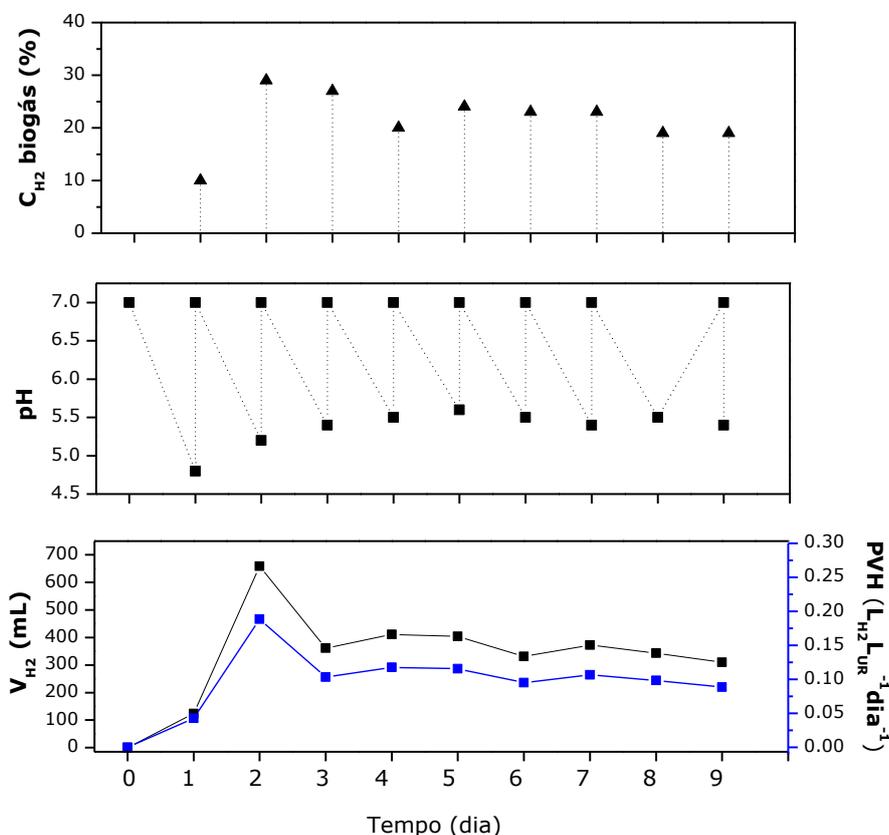


Figura 4.8: Volume de H₂ (V_{H₂}), produtividade volumétrica de H₂ (PVH), variação do pH e teor de H₂ no biogás (C_{H₂}) para ensaio de produção de H₂ empregando *K. pneumoniae* e AR sintética.

Os volumes de H₂ produzidos em cada ciclo podem ser considerados baixos, o que se reflete nos valores de PVH que variaram entre 0,09 e 0,12 L (L dia)⁻¹, com apenas um pico de 0,19 L (L dia)⁻¹. Estes resultados podem estar

relacionados ao fato de ter sido empregado tempo de ciclo de 24h, que é um tempo prolongado considerando-se que os substrato sacarose é facilmente degradado. A avaliação de menores tempos de ciclo permitiria concluir acerca desta hipótese.

No entanto, foi verificada uma estabilidade na produção após o primeiro ciclo e até o momento em que o ensaio foi encerrado (9º ciclo) o que é um fator positivo tendo em vista os resultados anteriores em que, além da instabilidade na produção, o inóculo tornava-se inativo precocemente (5 a 7 ciclos). A concentração de H₂ no biogás ficou entre 20 e 30% na maioria dos ciclos enquanto o pH, que era inicialmente 7,0 (valor da própria ARS, sem ajuste) oscilou entre 4,8 e 5,5 indicando uma leve acidificação do meio.

Para fins de comparação dos resultados com a literatura podem ser citados estudos em que *K. pneumoniae* foi empregado como inóculo e água residuária sintética como substrato, como por exemplo para ARS contendo glicose em que obteve-se PVH de 482 mL (L h)⁻¹, equivalente a cerca de 0,02 L (L dia)⁻¹ (NIU *et al.*, 2010), enquanto no presente trabalho obteve-se em geral 0,09 a 0,12 L (L d)⁻¹, indicando que o inóculo *K. pneumoniae*.

4.3.3 Produção de bioH₂ com água residuária de cervejaria: efeito da concentração de substrato, da carga orgânica volumétrica aplicada e do tempo de ciclo

Neste estágio do trabalho foram avaliados diferentes lotes de ARC, com diferentes concentrações de matéria orgânica e de açúcares. Com estes ensaios foi possível avaliar também a habilidade do inóculo em metabolizar os açúcares da ARC em comparação com ARS (sacarose) (ensaio R4 apresentado anteriormente).

Foram avaliados os efeitos da concentração de carboidratos (C_{carb}) e da carga orgânica volumétrica aplicada, em termos de carboidratos (COV_c), sobre a produção de bioH₂, por meio da variação destes parâmetros com tempo de ciclo fixo, de 24 horas. Nestes experimentos, identificados como R5 e R6, as condições de alimentação variaram da seguinte forma: R5, C_{carb} e COV_c de 2,8 g L⁻¹ e 2,6 g (L dia)⁻¹, respectivamente, e R6 com C_{carb} e COV_c de 7,2 g L⁻¹ e 6,8 g

(L dia)⁻¹, respectivamente. Como a COV_D acompanha a COV_C (DQO aumenta com o aumento de C_{carb}), a correlação da produção biológica de H₂ em função de um destes parâmetros é suficiente para a compreensão do efeito. Em seguida, para ARC com C_{carb} próxima à de R6 (6,7 g L⁻¹) avaliou-se o efeito da redução do tempo de ciclo de 24h para 12h e do aumento da COV_C que neste ensaio (R7) foi de 18,6 g (L dia)⁻¹.

Primeiramente serão apresentados os resultados do ensaio R5, para demonstrar os parâmetros de produção de bioH₂ em ARC; em seguida comparações entre R5 e R4 (meio sintético) a fim de identificar a adaptação do inóculo à ARC frente a um substrato ideal (sacarose) e por fim os ensaios R6 e R7 com as devidas comparações com R5 e R6 para concluir acerca dos efeitos de C_{carb}, COV_C e tempo de ciclo sobre a produção de H₂.

4.3.3.1 Ensaio R5: C_{carb} de 2,8 g L⁻¹ , COV_C de 2,6 g (L dia)⁻¹ e tempo de ciclo de 24h

O ensaio R5 foi conduzido por 11 dias, de modo a completar 10 ciclos com tempo de ciclo de 24 horas. Observou-se boa produção de hidrogênio, com volumes de cerca de 800 mL por dia e 2 picos de cerca de 1200 mL, com concentrações de H₂ no biogás entre 36 e 47 %. A diminuição do pH para todos os ciclos manteve-se entre 3,5 e 4,0, decréscimo típico da fermentação acidogênica com formação de ácidos orgânicos além do fato de não ter sido empregado suplementação de alcalinidade para tamponamento do meio . Os valores de PVH observados ficaram entre 0,23 e 0,29 L (L dia)⁻¹ com valores máximos de em 0,35 L (L dia)⁻¹ (Figura 4.9).

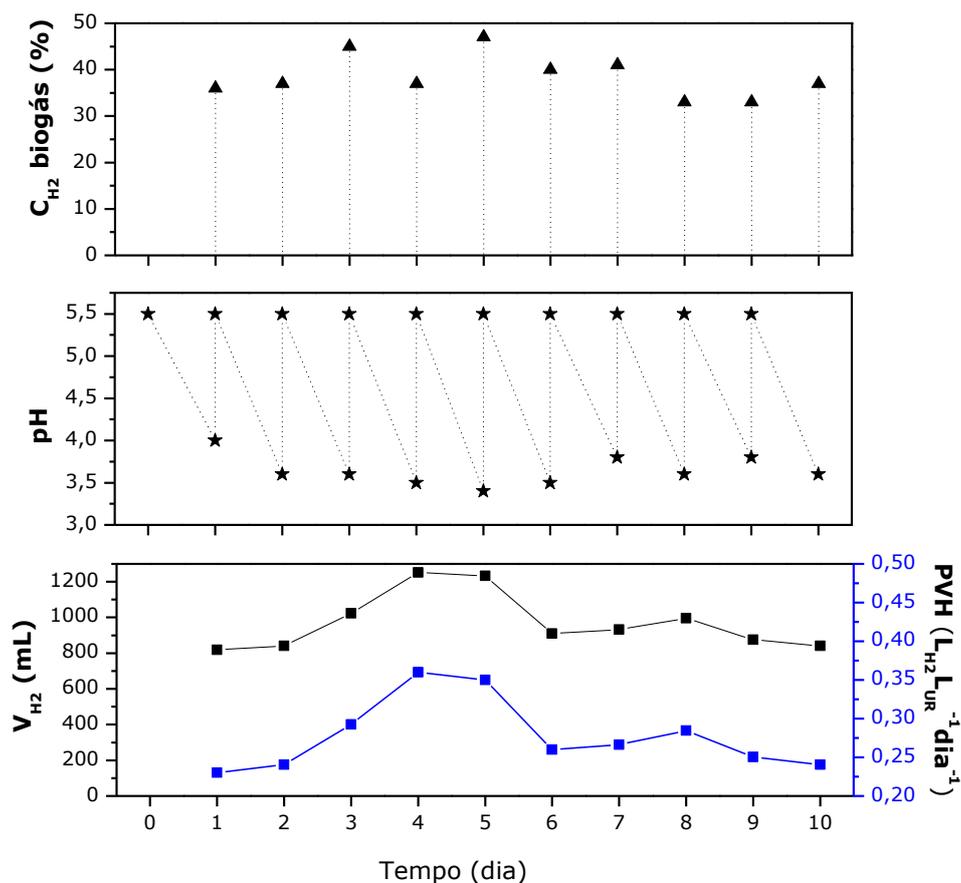


Figura 4.9. Volume de H₂ (V_{H2}), produtividade volumétrica de H₂ (PVH), variação do pH e teor de H₂ no biogás (C_{H2}), para ensaio R5 (C_{carb} 2,8 g L⁻¹ e COV_c 2,6 g (L d)⁻¹ e t_{ciclo} de 24 horas).

Neste ensaio notou-se também o aproveitamento dos açúcares disponíveis na ARC (expressos na forma de ART) em sua quase totalidade já que na maioria dos ciclos a [ART] chegou a zero. Com isto obteve-se uma alta eficiência de remoção de ART (ER_{ART}), entre 95 e 100% na maioria dos ciclos, que pode também ser correlacionada com a produção de H₂ por meio do parâmetro rendimento de H₂ (Y_{H2}) (Figura 4.10)

Os valores de rendimento de H₂ para o ensaio R5 oscilaram entre 0,80 e 1,25 mol_{H2} mol_{glicose}⁻¹, o que é um valor alto em comparação com águas residuárias sintéticas, por exemplo (Tabela 4.3 da seção 4.2.4). Esses valores expressam um bom aproveitamento dos carboidratos presentes na água residuária para formação do produto de interesse. No entanto estes valores não devem ser avaliados isoladamente mas sim em conjunto com o tempo de ciclo

empregado; por exemplo, se com ciclos de 4 horas as bactérias metabolizam os açúcares e produzem $0,60 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicose}}^{-1}$, isso pode ser mais vantajoso do que um ciclo de 24 horas no qual o rendimento seja superior a $0,60 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicose}}^{-1}$, uma vez que quanto maior o tempo de ciclo menor o número de bateladas por dia de operação.

De qualquer modo, os valores de Y_{H_2} associados ao consumo total de ART expressam uma boa adaptação deste inóculo aos açúcares presentes na água residuária, o que é um bom resultado. O fato de a água residuária conter desde açúcares prontamente disponíveis, como a glicose, até os açúcares complexos como maltotriose e dextrinas, pode propiciar a atividade metabólica do inóculo por um tempo mais prolongado, onde inicialmente sejam metabolizados os açúcares simples e posteriormente os demais. Esta possibilidade pode estar associada ao bom desempenho do inóculo frente à ARC.

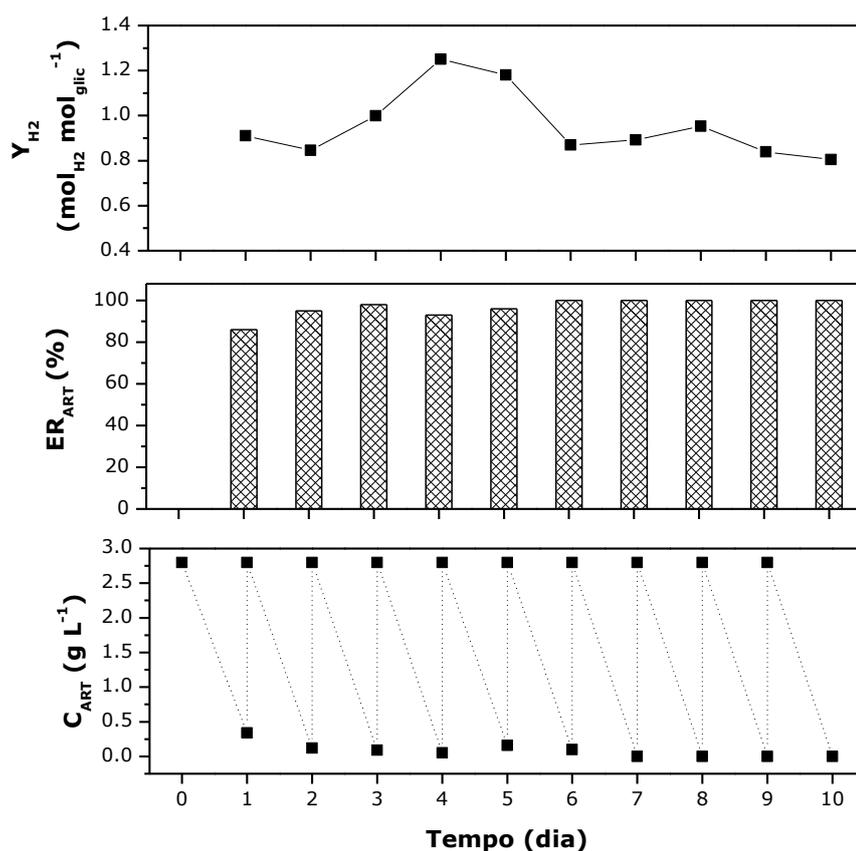


Figura 4.10: Consumo de açúcares (ART), eficiência de remoção de açúcares (ER_{ART}) e rendimento de H_2 (Y_{H_2}), para o ensaio R5 ($C_{\text{carb}} 2,8 \text{ g L}^{-1}$, $COV_c 2,6 \text{ g (L d)}^{-1}$ e t_{ciclo} de 24 horas).

Com relação à variação da DQO neste ensaio sabe-se que para a água residuária de cervejaria o valor de DQO acompanha o de [ART], ou seja, quanto maior a [ART] maior a DQO; no entanto o consumo de açúcares em cada ciclo não implica em redução drástica da DQO já que embora ocorra variação deste parâmetro, ainda resta uma elevada carga orgânica no final de todos os ciclos (entre 3,0 e 3,8 g_{O₂} L⁻¹). Este aspecto está relacionado com produção de ácidos orgânicos voláteis (AOV) e até mesmo de solventes, que acompanham a produção biológica de H₂, de acordo com as rotas metabólicas desempenhadas pelas bactérias.

Estes baixos valores de remoção de DQO são comuns em reatores acidogênicos e atribuídos aos compostos intermediários que permanecem no efluente (MANSSOURI *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2015; ANDREANI, 2017). Para os ensaios R5 e seguintes (R6, R7) foram analisados o AOV e solventes presentes em cada ciclo e os resultados serão abordados no item 4.4. Assim, a eficiência de remoção de DQO neste ensaio oscilou entre 19 e 36% (Figura 4.11).

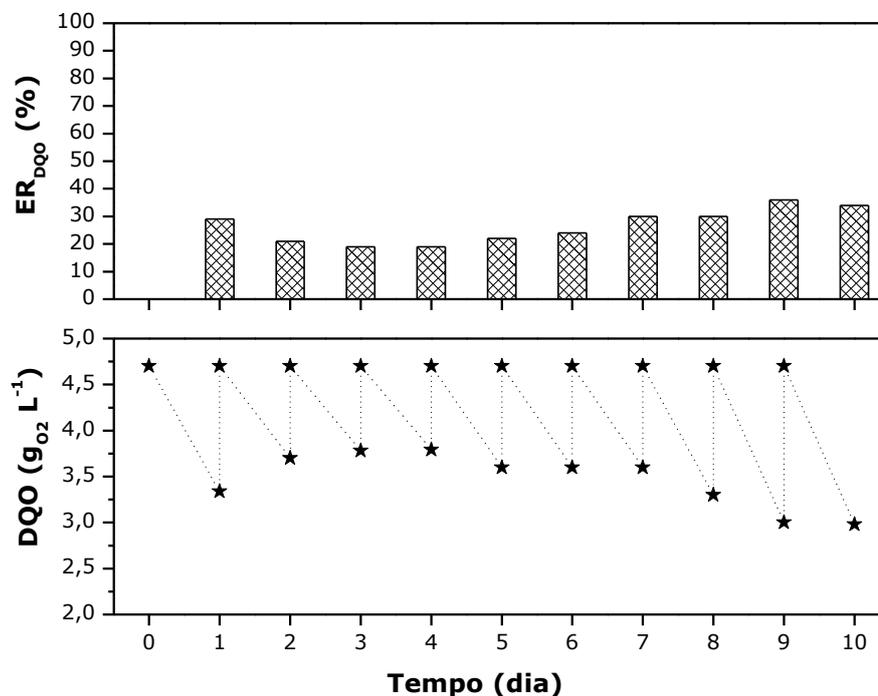


Figura 4.11: Variação da DQO e eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO}) para o ensaio R5 (COV_c 2,6 g (L d)⁻¹ e t_{ciclo} de 24 horas).

4.3.3.2 Ensaios R4 e R5: água residuária sintética X água residuária de cervejaria

A comparação da desempenho do reator AnSBBR inoculado com *K. pneumoniae* e alimentado ora com ARC ora com ARS, pode ser feita com base nos indicadores produção volumétrica de H₂, teor de H₂ no biogás, vazão de H₂, dentre outras respostas. Esta avaliação levou aos perfis de produção de H₂ apresentados na Figura 4.12 e revelou uma melhor adaptação do inóculo à ARC do que à sintética. Nota-se que tanto o teor de H₂ no biogás como a produção volumétrica e consequentemente molar foram superiores quando o reator foi alimentado com ARC.

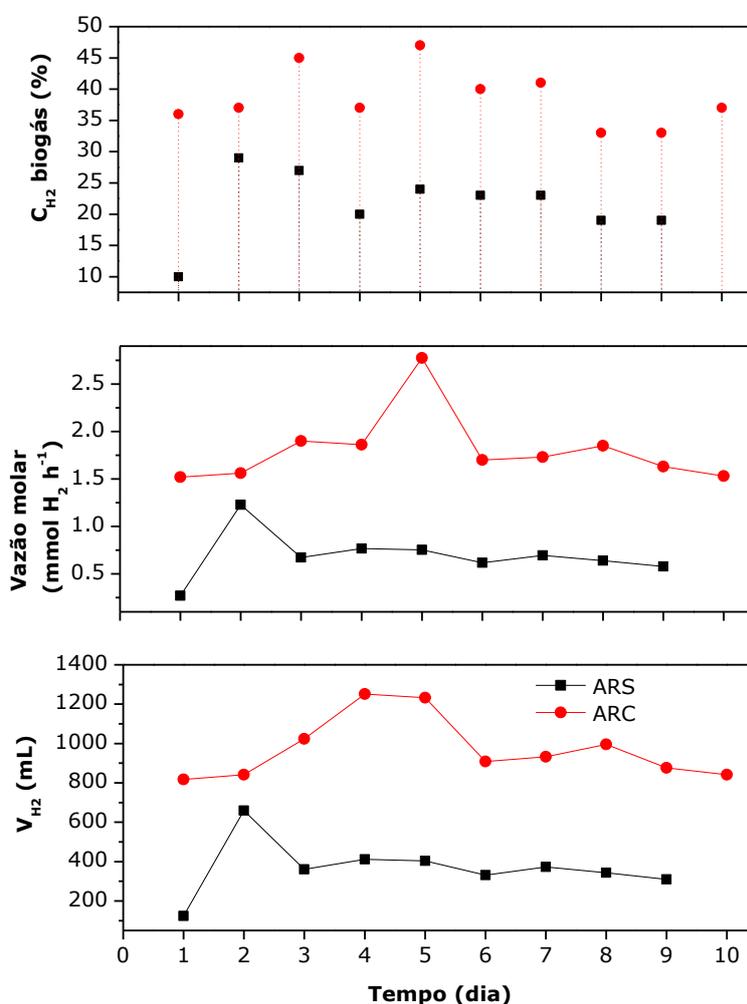


Figura 4.12: Produção de H₂ em AnSBBR inoculado com *Klebsiella pneumoniae* e alimentado com ARS (R4) ou ARC (R5) em termos de volume produzido por ciclo (V_{H₂}), vazão molar e teor de H₂ no biogás (C_{H₂}).

Tendo em vista que há boa disponibilidade de estudos na literatura para a produção de bioH₂ a partir de água residuária à base de sacarose, em reator anaeróbio com biomassa imobilizada, e que nestes trabalhos os autores apresentam a habilidade dos inóculos em fermentar este carboidrato e gerar bioH₂ esta AR foi escolhida no presente trabalho como substrato para fins de comparação (FERNANDES *et al.*, 2010; FONTES LIMA; ZAIAT, 2012; PENTEADO *et al.*, 2013; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2015). No entanto nestes estudos foram empregados como inóculos culturas mistas.

Especificamente para o inóculo *K. pneumonia*, avaliado na utilização de ARS como substrato, são relatados na literatura o uso de glicerol, glicose, xilose e celobiose (Tabela 2.1, seção 2.2.1) mas não foram localizados trabalhos com sacarose. Nestes estudos *K pneumonia* foi produtora de H₂ metabolizando todos os substratos testados, com melhores resultados para a glicose.

O fato de os resultados de produção de H₂ demonstrarem que os carboidratos da ARC foram melhor aproveitados pelo inóculo em relação à sacarose torna muito oportuno o uso de *K. pneumoniae* como inóculo para o aproveitamento de água residuária de cervejaria, como proposto no presente trabalho, motivando as próximas avaliações com o objetivo de otimização do processo e maior produção de H₂.

4.3.3.3 Ensaios R6 e R7: efeitos de C_{carb}, COV_c e do tempo de ciclo

A avaliação do efeito da concentração de substrato sobre a produção demonstrou que o aumento da concentração de açúcares na ARC favoreceu a produção de bioH₂: ao empregar ARC com C_{carb} de 7,2 g L⁻¹ (ensaio R6) os parâmetros de avaliação da produção de H₂ exibiram um favorecimento da produção volumétrica, quando comparado à ARC anterior com 2,8 g L⁻¹ (ensaio R5), implicando em aumento de produtividade volumétrica de H₂ (PVH) e vazão molar de H₂ (v_{H2}). O perfil obtido ao longo do ensaio pode ser observado na Figura 4.13 (a) que compara a produtividade volumétrica de H₂ (PVH) e vazão molar de H₂ (v_{H2}) para estas duas concentrações de substrato, C_{carb} de 2,8 e de 7,2 g L⁻¹.

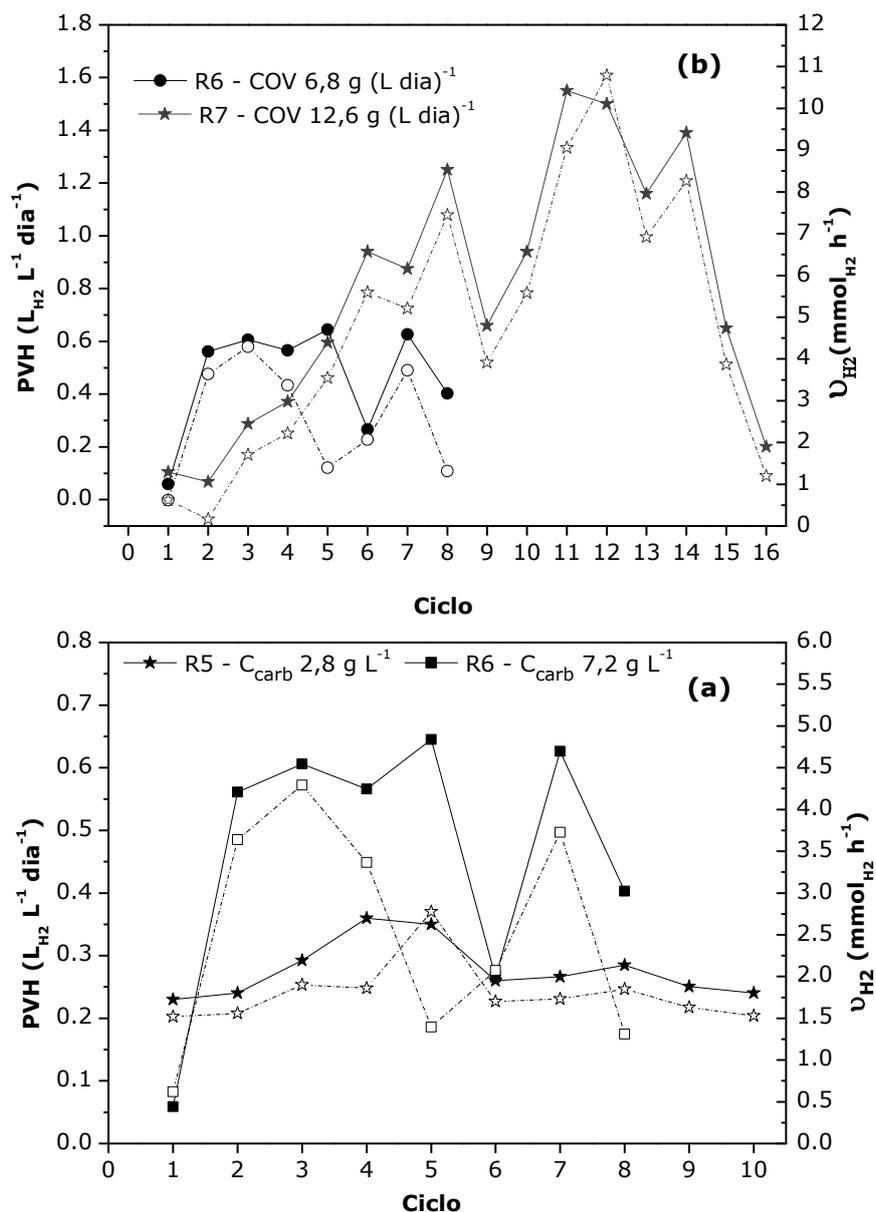


Figura 4. 13. Produtividade volumétrica de H₂ (PVH) e vazão molar de H₂ (U_{H_2}) para reator AnSBBR inoculado com *K. pneumoniae*: efeito da concentração de carboidratos (C_{carb}), R5 X R6 (a) e de tempo de ciclo e carga orgânica volumétrica aplicada (COV_c), R6 X R7 (c). Legenda: PVH (—); U_{H_2} (....).

Sendo a concentração de substrato e o tempo de ciclo variáveis intrínsecas à COV_c , o aumento de C_{carb} mantendo-se o tempo de ciclo em 24h, significou também o aumento da COV_c , de 2,6 para 6,8 g (L dia)⁻¹, de

modo que o efeito positivo desta variável pôde ser verificado, juntamente com o efeito de C_{carb} . Empregando o mesmo inóculo do presente trabalho (*Klebsiella pneumoniae*) porém em suspensão e ensaios em batelada com água residuária sintética, alguns estudos apontaram o efeito positivo do aumento da concentração da fonte carbono até valores máximos, acima dos quais ocorre inibição da produção de H_2 : máximo de 30 g L^{-1} de glicose (NIU *et al.*, 2010) ou glicerol (COSTA *et al.*, 2011). No presente trabalho, em que C_{carb} de cada um dos diferentes lotes de ARC foram próximos, a avaliação do efeito de C_{carb} de $7,2 \text{ g L}^{-1}$ é representativa da água residuária de cervejaria.

Os resultados obtidos nesta fase, apontando para efeito positivo de COV_c , e a necessidade de redução do tempo de ciclo, identificada por avaliações das vazões de biogás e H_2 em função do tempo no ensaio R6, que foram maiores entre 6 e 12 horas aproximadamente, levaram à adoção da estratégia de redução do tempo de ciclo de 24h para 12h, empregando ARC com C_{carb} de $6,7 \text{ g L}^{-1}$, o que corresponde a COV_c de $12,6 \text{ g (L dia)}^{-1}$ (ensaio R7). Desta forma foi possível avaliar de forma combinada os efeitos de redução do tempo de ciclo e do aumento de COV_c sobre a produção de $bioH_2$: a Figura 4.13 (b) exibe a melhor performance do inóculo frente ao aumento da COV_c e redução do tempo de ciclo, o que além de incrementar a geração de $bioH_2$ permitem o aproveitamento de maior volume de ARC em um dia.

A Tabela 4.4 exibe os parâmetros de avaliação da produção de H_2 e da fermentação obtidos para as diferentes estratégias adotadas variando concentração de carboidratos, tempo de ciclo e COV_c onde efeitos positivos de aumento de C_{carb} (R5 X R6), aumento de COV_c e redução de tempo de ciclo (R6 X R7) são notados para vazão molar de H_2 , produtividade volumétrica de H_2 , rendimento de H_2 e teor de H_2 no biogás.

Observa-se também que a conversão de carboidratos se manteve alta em todas as condições (81 – 89%), indicando um bom aproveitamento dos açúcares da ARC pelo inóculo; estes valores indicam uma alta eficiência de conversão, de acordo com comparações com valores relatados para ARS (sacarose), 67,2 – 79,2% (FONTES LIMA e ZAIAT, 2012); 62,8 – 73,8% (GOMES *et al.*, 2015); 88,4 – 92,7% (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015) ou para

AR industrial (soro de queijo), 92 – 99%; 98% (PERNA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015); para ARC não foram encontrados relatos deste parâmetro.

Já a baixa remoção de DQO, para qualquer condição reacional (18-23%) é típica deste tipo de processo uma vez que ao mesmo tempo em que ocorre consumo de carboidratos, a produção de H₂ se dá por vias metabólicas geradoras de ácidos orgânicos e solventes, o que mantém a COD alta. Este aspecto tem sido relatado como ponto comum na produção biológica de H₂ em reatores para diferentes inóculos, com valores como 14-32% (PERNA *et al.*, 2013), 12,7-19,2% (GOMES *et al.*, 2015) ou 30% (LIMA *et al.*, 2015).

Tabela 4.4: Indicadores da produção de bioH₂ em reator AnSBBR inoculado com *Klebsiella pneumoniae*, empregando ARC como substrato.

Indicadores de produção	Ensaio		
	R5	R6	R7
$v_{H_2^*}$ (mmolH ₂ h ⁻¹)	2,75	4,30	10,80
PVH (LH ₂ (L dia) ⁻¹)	0,28 ± 0,05	0,47 ± 0,21	0,88 ± 0,44
Y _{H₂} (molH ₂ mol ⁻¹ _{glic})	0,95 ± 0,15	0,58 ± 0,22	0,70 ± 0,37
ER _{DQO} (%)	18 ± 7	18 ± 6	23 ± 8
EC _{carb} (%)	89 ± 17	89 ± 16	81 ± 14
H ₂ no biogás (%)	24 - 47	11 - 35	18 - 42

v_{H_2} , vazão molar de H₂; PVH, produtividade volumétrica de H₂ ; Y_{H₂}, rendimento de H₂; ER_{DQO} , eficiência de remoção de DQO; EC_{carb}, eficiência de conversão de carboidratos; glic, glicose; *valores máximos.

4.4 Avaliação dos metabólitos solúveis: correlações da produção de H₂ com as rotas metabólicas

Para os ensaios R5, R6 e R7, bem como para os lotes de água residuária usados em cada ensaio, foram caracterizados e quantificados os

ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico e os álcoois metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol e isoamílico.

As concentrações de cada ácido identificado nos efluentes de cada ciclo são apresentadas na Figura 4.14 (d, e, f). Como pontos comuns para os três reatores tem-se que, nas amostras de água residuária dos lotes usados nos ensaios (R5 lote 2; R6 lote 3; R7 lote 6) foram detectados somente ácido butírico e isobutírico; em todos os ensaios os únicos ácidos produzidos foram propiônico, butírico e acético, com predomínio dos ácidos acético e butírico, enquanto o propiônico ocorreu em baixas concentrações e sem oscilação considerável.

O ácido isobutírico, detectado em todas os ciclos, foi detectado nas mesmas concentrações tanto na água residuária (afluente do reator) como nas amostras de efluente do reator. Já nos gráficos de proporção entre os ácidos (Figura 4.14 a, b, c) é possível identificar o predomínio de cada ácido, onde em geral foram majoritários acético e butírico, mas quando estes foram produzidos em quantidades muito pequenas se sobressaiu o ácido propiônico, como por exemplo no 1º ciclo dos ensaios R5 e R6. Todas as análises foram realizadas em triplicata, permitindo o cálculo de média e desvio padrão, que por ser muito baixo não é visualizado no gráfico.

Ao associar-se a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) aos perfis de concentração dos ácidos (Figura 4.14 d, e, f) nota-se que não há relação entre os picos de PVH observados e as concentrações de ácido acético, o que seria esperado já que a rota acética leva a maiores rendimentos teóricos de H₂; em alguns pontos há relação entre aumento da PVH e aumento de concentração de ácido butírico, mas isso não ocorre sempre; sendo assim pode-se dizer que não há uma relação estabelecida entre os valores máximos de PVH e as concentrações detectadas para algum dos ácidos especificamente.

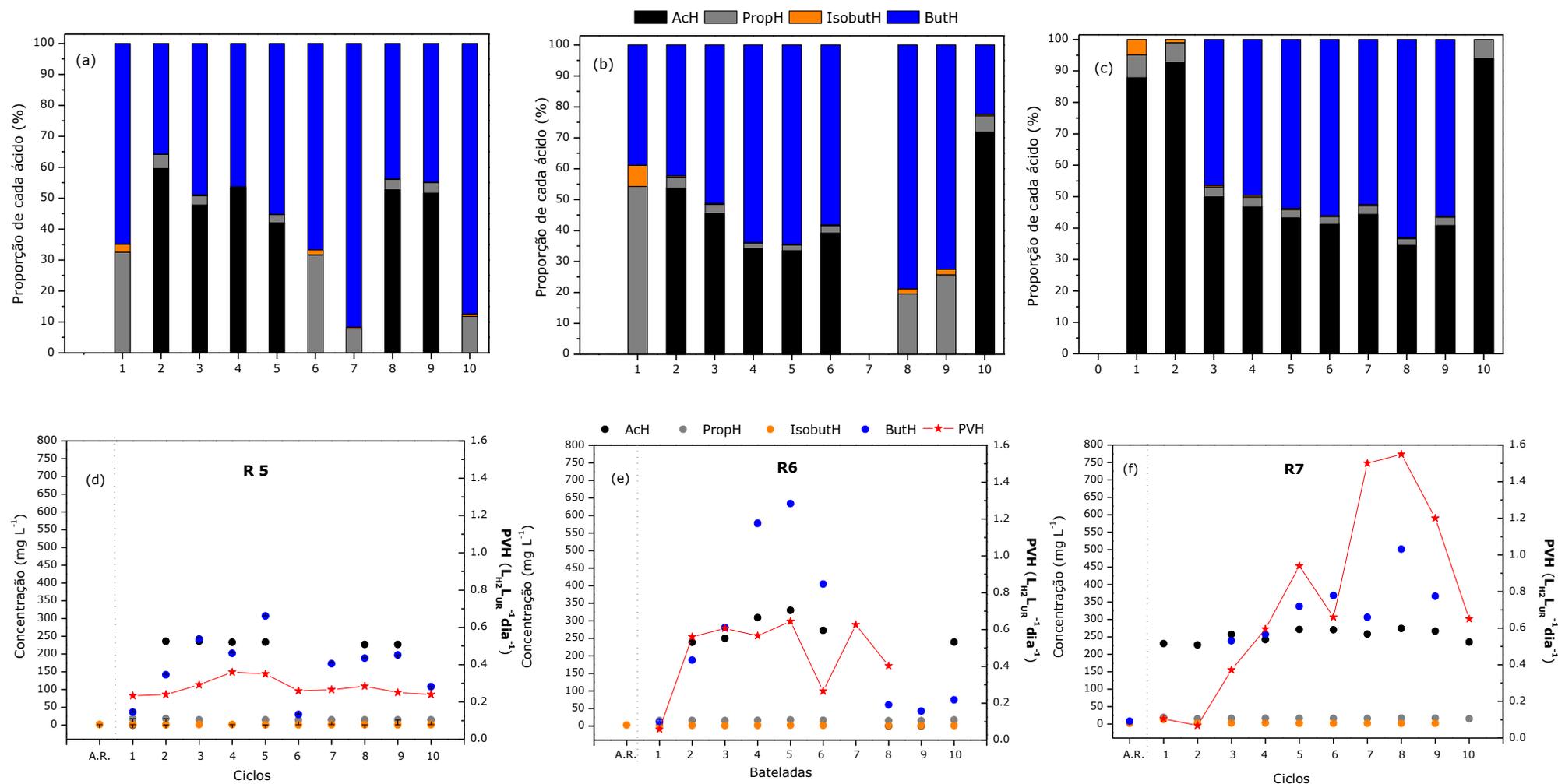


Figura 4.14: Proporção (a, b, c) e concentração dos ácidos orgânicos associado ao PVH (d, e, f) nos ciclos dos ensaios R5, R6 e R7 (5, 6 – t_{ciclo} 24h; 7 – t_{ciclo} 12h) e nas respectivas águas residuárias (AR) empregadas em cada ensaio. Legenda: AcH, ácido acético; PropH, ácido propiônico; IsobutH, ácido isobutírico; ButH, ácido butírico; PVH, produtividade volumétrica de H₂.

A participação destes ácidos no bioprocesso refere-se a rotas metabólicas estabelecidas pelas bactérias, conforme equações descritas na seção 2.2.2, em que podem ocorrer:

- rotas de produção de H_2 , pelas vias acética e butírica;
- rotas de competição por glicose, sem influência sobre o rendimento de H_2 , gerando ácido propiônico, ou consumo glicose e de H_2 , gerando este mesmo ácido e levando a baixos rendimentos de H_2 .

Já o ácido isobutírico, detectado na água residuária, está relacionado à contaminação microbiológica da água residuária no ambiente, do momento da coleta até o momento do uso, uma vez que trata-se de um meio propício para crescimento de microrganismos.

Na Figura 4.15 (a) são comparados os principais ácidos, acético e butírico, que são aqueles cuja concentração variou durante o processo, para os três ensaios, R5, R6 e R7. Em todos os casos a concentração de ácido acético foi próxima, na grande maioria dos ciclos, mesmo quando o tempo de ciclo empregado foi menor (12h), indicando que após as 12 horas de reação não há variação significativa destes metabólitos. Já para o ácido butírico nota-se maior oscilação na concentração para alguns pontos, especialmente para o ensaio R6.

O interesse na detecção dos ácidos acético e butírico deve-se ao rendimento de hidrogênio associado a cada uma destas rotas, uma vez que se apresenta a relação molar entre glicose e H_2 de 1:4 na via do acetato e 1:2 na via do butirato; assim autores discutem a produção biológica de H_2 em reatores acidogênicos apontando boa produção de H_2 para relações $ButH/AcH$ menores que 1,0 (PEIXOTO *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2015) ou relações $AcH/ButH$ maiores que 1,0 (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015). No presente trabalho as relações $ButH/AcH$ foram superiores a 1,0 na maioria dos ciclos, para os ensaios com maior carga orgânica, R6 e R7, como pode ser observado na Figura 4.15 (b).

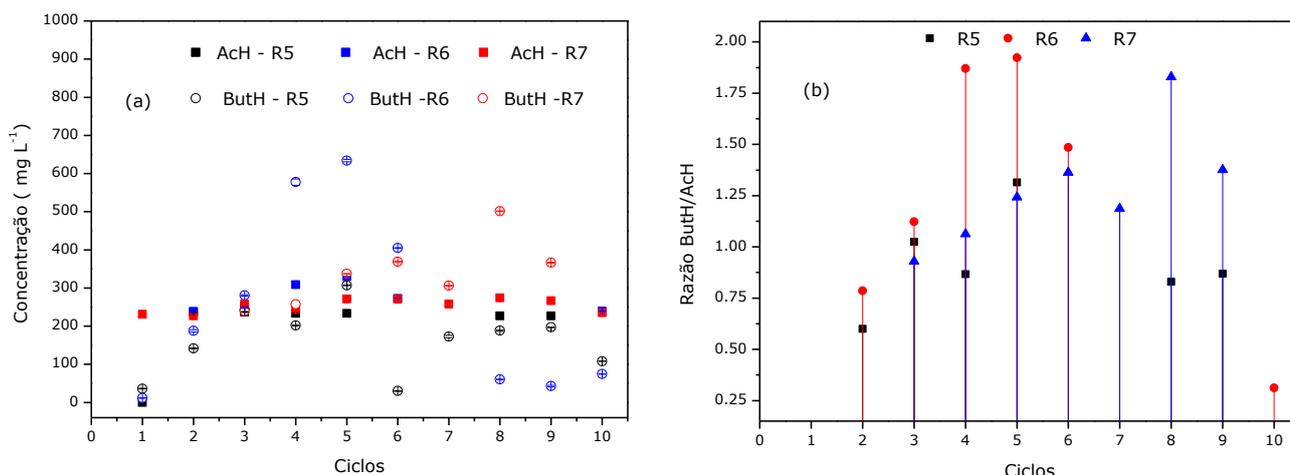


Figura 4.15: Concentrações dos ácidos acético e butírico (a) e relação ácido butírico / ácido acético (ButH/AcH) (b) para os ensaios R5, R6 (COV_c 2,6 e 6,8 $g (L \text{ dia})^{-1}$ e t_{ciclo} 24h) e R7 (COV_c 12,6 $g (L \text{ dia})^{-1}$ t_{ciclo} 12h).

Para uma melhor correlação entre a produção de bioH₂ e os metabólitos solúveis detectados nos efluentes dos reatores, é importante agregar a esta discussão os perfis obtidos para produção de álcoois nos reatores, uma vez que os diferentes AOV e álcoois são indicativos tanto de produção de H₂ quanto de competição por glicose ou consumo de H₂ no brioprocesso. Para tanto são introduzidos aqui os resultados da análise de álcoois para os ensaios R5, R6 e R7, primeiramente de forma isolada (Figura 4.16) e em seguida em correlação com os AOV e com a produção de bioH₂ (Figura 4.17).

Observa-se na Figura 4.16 que, dos álcoois detectados nas amostras de cada reator somente o etanol apresentou concentração expressiva, variando entre 1,1 e 8,5 $g L^{-1}$, e oscilação entre os ciclos (nos ensaios R6 e R7). Os valores de concentração de metanol permaneceram iguais e/ou muito próximos àqueles encontrados na água residuária (afluente) de cada ensaio (2,8 a 3,1 $mg L^{-1}$) e sua presença nos diferentes lotes de ARC é indicativo de ação microbiológica sobre estas amostras, principalmente pela ação de enzimas hidrolases sobre as pectinas. A concentração do butanol variou entre 4 e 229 $mg L^{-1}$ (R5), 23 e 275 $mg L^{-1}$ (R6) e 3 e 53 $mg L^{-1}$ (R7), o que é muito menor que as concentrações de etanol detectadas.

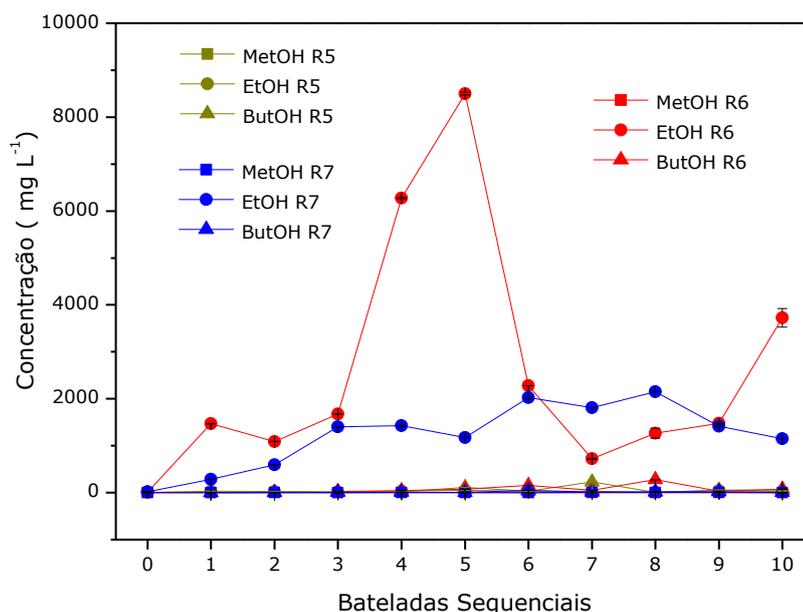
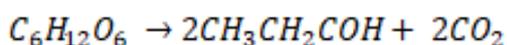


Figura 4.16: Concentração dos álcoois detectados nos efluentes dos ensaios R5, R6 (t_{ciclo} de 24h) e R7 (t_{ciclo} de 12h). Metanol, MetOH; etanol, EtOH; butanol, ButOH.

Os ensaios R6 e R7 são comparáveis entre si quanto à concentração de carboidratos (concentração afluenta), já que o valor de C_{carb} para cada um deles foi próximo: $7,2 \text{ g L}^{-1}$ (R6) e $6,7 \text{ g L}^{-1}$ (R7). Já a carga orgânica volumétrica aplicada foi maior em R7 ($12,6 \text{ g (L dia)}^{-1}$) do que em R6 ($6,8 \text{ g (L dia)}^{-1}$) e esta maior que em R5 ($2,6 \text{ g (L dia)}^{-1}$). Autores tem apontado que o aumento da carga orgânica aplicada favorece a rota de fermentação etanólica com consumo de glicose e produção de etanol e CO_2 (FERNANDES *et al.*, 2013; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015):



Pode-se perceber que o uso de maior carga orgânica em R6 em relação ao R5, combinado a tempo de ciclo de 24 h, foram os fatores que favoreceram a produção de etanol; de fato relata-se na literatura que a diminuição do tempo de ciclo é uma estratégia para diminuição da rota etanólica (FERNANDES *et al.*, 2013), para inóculo misto, o que foi constatado no presente trabalho já que com a redução de 24h (R6) para 12h (R7) as concentrações de etanol foram

reduzidas significativamente, apesar do aumento de COV_c , e esta estratégia levou a aumento na produção de H_2 o que se revela por meio do incremento nos valores de PVH.

Na Figura 4.17 é possível observar a correlação entre as concentrações de AOV e PVH (Figura 4.17 a, b, c) e as concentrações de etanol (Figura 4.17 d, e, f). É possível notar que ao mesmo tempo que o aumento de COV_c foi favorável para a produção de H_2 , a redução do tempo de ciclo também o foi, já que ocorreu menor produção de etanol nesta condição o que levou ao aumento do PVH do ensaio R7 comparativamente ao ensaio R6.

Observa-se também na Figura 4.17 que os ciclos em que foram detectados os valores máximos de concentração de etanol em R6 (Figura 4.17 e) coincidem com as máximas concentrações de ácido butírico (Figura 4.17 b). Este tipo de ocorrência pode estar relacionado com a mudança de metabolismo das bactérias de acidogênese para solvatogênese, sob estímulo do aumento da concentração de ácidos orgânicos voláteis.

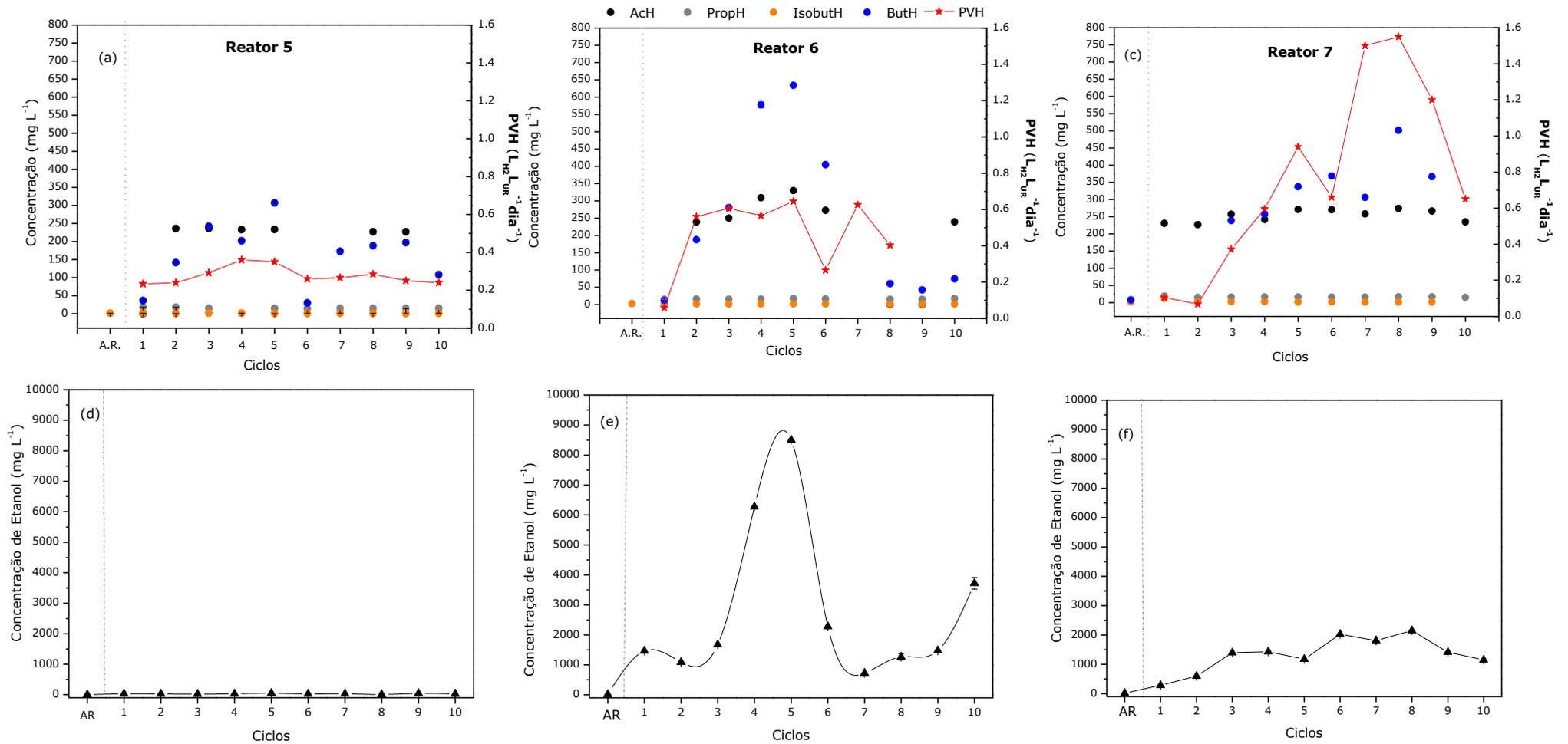


Figura 4.17: Concentração dos ácidos orgânicos associado ao PVH (a, b, c) e concentração de etanol (d, e, f) nos ensaios R5 , R6 e R7 (5, 6 – t_{ciclo} 24h; 7 – t_{ciclo} 12h) e nas respectivas águas residuárias (AR) empregadas em cada ensaio. Legenda: AcH, ácido acético; PropH, ácido propiônico; IsobutH, ácido isobutírico; ButH, ácido butírico; PVH, produtividade volumétrica de H₂.

A queda do pH poderia explicar o desvio da rota metabólica: após produção intensa de ácidos, a acidificação do meio leva à adoção de rotas de produção de etanol, butanol, acetona, enfim solventes. Mas no caso dos ensaios R5, R6 e R7 os valores de pH foram similares, variando em uma faixa entre 3,4 e 4,1, e não são observadas quedas bruscas, mesmo para aqueles ciclos em que houve aumento da concentração de ácido butírico (R6), como ser observado na Figura 4.18.

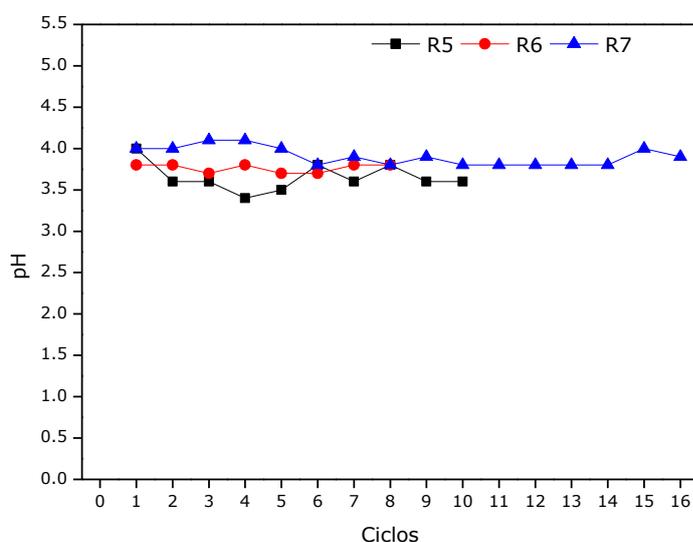


Figura 4. 18: Variação do pH nos ensaios R5, R6 e R7

Para o caso específico de inóculo *Klebsiella pneumoniae* um fator que pode ser relacionado à mudança de via metabólica no sentido da produção de etanol é a temperatura (Niu *et al.*, 2011). No entanto, no presente trabalho a temperatura empregada nos ensaios e entre os ciclos foi sempre a mesma.

Os metabólitos solúveis detectados nos ensaios R5, R6 e R7 são condizentes com as rotas metabólicas previstas para *Klebsiella pneumoniae* na fermentação de substratos contendo glicose para geração de H₂ e CO₂ (LEONHARTSBERGER, KORSA e BÖCK, 2002; NIU *et al.*, 2010; NIU *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013), sob condições fermentativas (anaerobiose total ou facultativa). Como apresentado na seção 2.2.2, na metabolização de glicose a piruvato e formato, este último ativa o sistema de expressão de enzimas

envolvidas na conversão de formato a H₂ e CO₂, paralelamente com a rota de oxidação de NADH, que também gera H₂:

Glicose → Piruvato → Formato → Ativação sist.FhIA/FHL = HCOOH → CO₂ + H₂

2NADH → 2NAD⁺ + H₂

Além desta rotas principais são relatados também a produção de metabólitos secundários, dentre os quais destaca-se o etanol que por sua vez prejudica a produção de H₂ já que sua produção envolve consumo de NADH:

ACCOA + 2NADH → COA + 2NAD⁺ + ETANOL

Assim, estratégias que reduzam o consumo de NADH para produção de etanol são favoráveis para este bioprocessos, como por exemplo o aumento da temperatura numa faixa de 34 a 37°C (NIU *et al.*, 2011). Como no presente trabalho já foi empregada temperatura nesta faixa (35°C) essa estratégia já estaria sendo aplicada.

4.5 Caracterização da biomassa ao final dos ensaios

Ao final dos ensaios R5 e R7 os suportes contendo biomassa foram inoculados em caldo LB e a cultura obtida após incubação foi semeada por estrias em ágar LB. As colônias cresceram com características uniformes de coloração e formato, apresentando-se redondas e amareladas; não foi observado crescimento de fungos (Figura 4.19 a, b). A partir de colônias isoladas foi realizado PCR utilizando os *primers* específicos para *K. pneumoniae* e ocorreu a amplificação do DNA para a maioria das colônias, gerando fragmentos de 126 pb, indicando a presença de *K. pneumoniae* na biomassa presente ao final dos ensaios (Figura 4.19 c,d).

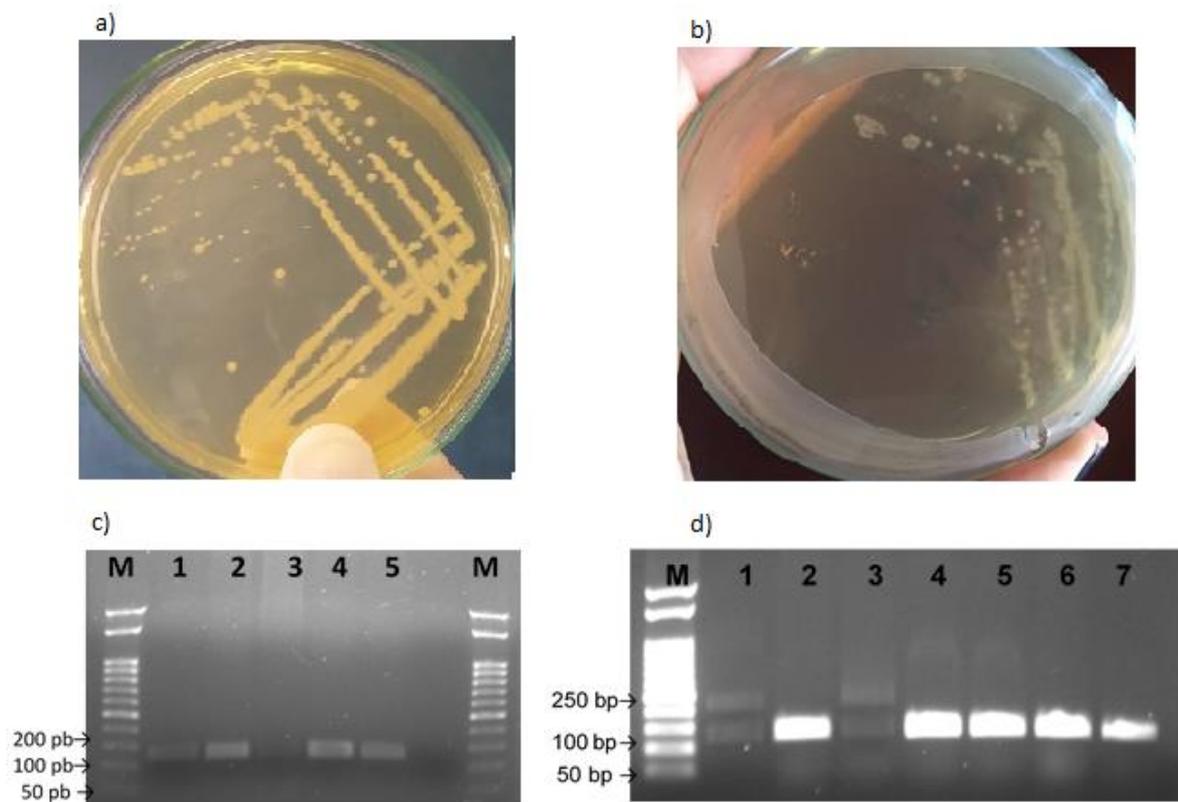


Figura 4.19: Colônias obtidas após inoculação ao final dos ensaios R5 e R7 (a, b) Produto de PCR de 126 pb, pertencente ao início da região rDNA 16S de *K. pneumoniae* amplificado a partir de colônias isoladas (c, d). M: 50 bp DNA Ladder (Ludwig Biotec); 1-7: colônias analisadas.

No ensaio R5 foi realizado também, ao final do experimento, a análise por microscopia eletrônica de varredura para verificar a adesão da biomassa a fragmentos da argila expandida, tanto internamente como externamente a este suporte. As imagens obtidas revelaram a adesão dos microrganismos à argila expandida, compatíveis com bacilos de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 4.20).

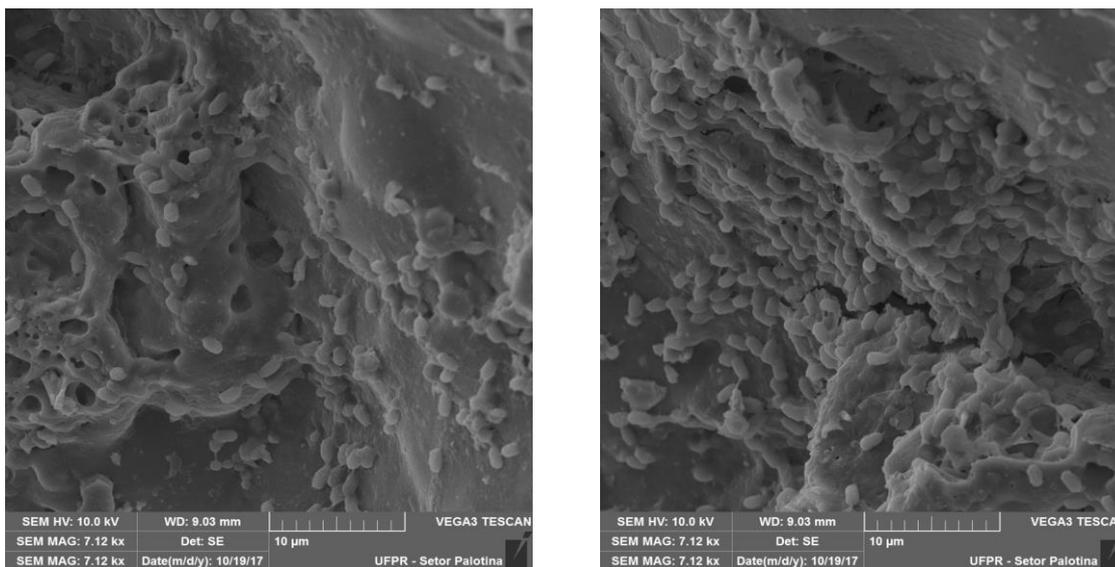


Figura 4.20: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura para fragmentos de argila expandida com inóculo aderido, bacilos de *K. pneumoniae*, ao final do ensaio R5.

4.6 Comparações com a literatura

Existe uma limitação para se estabelecer comparações dos resultados obtidos no presente trabalho, nos quais ARC foi empregada como substrato para a produção de bioH₂, com aqueles relatados na literatura utilizando ARC, uma vez que os estudos localizados referem-se a ensaios de produção em batelada, por meio de frascos agitados de pequeno volume, como apresentado na seção 2.6 (Tabela 2.7); nestes trabalhos são apresentadas tendências para o bioprocessamento mas os parâmetros de avaliação do desempenho do bioprocessamento são diferentes daqueles usualmente utilizados para biorreatores como vazão molar, produtividade volumétrica, rendimento de H₂, dentre outros.

Assim, é possível estabelecer comparações de duas formas: com o trabalho anterior a este, em que *Klebsiella pneumoniae* foi empregada como inóculo em suspensão, em bateladas de 72 h (ESTEVAM *et al.*, 2018) ou com trabalhos relevantes da literatura onde foram empregadas águas

residuárias de diferentes origens, inóculos mistos e reatores anaeróbios com configuração similar ao AnSBBR, utilizado no presente trabalho.

No primeiro caso os valores obtidos para ensaios em bateladas de 72h, com inóculo puro de *K. pneumoniae* em suspensão (ESTEVAM *et al.*, 2018) foram: teor de H₂ no biogás entre 30 e 40 %, vazão molar de H₂ (v_{H_2}) de 0,2 a 2,2 mmol_{H₂} h⁻¹ e rendimento de H₂ (Y_{H_2}) de 0,8 a 1,7 mol_{H₂} mol_{glicose}⁻¹, enquanto no presente trabalho em que se empregou reator AnSBBR inoculado com *K. pneumoniae* suportada em argila expandida o perfil de composição do biogás foi similar àquele obtido por ESTEVAM e colaboradores (2018) mas a vazão de H₂ aumentou consideravelmente (2,8 a 10,8 mmol H₂ h⁻¹) (Tabela 4.4), além da notável otimização do tempo já que ao invés de 72 horas o bioprocessamento ocorreu em 24 ou até 12h.

No caso da comparação com outras águas residuárias, na Tabela 4.5 estão agrupados os principais parâmetros de avaliação deste trabalho, obtidos para as melhores condições de operação (Ensaio R6 e R7) e também de trabalhos comparáveis a este (reator AnSBBR e diversas águas residuárias). Nota-se que os valores obtidos para os parâmetros de produção de bioH₂ neste trabalho estão compreendidos e são algumas vezes maiores que os relatados na literatura para diversas águas residuárias. Pode-se destacar ainda:

- Ponto comum entre os trabalhos é a baixa remoção de DQO, atribuída à geração de ácidos orgânicos voláteis e solventes nas rotas de produção de H₂, que são mantidos no reator já que o processo é interrompido na fase acidogênica;

- Os trabalhos com inóculos mistos (lodo anaeróbio) tem em comum o tempo reduzido de ciclo (baixos tempos de ciclo) o que é uma estratégia para inibir produção de CH₄;

- A eficiência de remoção de açúcares, ou de conversão de carboidratos, foi alta para todos os inóculos e águas residuárias empregados;

- Na maioria dos casos o teor de H₂ no biogás é relativamente baixo, entre 20 e 40%;

Tabela 4.5: Indicadores de produção de bioH₂ no presente trabalho (R6 e R7) e comparações com a literatura para reator AnSBBR e diferentes substratos.

Água residuária	Inóculo	COV _c (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	Tempo de ciclo (h)	H ₂ no biogás (%)	Y _{H₂} (mol _{H₂} substrato ⁻¹)	PVH (L _{H₂} L ⁻¹ dia ⁻¹)	u _{H₂} (mmol _{H₂} h ⁻¹) (máx)	ER _{DQO} (%)	ER _{ART} (%)	Referência
ARC	Cultura pura de <i>K. pneumoniae</i>	6,8 (ART)	24	11 – 35	3,3 ± 1,1 mol _{H₂} Kg _{ART} ⁻¹ (8)	0,5 ± 0,2 (8)	4,3	18 ± 6 (8)	89 ± 16 (8)	Este trabalho
		12,6 (ART)	12	18 - 42	3,9 ± 2,2 mol _{H₂} Kg _{ART} ⁻¹ (16)	0,9 ± 0,4 (16)	10,8	23 ± 8 (16)	81 ± 14 (16)	
ARS + Vinhaça + melaço	Lodo anaeróbio	6,1 (Carb)	3	39	2,9 mol _{H₂} Kg _{Carb} ⁻¹	0,3	nd	13	73	ALBANEZ <i>et al.</i> , 2016
AR de fecularia	Fermentação Natural	12,0 (Carb)	4	35	4,9 mol _{H₂} Kg _{Carb} ⁻¹	0,9	2,0	7 - 47	79 - 99	ANDREANI, 2017
		Lodo anaeróbio	14,0 (Carb)	4	31	2,2 mol _{H₂} Kg _{Carb} ⁻¹	2,4	6,4	17 - 35	

Legenda: Valores entre parênteses = número de amostras considerados para o cálculo da média; ART, açúcares redutores totais; Sac, sacarose; Carb, carboidratos totais; DQO, demanda química de oxigênio; na, não se aplica; nd, não determinado. *Obs: algumas unidades originais descritas pelos autores foram convertidas para fins de comparação*

Tabela 4.5: Continuação

Água residual	Inóculo	COV _c (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	Tempo de ciclo (h)	H ₂ no biogás (%)	Y _{H2} (mol _{H2} substrato ⁻¹)	PVH (L _{H2} L ⁻¹ dia ⁻¹)	v _{H2} (mmol _{H2} h ⁻¹) (máx)	ER _{DQO} (%)	ER _{ART} (%)	Referência
ARS (Sac)	Lodo anaeróbio	16,0 (Sac)	5	25	2,3 mol _{H2} Kg _{Sac} ⁻¹	0,9	5,8	18	83 - 97	MANSSOURI <i>et al.</i> , 2013
ARS + Glicerol	Lodo anaeróbio	17,1 (DQO)	3	68	1,1 mol _{H2} mol _{glicerol} ⁻¹	0,4	2,2	17 - 38	na	(LOVATO <i>et al.</i> , 2015
Soro de Queijo	Lodo anaeróbio	11,6 (Carb)	3	36	0,6 mol _{H2} mol _{Carb} ⁻¹	0,4	2,9	nd	nd	LIMA <i>et al.</i> , 2015

Legenda: Sac, sacarose; Carb, carboidratos toatais; DQO, demanda química de oxigênio; na, não se aplica; nd, não determinado.

Obs: algumas unidades originais descritas pelos autores foram convertidas para fins de comparação.

- Em comparação com a ARC, as demais águas residuárias apresentavam maior carga orgânica em termos de carboidratos ou foram formuladas deste modo (no caso das águas residuárias sintéticas); mesmo assim o desempenho da produção de BioH₂ no presente trabalho foi comparável a estes.

5. CONCLUSÃO

A água residuária de cervejaria apresentou potencial para a produção biológica de H_2 sendo que dentre os seis lotes de AR coletados a concentração de açúcares redutores totais variou de 2,8 a 7,2 g L^{-1} , o que significa uma fonte de carbono apropriada para o bioprocessamento. Adicionalmente, sua composição química revelou a presença dos elementos considerados importantes para a produção biológica de H_2 .

A fermentação natural como fonte de inóculo levou a baixa produção de H_2 , instabilidade e curto período de atividade, quando submetida a ensaios prolongados em bateladas sequenciais, de modo que foi considerada inviável para o bioprocessamento neste trabalho. A autofermentação da água residuária de cervejaria não levou à produção de $bioH_2$, indicando uma dificuldade de geração de inóculo acidogênico produtor de $bioH_2$ por esta metodologia.

O suporte argila expandida mostrou-se adequado para a adesão de microrganismos permitindo a realização dos ensaios com biomassa imobilizada, sendo ele inerte, estável, de fácil manipulação, acessível e de baixo custo.

A enterobactéria *Klebsiella pneumoniae*, sob a forma de biofilme, imobilizada à argila expandida, apresentou boa habilidade de fermentar água residuária de cervejaria, em experimentos prolongados (avaliação até 16 ciclos). O inóculo apresentou melhor performance na água residuária, comparativamente a um substrato sintético à base de sacarose.

Observou-se um efeito positivo do aumento da carga orgânica volumétrica aplicada, na faixa de estudo de 2,6 a 12,6 g $(L \text{ dia})^{-1}$ e da redução do tempo de ciclo de 24h para 12h, sobre a produção de H_2 . Os melhores resultados foram obtidos para COV_c de 12,6 g $(L \text{ dia})^{-1}$ e tempo de ciclo de 12h: produtividade volumétrica média de 0,9 $L_{H_2} (L \text{ dia})^{-1}$, vazão molar máxima de 10,8 $mmol_{H_2} h^{-1}$, rendimento médio de 3,9 $mol_{H_2} Kg_{ART}^{-1}$, com teor de H_2 no biogás entre 18 e 42% e eficiência média de remoção de ART e de DQO de 89% e 23%, respectivamente.

A avaliação dos metabólitos solúveis levou à conclusão de que as rotas metabólicas predominantes no bioprocesso, nas melhores condições, foram a acética e a butírica, que são relacionadas a maiores rendimentos de H₂. Ocorreu também aumento da produção de etanol com o aumento da carga orgânica volumétrica aplicada e o aumento de ácidos orgânicos voláteis, mas a redução do tempo de ciclo permitiu manter os níveis de etanol sob controle, influenciando positivamente a produção volumétrica de H₂.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKUNLE, K. F.; OKOLIE, J. A. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Scientific Research Publishing Inc.*, v. 6, March, p. 205–212, 2015.

AGLER, M. T. *et al.* Anaerobic digestion of brewery primary sludge to enhance bioenergy generation: A comparison between low- and high-rate solids treatment and different temperatures. *Bioresource Technology*, v. 101, n.15, p. 5842–5851, 2010.

AJEEJ, A. *et al.* An overview of bio augmentation of methane by anaerobic co-digestion of municipal sludge along with microalgae and waste paper. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50, p. 270–276, 2015.

ALBANEZ, R. *et al.* 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, n. 45, p. 20473–20484, 2016.

ALVES, H. J. *et al.* Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 13, p. 5215–5225, 2013.

AMORIM, E. L. C. *et al.* Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 2, p. 783–790, 2009.

Andreani, C. L. *Avaliação de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBRr) visando à produção de hidrogênio a partir de água residuária de fecularia de mandioca.* 85 p. Unioeste - Cascavel, PR, 2017.

ANTONOPOULOU, G. *et al.* Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 5, p. 1921–1928, 2010.

ANZOLA-ROJAS, P. *et al.* The use of the carbon / nitrogen ratio and specific

organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, v. 5, p. 46–54, 2015.

ANZOLA ROJAS, M. D. P. Influência Da Relação C/N Na Produção De Hidrogênio Em Reator Anaeróbio De Leito Fixo. 67p. EESC - USP, São Carlos, 2010.

AOAC. *Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists*. 19th. ed. Washington, D., 2012.

APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22. ed. Washington, D., 2012.

ARANTES, M. K. *et al.* Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, p. 26243–26256, 2017.

ARGUN, H. *et al.* 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*, v. 33, n. 7, p. 1813–1819, 2008.

ARGUN, H.; DAO, S. Hydrogen gas production from waste peach pulp by dark fermentation and electrohydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 27, p. 11568–11576, 2016.

AUGELLETTI, R.; CONTI, M.; ANNESINI, M. C. Pressure swing adsorption for biogas upgrading. A new process configuration for the separation of biomethane and carbon dioxide. *Journal of Cleaner Production*, v. 140, p. 1390–1398, 2017.

BADIEI, M. *et al.* Microbial community analysis of mixed anaerobic microflora in suspended sludge of ASBR producing hydrogen from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 4, p. 3169–3176, 2012.

BAO, H. *et al.* Optimization of key factors affecting biohydrogen production from microcrystalline cellulose by the co-culture of *Clostridium acetobutylicum* X₉ + *Ethanoigenens harbinense* B₂. *RSC Adv.*, v. 6, n. 5, p. 3421–3427, 2016

BARROS, A. *et al.* Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 8, p. 3379–3388, 2010.

BECKERS, L. *et al.* Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochemical Engineering Journal*, v. 98, p. 18–28, 2015.

BOBOESCU, I. Z. *et al.* Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate. *Biotechnology for biofuels*, v. 7, n. 1, p. 139, 2014.

BOBOESCU, I. Z. *et al.* Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment based on the selective enrichment of the fermentation ecosystem. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, n. 3, 2014.

CHEN, H. *et al.* Brewery Wastewater Treatment Using An Anaerobic Membrane Bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 105, p. 321–331, 2015.

CHEN, Z. *et al.* Cell physiology and metabolic flux response of *Klebsiella pneumoniae* to aerobic conditions. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 8, p. 862–868, 2009.

CHOI, J.; AHN, Y. Biohydrogen fermentation from sucrose and piggery waste with high levels of bicarbonate alkalinity. *Energies*, v. 8, n. 3, p. 1716–1729, 2015.

COSTA, J. B. *et al.* The optimization of biohydrogen production by bacteria using residual glycerol from biodiesel synthesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 46:13, n. January, p. 1461–1468, 2011.

COX, D. L. N. M. M. (Org.). *Lehninger Principles of biochemistry*. 4 th ed., 2004.

CRUZ, L. M. *et al.* 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp) and Pineapple (*Ananas* 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from

Banana (*Musa spp*) and Pineapple (*Ananas comosus*). *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001.

ENITAN, A. M. *et al.* Anaerobic Digestion Model to Enhance Treatment of Brewery Wastewater for Biogas Production Using UASB Reactor. *Environmental Modeling and Assessment*, v. 20, n. 6, p. 673–685, 2015.

ENITAN, A. M. *et al.* Kinetic Modelling and Characterization of Microbial Community Present in a Full-Scale UASB Reactor Treating Brewery Effluent. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 2, p. 358–368, 2014.

ESTEVAM, A. *et al.* Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

FERNANDES, B. S. *et al.* Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, v. 14, n. 2, p. 143–148, 2010.

FERNANDES, B. S. *et al.* The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 170, n. 6, p. 1348–1366, 2013.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo. 2013. 136 p. USP - Universidade de São Paulo, 2013.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. *Anaerobe*, v. 34, p. 94–105, 2015.

FONTES LIMA, D. M.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 12, p. 9630–9635, 2012..

FU, S.-F. *et al.* Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 7, n. 189, p. 81–86, 2017.

GOLUB, N. B.; SHCHURSKAYA, E. A.; TROTSENKO, M. V. Anaerobic treatment of brewery wastewater with simultaneous hydrogen production. *Journal of Water Chemistry and Technology*, v. 36, n. 2, p. 90–96, 2014.

GOMES, S. D. *et al.* 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.

GOMEZ-ROMERO, J. *et al.* Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, n. 24, p. 12541–12550, 2014.

HARTMAN, L. J. *et al.* Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: Screening of nonhuman primates. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 11, n. 5, p. 464–471, 2009.

KISIELEWSKA, M.; DEBOWSKI, M.; ZIELIŃSKI, M. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, n. 10, p. 1925–1933, 2015.

LEÃO, P R P; MEDINA, A L; VIEIRA, M A; RIBEIRO, A. S. Beer sample decomposition using a reflux system for the monoelementar determination by F AAS / AES and multielementar determination by MIP OES. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, edição 2017062, 2018.

LEE, KS; WHANG, LM; SARATALE, GD; CHEN, SD; CHANG, JS; HAFEZ, H; NAKHLA, G; NAGGAR, H. Biological hydrogen production: dark fermentation. *Handbook of Hydrogen Energy*. [S.l.]: Taylor & Francis, 2014. p. 249–320.

LEE, D. J.; SHOW, K. Y.; SU, A. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8393–

8402, 2011.

LEITE, J. A. C. *et al.* Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 2, p. 579–586, 2008.

LEONHARTSBERGER, S.; KORSA, I.; BÖCK, A. The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, v. 4, n. 3, p. 269–76, 2002.

LIMA, D. M. F. *et al.* Biohydrogen from cheese whey treatment in an ansbbr: Achieving process stability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 32, n. 2, p. 397–408, 2015.

LIU, F.; FANG, B. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology journal*, p. 374–380, 2007.

LORA, E E S; VENTURINI, O. J. *Biocombustíveis*. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

LOVATO, G. *et al.* 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.

LUCAS, S. D. M. *et al.* Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy*, v. 75, p. 496–504, 2015.

LUO, G. *et al.* Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 3, p. 959–964, 2010.

MAINTINGUER, S. I. *et al.* Bioproduction with *Enterobacter* sp . isolated from brewery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, p. 152–160, 2017.

MANSSOURI, M. *et al.* 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, n. 7, p. 1832–1854, 2013.

MATA-ALVAREZ, J. *et al.* A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 36, p. 412–427, 2014.

METCALF, E.; EDDY, H. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4th. ed. New Delhi, India: McGraw-Hill Publishing Company Limited, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426–428, 1959.

NIGAM, P. S. NEE'; PANDEY, A. *Biotechnology for Agro -Industrial Residues Utilisation*. [S.l.]: Springer Netherlands, 2009.

NIU, K. *et al.* Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 1, p. 71–80, 2010.

NIU, K. *et al.* Effect of culture conditions on producing and uptake hydrogen flux of biohydrogen fermentation by metabolic flux analysis method. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 15, p. 7294–7300, 2011.

NOVAK, D. *et al.* Biotic and abiotic processes contribute to successful anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. *Water Research*, v. 47, n. 11, p. 3644–3653, 2013.

O-THONG, S. *et al.* Two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogenic process for biohythane production from palm oil mill effluent with methanogenic effluent recirculation for pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 46, p. 21702–21712, 2016.

PASSAGHE, P. *et al.* Monitoring of some selected heavy metals throughout the brewing process of craft beers by inductively coupled plasma mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, v. 241, n. 2, p. 199–215, 2015.

PAVINI, W. D. *Determinação de compostos orgânicos voláteis gerados em processos biológicos de produção de hidrogênio usando LLME-GC-FID*. 2017.

108 f. UNESP - Araraquara/SP, 2017.

PEIXOTO, G. *et al.* Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. 168, 651 – 671. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, p. 651–671, 2012.

PENTEADO, E. D. *et al.* 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.

PERNA, V. *et al.* Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 1, p. 54–62, 2013.

POHL, P. Determination and fractionation of metals in honey. *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 6, p. 693–703, 2008.

POLETO, L. *et al.* Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 7, p. 4374–4381, 2016.

RAJHI, H. *et al.* Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, v. 10, n. 3, p. 513–521, 2016.

RODRIGUEZ, L.; VILLASENOR, J.; FERNANDEZ, F. J. Influence of the cleaning additives on the methane production from brewery effluents. *Chemical Engineering Journal*, v. 215–216, p. 685–690, 2013.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A Química da Cerveja. *Química Nova na Escola*, v. 37, n. 2, p. 98–105, 2015.

ROY, S. *et al.* Metabolically redirected biohydrogen pathway integrated with biomethanation for improved gaseous energy recovery. *Fuel*, v. 158, p. 471–478, 2015.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. HYDROGEN

PRODUCTION BY ANAEROBIC FERMENTATION – GENERAL ASPECTS AND POSSIBILITY OF USING BRAZILIAN AGRO-INDUSTRIAL WASTES. *Química Nova*, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.

SÉRGIO ESTRACANHOLLI, É. *Quantificação óptica de carboidratos e etanol em mosto cervejeiro*. 2012. 144 f. USP, Universidade de São Paulo, 2012.

SHAO, X. *et al.* Treatment of brewery wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Bioresource Technology*, v. 99, n. 8, p. 3182–3186, 2008.

SHI, X. Y. *et al.* Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *Renewable Energy*, v. 35, n. 7, p. 1493–1498, 2010.

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

SHOW, K. Y. *et al.* Biohydrogen production : Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 20, p. 15616–15631, 2012.

SIMATE, G. S. *et al.* The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. *Desalination*, v. 273, p. 235–247, 2011.

SINBUATHONG, N.; SOMJIT, C.; LEUNGPRASERT, S. Feasibility study for biohydrogen production from raw brewery wastewater. *International Journal of Energy Research*, v. 39, n. 13, p. 1769–1777, 2015.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 13, p. 7460–7478, 2011.

SUN, Q. *et al.* Selection of appropriate biogas upgrading technology-a review of biogas cleaning, upgrading and utilisation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 51, p. 521–532, 2015.

SYDNEY, E. B. *et al.* Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 380–386, 2014.

TAPIA-VENEGAS, E. *et al.* Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 19, p. 8295–8308, 2015.

TBCA. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca/>. Acesso em: 30 jan. 2018.

USDA. *Food Composition Databases*. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list?qlookup=19902>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

WANG, H. *et al.* Cascade degradation of organic matters in brewery wastewater using a continuous stirred microbial electrochemical reactor and analysis of microbial communities. *Scientific Reports*, v. 6, n. June, p. 27023, 2016.

WICHER, E. *et al.* Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 19, p. 7767–7773, 2013.

XIAO, Y. *et al.* Effect of the culture media optimization , pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15. *Bioresource Technology*, v. 137, p. 9–17, 2013.

XU, F. *et al.* Identical full-scale biogas-lift reactors (BLRs) with anaerobic granular sludge and residual activated sludge for brewery wastewater treatment and kinetic modeling. *Journal of Environmental Sciences (China)*, v. 25, n. 10, p. 2031–2040, 2013.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic *Rhizobium* Strain BTail by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. v. 173, n. 7, p. 2271–2277, 1991.

ZHANG, L. *et al.* Effects of the ecological factors on hydrogen production and [FeeFe]-hydrogenase activity in *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 40, p. 6792–6797, 2015.

ZHEN, G. *et al.* Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 69, n. November 2016, p. 559–577, 2017.

ZHONG, J.; STEVENS, D. K.; HANSEN, C. L. Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 45, p. 15470–15476, 2015.

ZHU, G.-F. *et al.* Biohydrogen production from purified terephthalic acid (PTA) processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 15, p. 8350–8356, 2010.