

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

**ATRIBUTOS DO REATOR ANAERÓBIO CONTÍNUO DE TUBOS MÚLTIPLOS NO
CONTROLE DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA NA FASE
ACIDOGÊNICA VISANDO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO**

ANA PAULA TREVISAN

CASCADEL – PARANÁ – BRASIL

MARÇO – 2020

ANA PAULA TREVISAN

**ATRIBUTOS DO REATOR ANAERÓBIO CONTÍNUO DE TUBOS MÚLTIPLOS NO
CONTROLE DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA NA FASE
ACIDOGÊNICA VISANDO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração em Saneamento Ambiental.

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

CASCADEL – PARANÁ – BRASIL

MARÇO – 2020

Trevisan, Ana Paula

Atributos do reator anaeróbio contínuo de tubos múltiplos no controle da carga orgânica volumétrica específica na fase acidogênica visando à produção de hidrogênio / Ana Paula Trevisan; orientador(a), Simone Damasceno Gomes, 2020.
101 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, 2020.

1. Fermentação escura. 2. Sacarose. 3. Acidogênese. 4. Relação A/M. I. Damasceno Gomes, Simone . II. Título.

ANA PAULA TREVISAN

Atributos do reator anaeróbico contínuo de tubos múltiplos no controle da carga orgânica volumétrica específica na fase acidogênica visando à produção de biohidrogênio

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


Orientador(a) - Simone Damasceno Gomes

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


Marcelo Zaiat

Universidade de São Paulo (USP)


Airton Kunz

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


Lucas Fadelu Fuess

Universidade de São Paulo (USP)


Maria Herminia Ferreira Tavares

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

Cascavel, 13 de março de 2020

BIOGRAFIA

Ana Paula Trevisan, filha de José Antônio Trevisan e Vanda Maria Rosolen Trevisan, nascida em Rolândia - PR, em junho de 1989, onde viveu e concluiu seus estudos até o ensino médio. Em 2007, iniciou o Curso de Tecnologia em Gestão Ambiental na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Campo Mourão, onde teve oportunidade de participar de projetos de iniciação científica e concluiu sua graduação, em março de 2010. No mesmo ano, ingressou no curso de mestrado *stricto sensu* do Programa de Pós-graduação em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá - UEM, *Campus* Maringá, onde pesquisou e trabalhou sobre a “Aplicação de água residuária de suinocultura em colunas de solo”; concluiu o mestrado em fevereiro de 2012. Durante os anos de 2012 a 2015, adquiriu experiência como docente em instituições de ensino público e privadas. No ano de 2016, ingressou no curso de doutorado *stricto sensu* do Programa de Pós-graduação de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *Campus* Cascavel, no qual, sob orientação da Prof^a Dra^a Simone D. Gomes, desenvolveu seu projeto de tese, com o tema produção de biohidrogênio e participou de outros projetos correlatos à produção de energia com base em substratos orgânicos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

Aos meus amados pais, Vanda e José, minha saudade diária, que sempre estão ao meu lado, me ajudando a buscar e realizar meus sonhos, que me motivam com suas palavras e que são meus maiores exemplos de pessoas batalhadoras. Amo muito vocês!

Ao meu adorado irmão, André, que sempre me dá bons conselhos e me mostra como dar conta de várias coisas ao mesmo tempo.

À minha querida e tão amada sobrinha, Helo, de quem morro de saudade todos os dias, a qual me motiva diariamente, mesmo sem saber.

Ao meu amado e querido marido, Eduardo, que sempre está ao meu lado, me ajudando, me estimulando a seguir e a buscar o melhor; agradeço por todo o seu amor, carinho, paciência e presença incansável com que me apoiou, ao longo do período de elaboração desta tese. Amo muito você e te admiro demais!

À minha querida orientadora, Dra Simone D. Gomes, uma verdadeira mãe como orientadora, sempre muito calma, que me ajudou em tudo em que solicitei e deu dicas valiosas para a vida. Uma pessoa sensacional e com a qual jamais quero perder o contato.

Aos meus sogros, Norma e Jorge, que sempre se preocupam comigo e me tratam como uma filha.

Aos 'meus' alunos de iniciação científica, Giovane, Luana e José, que me ajudaram muito nas atividades do laboratório; com vocês, foi mais rápido e divertido.

Aos amigos e colegas que conquistei nesse período, Tatiane, Aruani, Kauanna, Paula, Tamiris, Luana M., Willyan, Jackeline e Luana G.: saber que posso contar com vocês é muito gratificante.

Aos técnicos e amigos, Edison B. Cunha e Euro Kava, pela disposição e ajuda sempre oferecida na solução dos diversos problemas que apareceriam inesperadamente.

Aos prezados membros doutores da banca, Airtton Kunz, Lucas Fuess, Marcelo Zaiat e Maria Hemínia Tavares, que, no meu exame de qualificação, me deram dicas valiosas para a conclusão deste trabalho.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), pela oportunidade da realização do doutorado.

À Capes e Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de estudos.

ATRIBUTOS DO REATOR ANAERÓBIO CONTÍNUO DE TUBOS MÚLTIPLOS NO CONTROLE DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA NA FASE ACIDOGÊNICA VISANDO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

RESUMO

O reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) é uma configuração proposta para a produção de hidrogênio, com intuito de contribuir à sustentabilidade energética. Essa tecnologia foi concebida com o objetivo de fornecer maior área de contato para a fixação da biomassa, sem utilização de material suporte e, ao mesmo tempo, permitir o seu descarte contínuo, evitando, assim, acúmulo no interior do reator. Dessa forma, esse reator tem se mostrado promissor pela capacidade de garantir a manutenção da carga orgânica volumétrica específica (COVe), por meio do descarte contínuo de biomassa; no entanto, problemas estruturais e operacionais, além do baixo desempenho na produção de hidrogênio, no uso do RCTM, foram relatados por Gomes et al. (2015). Nesse contexto, a superfície interna dos tubos foi adaptada com ranhuras no formato rosca sem fim, na tentativa de melhorar os aspectos relacionados ao balanço de biomassa do reator. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do RCTM no controle da COVe e na produção de hidrogênio de forma contínua e estável. O RCTM foi operado sob condições mesofílicas de temperatura (25°C), inoculado por processo de autofermentação e alimentado com água residuária sintética, à base de sacarose como fonte de carbono. A influência da carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) foi avaliada variando-se a concentração de DQO em 2000, 4000, 6000, 8000, 12000 e 16000 mg DQO L⁻¹ e utilizando tempo de detenção hidráulica (TDH) de 2 e 4 horas. A partir dessas variações, foram realizados 8 ensaios, distribuídos em quatro condições de COVa, sendo elas: COVa – 24 g DQO L⁻¹d⁻¹: E1 e E5, COVa – 48 g DQO L⁻¹d⁻¹: E2 e E6, COVa – 72 g DQO L⁻¹d⁻¹: E3 e E7 e COVa – 96 g DQO L⁻¹d⁻¹: E4 e E8. Os resultados revelaram que a produção de hidrogênio se manteve contínua por longos períodos de operação (~90 dias), em todos os ensaios, embora com sinais de instabilidade. O efeito estrutural da adaptação de ranhuras à superfície interna dos tubos foi eficaz na fixação da biomassa, sendo, ao mesmo tempo, eficiente em evitar o seu acúmulo excessivo no meio, o que contribuiu para as necessidades de arraste natural do sistema. Desse modo, o balanço de biomassa foi favorável à manutenção de valores de COVe apropriados para a produção contínua de hidrogênio. Os resultados demonstraram que os ensaios, operados com menores valores de carga (E1, E2, E5 e E6), foram superiores, considerando-se os parâmetros: conversão de sacarose, vazão molar, produção volumétrica e rendimento de hidrogênio. As porcentagens de hidrogênio no biogás desses ensaios se mantiveram acima de 63%. Os ensaios com maiores valores de COVa (E3, E4, E7 e E8) apresentaram perda de desempenho quanto à produção de hidrogênio, em razão de possível inibição da biomassa pelo substrato (condições de sobrecarga). Os principais metabólitos produzidos nos ensaios foram ácidos acético, láctico, butírico e etanol; o melhor desempenho foi alcançado no ensaio E2 (1593,6 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹; 0,5 mol H₂ mol⁻¹sac; 1,80 mmol H₂ h⁻¹). O RCTM mostrou-se promissor para a produção contínua de hidrogênio e dispensou a utilização de estratégias adicionais de descarte de biomassa.

Palavras-chave: Fermentação escura. Sacarose. Acidogênese. Relação A/M.

CONTINUOUS MULTIPLE TUBE ANAEROBIC REACTOR ATTRIBUTES ON CONTROL OF SPECIFIC ORGANIC LOADING RATE IN THE ACIDOGENIC PHASE FOR BIOHYDROGEN PRODUCTION

ABSTRACT

The continuous multiple tube reactor (CMTR) is a configuration proposed to produce hydrogen to contribute to energy sustainability. This technology has been shown to be promising due to its ability to guarantee the maintenance of the specific organic loading rate (SOLR), through the continuous disposal of biomass. In this context, the objective of this study was to evaluate the performance of the CMTR in the control of SOLR and in the production of hydrogen in a continuous and stable form. For this, the inner surface of tubes was adapted with grooves in the shape of an endless screw to improve the aspects related to the biomass balance of the reactor. The CMTR was operated under mesophilic temperature conditions (25°C), inoculated by a natural fermentation process and fed with synthetic wastewater based on sucrose as the carbon source. The influence of the organic loading rate (OLR) was evaluated by varying the COD in 2000, 4000, 6000, 8000, 12000 and 16000 mg COD L⁻¹ and using a hydraulic retention time (HTR) of 2 and 4 hours. From these variations, four OLR conditions were obtained: 24 (E1 and E5), 48 (E2 and E6), 72 (E3 and E7) and 96 (E4 and E8) g COD L⁻¹d⁻¹. The results revealed that the hydrogen production remained continuous for long periods of operation (~90 days) in all tests, although with signs of instability. The structural effect of adapting grooves to the inner surface of the tubes was effective in fixing the biomass, while being efficient in preventing its excessive accumulation in the medium, which contributed to the natural dragging needs of the system. In this way, the biomass balance was favorable in maintaining SOLR values appropriate for continuous hydrogen production. The results showed that the tests operated with lower load values (E1, E2, E5 and E6) were superior considering the parameters: sucrose conversion efficiency, molar hydrogen flow rate, volumetric hydrogen production rate and hydrogen yield. The percentages of hydrogen in the biogas from these tests remained above 63%. The tests with higher OLR values (E3, E4, E7 and E8) had a loss of performance in terms of hydrogen production due to possible inhibition of biomass by the substrate (overload conditions). The main metabolites produced in the tests were acetic, lactic, butyric acids and ethanol and the best performance was achieved in the E2 test (1593.6 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹; 0.5 mol H₂ mol⁻¹sac; 1.80 mmol H₂ h⁻¹). The CMTR proved to be promising for the continuous production of hydrogen and dispensed with the use of additional biomass disposal strategies.

Keywords: Dark fermentation. Sucrose. Acidogenesis. Ratio F/M.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Hipóteses.....	19
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Importância do hidrogênio como vetor energético.....	21
3.2 Vias de produção de biohidrogênio.....	23
3.2.1 Produção biológica via fermentação escura.....	25
3.3 Fatores que influenciam a produção de biohidrogênio.....	27
3.3.1 Importância do Potencial Hidrogeniônico (pH).....	28
3.3.2 Efeito da Temperatura.....	29
3.3.3 Influência do tempo de detenção hidráulica (TDH).....	29
3.3.4 Influência do Substrato.....	31
3.3.5 Efeito do Inóculo.....	33
3.3.6 Tipo de reator.....	34
3.4 Carga orgânica volumétrica específica (COVe).....	36
3.5 Considerações Finais – Revisão de Literatura.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Substrato.....	41
4.2 Inóculo.....	42
4.3 Reator contínuo de tubos múltiplos e condições experimentais.....	42
4.4 Avaliação do Desempenho do reator: Métodos Analíticos.....	47
4.5 Desempenho do reator: Cálculos da Produção de Hidrogênio.....	49
4.6 Cálculo da Carga Orgânica Volumétrica Específica (COVe).....	51
4.7 Análise dos resultados.....	53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Tempo de Detenção Hidráulica de 2h: Avaliação da Estabilidade Operacional, Conversão de Matéria Orgânica e Produção de hidrogênio	54
5.1.1 Desempenho do RCTM na produção de hidrogênio	54
5.1.2 Comportamento do RCTM e conversão do substrato	59
5.1.3 Produção de biomassa e dinâmica da COVe	61
5.1.4 Avaliação da Produção de Metabólitos da Fermentação	67
5.2 Tempo de Detenção Hidráulica de 4h: Avaliação da Estabilidade Operacional, Conversão de Matéria Orgânica e Produção de hidrogênio	73
5.2.1 Desempenho do RCTM na produção de hidrogênio	73
5.2.2 Comportamento do RCTM e conversão do substrato	77
5.2.3 Produção de biomassa e dinâmica da COVe	79
5.2.4 Avaliação da Produção de Metabólitos da Fermentação	84
6 CONCLUSÕES	91
7 CONSIDERAÇÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8 REFERÊNCIAS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Caminhos biológicos para produzir hidrogênio. Fonte: Ghimire et al. (2015).	23
Figura 2 Fluxo esquemático das principais etapas do processo de digestão anaeróbia. Fonte: Adaptado Sá et al. (2014).	26
Figura 3 Representação esquemática do aparato experimental. Legenda: 1- reservatório de efluente sintético; 2- bomba peristáltica; 3- reator de tubos múltiplos; 4- coleta de efluente; 5- selo hídrico; 6- gasômetro (Ritter®). Fonte: Adaptado de Gomes et al. 2015.....	43
Figura 4 Dimensões e características construtivas do reator. Legenda: 1- descarga do efluente; 2- tubos de PVC; 3- câmara de saída do efluente; 4- saída do biogás; 5- dreno do efluente. Fonte: Elaboração própria.....	44
Figura 5 Representação das ranhuras confeccionadas nas paredes internas dos tubos no formato rosca sem fim. Fonte: Elaboração própria.....	44
Figura 6 Detalhes do aparato experimental utilizado: (a) aparato experimental em funcionamento; (b) distribuição dos tubos no RCTM. Legenda: 1- RCTM, 2- câmara de temperatura, (3) mangueiras de alimentação, (4) coleta da água residuária acidificada (descarga), (5-6-7) sistema de medição volumétrica de biogás (mangueiras Tygon®, selos hídricos e gasômetros e (8) termostato para controle da temperatura. Fonte: Elaboração própria.....	45
Figura 7 Produção de biogás e hidrogênio nos ensaios E1 (-●-; -○-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E2 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E3 (-▲-; -△-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E4 (-■-; -□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 2h: (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e vazão de biogás (VBG, -○-; -◇-; -△-; -□-), (b) vazão molar de hidrogênio (VMH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa, -○-; -◇-; -△-; -□-), (c) composição do biogás (hidrogênio, -●-; -◆-; -▲-; -■-; gás carbônico, -○-; -◇-; -△-; -□-) e (d) rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Ensaios (E1-E4).	57
Figura 8 Monitoramento da fase líquida do reator RCTM nos ensaios E1 (-●-; -○-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E2 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E3 (-▲-; -△-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E4 (-■-; -□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 2h: (a) o pH de saída do reator, (b) eficiência de conversão de sacarose (EC _{SAC}) e (c) eficiência de remoção de DQO (ER _{DQO} ; total -●-; -◆-; -▲-; -■-, solúvel -○-; -◇-; -△-; -□-). Legenda: Ensaios (E1-E4).....	60
Figura 9 Performance da retenção de biomassa no reator RCTM nos ensaios E1 (-●-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E2 (-◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E3 (-▲-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E4 (-□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 2h: (a) concentração de biomassa retida no reator, (b) carga orgânica volumétrica específica (COVe) e (c) COVe a partir do período de aclimação da biomassa. Legenda: Ensaios (E1-E4).	62

Figura 10 Influência da carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) sobre o rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Pontos experimentais (○), curva polinomial ajustada aos pontos experimentais (—).....	66
Figura 11 Perfil temporal de concentração de metabólitos ao longo da operação dos ensaios: (a) E1 (24gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), (b) E2 (48gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), (c) E3 (72gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e (d) E4 (96gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 2h. Legenda: Ensaios (E1-E4).....	69
Figura 12 Proporção de metabólitos solúveis quantificados ao longo da operação dos ensaios: (a) E1 (24gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), (b) E2 (48gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), (c) E3 (72gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e (d) E4 (96gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 2h. Legenda: Ensaios (E1-E4).	70
Figura 13 Razão HBU/HAC na ARS fermentada (-●-; -◆-; -▲-; -■-) e (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -○-; -◇-; -Δ-; -□-) e (b) rendimento de hidrogênio (HY, -○-; -◇-; -Δ-; -□-) nos ensaios E1 (-●-; -○-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E2 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E3 (-▲-; -Δ-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E4 (-■-; -□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH (2h). Legenda: Ensaios (E1-E4).	72
Figura 14 Produção de biogás e hidrogênio nos ensaios E5 (-●-; -○-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E6 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E7 (-▲-; -Δ-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E8 (-■-; -□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 4h: (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e vazão de biogás (VBG, -○-; -◇-; -Δ-; -□-), (b) vazão molar de hidrogênio (VMH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa, -○-; -◇-; -Δ-; -□-), (c) composição do biogás (hidrogênio, -●-; -◆-; -▲-; -■-, gás carbônico, -○-; -◇-; -Δ-; -□-) e (d) rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Ensaios (E5-E8).	76
Figura 15 Monitoramento da fase líquida do reator RCTM nos ensaios E5 (-●-; -○-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E6 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E7 (-▲-; -Δ-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E8 (-■-; -□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 4h: (a) o pH de saída do reator, (b) eficiência de conversão de sacarose (EC _{SAC}) e (c) eficiência de remoção de DQO (ER _{DQO} ; total -●-; -◆-; -▲-; -■-, solúvel -○-; -◇-; -Δ-; -□-). Legenda: Ensaios (E5-E8).....	77
Figura 16 Performance da retenção de biomassa no reator RCTM nos ensaios E5 (-●-) (24 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E6 (-◇-) (48 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), E7 (-▲-) (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e E8 (-□-) (96 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 4h: (a) concentração de biomassa retida no reator, (b) carga orgânica volumétrica específica (COVe) e (c) COVe a partir do período de aclimação da biomassa. Legenda: Ensaios (E5-E8).	80
Figura 17 Biomassa total gerada em função da variação da COVa para os ensaios realizados no TDH de 2h (E1 a E4) e de 4 h (E5 a E8).Legenda: E1, E2, E3 e E4 (-x-) e E5, E6, E7 e E8 (-→Ж→-).	82
Figura 18 Perfil temporal de concentração de metabólitos ao longo da operação dos ensaios: (a) E5 (24gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), (b) E6 (48gDQO L ⁻¹ d ⁻¹), (c) E7 (72 gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) e (d) E8 (96gDQO L ⁻¹ d ⁻¹) no TDH de 4h. Legenda: Ensaios (E5-E8).	87

Figura 19 Proporção de metabólitos solúveis quantificados ao longo da operação dos ensaios: (a) E5 (24 gDQO L⁻¹ d⁻¹), (b) E6 (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), (c) E7 (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e (d) E8 (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 4h. Legenda: Ensaios (E5-E8)..... 88

Figura 20 Razão HBU/HAC na ARS fermentada (-●-; -◆-; -▲-; -■-) e (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -○-; -◇-; -Δ-; -□-) e (b) rendimento de hidrogênio (HY, -○-; -◇-; -Δ-; -□-) nos ensaios E5 (-●-; -○-) (24 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E6 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E7 (-▲-; -Δ-) (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e E8 (-■-; -□-) (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH (4h). Legenda: Ensaios (E5-E8). 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação dos diferentes processos de produção de biohidrogênio.....	24
Tabela 2 Resumo dos valores de pH estudados pela literatura e a sua influência na produção de H ₂ a partir de substrato de sacarose.....	28
Tabela 3 Revisão da literatura relacionada a influência da concentração de sacarose como substrato para produção de hidrogênio.	32
Tabela 4 Resumo das características operacionais de cada tipo de reator contínuo na produção de hidrogênio.....	35
Tabela 5 Resumo dos valores de COVe encontrados na literatura e a sua influência na produção de H ₂	39
Tabela 6 Composição da ARS utilizada como substrato.	41
Tabela 7 Resumo das condições operacionais de cada ensaio utilizando RCTM.	46
Tabela 8 Métodos analíticos e frequência de análises empregadas no monitoramento do reator.....	47
Tabela 9 Desempenho do RCTM nos ensaios realizados com TDH de 2h.	55
Tabela 10 Balanço de biomassa no RCTM com TDH de 2h.	65
Tabela 11 Produção média dos produtos intermediários da fermentação no TDH de 2h.....	67
Tabela 12 Desempenho do RCTM nos ensaios realizados com TDH de 4h.	74
Tabela 13 Balanço de biomassa no RCTM com TDH de 4h.	81
Tabela 14 Produção média dos produtos intermediários da fermentação no TDH de 4h.....	84

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL : microlitro

AFBR: reator anaeróbico de leito fluidizado (*anaerobic fluidized-bed reactor*)

APBR: reator de leito fixo empacotado (*anaerobic packed-bed reactor*)

ASBR: reator anaeróbico em bateladas sequenciais (*anaerobic sequencing batch reactor*)

ASTBR: reator anaeróbico de leito estruturado (*anaerobic structured-bed reactor*)

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: sacarose

CH_4 : metano

CO_2 : dióxido de carbono, gás carbônico

COVa: carga orgânica volumétrica aplicada

COVe: carga orgânica volumétrica específica

CSTR: reator anaeróbico continuamente agitado (*continuously stirred-tank reactor*)

DQO, DQOt: demanda química de oxigênio total

DQOs: demanda química de oxigênio solúvel

DQO_s: demanda química de oxigênio solúvel

DQO_t: demanda química de oxigênio total

EC_{SAC}: eficiência de conversão de sacarose

EGSB: reator de leito expandido granular (*expanded granular sludge-bed reactor*)

ER_{DQO}: eficiência de remoção de DQO

EtOH: etanol

H_2 : hidrogênio molecular

H_2O : água

HAc: ácido acético

HBu: ácido butírico

HLa: ácido láctico

HPr: ácido propiônico

HY: rendimento de hidrogênio

N_2 : nitrogênio molecular

PVH: produção volumétrica de hidrogênio

RCTM: reator contínuo de tubos múltiplos (*continuous multiple tube reactor*)

SSV: Sólidos suspensos voláteis

T: temperatura,

TCD: detector de condutividade térmica

TDH: tempo de detenção hidráulica

TDH: tempo de detenção hidráulica

TRS: tempo de retenção de sólidos

UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*)

VBG: vazão de biogás

1 INTRODUÇÃO

O prognóstico realizado pelo Conselho Mundial de Energia afirma que o crescimento da demanda energética da América Latina e Caribe ainda permanecerá em um nível relativamente alto até 2060, em comparação com a maioria das outras regiões do mundo. Fontes de energias alternativas, como a eólica e solar, representam apenas cerca de 2% da geração de eletricidade da América Latina, enquanto a média mundial é de 4%. A demanda por petróleo alcançará um platô entre os anos de 2030 e 2040 e a necessidade do setor de transporte por biocombustíveis crescerá cinco vezes entre 2014 e 2060. Dessa forma, os riscos associados ao suprimento e aos impactos para o meio ambiente estão fazendo crescer o interesse em combustíveis limpos.

Diante desse cenário, aspectos, como a segurança energética e a redução dos impactos ambientais, constituem-se nos principais motivadores para a mudança de paradigma do setor energético. É possível constatar que existe uma forte tendência mundial de se priorizar pesquisa e desenvolvimento na direção de tecnologias alternativas, que utilizem fontes de energia renováveis, com vistas a contribuir para a maior sustentabilidade ambiental.

Dentre as alternativas, as tecnologias de produção do hidrogênio (H_2) são consideradas como sucessoras aos combustíveis fósseis, por se tratar de um combustível com significativo valor energético em relação aos combustíveis convencionais (poder calorífico do $H_2 = 28.642 \text{ Kcal kg}^{-1}$; Diesel = $10.100 \text{ kcal kg}^{-1}$). Somado a isso, além de ser o elemento mais abundante no universo, o H_2 pertence à categoria dos combustíveis de menor produção de poluentes, sendo gerado apenas vapor d'água como subproduto da sua combustão.

Na última década, os processos biológicos têm demonstrado potencial para a geração de H_2 a partir de resíduos, aliando geração de energia e redução de custos com o tratamento. Dentre os sistemas biológicos para produção de H_2 , a fermentação tem se destacado, devido, principalmente, à maior produção desse gás, quando comparada aos outros processos biológicos e à possibilidade de utilização e digestão de diferentes materiais residuais como substrato.

A produção de H_2 por processos fermentativos vem sendo abordada pela literatura em diferentes configurações de reatores, tanto em processos contínuos quanto em operação batelada.

Deve-se ressaltar que existem muitos fatores que influenciam a produção biológica de H_2 , incluindo o pH, tempo de detenção hidráulica (TDH), tempo de retenção de sólidos (TRS), temperatura, fonte de carbono, carga orgânica aplicada, vias metabólicas envolvidas e a diversidade microbiana. Assim, a partir do conhecimento gerado, sabe-se que a produção

de hidrogênio é um processo muito sensível, de modo a requerer um balanço cuidadoso desses fatores que influenciam na sua produção.

Diversas pesquisas têm reportado sobre a dificuldade da manutenção de produções contínuas e elevadas de H_2 , por longos períodos de operação. Essa dificuldade tem sido, muitas vezes, relacionada aos fatores bióticos do processo, como alterações na composição da comunidade microbiana, presença de organismos que consomem hidrogênio e competem pelo substrato e acúmulo de produtos da fermentação.

Nesse sentido, os trabalhos que visam à estabilidade da produção biológica de H_2 têm direcionado atenção ao desenvolvimento de formas de controle da biomassa no reator. As estratégias de controle são focadas basicamente nos aspectos estruturais, por meio da resolução de alguns problemas específicos, ligados à configuração dos reatores, e operacionais, os quais procuram criar condições de seleção das comunidades microbianas e vias metabólicas, adequadas à produção de H_2 .

A carga orgânica volumétrica específica (COVe), também designada como relação alimento/microrganismo (A/M), tem demonstrado influência nas mudanças da comunidade microbiana e, assim, interfere na instabilidade da produção volumétrica e rendimento de hidrogênio. Os resultados da literatura demonstram que valores relativamente elevados e a constante diminuição da COVe podem causar mudanças negativas nas rotas metabólicas, tais como o desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio.

Portanto, aplicar valor adequado da COVe para a produção de hidrogênio pode ser a chave para manter a continuidade na produção. Dessa forma, o desafio em torno da produção biológica de hidrogênio de forma contínua e estável exige o estudo e desenvolvimento de estratégias de controle, principalmente, da COVe.

Diante disso, Gomes et al. (2015) propuseram o reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) para a produção biológica de hidrogênio. No RCTM, a zona de reação é constituída por tubos paralelos de pequeno diâmetro, que proporcionam alta relação comprimento/diâmetro e, conseqüentemente, melhoram o controle sobre a velocidade superficial do fluxo no leito. O objetivo da configuração proposta foi de fornecer maior superfície de contato para a fixação da biomassa do que um reator de tubo convencional sem material suporte e, ao mesmo tempo, permitir a descarga contínua da biomassa devido à alta velocidade superficial. Sendo assim, evita-se o acúmulo de biomassa no reator, o que contribui para a manutenção da concentração apropriada de biomassa à produção de hidrogênio.

Porém, esses autores relataram problemas de ordem operacional e estrutural no uso do RCTM, indicando que as estratégias utilizadas no referido trabalho foram insuficientes para comprovar o desempenho da configuração proposta. A baixa fixação da biomassa, nas

paredes internas dos tubos, foi apontada como a principal causa do baixo desempenho na produção de hidrogênio, já que resultou em valores altos de COVe, considerados desfavoráveis ao processo. Gomes et al. (2015) sugeriram, então, o uso de tubos com maior rugosidade interna, como forma de contornar os problemas vivenciados nessa primeira tentativa de produção de biohidrogênio em RCTM.

Nesse sentido, como o RCTM se mostra promissor, é importante explorar novas estratégias que alcancem condições de lavagem controlada de biomassa e que mantenham concentrações adequadas de microrganismos ativos dentro do reator. No presente trabalho, a estratégia para aprimorar a capacidade de controle de biomassa atuou em fornecer rugosidade à parede interna dos tubos do RCTM, a fim de acompanhar o efeito dessa textura sobre a produção de hidrogênio, em diferentes condições operacionais de carga orgânica aplicada e variação de TDH.

1.1 Hipóteses

Hipótese Central

O desenvolvimento do trabalho esteve orientado em uma hipótese central, na qual se afirma que “o reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM), com ranhuras no interior dos tubos no formato rosca sem fim, permite manter a COVe em níveis favoráveis à produção contínua e estável de biohidrogênio, sendo esta influenciada pelo TDH e pela concentração do substrato”.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal é avaliar o desempenho do reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM), com ranhuras no interior dos tubos no formato rosca sem fim, no controle da carga orgânica volumétrica específica (COVe), para a produção contínua e estável de hidrogênio, utilizando água residuária sintética à base de sacarose.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar estratégias operacionais para o controle da COVe, com base na variação do TDH e da concentração de substrato, para produção contínua e estável de hidrogênio;
- Identificar as vias metabólicas da produção de hidrogênio, em função das condições operacionais estabelecidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta conteúdo da literatura especializada a respeito dos assuntos que estão relacionados ao eixo central dos objetivos, propostos na execução deste trabalho. Os tópicos a seguir foram escolhidos como relevantes para a fundamentação da pesquisa, a qual deve cumprir a função de servir de referência para a discussão dos resultados e formulação das conclusões, bem como validação da hipótese. Portanto, a revisão bibliográfica inclui:

i. Contextualização e importância do hidrogênio na composição da matriz energética, considerando os futuros cenários de demanda por energia no mundo. Além disso, são apresentadas as vantagens da produção de hidrogênio, utilizando processos fermentativos e o desafio de superar as limitações relacionadas à estabilidade da produção, de modo a incorporar efetivamente a tecnologia do biohidrogênio à cadeia produtiva de energia;

ii. Conceitos e fundamentos da digestão anaeróbia, destacando o uso e as potencialidades da sacarose na produção de hidrogênio, bem como a relação de rotas metabólicas com os rendimentos observados nas reações de geração e consumo de hidrogênio pelos microrganismos;

iii. Fatores que exercem influência na produção de hidrogênio e suas relações com os aspectos operacionais e estruturais, com ênfase à estabilidade e rendimento da produção.

3.1 Importância do hidrogênio como vetor energético

Diante do constante aumento da demanda energética e do aquecimento global, esforços consideráveis vêm sendo realizados para explorar fontes alternativas de energia, em substituição aos combustíveis fósseis, como o petróleo, carvão e gás natural. Dentre essas fontes, encontra-se o hidrogênio, considerado uma fonte limpa, de maneira que pode ser obtido a partir de matéria-prima renovável e sua combustão não é agressiva ao ambiente, pois libera apenas energia e vapor d'água (HAWKES et al., 2007).

O hidrogênio é considerado um carreador de energia eficiente, uma vez que apresenta elevada densidade energética (da ordem de 122 kJ g^{-1}), sendo 2,75 vezes superior quando comparado aos combustíveis à base de hidrocarbonetos pesados (ARGUN et al., 2008). Sua utilização pode ser realizada diretamente como combustível em motores de combustão ou em células a combustível (DAS; VEZIROGLU, 2008).

Geralmente, são quatro os processos básicos para a produção do gás hidrogênio, a partir de fontes primárias de energias não-fósseis: (i) eletrólise da água; (ii) processos termoquímicos; (iii) processos radiolíticos e (iv) processos biológicos (DAS; VEZIROGLU, 2008). Apesar de vários processos para a produção de H₂, a maneira econômica e promissora de produzir esse gás, de acordo com Preethi et al. (2019), é usar microrganismos sob métodos de fermentação, sendo chamado biohidrogênio.

A produção de biohidrogênio pode envolver a utilização de resíduos e contribuir para a redução de gases de efeito estufa. No entanto, a sua aplicação industrial em larga escala ainda não foi implementada devido a inúmeros desafios em sua produção, armazenamento e transporte. A produção de biohidrogênio é potencialmente uma alternativa viável, devido à possibilidade de reduzir os impactos ambientais e os custos de obtenção. Além disso, a dependência dos sistemas de combustíveis fósseis no futuro pode ser minimizada quando a produção de biohidrogênio for praticável com base em fontes de energias renováveis (KHAN et al., 2018).

Entretanto, existem alguns motivos pelos quais a produção industrial de biohidrogênio ainda não é viável, ambiental e economicamente. Alguns desses desafios incluem os problemas de instabilidade na produção, a partir de diferentes substratos; a identificação das condições de inibição do processo e a busca de alternativas para evitá-las; otimização dos parâmetros comuns do processo; finalmente, os desafios econômicos e de segurança envolvidos na criação de um sistema de armazenamento de hidrogênio (KHAN et al., 2018).

Segundo Eroglu et al. (2006), uma maneira de superar as restrições econômicas da produção do biohidrogênio é associar esse processo ao tratamento de resíduos, pois, nas aplicações práticas de resíduos biológicos à produção de hidrogênio, não se deve utilizar meios de cultura sintéticos caros. Como consequência, na literatura, são encontrados vários trabalhos que abordam a utilização de substratos orgânicos para a produção de biohidrogênio, como resíduos da indústria alimentar e agrícola ou águas residuárias com altos níveis de compostos orgânicos.

Em termos de tecnologias de produção de hidrogênio, o processo biológico é a melhor opção para obter altos rendimentos de hidrogênio, quando comparado a outras tecnologias de produção desse gás. Essa tecnologia pode fornecer hidrogênio suficiente para alimentar células a combustível de grandes capacidades portáteis e estacionárias, com alta eficiência de geração de energia, usando, para isso, um sistema adequado de purificação do biohidrogênio. Dentro desse contexto, membrana polimérica não porosa (NPPM), contactores com membranas (MC) e membrana suportada em líquido iônico (SILM) são tecnologias

possíveis para a separação e purificação de hidrogênio, a partir de impurezas como CO_2 e H_2S (RAHMAN et al., 2016).

Pesquisas e desenvolvimento são necessários para aumentar as taxas e os rendimentos da produção de biohidrogênio e otimizar o dimensionamento de biorreatores. Assim, a produção de biohidrogênio poderá substituir as fontes de energia não renováveis, como os combustíveis fósseis, e também manter o suprimento de energia do mundo (RAHMAN et al., 2016).

Além disso, os autores notaram que é essencial estudar e pesquisar extensivamente a tecnologia de membranas para a separação de hidrogênio, juntamente com o processo de fermentação, para determinar a possibilidade de uma aplicação integrada. Por conseguinte, seria benéfico criar um aprovisionamento energético sustentável, minimizar os resíduos e a poluição, por meio de sua utilização como recurso, além de usar o hidrogênio gerado como o combustível na tecnologia de células a combustível para gerar eletricidade.

3.2 Vias de produção de biohidrogênio

O biohidrogênio pode ser gerado por diferentes vias que podem ser amplamente categorizadas em dois grupos distintos: processos fermentativos escuros e dependentes da luz. Os processos dependentes da luz incluem biofotólise e fotofermentação, enquanto a fermentação escura é o principal processo independente da luz (Figura 1).

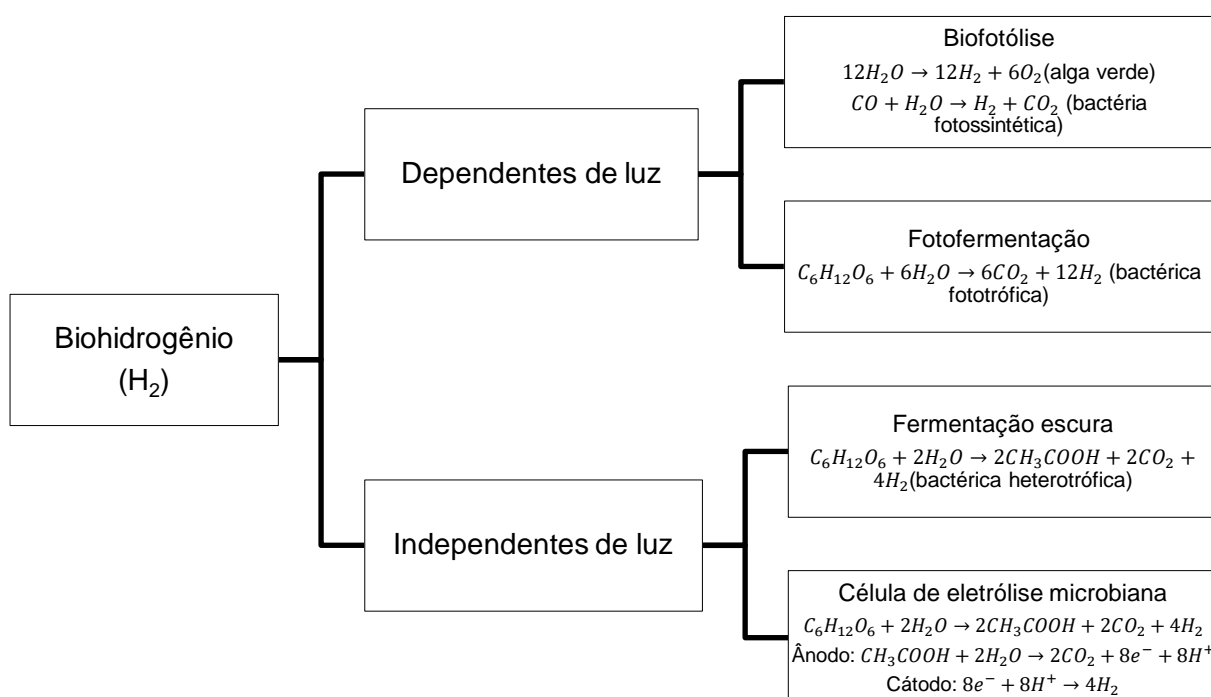


Figura 1 Caminhos biológicos para produzir hidrogênio. Fonte: Ghimire et al. (2015).

Nas conversões autotróficas (também conhecidas como biofotólise direta ou indireta), a energia solar é diretamente convertida em hidrogênio, por meio de reações fotossintéticas mediadas por microrganismos fotossintéticos, isto é, microalgas, protistas e bactérias fotossintéticas. Sob condições heterotróficas, os substratos orgânicos são transformados em compostos orgânicos mais simples, com produção simultânea de hidrogênio molecular. Existem dois tipos de conversões heterotróficas: a fotofermentação, realizada por bactérias fotossintéticas, e a fermentação escura, realizada por bactérias anaeróbias, que convertem carboidratos em biohidrogênio (GHIMIRE et al., 2015)

A fermentação escura é a tecnologia mais estudada e promissora para a produção de biohidrogênio, devido às suas maiores taxas de produção e capacidade de tratamento de resíduos orgânicos. Vários substratos ricos em carboidratos também são utilizáveis, como culturas de combustível de primeira geração (por exemplo, cana-de-açúcar, trigo, milho e beterraba sacarina), bem como biomassa de segunda geração, como resíduos agrícolas, assim como resíduos industriais e águas residuais.

A Tabela 1 apresenta um panorama geral de vantagens e desvantagens de cada tecnologia de produção de biohidrogênio.

Tabela 1 Comparação dos diferentes processos de produção de biohidrogênio.

Processo	Taxas de produção	Rend.	Vantagens	Desvantagens	Perspectivas futuras
Biofotólise	2,5-13 mols $H_2 L^{-1} h^{-1}$	$\leq 0,1\%$	-Substrato abundante e inesgotável (água); -Caminho totalmente independente do carbono; -Produtos simples, hidrogênio e oxigênio.	-Necessidade de fotobiorreatores de baixo custo; -Baixa eficiência de conversão fotossintética.	-A criação de uma hidrogenase resistente ao oxigênio seria um avanço.
Fotofermentação	12-83 mols $H_2 L^{-1} h^{-1}$	$\leq 0,1\%$, 80%	-Conversão de substrato quase completa; -Pode extrair hidrogênio adicional de efluentes de fermentação escura.	-Baixas taxas volumétricas de produção; -Baixa eficiência de conversão fotossintética.	- Melhoria da potencial elétrico através da engenharia metabólica.
Fermentação escura	$10-15 \times 10^3$ mols $H_2 L^{-1} h^{-1}$	33%	-Tecnologia simples de reator, condições não estéreis aceitáveis, altas taxas alcançadas com culturas mistas imobilizadas.	-Baixa remoção de DQO; -Grande quantidade de subprodutos.	-Avanço nas limitações metabólicas; -Sistemas de dois estágios podem extrair energia adicional e reduzir DQO.

Fonte: Hallenbeck et al. (2012).

Dentre os sistemas apresentados na Tabela 1, de acordo com Sá et al. (2014), a produção de hidrogênio por fermentação escura tem despertado grande interesse, devido, principalmente, a uma maior produção de hidrogênio, quando comparada aos outros processos biológicos. A produção de hidrogênio, por meio de bactérias fermentativas, permite uma geração contínua e em ritmo sustentado, uma vez que não há inibição pela ausência de iluminação. Além disso, os microrganismos fermentativos são mais eficazes na produção de hidrogênio, em um curto intervalo de tempo, quando comparados aos microrganismos responsáveis pelos processos dependentes de luz.

3.2.1 Produção biológica via fermentação escura

As abordagens biológicas de produção de hidrogênio são consideradas mais viáveis economicamente, especialmente, se o hidrogênio é produzido pela fermentação de materiais orgânicos renováveis, como os resíduos agroindustriais, que contêm carboidratos em sua composição (WANG & WAN, 2009).

O processo de fermentação anaeróbia é desenvolvido em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na primeira fase do processo fermentativo, bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares, que promovem a degradação dos materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Na fase acidogênica, os produtos solúveis, oriundos da etapa anterior, são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples.

Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 , H_2 , além de novas células bacterianas. As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica, em substrato apropriado (H_2 e ácido acético), para as arqueias metanogênicas. Nessa etapa do processo, o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. Na última etapa do processo, as arqueias metanogênicas convertem o H_2 e o ácido acético em CH_4 e CO_2 . Em função de sua afinidade pelo substrato, as arqueias metanogênicas podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas (arqueias que utilizam o ácido acético como substrato) e metanogênicas hidrogenotróficas (arqueias que utilizam o hidrogênio como substrato). Na presença de sulfato e nitrato no meio fermentativo, as bactérias nitrato-redutoras e as bactérias sulfato-redutoras são capazes de utilizar o H_2 para formação de amônia e sulfeto, respectivamente (SÁ et al., 2014). Uma representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio é apresentada na Figura 2.

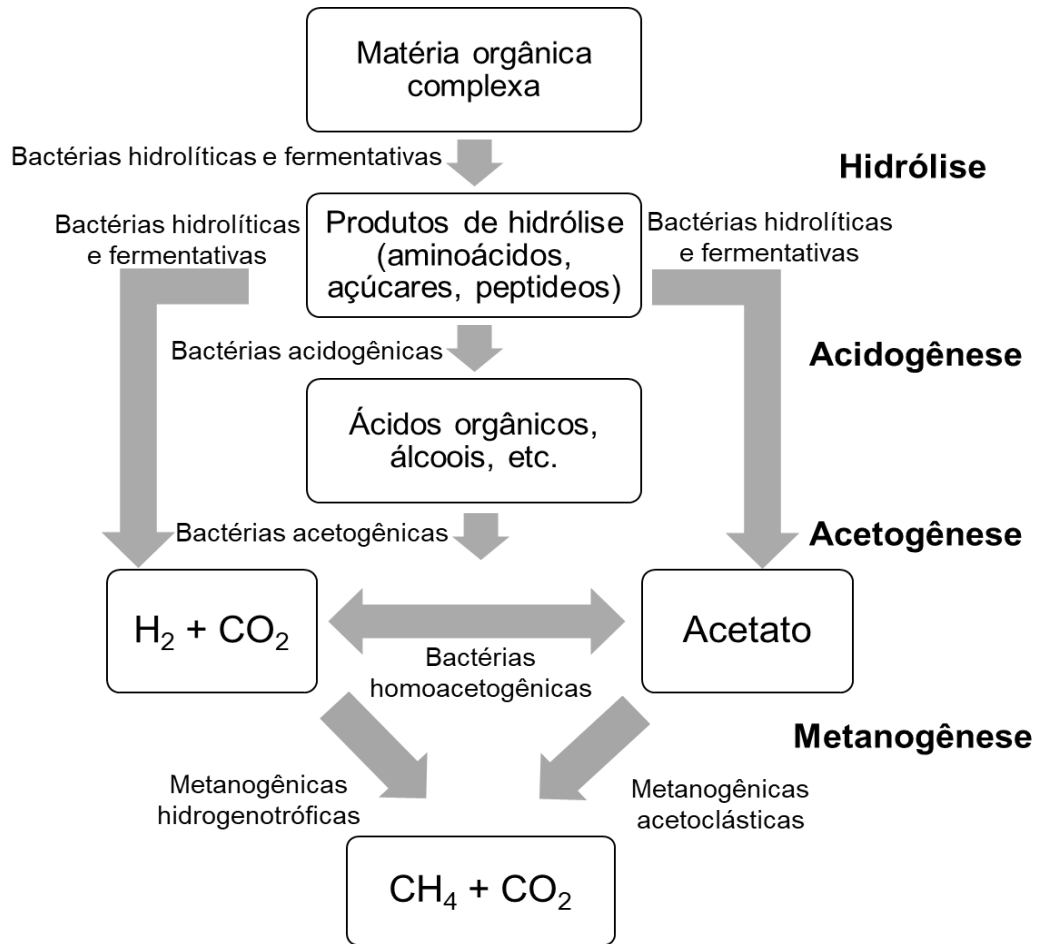
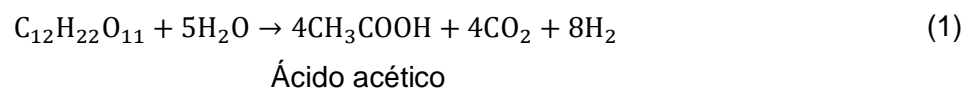
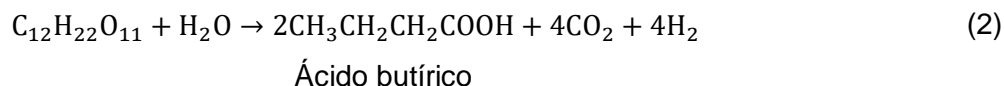


Figura 2 Fluxo esquemático das principais etapas do processo de digestão anaeróbia. Fonte: Adaptado Sá et al. (2014).

Uma grande variedade de materiais ricos em carboidratos, lipídios e/ou proteínas pode ser utilizada como substratos na produção de H_2 por via biológica. No entanto, conforme descrito por Sá et al. (2014), os carboidratos constituem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo. Disponibilidade, custo e biodegradabilidade constituem os principais critérios para seleção de substratos adequados à produção de H_2 fermentativo. Carboidratos simples, como sacarose, são facilmente biodegradáveis, sendo, por esse motivo, utilizados como substratos modelo para a produção de hidrogênio biológico.

No caso da sacarose, as seguintes vias de degradação podem ocorrer em processos fermentativos de produção de gás hidrogênio: (i) consumo de sacarose e geração de ácido acético e (ii) consumo de sacarose e geração de ácido butírico, conforme descrito nas Equações 1 e 2:

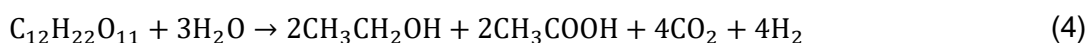
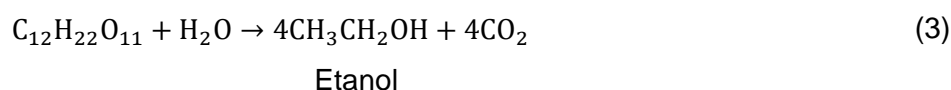




A conversão teórica máxima de sacarose em hidrogênio é igual a 1 mol de sacarose, que gera 8 moles de gás hidrogênio na produção do ácido acético. No entanto, a geração de 4 moles de hidrogênio por mole de sacarose consumida ocorre se a sacarose for convertida em ácido butírico. Então, a principal produção teórica de hidrogênio visualiza o acetato como o produto final da fermentação.

Por outro lado, na prática, a alta produção de hidrogênio está relacionada à mistura de produtos de fermentação, como ácidos acético e butírico; e a baixa produção de hidrogênio está associada à formação de ácido propiônico e produtos finais menos reduzidos, como álcoois e ácido láctico.

A fermentação da sacarose pode assumir a rota de produção de etanol, conforme a Equação (3), na qual não ocorre produção de hidrogênio; a rota de produção de etanol e hidrogênio, concomitantemente, apresentada na Equação (4), com rendimento máximo de produção de 4 mol H₂ mol⁻¹ sacarose.



A capacidade dos microrganismos atuarem na decomposição de um determinado substrato em H₂ está relacionada à presença de enzimas específicas, tais como as hidrogenases. Segundo Sá et al. (2014), essas enzimas são responsáveis pela catálise da reação reversível de oxidação do hidrogênio (Equação 5).



3.3 Fatores que influenciam a produção de biohidrogênio

Muitos fatores influenciam a produção de hidrogênio, tais como fonte de carbono, inóculo, tipo de reator, temperatura, pH e as condições operacionais dos reatores, que são parâmetros determinantes à evolução de comunidades produtoras de hidrogênio (WANG & WAN, 2009; HUNG et al., 2011).

3.3.1 Importância do Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH é um fator importante que influencia a síntese de hidrogênio em sistemas biológicos. Estudos mostraram que variações no pH têm efeito sobre o metabolismo microbiano, por exemplo, na eficiência de degradação do substrato, na síntese de proteínas, na liberação de metabólitos pela célula, na atividade das enzimas hidrogenases e nas rotas metabólicas envolvidas no processo (KARADAG & PUHAKKA, 2010; LEAÑO & BABEL, 2012).

O potencial hidrogeniônico, em uma faixa apropriada entre 4,0 e 7,0, pode aumentar a capacidade das bactérias produtoras de hidrogênio durante a produção fermentativa; mas, em níveis muito mais altos, entre 10 e 14, pode diminuir a produção (WANG & WAN, 2009).

Estudos mostram que o pH ótimo, em termos de produção de hidrogênio, se encontra na faixa de 5 a 7, sendo o pH em torno de 5,5 relacionado aos melhores rendimentos de produção de hidrogênio (GINKEL et al., 2001; KHANAL et al., 2004). O pH dentro da faixa supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do hidrogênio, bem como permite a inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio, presentes no meio fermentativo (LI & FANG, 2007; VALDEZ-VAZQUEZ & POGGI-VARALDO 2009).

Como mostra a Tabela 2, existe certa discordância quanto ao pH inicial ideal para a produção fermentativa de hidrogênio. De acordo com Wang & Wan (2009), é possível que a razão para essa divergência esteja na diferença entre esses estudos, principalmente, nas condições de inóculo, substrato e faixa inicial de pH estudada.

Tabela 2 Resumo dos valores de pH estudados pela literatura e a sua influência na produção de H₂ a partir de substrato de sacarose.

Inóculo	pH		T (°C)	Rend. máx.	Referência
	Intervalo	Ótimo			
Lodo anaeróbio	4,9 a 6,7	4,9	39	2,5 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Chen et al. (2009)
Lodo anaeróbio de UASB	3,4 a 6,3	4,2	40	1,6 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Mu et al. (2006)
Lodo anaeróbio de UASB	6,1 a 9,5	7,0	39	1,6 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Zhao & Yu (2008)
Lodo anaeróbio de UASB	4,7 a 6,3	5,5	33	3,7 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Wang et al. (2005)

Conforme apresentado na Tabela 2, os valores ótimos de pH convergem para aproximadamente 5,5. Esses resultados da literatura estão alinhados com o que Sivagurunathan et al. (2016) apontam em relação às bactérias do gênero *Clostridium* spp., notáveis produtores de H₂, as quais possuem várias rotas metabólicas, que são acopladas à hidrogênese e favorecem a faixa de pH ácido, principalmente 5,5 ± 1, enquanto que reações não hidrogênicas, geralmente, são desencadeadas fora desse intervalo.

3.3.2 Efeito da Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes que exerce influência na produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia. Demonstra-se que o acréscimo da temperatura pode aumentar a capacidade das bactérias produtoras de hidrogênio, pois influencia significativamente a taxa de biodegradação do substrato, a atividade das enzimas produtoras de hidrogênio (por exemplo, hidrogenases) e o metabolismo dos produtores de H₂. No entanto, quando a temperatura se encontra em níveis muito altos, pode ocorrer um decréscimo na produção, pois temperaturas extremamente altas (por exemplo, > 60°C) podem inibir os produtores de H₂ via inativação de enzimas essenciais para o crescimento celular, bem como desnaturação de proteínas celulares (WANG & WAN, 2008; ELBESHISHY et al., 2017).

A temperatura de operação pode até mudar as vias metabólicas, à medida que diferentes bactérias se tornam predominantes em diferentes temperaturas. Verificou-se que o aumento da temperatura dos reatores de fermentação escura, dentro de uma faixa adequada, pode aumentar significativamente a produção de H₂, uma vez que a alta temperatura de operação pode suprimir a atividade dos consumidores de H₂, como bactérias metanogênicas e homoacetogênicas (ELBESHISHY et al., 2017).

As reações de fermentação, visando à produção de biohidrogênio, podem ser conduzidas em faixas de temperaturas mesofílicas (25-40°C), termofílicas (40-65°C), termofílicas extremas (65-80°C) e hipertermofílicas (>80°C) (ELBESHISHY et al., 2017). Entretanto, em diversos trabalhos, que apresentam a maior diversidade de microrganismos produtores de hidrogênio, são utilizadas temperaturas mesofílicas (LEVIN et al., 2004).

3.3.3 Influência do tempo de detenção hidráulica (TDH)

A influência da TDH na produção de H₂ vem sendo extensivamente investigada na literatura. Sua influência nos diferentes processos que afetam a produção de H₂ tem sido avaliada, considerando principalmente a capacidade de induzir um balanço de biomassa favorável à produção de H₂.

Nesse contexto, segundo Show et al. (2011), o TDH é um fator operacional que pode ser usado como uma ferramenta para selecionar populações microbianas, cujas taxas de crescimento são capazes de acompanhar a diluição mecânica criada pela vazão contínua. Nesse sentido, para manter a produção específica de hidrogênio, a partir das bactérias anaeróbias, e inibir a atividade metanogênica, é importante operação em baixos valores de TDH, pois contribui para a lavagem das arqueas metanogênicas dos reatores (CHANG et al., 2002; LEE et al., 2003; CHEN et al., 2004; BARROS et al., 2010).

A lavagem de bactérias produtoras de metano para fora dos reatores pode se efetivar devido à sua velocidade específica de crescimento (μ) - cerca de $0,4 \text{ dia}^{-1}$ (ou $0,0167 \text{ h}^{-1}$) - ser muito inferior a das bactérias acidogênicas, que é de aproximadamente $0,083 \text{ h}^{-1}$. Dessa forma, a sua taxa específica de crescimento pode provocar o arraste completo das arqueas metanogênicas, enquanto que a população de produtoras de hidrogênio permanece no sistema (CHEN et al., 2001). Para Lo et al. (2009), o valor encontrado para a taxa de crescimento específico, típica de bactérias produtoras de metano, foi de cerca de $0,0167$ a $0,02 \text{ h}^{-1}$, muito mais baixa que a de bactérias produtoras de hidrogênio, de cerca de $0,172 \text{ h}^{-1}$. Portanto, isso significa que o TDH é capaz de inibir a metanogênese na produção de hidrogênio por digestão anaeróbia.

Do ponto de vista da influência do TDH na formação de metabólitos, Zhang et al. (2006) descobriram que a diminuição do TDH reduziria a diversidade microbiana associada à inibição da produção de ácido propiônico, sem afetar a existência de espécies dominantes, levando a um aumento no rendimento de hidrogênio.

Dessa forma, os mesmos autores afirmam que o rendimento de hidrogênio pode ser considerado uma função das populações microbianas da cultura; nesse contexto, o TDH é um fator que afeta a comunidade microbiana em certa medida e, por sua vez, representa um impacto ao rendimento da produção de hidrogênio. Com base nos resultados experimentais obtidos, os autores concluíram que o TDH desempenha uma função de seleção hidrodinâmica significativa nas populações microbianas mistas. Uma população microbiana estável foi alcançada lavando as bactérias produtoras de ácido propiônico, à medida que a TDH foi reduzida para 6 h. Um aumento no rendimento de hidrogênio de 1,6 para $1,9 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose foi medido quando a TDH foi diminuída de 8 para 6 h.

Em outro estudo, que evidencia a relação do TDH e a produção de H_2 , ilustrado por Salem et al. (2018), os autores conseguiram mostrar que a produção de H_2 a partir de água residuária de sacarose e batata foi significativamente influenciada pela redução do TDH nos intervalos de 24, 18 e 12 h. Os resultados indicaram que a taxa de produção de hidrogênio aumentou com a diminuição do TDH. Valores ótimos de rendimento de hidrogênio de $320 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ (sacarose) e $150 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SV}$ (batata) foram alcançados para TDH de 18 h.

3.3.4 Influência do Substrato

A fonte de carbono orgânico selecionada para a produção de hidrogênio é de fundamental importância, uma vez que sua composição define o rendimento do processo. Segundo estudo realizado por Dong et al. (2009), podem ser utilizados materiais ricos em carboidratos, proteínas, lipídios e materiais biodegradáveis, no entanto, os carboidratos constituem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo.

O teor de carbono, em diferentes tipos de água residuária, difere amplamente, assim como o rendimento e a taxa de produção de biohidrogênio. Taxa e rendimento variáveis não podem necessariamente garantir a sustentabilidade à produção de biohidrogênio. Águas residuárias ricas em carbono são requisitos necessários para a sustentabilidade do processo de produção de hidrogênio (LUCAS et al., 2015; KAN, 2013).

Disponibilidade, custo e biodegradabilidade constituem os principais critérios para a seleção de substratos adequados para a produção de hidrogênio por processos fermentativos (HAWKES et al., 2002). Carboidratos simples, como sacarose e glicose, são utilizados como modelo para a produção do biohidrogênio (GINKEL et al., 2005; KIM et al., 2006; SREETHAWONG et al., 2010). No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para a produção de hidrogênio em grande escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo (DAS; VEZIROGLU, 2008). Porém, vale ressaltar a importância da utilização de fontes puras nas investigações de fermentação biológica, que possibilita maior controle sobre o processo, com intuito de estabelecer referenciais teóricos que auxiliarão na aplicação das tecnologias em efluentes reais.

Alguns substratos complexos, como resíduos industriais ricos em matéria orgânica, não são ideais para a produção fermentativa de hidrogênio, devido à sua complexidade. No entanto, depois de serem pré-tratados por alguns métodos, eles podem ser facilmente usados por bactérias produtoras de hidrogênio. O ultrassom, acidificação, congelamento e descongelamento, esterilização e inibição da atividade metanogênica e micro-ondas são métodos de pré-tratamento comumente usados para tal fim (WANG & WAN, 2009).

Além dos aspectos qualitativos a serem considerados para um melhor aproveitamento do substrato, com o objetivo de produzir H₂, a quantidade de substrato deve ser objeto de estudo, pois a literatura tem evidenciado limitações da carga de substrato aplicada em reatores anaeróbios.

Os resultados da literatura, em geral, mostram que o aumento das concentrações de substrato dentro de uma faixa ideal geralmente melhora a produção de H₂ na fermentação escura. No entanto, altas concentrações de substrato podem ser desfavoráveis à produção

de H₂, uma vez que a atividade dos microrganismos produtores de hidrogênio pode ser inibida de várias maneiras, incluindo o acúmulo de ácidos graxos voláteis, menor pH intracelular e alta pressão parcial de H₂. Portanto, a otimização da concentração de substrato ou da razão alimento/microrganismo é crítica para evitar a inibição da produção de H₂ pelo substrato (ELBESHISHY et al., 2017).

A Tabela 3 apresenta um resumo das concentrações inibitórias de substrato relatadas na literatura.

Tabela 3 Revisão da literatura relacionada a influência da concentração de sacarose como substrato para produção de hidrogênio.

Inóculo	Concentração do Substrato (g DQO L ⁻¹)			T (°C)	Oper.	Rend. máx. mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Ref.
	Intervalo	Ótimo	Inibição				
Composto	1,5 a 45	7,5	45	37	Batelada	4,9 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Ginkel et al. (2001)
Lodo anaeróbio de esgoto	10 a 60	30	35	35	Contínuo	1,2 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Kim et al. (2006)
<i>Clostridium butyricum</i>	5 a 30	20	30	37	Batelada	2,8 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Chen et al. (2004)
Autofermentação	2 a 4	2	4	25	Contínuo	0,6 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Gomes et al. (2015)
Autofermentação	1 a 16	16	2	30	Contínuo	2,2 mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	Anzola- Rojas et al. (2016)

A Tabela 3 evidencia que a maioria dos trabalhos que avaliou a influência da carga de substrato sobre produção de H₂ aponta que as concentrações mais extremas das faixas estudadas representam fator inibitório na geração de H₂.

Essas conclusões também são encontradas por Maintinguer et al. (2008). No referido trabalho, os autores, ao estudarem diferentes condições de concentração de sacarose (630 a 4128 mg L⁻¹), identificaram que as condições 630 e 1184 mg L⁻¹ apresentaram geração de H₂ nas primeiras horas de operação, indicando que as concentrações do substrato não eram inibidoras. A condição com concentração de 4128 mg L⁻¹ apresentou taxas reduzidas de produção de H₂. Portanto, o estudo concluiu que as condições impostas de altas concentrações de substrato tornaram-se tóxicas para os consórcios purificados, causando lentidão ao processo de geração de H₂.

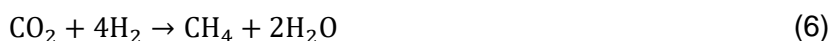
Além disso, os mesmos autores verificaram que o substrato também influenciou o rendimento da produção molar de H₂. A melhor eficiência da conversão da sacarose em H₂ foi obtida na condição 1184 mg L⁻¹. A atividade específica máxima da produção de H₂ foi observada na condição 1816 mg L⁻¹ de sacarose.

3.3.5 Efeito do Inóculo

A produção biológica de hidrogênio pode ser realizada por meio de culturas puras, selecionadas a partir de bactérias produtoras de hidrogênio, ou através de culturas microbianas mistas derivadas de ambientes naturais. No ambiente natural, as bactérias produtoras de hidrogênio podem ser encontradas no solo e em lodos de estações de tratamento de águas residuárias, que utilizam a tecnologia anaeróbia (WANG & WAN, 2009).

Os processos fermentativos que utilizam culturas mistas apresentam vantagens do ponto de vista econômico e operacional, quando comparados com processos operados com culturas puras. Além disso, apresentam como vantagem a possibilidade de utilização de uma ampla variedade de substratos (WANG & WAN, 2009). A desvantagem na utilização de culturas mistas está relacionada à presença, sempre provável, de arqueas metanogênicas, bactérias homoacetogênicas e as bactérias redutoras de sulfato e nitrato, que consomem o hidrogênio produzido pelas bactérias fermentativas acidogênicas (SHOW et al., 2012).

Como já mencionado, o metano é uma causa comum de instabilidade e baixo desempenho em reatores produtores de H₂. Os organismos metanogênicos hidrogenotróficos, relacionados aos gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*, foram identificados nos sistemas produtores de H₂, consumindo H₂ como doador de elétrons para reduzir o CO₂ ao metano. Nesse sentido, na reação estequiométrica para a produção de metano, 4 moles de H₂ são consumidos para produzir 1 mol de metano, dificultando significativamente a produção de H₂ (Equação 6).



Baseado nessas informações, Castelló et al. (2020) concluíram que a instabilidade na produção de hidrogênio pode estar principalmente ligada aos aspectos bióticos do processo (ou seja, alterações na composição da comunidade microbiana, presença de organismos que consomem hidrogênio e competem pelo substrato e acúmulo de produtos de fermentação), independentemente da configuração do reator. No entanto, alguns problemas, como crescimento excessivo de microrganismos e presença de biomassa metanogênica, foram relatados principalmente em reatores de leito fixo.

3.3.6 Tipo de reator

Embora a maioria dos estudos de fermentação escura venha sendo realizada por operação em batelada, também são relatadas, de forma expressiva, operações contínuas usando diferentes substratos e consórcios microbianos. A operação em sistemas de reatores contínuos fornece qualidade constante do produto, taxa de produção e rendimento com altas produtividades no estado estacionário, em comparação com a fermentação em reatores por batelada (ARGUN & KARGI, 2011).

A maioria dos estudos tem focado em batelada principalmente pelo motivo facilidade e flexibilidade, gerando uma série de trabalhos com diferentes resíduos à produção de hidrogênio (GUO et al., 2010; WANG & WAN, 2009). No entanto, para operações em grande escala, são requeridos processos de produção contínua por razões práticas de engenharia (WANG & WAN, 2009).

Por essa razão, a configuração do reator é considerada imprescindível ao rendimento do processo fermentativo de produção de hidrogênio, visto que influencia a retenção da biomassa, o comportamento hidrodinâmico, a população microbiana e a efetividade do contato substrato/biomassa (BABU; MOHAN; SARMA, 2009; REN et al., 2011).

Entre os reatores contínuos, os mais utilizados são o CSTR (*continuously stirred-tank reactor*), o UASB (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*), o EGSB (*expanded granular sludge-bed reactor*), o AFBR (*anaerobic fluidized-bed reactor*) e o RCTM (reator contínuo de tubos múltiplos), que apresenta uma configuração inovadora. A Tabela 4 apresenta as principais vantagens e desvantagens de cada configuração, com ênfase sobre a produção de hidrogênio.

As principais desvantagens de cada tipo de reator, apontadas na Tabela 4, são direcionadas ao balanço de biomassa. De fato, o crescimento e acúmulo de biomassa representam aspectos fundamentais à produção de H₂. De acordo com Castelló et al. (2020), a diversidade de comunidades microbianas pode ser afetada pela tecnologia do reator. Reatores do grupo, que operam com retenção de biomassa em grânulos, como é o caso do UASB, EGSB e AFBR, apresentaram uma diversidade maior em comparação ao observado em reatores com biomassa suspensa, como os reatores CSTR. No entanto, ainda não está claro na literatura se é mais conveniente ter uma alta diversidade ou ter comunidades altamente especializadas, que possam garantir elevada produtividade.

Tabela 4 Resumo das características operacionais de cada tipo de reator contínuo na produção de hidrogênio.

Tipo de Reator	Vantagens	Desvantagens	Parâmetros operacionais
CSTR	- Fácil projeto e operação; - Fácil controle de pH e TDH.	-Valores pequenos de TDH limitam a concentração de biomassa no interior do reator (instabilidade na operação); -Crescimento e acúmulo de organismos metanogênicos; -Falta de controle no surgimento de reações de homoacetogênese.	COVa = 10 a 99 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 6 h a 3,5 d PVH = 0,5 a 13,7 L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ pH = 4,5 a 6
AFBR	-Alta capacidade de fixação de biomassa; -Evita lavagem de biomassa (< TDH).	-Apresenta limitação na transferência de massa gás-líquido; -Crescimento excessivo de microrganismos.	COVa = 12 a 96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 2 a 24 h PVH = 0,1 a 10,6 L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ pH = 5 a 6,5
UASB ou EGSB	-Maior estabilidade na produção.	- Crescimento e acúmulo de organismos metanogênicos	COVa = 2,4 a 240 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 1,5 a 24 h PVH = 0,7 a 56,8 L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ pH = 4 a 6,6
RCTM*	-Melhor controle sobre a velocidade de escoamento superficial no "leito"	-Baixo TDH; -Altas cargas podem prejudicar a produção de H ₂ .	COVa = 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 2 a 4 h PVH = 0,5 a 1,05 L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ pH = 6,5

Fonte: Adaptado Castelló et al. (2020).

*Gomes et al. (2015).

Ainda nesse contexto, em torno da capacidade de retenção de biomassa no interior de cada reator, Show et al. (2011) destacam que o CSTR é incapaz de manter altos níveis de biomassa fermentativa, por causa do padrão operacional rapidamente agitado. A lavagem da biomassa pode ocorrer em curtos TDH, portanto, as taxas de produção de hidrogênio são consideravelmente restritas.

Castelló et al. (2020) tentam explicar isso de maneira mais clara, ao afirmar que, nos reatores CSTR, o TDH é igual à TRS, o que implica que apenas a biomassa com um tempo duas vezes menor que o TDH será retida no reator. Em reatores com retenção de biomassa, como UASB, EGSB, AFBR e RCTM, o TDH também afeta a comunidade microbiana; o TDH ideal depende principalmente dos substratos utilizados estarem entre 4 e 24h na maioria dos casos.

Apesar das inúmeras pesquisas na área, em todos os casos, as produções de hidrogênio apresentaram-se inferiores à produção teórica. Essa baixa eficiência de conversão, que gira em torno de 50%, deve estar associada tanto ao consumo de hidrogênio pelas

arqueas metanogênicas (devido ao alto valor do pH), quanto à síntese de acetato via homoacetogênese e à síntese de etanol. Essa constatação sugere que muitas alterações ainda devem ser feitas nas configurações dos reatores, a fim de otimizar os processos de produção de hidrogênio (FERNANDES, 2008).

Dentre as configurações de reatores citadas, o emprego do reator anaeróbio de leito fixo na produção de hidrogênio tem sido objeto de vários estudos. Nessa configuração, a literatura tem direcionado esforços às investigações de fatores como material suporte, porosidade do leito, TDH (FERNANDES, 2008; ANDREANI et al., 2015), condição de mistura (LIMA e ZAIAT, 2012), origem e formas de pré-tratamento do inóculo (PENTEADO et al., 2013), concentração de cálcio (CARMINATO, 2013), relação carbono/nitrogênio e controle da carga orgânica volumétrica específica (COVe) (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). Nesse último trabalho, os autores obtiveram rendimento máximo de $2,3 \pm 0,2$ mol mol⁻¹ sac (sacarose consumida), operado em fluxo ascendente, TDH de 2h, concentração do substrato de 2 g DQO L⁻¹, perfazendo uma carga orgânica volumétrica (COVa) de 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e controlando a COVe média em $4,4 \pm 0,8$ g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹.

A partir da averiguação dos resultados obtidos por Anzola-Rojas et al. (2015), na operação do reator anaeróbio de leito fixo, em diferentes condições, foram identificadas anomalias hidrodinâmicas (curtos circuitos e zonas mortas), devido ao acúmulo de biomassa que pode ter dificultado a liberação do biogás produzido (FERNANDES, 2008; CARMINATO, 2013) e provocado a diminuição constante da COVe (ANZOLA-ROJAS, 2014). Reduzidos valores de COVe resultam na baixa disponibilidade de substrato para os organismos, sendo que alguns, que possuem a capacidade de viver heterotrófica e autotroficamente, podem potencializar a rota autotrófica, com conseqüente consumo de H₂ e CO₂ (DRAKE; KÜSEL; MATTHIES, 2002; DRAKE; GÖBNER; DANIEL, 2008). Além disso, a utilização da energia pode ser redirecionada para o crescimento e manutenção celular, ao invés da produção de biogás. Diante disso, os autores verificam a necessidade de descarte da biomassa acumulada em quantidades adequadas, pois a retirada excessiva de lodo pode causar a desestabilização do sistema.

3.4 Carga orgânica volumétrica específica (COVe)

O relato feito pela literatura de problemas de instabilidade da produção de H₂, associados ao crescimento excessivo de biomassa, pode ser considerado um dos principais argumentos para explicar o insucesso na tentativa de se impedir a tendência de decréscimo na produção de H₂ e, por conseguinte, na manutenção de produções a longo prazo. Anzola-Rojas (2014) exemplifica que, na condição de acúmulo excessivo de microrganismos no

reator, isso poderá ocasionar baixa disponibilidade de compostos orgânicos para os organismos, sendo que alguns que possuem a capacidade de viver heterotroficamente e autotroficamente passam a potencializar a rota autotrófica, com consequente consumo de H_2 e CO_2 . Portanto, o controle da relação alimento/microrganismo (A/M), ou também denominada COVe (carga orgânica volumétrica específica), é fundamental para a produção de H_2 em condições de maior tempo de operação.

Em operações de longo prazo, de acordo com Ferraz Jr. et al. (2015), o crescimento natural de biomassa pode reduzir a COVe, afetando negativamente a produção de hidrogênio. Isso quer dizer que, assumindo uma constante concentração inicial do substrato, a sua disponibilidade pode diminuir devido ao crescimento natural da biomassa, resultando em diminuição na quantidade de hidrogênio liberado na fase gasosa. Portanto, a COVe representa um parâmetro extremamente importante, pois os valores obtidos da relação A/M podem induzir mudanças microbianas, levando a aumentos no rendimento de biomassa; porém, esse aumento não está relacionado necessariamente aos produtores de hidrogênio.

Dessa forma, a COVe, determinada como a quantidade de substrato aplicada por microrganismo, em função do tempo ($g \text{ Sac } g^{-1} \text{ SSV } d^{-1}$), ainda pouco discutida na literatura, tem sido evidenciada como um importante fator de influência à produção contínua e estável de biohidrogênio. A sobrecarga em termos de COVe pode apresentar influência direta na conversão do substrato, inibição e mudanças nas rotas metabólicas dos microrganismos (ANZOLA-ROJAS, 2014). Os valores ótimos de COVe dependem de vários fatores, como pH, tipo e concentração do substrato e do inóculo, temperatura e tipo de reator (ARIMI et al., 2015).

As investigações mencionadas corroboraram para uma nova abordagem de controle do processo, direcionada em função da COVe, evidenciando uma nova linha de pesquisa, diferente dos trabalhos anteriores, que indicaram que a COVa era o principal fator de influência sobre o rendimento e a produção estável do hidrogênio (KIM; HAN; SHIN, 2006; SHEN; BAGLEY; LISS, 2009; AMORIM et al., 2009; HAFEZ et al., 2010).

De modo geral, o parâmetro da COVe pode atingir valores desfavoráveis para a produção de hidrogênio em concentrações excessivamente baixas e altas de biomassa no reator (HAFEZ et al., 2010; ANZOLA-ROJAS et al., 2015).

Hafez et al. (2010) relataram taxas de produção de hidrogênio para valores de COVe, variando de 4,4 a 6,4 $g \text{ DQO } g^{-1} \text{ SSV } d^{-1}$, usando glicose como fonte de carbono. Os autores mencionados também observaram uma diminuição no desempenho do sistema, quando aplicado uma COVe de 8,5 e 12,1 $g \text{ DQO } g^{-1} \text{ SSV } d^{-1}$. Resultados semelhantes foram observados por Anzola-Rojas et al. (2015) e melhores respostas, com relação à produção de hidrogênio, foram obtidas com uma COVe de 6,0 g de sacarose $g^{-1} \text{ SSV } d^{-1}$ (6,72 $g \text{ DQO } g^{-1}$

SSV d⁻¹). Nesse caso, as condições testadas incluíram valores de COVe de 3,9, 4,7, 6,0, 8,5 e 12,4 g de sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹.

Diante dessas evidências, diferentes estratégias operacionais de controle da COVe e das características hidrodinâmicas devem ser estabelecidas para obtenção da produção contínua e estável de hidrogênio. A manipulação desses fatores está vinculada a parâmetros como a direção do escoamento, a COVa, o TDH, a concentração do substrato e a configuração do reator.

Considerando as dificuldades de manter os valores de COVe na faixa recomendada pela literatura, configurações inovadoras de reatores devem ser propostas para fornecer simultaneamente uma lavagem controlada de biomassa e manter uma concentração adequada de microrganismos ativos dentro do reator. Dentro desse contexto, uma nova configuração de reator em tubos múltiplos foi investigada para a produção de hidrogênio, a partir de processo fermentativo de meio sintético e água residuária de farinha de mandioca. Essa configuração, apresentada por Gomes et al. (2015), tem como diferencial a descarga contínua da biomassa, devido à alta velocidade superficial no interior dos tubos, que pode evitar o acúmulo de biomassa e auxiliar na manutenção da COVe. Além disso, a disposição em tubos disponibiliza maior superfície de contato para a fixação da biomassa, dispensando a necessidade de meio suporte.

Nessa configuração, os fatores de influência investigados foram: TDH, material suporte na câmara de saída, diferentes concentrações do meio sintético, em termos de DQO (GOMES et al., 2015), tratamento térmico do substrato, estratégias de alimentação e suplementação de nutrientes (GOMES et al., 2016). Apesar do reator em tubos múltiplos demonstrar grande potencial, devido à possibilidade de controle da concentração de biomassa no sistema, as produções foram caracterizadas por instabilidade e curtos períodos; além disso, os rendimentos máximos observados não superaram 0,6 mol H₂ mol⁻¹sacarose.

Os autores atribuíram o baixo desempenho do reator às características da superfície interna dos tubos, que não atenderam às condições adequadas para a imobilização da biomassa e que devem ser melhoradas. A aplicação de COVa de 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹, em ensaios com meio sintético, resultou em valores de COVe em intervalo de 39,74 a 3,15 g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, sendo que, na maior parte dos ensaios, os valores encontravam-se acima do recomendado, o que pode ter implicado em baixo rendimento de hidrogênio por excesso de substrato.

Hafez et al. (2010) e Dhar et al. (2015) relataram, em estudos com reatores, operados em regime de batelada, que as taxas de alimento/microrganismo (F/M, g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹), superiores a 6,0, podem diminuir substancialmente o rendimento de H₂ na fermentação de culturas mistas, em ambos os substratos sintéticos e resíduos orgânicos reais.

De acordo com Aquino et al. (2017), a COVe é um parâmetro ideal para comparar reatores com condições operacionais equivalentes, pois fornece um entendimento mais preciso da capacidade de tratamento dos sistemas, refletindo a eficácia real da biomassa ao lidar com as diferentes cargas de substrato.

Como mostrado na Tabela 5, existe certa variação quanto aos valores de COVe, encontrados na literatura, para a produção de hidrogênio. Dependendo do tipo de água residuária, COVe de 10 a 100 g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹, podem estar associadas a condições operacionais estáveis em sistemas acidogênicos (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FUESS et al., 2016; BLANCO et al., 2017).

Tabela 5 Resumo dos valores de COVe encontrados na literatura e a sua influência na produção de H₂.

Tipo de Substrato	Inóculo	COVa ou Concentração de Substrato	TDH	Reator	COVe	Ref.
Glicose	Lodo anaeróbico	6,5-206 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	8 h	CSTR	4,4 - 6,4 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Hafez et al. (2010)
Sacarose	Autofermentação	2 g DQO L ⁻¹	2 h	ASTBR	4,8 g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Anzola-Rojas e Zaiat (2015)
Sacarose	Autofermentação	12 - 96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	2-4 h	ASTBR	3,8 - 6,2 g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Anzola-Rojas et al. (2016)
Vinhaça de cana-de-acúcar	Autofermentação	84,2 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	7,5 h	APBR	6,3 - 6,4 g CH g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Fuess et al. (2016)
Sacarose	Autofermentação	24 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	2 h	ASTBR	4,2 - 6,9 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Blanco et al. (2017)
Vinhaça de cana-de-acúcar	Autofermentação	40 - 120 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	24-4h	ASTBR	2,0 - 7,0 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Fuess et al. (2019)
AR de fecularia de mandioca	Lodo anaeróbico e Autofermentação	10 - 20 g CH L ⁻¹ d ⁻¹	2-4h	AFBR	0,6-5,3 g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹	Corbari et al. (2019)

3.5 Considerações Finais – Revisão de Literatura

A partir das fundamentações em torno da produção de biohidrogênio até aqui apresentadas, é importante reforçar os principais pontos com os quais a presente pesquisa visa contribuir, que são: [i] a obtenção de produções contínuas de H₂, por meio do efeito da mudança estrutural na parede interna dos tubos do RCTM; [ii] o papel da carga de substrato e TDH no crescimento e acúmulo de biomassa e nos valores de produção de H₂; e [iii] a

aplicabilidade da COVe como parâmetro-chave para uma operação estável e eficiente no processo de produção de H₂.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados os materiais utilizados e os procedimentos metodológicos, que auxiliaram no atendimento dos objetivos e verificação da hipótese central, estabelecida na origem do trabalho.

Nos próximos tópicos, segue a descrição das etapas metodológicas, conduzidas no trabalho, conforme inclui:

- i. Preparação de amostras de substrato à base de sacarose;
- ii. Obtenção do inóculo por processo autofermentativo;
- iii. Montagem do aparato experimental para aplicação do substrato e inóculo no RCTM;
- iv. Definição e estabelecimento das condições experimentais e operacionais do RCTM;
- v. Seleção dos parâmetros de desempenho e análise dos dados de produção de H₂.

4.1 Substrato

O substrato utilizado na operação do reator foi água residuária sintética (ARS), à base de sacarose, como fonte de carbono, e solução de nutrientes, proposta por Lima e Zaiat (2012), adaptada por Penteado et al. (2013), conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 Composição da ARS utilizada como substrato.

Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	1781,24
Uréia (CH ₄ N ₂ O)	11,51
Óxido de selênio (SeO ₂)	0,036
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	5,36
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,30
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	2,70
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .6H ₂ O)	2,06
Sulfato de níquel (NiSO ₄ .6H ₂ O)	0,50
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,50
Cloreto férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,25
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .2H ₂ O)	0,04

Fonte: Lima e Zaiat (2012), adaptado por Penteado et al. (2013).

Na composição apresentada na Tabela 6, a ARS apresenta valor de DQO próximo de 2000 mg L⁻¹. Para todos os ensaios, o pH foi ajustado para 6,5 pela adição de 0,25 mL L⁻¹ de solução de ácido clorídrico (HCl) 12 mol L⁻¹ e 500 mg L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

Em todas as condições experimentais, a relação carbono/nitrogênio (C/N) se manteve em 140 mediante a adição de Ureia, conforme Anzola-Rojas (2010). O cálculo dessa relação foi baseado na quantidade de massa de carbono e nitrogênio, presentes na sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) e ureia (CH₄N₂O), respectivamente.

4.2 Inóculo

O inóculo foi obtido por processo de fermentação natural, de acordo com a metodologia descrita por Leite et al. (2008). O procedimento de obtenção consistiu na produção de 15 L de substrato sintético, sendo esse volume mantido à temperatura ambiente (~25 °C), em recipiente aberto por três dias. Decorrido o período de fermentação, o substrato fermentado foi então introduzido no RCTM e recirculado por cinco dias, com o objetivo de induzir a adesão da biomassa nas paredes dos tubos do reator.

O inóculo continha DQO próxima de 2000 mg L⁻¹ e relação C/N de 140 (Anzola-Rojas, 2010), conforme apresentado na Tabela 6. Todos os ensaios foram inoculados com a mesma composição e concentração de meio.

4.3 Reator contínuo de tubos múltiplos e condições experimentais

O aparato experimental foi composto basicamente de: (1) sistema de alimentação da ARS, composto de recipiente para acondicionar a ARS e (2) bomba peristáltica (Grundfos®, 100-240 V, 50/60 Hz, com pressão de 10 bar e vazão máxima de 6 L h⁻¹), para alimentar o RCTM com a ARS afluyente; (3) Reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM); (4) sistema de descarga, constituído por um recipiente para acondicionamento da ARS efluente ao RCTM; e (5) sistema de medição volumétrica de biogás, composto por um selo hídrico e (6) gasômetro (Ritter® MilliGascounter MGC-1 PMMA). O aparato experimental utilizado está ilustrado na Figura 3.

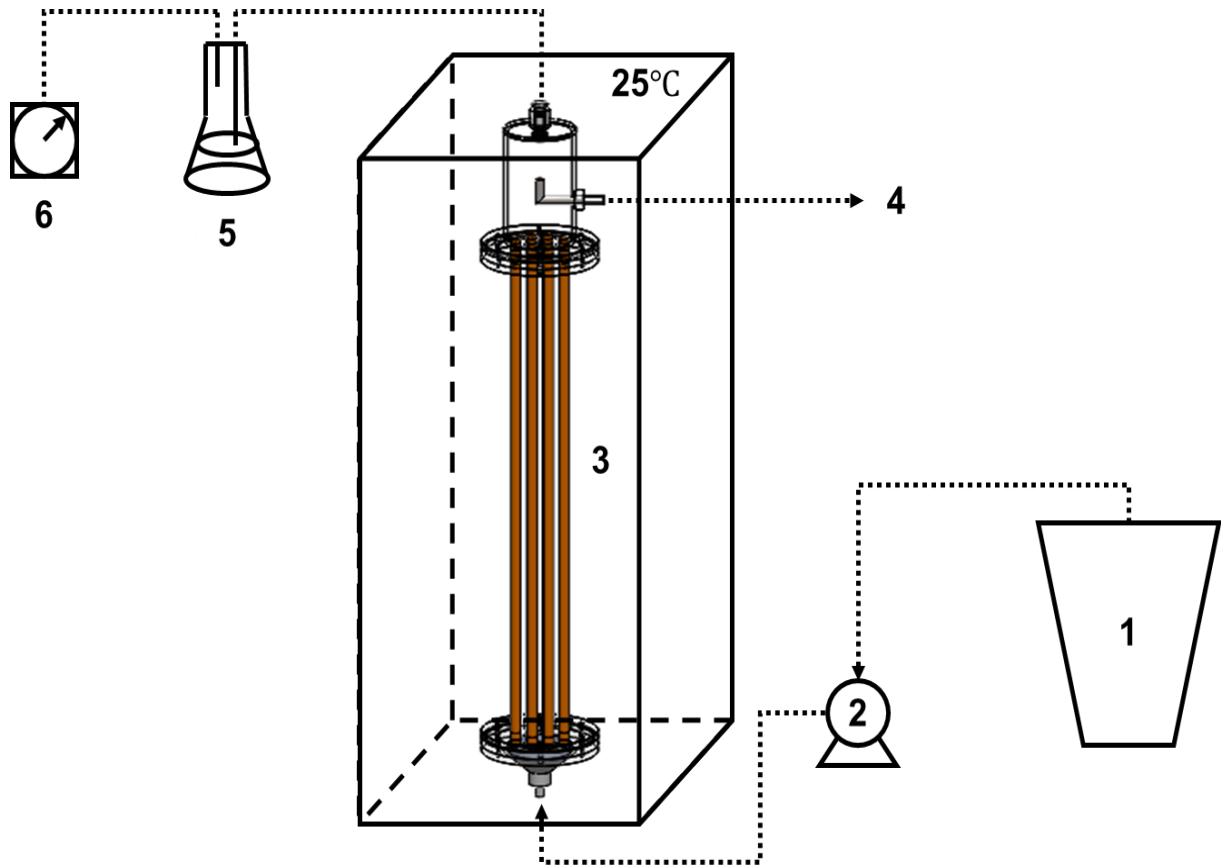


Figura 3 Representação esquemática do aparato experimental. Legenda: 1- reservatório de efluente sintético; 2- bomba peristáltica; 3- reator de tubos múltiplos; 4- coleta de efluente; 5- selo hídrico; 6- gasômetro (Ritter®). Fonte: Adaptado de Gomes et al. 2015.

O RCTM é dividido em três partes: câmaras de entrada e saída, confeccionadas em acrílico, e região intermediária, composta por um conjunto de 12 tubos de PVC, com diâmetro externo e altura de 12 e 680 mm, respectivamente, características mantidas de acordo com Gomes et al. (2015).

A superfície interna dos tubos recebeu ranhuras no formato de rosca sem fim, com o intuito de melhorar a adesão da biomassa. As ranhuras foram realizadas com espaçamento de aproximadamente 0,5 cm e 0,1mm de profundidade.

O volume útil total do reator compreende 1065,5 mL, sendo: 80 mL (câmara de entrada) 545,5 mL (região intermediária dos tubos) + 440 mL (câmara de saída). As características construtivas do reator e a indicação das ranhuras confeccionadas são apresentadas nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

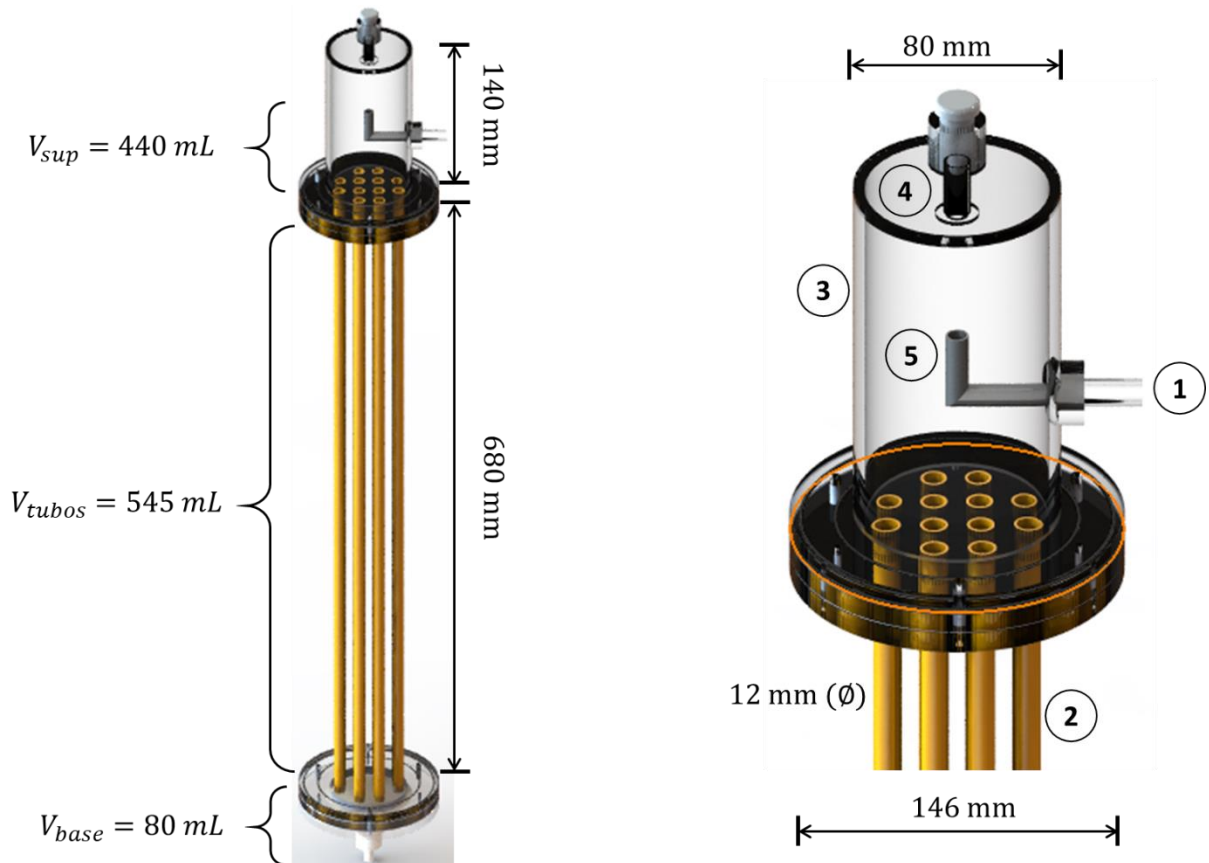


Figura 4 Dimensões e características construtivas do reator. Legenda: 1- descarga do efluente; 2- tubos de PVC; 3- câmara de saída do efluente; 4- saída do biogás; 5- dreno do efluente. Fonte: Elaboração própria.

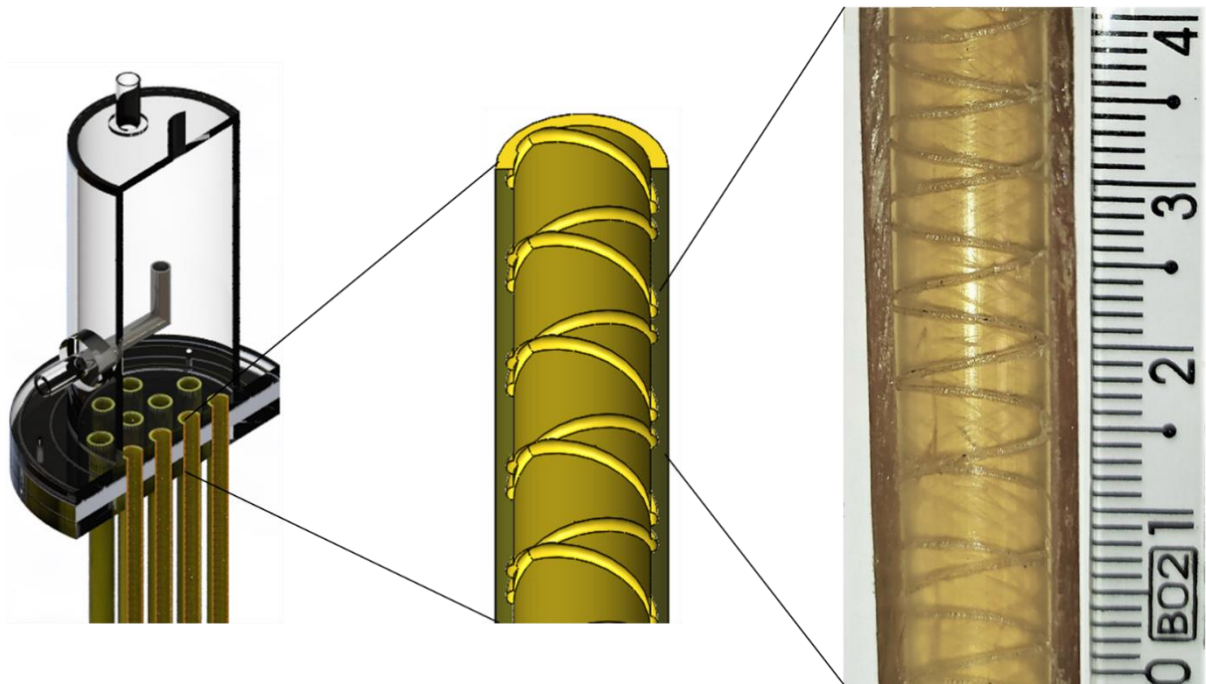


Figura 5 Representação das ranhuras confeccionadas nas paredes internas dos tubos no formato rosca sem fim. Fonte: Elaboração própria.

A Figura 6 representa o aparato montado e em funcionamento, sob condições controladas no laboratório. Simultaneamente, a cada início de condição, eram operados dois ensaios distintos por períodos iguais.

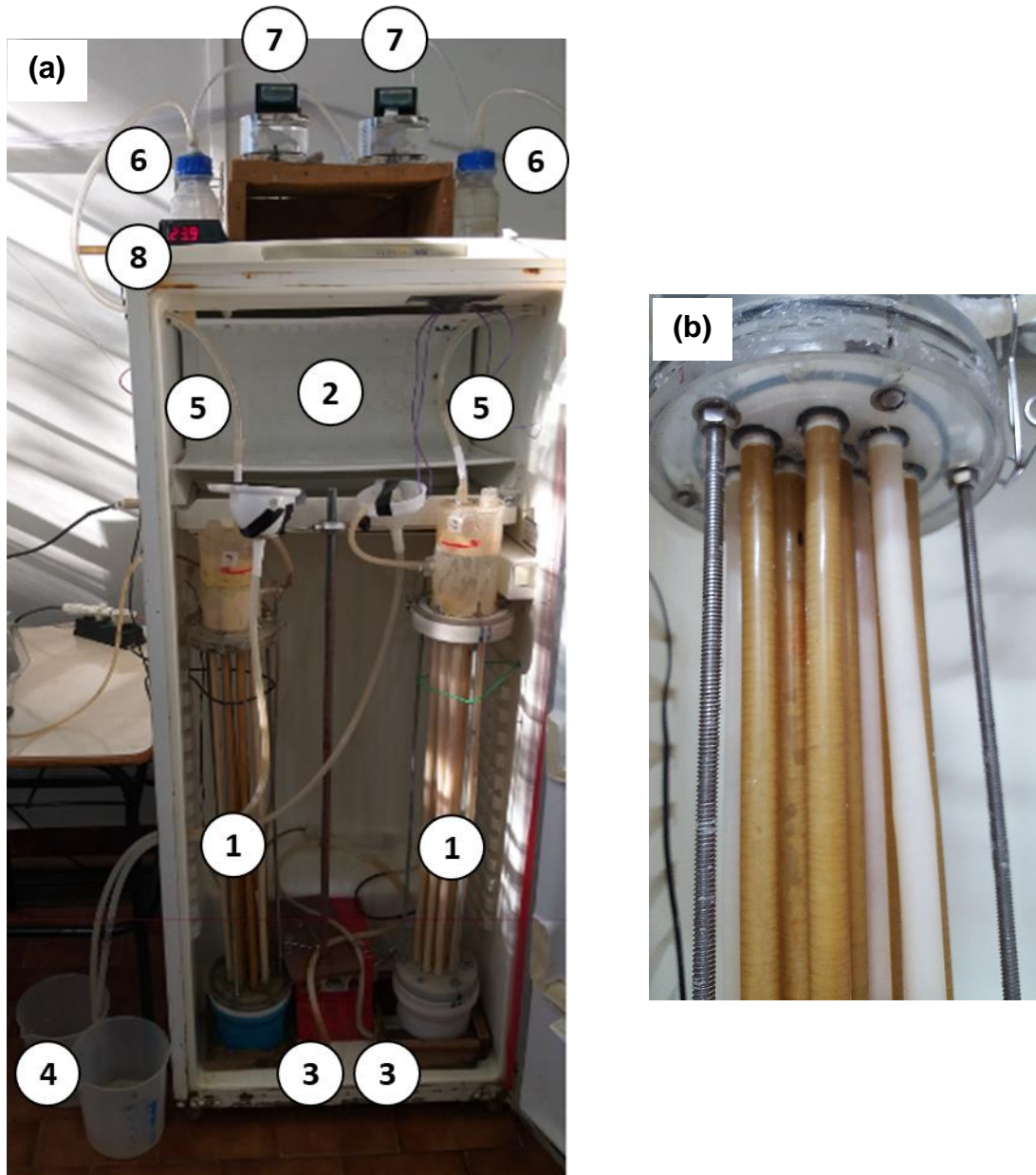


Figura 6 Detalhes do aparato experimental utilizado: (a) aparato experimental em funcionamento; (b) distribuição dos tubos no RCTM. Legenda: 1- RCTM, 2- câmara de temperatura, (3) mangueiras de alimentação, (4) coleta da água residuária acidificada (descarga), (5-6-7) sistema de medição volumétrica de biogás (mangueiras Tygon®, selos hídricos e gasômetros e (8) termostato para controle da temperatura. Fonte: Elaboração própria.

O RCTM foi operado em condições anaeróbias, fluxo ascendente contínuo e mantido em câmara climatizada, à temperatura de 25°C.

Diante do histórico dos ensaios realizados com a configuração do RCTM, utilizado por Gomes et al. (2015), e indicações propostas pela literatura (Anzola-Rojas et al., 2015), os fatores selecionados para a investigação foram tempo de detenção hidráulica (horas) e concentração da ARS de alimentação (em mg L⁻¹ de DQO). Esses fatores foram escolhidos com o intuito de controlar a COVe em valores adequados à produção e estabilidade da produção de H₂, a fim de proporcionar maior dinâmica ao sistema para evitar anomalias hidrodinâmicas.

Para isso, 8 ensaios foram conduzidos e diferenciados por meio da variação do TDH e concentração de ARS, conforme descrito na Tabela 7. Os valores de COVa de cada ensaio (24; 48; 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹) foram calculados em função da concentração do substrato afluente (2000; 4000; 6000; 8000; 12000 e 16000 mg DQO L⁻¹) e do tempo de detenção hidráulica (2 e 4 h).

Tabela 7 Resumo das condições operacionais de cada ensaio utilizando RCTM.

Ensaio	TDH (h)	DQO (mg L ⁻¹)	COVa (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)
E1	2	2000	24
E2	2	4000	48
E3	2	6000	72
E4	2	8000	96
E5	4	4000	24
E6	4	8000	48
E7	4	12000	72
E8	4	16000	96

Na conclusão de cada um dos ensaios (E1 a E8), o reator foi esvaziado e o sistema, o qual inclui o reator, mangueiras, reservatórios e bombas, foi devidamente lavado. Essa limpeza foi realizada antes de cada novo ensaio, cujo início de operação correspondeu ao procedimento de adição de novo inóculo autofermentado ao reator. Esse procedimento teve como objetivo eliminar interferências de eventuais cargas residuais dos ensaios anteriores.

Nos ensaios de maior COVa, 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹, foi adicionado bicarbonato de sódio (NaHCO₃) à concentração de 500 mg L⁻¹ ao afluente, para fornecer alcalinidade ao sistema, tendo em vista que foram observados problemas preliminares na produção de H₂.

4.4 Avaliação do Desempenho do reator: Métodos Analíticos

A avaliação do desempenho do RCTM foi baseada no monitoramento analítico regular de amostras do afluente (ARS) e efluente (ARS acidificada), que constituem a fração líquida do sistema; de amostras do biogás, que constituem a fração gasosa; e de amostras de biomassa, que constituem a fração sólida. Em termos da fase líquida, os parâmetros avaliados foram: pH, demanda química de oxigênio total (DQO_t) e solúvel (DQO_s); teor de sólidos suspensos voláteis (SSV); concentração de sacarose (Sac) e concentração de ácidos orgânicos e álcoois. As metodologias e a frequência amostral das análises, empregadas no monitoramento do reator, são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 Métodos analíticos e frequência de análises empregadas no monitoramento do reator

Parâmetro	Frequência de análises (na semana)	Método	Referência
<i>Afluente e Efluente</i>			
Temperatura	Diária	Potenciométrico	APHA (2005)
pH	2-3x	Potenciométrico	APHA (2005)
DQO _t , DQO _s	2-3x	Digestão/ Espectrofotometria	APHA (2005)
Sacarose	2-3x	Espectrofotometria	Dubois et al. (1956)
Ácidos orgânicos + álcoois	2-3x	Cromatografia Líquida	Penteado (2012)
SSV	2-3x	Gravimétrico/Calcinação	APHA (2005)
<i>Biomassa</i>			
SSV	Final de cada ensaio	Gravimétrico/Calcinação	APHA (2005)
<i>Biogás</i>			
Vazão de biogás	Diária	Volumétrico	-
Composição do biogás	2-3x	Cromatografia Gasosa	Perna et al. (2013)

As análises de DQO_t, DQO_s e SSV foram realizadas segundo os protocolos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). As amostras foram coletadas na entrada (afluente) e saída do reator (efluente), as quais foram filtradas em membrana de 1,22 µm antes de cada análise.

A determinação da sacarose foi conduzida pelo método fenol-sulfúrico, proposto por Dubois et al. (1956), por meio da desidratação do açúcar com o ácido sulfúrico, complexação

dos produtos formados com adição do fenol e leitura da absorbância da solução medida na região visível (488 nm). As leituras foram substituídas na equação gerada a partir da curva padrão de sacarose de intervalo de 5 a 50 mg_{SAC} L⁻¹.

As análises de ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e butírico) e álcoois (etanol e butanol) foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando aparelho da marca Shimadzu®, equipado com uma coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm Bio-Rad), forno CTO-20A a temperatura de 64°C, bomba LC-20AT, controlador CBM-20A e dois detectores ligados em série: um detector de ultravioleta (UV – SDP-20A), com arranjo de diodo para análise de ácidos, e um detector por índice de refração (RID-10A), para análise de álcoois. As amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose, com poro de 0,2 µm e acidificadas com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (2 M), acondicionadas em frasco- padrão de vidro, com capacidade de 2,0 mL, tampa rosqueável e septo de silicone. A fase móvel foi composta por água ultrapura Milli-Q (Millipore®), acidificada com 0,005 M de H₂SO₄ em fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20µL (VONACH et al., 1998; LAZARO et al., 2012; PENTEADO et al., 2013).

A vazão de biogás foi monitorada continuamente por gasômetro modelo MGC-1 (Ritter®), conectado ao *headspace* da câmara de saída do reator. As alíquotas do gás foram coletadas em seringa, com dispositivo de trava (Sigma®), diretamente da mangueira que liga a saída de gás do reator ao gasômetro. A composição do biogás (H₂, N₂, CO₂ e CH₄) foi analisada por Cromatografia Gasosa (sistema da marca Shimadzu®), equipada com coluna capilar Supelco Carboxen® 1010 Plot (30 m, x 0,53 mm x 0,30 µm) e detector de condutividade térmica (TCD), utilizando argônio como gás de arraste (8,0 mL min⁻¹). As temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 230°C, respectivamente. A rampa de aquecimento da coluna foi de 130°C a 135°C, a uma taxa de 46°C min⁻¹, com tempo de corrida aproximado de 6 min; o volume de amostra injetado foi de 500 µL (PENTEADO et al., 2013; PERNA et al., 2013).

As variáveis-respostas, usadas para avaliar o desempenho do reator, foram: pH, eficiência de remoção de DQO_t e DQO_s (ER_{DQO}, em %); eficiência de conversão de sacarose (EC_{SAC}, em %); vazão de biogás (VBG, em mL d⁻¹); produção volumétrica de hidrogênio (PVH, em mL H₂ L⁻¹ d⁻¹); vazão molar de hidrogênio (VMH, em mmol H₂ h⁻¹); rendimento de hidrogênio (HY, em mol H₂ mol⁻¹ sacarose); conteúdo de hidrogênio no biogás (%H₂, em %); e relação ácido butírico/ácido acético (BuH/AcH). No final dos ensaios, foram calculados os valores do rendimento celular de biomassa (Y_{X/S}, em g SSV g⁻¹ sacarose); quantidade de biomassa acumulada no interior do reator (X_n, em gSSV L⁻¹ reator); e o perfil de variação temporal da carga orgânica volumétrica específica (COVe, em gS_c g⁻¹ SSV d⁻¹).

4.5 Desempenho do reator: Cálculos da Produção de Hidrogênio

Neste tópico, são apresentadas as principais fundamentações associadas aos procedimentos de quantificação dos parâmetros de determinação e avaliação do desempenho do RCTM.

A vazão da ARS alimentada no RCTM (Q), em $L\ h^{-1}$, foi calculada conforme a Equação (7), na qual, V_u corresponde ao volume útil do reator (1,0655 L) e TDH ao tempo de detenção hidráulica teórico aplicado em horas (h).

$$Q_{af} = \frac{V_u}{TDH} \quad (7)$$

A determinação da eficiência de conversão de sacarose (EC_{SAC}), em %, é dada pela Equação (8), em que os termos C_{Saf} e C_{Sef} correspondem, respectivamente, à concentração de sacarose afluyente ao RCTM ($mg\ S_{ac}\ L^{-1}$) e à concentração de sacarose efluente ao RCTM ($mg\ S_{ac}\ L^{-1}$).

$$EC_{SAC} = \left(\frac{C_{Saf} - C_{Sef}}{C_{Saf}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Por meio da Equação (9), calculou-se a eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO}), em %. Na Equação (9), tem-se que DQO_{af} corresponde a DQO, afluyente ao RCTM ($mg\ L^{-1}$), e DQO_{ef} , é a DQO, efluente do RCTM ($mg\ L^{-1}$).

$$ER_{DQO} = \left(\frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}} \right) \times 100 \quad (9)$$

A vazão de biogás (VBG), em $mL\ d^{-1}$, foi calculada por meio da Equação (10), em que $V_{gasômetro}$ e t correspondem, respectivamente, ao volume de gás medido no gasômetro (mL) e ao tempo de medição (d).

$$VBG = \frac{V_{gasômetro}}{t} \quad (10)$$

Nas Equações (11) e (12), são apresentados os cálculos da distribuição percentual de hidrogênio ($\%H_2$) e dióxido de carbono ($\%CO_2$) no biogás, sendo os termos n_{H_2} o número de mols de H_2 (mol), n_{CO_2} , o número de mols de CO_2 (mol) e n o número de mols totais na amostra de gás injetado (mol).

$$\%H_2 = \frac{nH_2}{n_{total}} \quad (11)$$

$$\%CO_2 = \frac{nCO_2}{n_{total}} \quad (12)$$

A determinação da vazão molar de hidrogênio (VMH), em mmol H₂ h⁻¹, foi calculada de acordo com a Equação (13), em que, VBG corresponde à vazão de biogás (mL d⁻¹), nH₂ é o número de mols de H₂ (mol) e V_i é o volume de gás injetado no cromatógrafo (0,5mL).

$$VMH = \left(\frac{VBG \cdot nH_2}{V_i} \right) \times \frac{1000}{24} \quad (13)$$

Na Equação (14), é apresentado o cálculo da velocidade de conversão de sacarose (V_s), em mmol S_{ac} h⁻¹, sendo os termos Q, C_{Saf}, C_{Sef} e MM_{sacarose}, respectivamente, a vazão de ARS alimentada ao RCTM (L h⁻¹), a concentração de sacarose aflente ao RCTM (mg S_{ac} L⁻¹), a concentração de sacarose efluente ao RCTM (mg S_{ac} L⁻¹) e a massa molar da sacarose (342 g mol⁻¹).

$$V_s = \frac{Q \cdot (C_{Saf} - C_{Sef})}{MM_{sacarose}} \quad (14)$$

O rendimento de hidrogênio (HY), em mol H₂ mol⁻¹ Sac, foi definido pela razão entre a vazão molar de hidrogênio (VMH, mmol H₂ h⁻¹) e a velocidade de conversão de sacarose (V_s, em mmol h⁻¹), conforme apresentado na Equação (15).

$$HY = \frac{VMH}{V_s} \quad (15)$$

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ foi baseada na Equação (16), na qual os termos VBG, %H₂ e V_u representam, respectivamente, a vazão de biogás (mL d⁻¹), o conteúdo de hidrogênio no biogás (%) e o volume útil do RCTM (L).

$$PVH = \frac{VBG \cdot \%H_2}{V_u} \quad (16)$$

4.6 Cálculo da Carga Orgânica Volumétrica Específica (COVe)

A determinação da COVe foi baseada na metodologia previamente descrita por Anzola Rojas et al. (2015). Primeiramente, foi calculado o coeficiente de rendimento celular da biomassa acidogênica ($Y_{x/s}$), em g SSV g⁻¹ sac (sacarose consumida), conforme apresentado na Equação (17). Os termos X_a , X_s e X_e representam, respectivamente, a quantidade de biomassa aderida à parede do RCTM, ao final da operação (gSSV); a quantidade de biomassa do líquido drenado do RCTM, ao final da operação (g); e a quantidade total de biomassa lavada do RCTM, na corrente efluente, ao longo do período de operação (g). O termo S_c representa a massa total de substrato consumida durante o período operacional (g sacarose).

$$Y_{x/s} = \frac{X_a + X_s + X_e}{S_c} \quad (17)$$

Para obtenção de X_a , ao final de cada operação do RCTM e após a sua drenagem completa, suas paredes foram lavadas com um volume conhecido de água destilada para remoção da biomassa aderida. Da solução final de lavagem, foram retiradas alíquotas que foram filtradas, secas em estufa por 24h a 105°C e, posteriormente, calcinadas em mufla por 30 min a 550°C, para determinação da concentração de SSV, sendo, então, X_a obtido pela multiplicação dessa concentração pelo volume da lavagem. A determinação de X_s seguiu o mesmo protocolo, sendo retiradas as alíquotas do volume drenado ao final da operação, as quais foram submetidas à filtração, secagem e calcinação.

A determinação de X_e foi baseada no cálculo da integral da vazão mássica da biomassa, eliminada na corrente efluente ao RCTM, ao longo do período operacional, segundo a Equação 18. Os termos SSV_e , Q e t representam, respectivamente, a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente (gSSV L⁻¹), a vazão de ARS alimentada ao RCTM (L d⁻¹) e o tempo de operação do sistema (d). Para a resolução das equações integrais, utilizou-se o *software* OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

$$X_e = \int_0^t (SSV_e \cdot Q) dt \quad (18)$$

O termo S_c foi determinado a partir da equação integral da vazão mássica de substrato consumido em função do tempo, isto é, a massa total de sacarose consumida ao longo da operação. A Equação (19) apresenta o cálculo da referida equação integral.

$$S_C = \int_0^t Q \cdot (C_{S_{af}} - C_{S_{ef}}) dt \quad (19)$$

Após o cálculo do $Y_{x/s}$ (Eq. 17), foi possível determinar a produção de biomassa pelo consumo de substrato em um determinado intervalo de tempo (P_x) (gSSV d⁻¹), por meio da Equação (20). Com base na Equação (21), calculou-se a quantidade de biomassa acumulada no interior do RCTM, em um determinado tempo (X_n , gSSV L⁻¹). Na Eq. (21), V_u corresponde ao volume útil do reator (1,0655 L), X_t é a quantidade de biomassa total produzida durante o tempo de operação do RCTM ($X_a + X_s + X_e$, em gSSV); X_n é a quantidade total de biomassa no interior do RCTM no tempo n (gSSV L⁻¹ reator) e X_{n-1} é a quantidade total de biomassa no interior do RCTM no tempo $n-1$ (gSSV L⁻¹ reator).

$$P_x = Q \cdot (C_{S_{af}} - C_{S_{ef}}) \cdot Y_{x/s} \quad (20)$$

$$X_n = \left[\frac{\int_{n-1}^n P_x dt}{V_u} \cdot \left(\frac{X_a + X_s}{X_t} \right) \right] + X_{n-1} \quad (21)$$

No tempo $t = 0$, a quantidade de biomassa, no interior do RCTM (X_0 , gSSV L⁻¹ reator), foi estimada a partir da Equação (22), em que V_{in} corresponde ao volume de substrato utilizado para a inoculação (autofermentação); no caso deste trabalho, utilizado 15 L.

$$X_0 = \frac{C_{S_0} \cdot Y_{x/s} \cdot V_{in}}{V_u} \quad (22)$$

Desse modo, a COVe, em um determinado tempo n de operação (gS_{ac} g⁻¹SSV d⁻¹), foi calculada pela relação entre a carga orgânica volumétrica de sacarose, aplicada ao RCTM (COVa, gS_c L⁻¹ reator d⁻¹), e a quantidade de biomassa retida neste (X_n , gSSV L⁻¹ reator), conforme apresentado na Equação (23). Na Eq. (23), os termos $C_{S_{af}}$ e Q correspondem à concentração de afluente ao reator (gS_{ac} L⁻¹) e à vazão afluente ao reator no tempo n (L d⁻¹).

$$COV_e = \frac{COV_a}{X_n} = \frac{C_{S_{af}} \cdot Q}{X_n} \quad (23)$$

4.7 Análise dos resultados

A análise da produção de H₂ a partir das diferentes condições operacionais foi baseada nas seguintes variáveis-resposta: [i] produção volumétrica de hidrogênio (PVH); [ii] vazão de biogás (VBG); [iii] vazão molar de hidrogênio (VMH); [iv] rendimento molar de hidrogênio (HY) e [v] potencial hidrogeniônico (pH), fornecidas diretamente pelas medições do analisador Ritter® e pelas análises cromatográficas.

Os aspectos de geração e acúmulo de biomassa foram analisados, principalmente, pelas seguintes variáveis-resposta: [i] carga orgânica volumétrica específica (COVe); [ii] biomassa arrastada; [iii] biomassa dentro do reator, fornecidas pelas análises gravimétricas.

As variáveis-resposta, relacionadas à produção de H₂ e geração de biomassa, foram utilizadas para interpretações vinculadas às variáveis independentes: [i] carga orgânica volumétrica aplicada (COVa); [ii] tempo de detenção hidráulica (TDH); [iii] concentração de sacarose. O objetivo foi identificar os possíveis efeitos das diferentes condições operacionais (variáveis independentes) sobre as variáveis-resposta e determinar comportamentos padrões que auxiliem os prognósticos de melhoria do rendimento e eficiência do processo de produção de H₂, utilizando o RCTM.

Com os valores médios de rendimento de hidrogênio em cada COVa estudada, foi feita a análise matemática, utilizando o programa Microsoft Excel, no intuito de encontrar qual o valor de COVa mais adequado para a produção de hidrogênio em RCTM. Os valores foram ajustados a uma função polinomial de segunda ordem e, em seguida, essa equação foi derivada para encontrar o valor máximo ($\frac{dHY}{dCOVa} = 0$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados e discussão referentes aos objetivos propostos no presente trabalho. O estudo da produção de hidrogênio, a partir de água sintética à base de sacarose, em um reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM), constituiu-se de duas etapas, divididas com o intuito de tornar a compreensão dos resultados mais didática. Inicialmente, foram analisados os resultados dos Ensaios E1, E2, E3 e E4 (24; 48; 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹), operados no TDH de 2h; na segunda etapa, apresentam-se os dados da operação dos Ensaios E5, E6, E7 e E8 (24; 48; 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹), com TDH de 4h.

Nesses ensaios, foi avaliada a influência da carga orgânica volumétrica aplicada, do TDH e da concentração de matéria orgânica, em termos de DQO afluente. O desempenho dos ensaios foi comparado a diferentes estudos, com sistemas biológicos anaeróbios de produção de hidrogênio, visando discutir as potencialidades da configuração estudada.

5.1 Tempo de Detenção Hidráulica de 2h: Avaliação da Estabilidade Operacional, Conversão de Matéria Orgânica e Produção de hidrogênio

Esta fase do estudo compreendeu os ensaios E1 a E4 e teve como objetivo verificar o comportamento do RCTM, quando submetido às diferentes concentrações de COVa (24; 48; 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹). Os ensaios E1 a E4 foram monitorados diariamente, sendo os dois primeiros por um período de aproximadamente 96 dias (E1 e E2) e os dois últimos durante 85 dias (E3 e E4), totalizando um tempo de operação de 362 dias.

5.1.1 Desempenho do RCTM na produção de hidrogênio

Na Tabela 9, são apresentados os dados de desempenho do RCTM, referentes à pH, remoção de DQO total e solúvel, conversão de carboidratos, concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente, proporção de hidrogênio e vazão de biogás, produção volumétrica, vazão molar e rendimento de hidrogênio.

A VBG e a proporção dos gases, que compõem o biogás, foram semelhantes para todos os ensaios, com valores médios de 2158,5mL, 2438,2mL, 2550,3mL e 2541,1mL de biogás, respectivamente, nos ensaios de E1 a E4. As porcentagens médias de hidrogênio atingiram valores iguais a 63,2, 71,4, 63,5 e 64,4%, respectivamente (Tabela 9), mostrando que a concentração de hidrogênio foi superior à concentração de dióxido de carbono, durante todo o período de operação. O gás metano não foi detectado em nenhum dos ensaios, mesmo durante longo período de operação do reator.

Tabela 9 Desempenho do RCTM nos ensaios realizados com TDH de 2h.

Variável-resposta	Ensaio			
	(E1)	(E2)	(E3)	(E4)
	24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	48 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	72 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
pH	4,3±0,5	3,6±0,4	4,7± 0,7	4,6±0,7
	5,6 (23)	4,1 (21)	5,9 (16)	5,8 (16)
ER _{DQOt}	19,0±9,4	17,5±7,9	9,9±9,0	21,6±14,2
	47,2 (38)	33,7 (25)	32,9 (13)	47,9 (12)
ER _{DQOs}	22,2±11,2	20,1±14,1	14,4±10,3	16,2±13,7
	54,1 (41)	60,2 (25)	40,8 (17)	51,4 (15)
EC _{SAC}	77,6±10,0	63,8±13,8	38,6±12,6	69,7±10,4
	95,1 (28)	89,3 (29)	63,7 (21)	82,7 (21)
SSV _e	0,05±0,04	0,05±0,04	0,10±0,04	0,12±0,06
	0,22 (43)	0,19 (27)	0,21 (21)	0,29 (20)
H ₂ (biogás) (%)	63,2±9,5	71,4±5,1	63,6±5,2	64,4±6,5
	77,7 (28)	89,3 (29)	73,0 (21)	76,9 (21)
VBG	2158,5±1904,5	2438,2±1194,7	2550,3± 1969,3	2541,1±1254,6
	7783,2 (28)	4963,0 (29)	7738,9 (21)	5373,9 (21)
PVH	1158,8±889,8	1593,6±751,7	1516,9±1131,8	1511,0±722,4
	4103,7 (28)	3151,6 (29)	4488,3 (21)	3124,2 (21)
VMH	0,99±0,7	1,80±1,0	1,54±1,3	1,55±0,8
	2,8 (28)	3,9 (29)	5,2 (21)	3,7 (21)
HY	0,40±0,3	0,50±0,3	0,48±0,4	0,15±0,1
	1,3 (28)	1,2 (29)	1,6 (21)	0,3 (21)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras, considerado no cálculo da média. Valores em *itálico* correspondem aos máximos observados no referido período operacional.

Variáveis-resposta: pH = pH de saída; ER_{DQOt} = eficiência de remoção de DQO total; ER_{DQOs} = eficiência de remoção de DQO solúvel; EC_{SAC} = eficiência de conversão de sacarose; SSV_e = concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente do reator; H₂ (biogás) = proporção de hidrogênio no biogás; VBG = vazão de biogás; PVH = produção volumétrica de hidrogênio; VMH = vazão molar de hidrogênio; HY = rendimento de hidrogênio.

Em relação aos resultados dos parâmetros de PVH e VMH (Tabela 9), nos quatro ensaios realizados, é possível afirmar que os valores encontrados não apresentaram diferenças expressivas, ao considerar a variação da carga orgânica volumétrica aplicada (COVa), com exceção do E1 (COVa = 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹), cujos resultados foram PVH = 1158,8 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e VMH = 0,99 mmol H₂ h⁻¹. O valor máximo alcançado para a PVH e VMH foi de 1593,6 mmolH₂ h⁻¹ e 1,80 mmolH₂ h⁻¹ para o E2 (COVa = 48 g DQO L⁻¹ d⁻¹).

Os valores de HY, nos ensaios E1, E2, E3 e E4, foram, respectivamente, de 0,40, 0,50, 0,48 e 0,15 mol H₂ mol⁻¹ sac. O HY alcançou valores mais altos no E2, embora a conversão de sacarose tenha sido menor que nos ensaios E1 e E4 (77,6 e 69,7%). Comparando os quatro ensaios, as eficiências máximas de conversão de sacarose foram 95,1, 89,3, 63,7 e 82,7%, respectivamente.

Os dados de SSVe utilizados para monitorar o balanço de biomassa no efluente do RCTM não sofreram grandes variações ao longo do tempo de operação, porém, aumentam suas concentrações com o aumento da COVa, a partir do ensaio E2 (SSVe, E1 e E2 = 0,05±0,04 g L⁻¹, E3 = 0,10±0,04 e E4 = 0,12±0,06).

Na Figura 7, são apresentados os perfis temporais da produção volumétrica de hidrogênio e vazão de biogás, composição do biogás (H₂ e CO₂), vazão molar, rendimento de hidrogênio e a carga orgânica aplicada ao reator, obtidos ao longo de cada um dos ensaios.

Os resultados da Figura 7 demonstram que o sistema apresentou capacidade para recuperar a produção de H₂ ao longo do período de operação, o que indica a possibilidade da manutenção de produções contínuas de hidrogênio, durante longos períodos. Ressalta-se que o tempo total de produção indicado não significa que, ao final do respectivo período, houve perda da capacidade da produção, e sim, que houve interrupção induzida pelo operador, de modo que, na suspensão da operação, foi constatado que o sistema ainda estava em produção. Tal fato deve ser enfatizado, uma vez que a literatura é escassa em relatos de sistemas acidogênicos operados com estabilidade por períodos superiores a 30 dias. Os trabalhos têm reportado picos de produção e, posteriormente, decréscimos até atingir completa estagnação. Os períodos máximos de produção de H₂ são relatados com 22 dias (GOMES et al., 2015), 25 dias (GOMES et al., 2016), 30 dias (CASTELLÓ et al., 2017), 30 dias (ANZOLA-ROJAS et al., 2016), 20 dias (KYAZZE et al., 2006) e 30 dias (MANSSOURI et al., 2013).

Gomes et al. (2015), operando um RCTM na produção de H₂ com água residuária sintética à base de sacarose, obtiveram aumento da produção até o 10^o dia, a partir do qual a produção foi diminuindo e cessou. As condições avaliadas pelos autores foram 2g L⁻¹ em TDH de 2h, com e sem meio suporte na câmara de saída do reator, e 4 g L⁻¹, em TDH de 4h, também com meio suporte na câmara de saída, todas compreendendo uma COVa de 24g DQO L⁻¹ d⁻¹. No entanto, para as três condições, o RCTM apresentou o mesmo comportamento, havendo a produção de H₂ somente até o 30^o dia de operação. Os autores justificaram a perda da capacidade de produção ao longo do tempo, pelo fato do reator não ter cumprido eficientemente a função de controlar a COVe em faixas de valores adequados à produção de H₂.

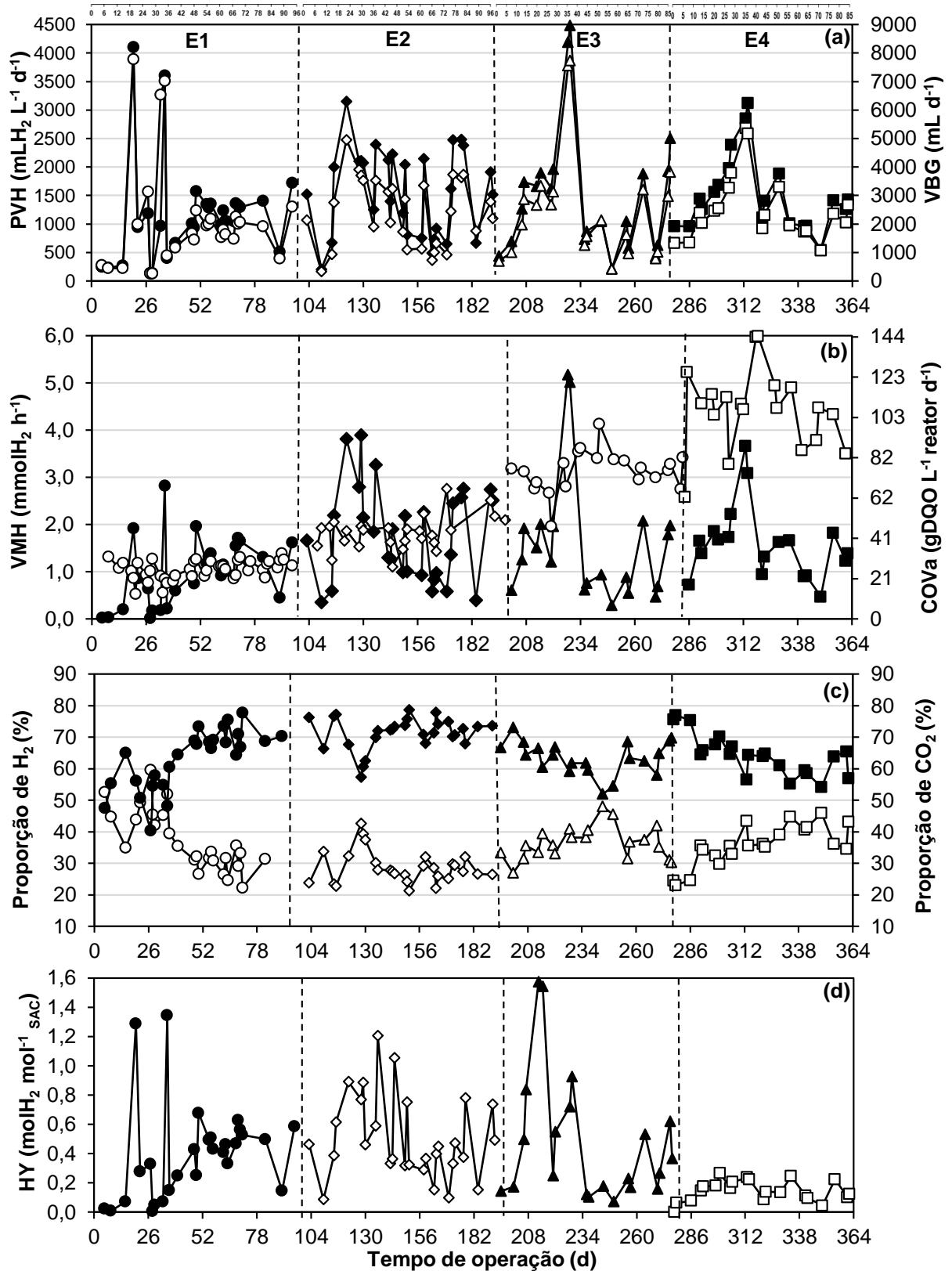


Figura 7 Produção de biogás e hidrogênio nos ensaios E1 (-●-; -○-) (24 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E2 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E3 (-▲-; -△-) (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e E4 (-■-; -□-) (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 2h: (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e vazão de biogás (VBG, -○-; -◇-; -△-; -□-), (b) vazão molar de hidrogênio (VMH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa, -○-; -◇-; -△-; -□-), (c) composição do biogás (hidrogênio, -●-; -◆-; -▲-; -■-; gás carbônico, -○-; -◇-; -△-; -□-) e (d) rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Ensaios (E1-E4).

Diante da necessidade de superar as limitações de estabilidade e os significativos decréscimos de produção de hidrogênio, impostos pelas dificuldades de controle da COVe, o presente trabalho optou por adaptar, à superfície interna dos tubos, uma textura com ranhuras no formato rosca sem fim. Com esse procedimento, buscou-se fornecer condições adequadas ao aumento de adesão de biomassa às paredes dos tubos, propiciando um melhor controle sobre a COVe no sistema, a partir de um descarte contínuo (e controlado) da biomassa acidogênica.

A modificação nas paredes internas dos tubos demonstrou efeito positivo, visto que, em todas as condições de cargas orgânicas avaliadas, a produção de hidrogênio permaneceu durante todo o período de cada ensaio (~ 90 dias). Assim, pode-se considerar que o RCTM compreende uma configuração intermediária entre um reator tubular de crescimento suspenso e um reator de leito fixo empacotado, uma vez que as paredes dos tubos de pequeno diâmetro cumprem a função de favorecer a adesão microbiana à superfície.

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH), nos ensaios E1 e E2, apresentou oscilação relativamente constante após o 15^o (E1) e 14^o (E2) dia de operação (Figura 7a). Assume-se, então, que, após esse período, a biomassa já estava estabelecida e aclimatada para a produção de H₂. Essa fase de aclimação também foi observada por Anzola-Rojas et al. (2016), que dividiram o período experimental em fase transiente e fase de estabilidade. Nesse estudo, os autores utilizaram as mesmas condições do E1 (COVa = 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹) e observaram aumento da produção de hidrogênio, a partir do 41^o dia de operação para o reator anaeróbico de leito ordenado com polietileno e espuma; e, a partir do 21^o dia, no reator com leito de cerâmica.

Os fatores relacionados à maior produção volumétrica são discutidos também por Gavala, Skiadas & Ahring (2006) e Lo et al. (2008). Esses autores mostram ocorrer maior produção de H₂ com o aumento de concentração de carboidratos. Contudo, existe um limite em que o metabolismo bacteriano é alterado, passando a produzir álcoois, o que acarreta diminuição da produção.

Comparando os valores obtidos para o rendimento de hidrogênio, no início e no final da operação (Figura 7d), nota-se que maiores rendimentos foram observados no período inicial dos ensaios. Segundo Fuess et al. (2016), esse resultado sugere o estabelecimento de condições mais favoráveis às bactérias produtoras de hidrogênio, no início da operação, tendo em vista um aproveitamento mais eficiente do substrato em termos de extração de energia (maiores valores de HY). Os autores também atribuem o resultado do melhor rendimento, no início da operação, devido ao menor acúmulo de biomassa no reator, nesse período.

Os resultados de HY, dos ensaios E1 a E3, apresentaram valores muito próximos entre si (HY iguais a 0,40; 0,50 e 0,48 mol H₂ mol⁻¹ sac, respectivamente). Por outro lado, o

incremento da DQO de E3 para E4 afetou negativamente o valor de HY. O rendimento molar sofreu redução de 0,48 para 0,15 mol H₂ mol⁻¹ sac (Figura 7d), conforme a COVa aumentou de 72 para 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹.

Esse efeito negativo do aumento da DQO sobre a produção de H₂ também foi observado por Gorgeç e Karapinar (2018), em reator APBR, no qual a variação da concentração de substrato entre 10 e 35 g L⁻¹ resultou na diminuição de todos os critérios de desempenho (PVH, VBG, %H₂ e HY). Andreani et al. (2019), utilizando água residuária de fecularia de mandioca como substrato, também identificaram que o aumento da carga de substrato de 12 a 18 g L⁻¹ d⁻¹ diminuiu a PVH de 0,45 para 0,30 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e do HY de 1,5 para 0,20 mol H₂ kg⁻¹ CH, respectivamente.

5.1.2 Comportamento do RCTM e conversão do substrato

Na Figura 8, são apresentados os perfis temporais dos ensaios E1 a E4, relacionados aos parâmetros de pH, eficiência de conversão de sacarose (EC_{SAC}) e eficiência de remoção de DQO, total e solúvel (ER_{DQOt} e ER_{DQOs}).

O pH medido no efluente atingiu valores médios de 4,3, 3,6, 4,7 e 4,6 para os ensaios E1, E2, E3 e E4, respectivamente (Tabela 9). Apesar das variações verificadas em torno desses valores médios, a produção de hidrogênio permaneceu durante o período de avaliação de todos os ensaios (~90 dias).

Em geral, foi observado que os maiores valores encontrados de PVH coincidiram com valores de pH abaixo dos valores médios de cada ensaio. Por exemplo, os valores máximos de PVH de 4103 (E1), 3151 (E2), 4488 (E3) e 3124 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ (E4) corresponderam, respectivamente, a valores de pH de 4,1, 3,3, 3,8 e 3,7. Essas alterações nos valores de pH estão, principalmente, relacionadas à acidificação do meio pela ação dos metabólitos, produzidos durante a fermentação.

Em todos os ensaios, observou-se uma sucessão de ocorrências relativamente padrão, sendo ela: diminuição do pH, aumento da PVH, aumento na concentração dos produtos intermediários e aumento do pH (Figuras 7a e 8a). Em contrapartida, as menores produções de H₂ (PVH), em todos os ensaios, estiveram associadas ao aumento do pH no efluente ao reator. Estevam et al. (2018) observaram comportamento semelhante quando utilizaram um reator anaeróbio agitado mecanicamente (AnBBR), para a produção de H₂, a partir de águas residuárias de cervejaria.

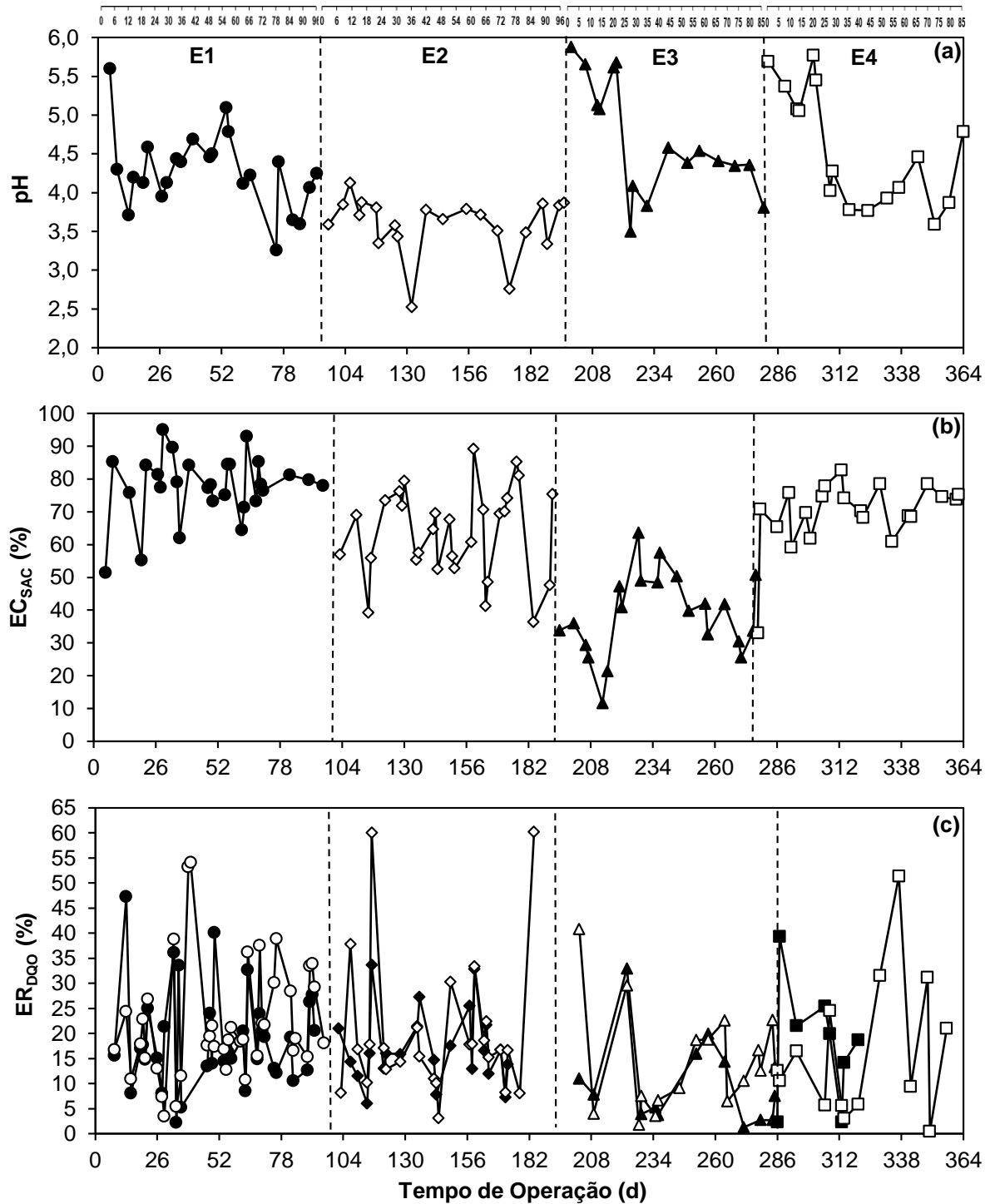


Figura 8 Monitoramento da fase líquida do reator RCTM nos ensaios E1 (-●-; -○-) ($24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E2 (-◆-; -◇-) ($48 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E3 (-▲-; -△-) ($72 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e E4 (-■-; -□-) ($96 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) no TDH de 2h: (a) o pH de saída do reator, (b) eficiência de conversão de sacarose (EC_{SAC}) e (c) eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO} ; total -●-; -◆-; -▲-; -■-, solúvel -○-; -◇-; -△-; -□-). Legenda: Ensaios (E1-E4).

Na conversão de sacarose (Figura 8b), foram obtidas eficiências de 77,6, 63,8, 38,6 e 69,7%, para os ensaios E1, E2, E3 e E4, respectivamente. Esses valores percentuais foram calculados com base nas concentrações iniciais de 2076,7, 3701,6, 6281,3 e 8993,8 mg DQO L^{-1} ,

os quais representam, respectivamente, E1, E2, E3 e E4. A partir desses valores, é possível observar que o aumento da COVa resultou em menores eficiências de conversão, com os valores reduzindo de 77,6% (E1) para 38,6% (E3). Portanto, considerando esse efeito, pode-se concluir que a utilização de elevados valores de COVa, em reatores acidogênicos, pode conduzir a menores eficiências de conversão de sacarose. Inoue et al. (2014) encontraram resultados similares a respeito do efeito da concentração afluyente de sacarose (3,5 e 5,25 g DQO L⁻¹) sobre a eficiência de conversão. Tais autores demonstraram que o aumento da DQO ocasionou redução da remoção de sacarose de 99 para 86%, para o tempo de 2h.

Em relação à eficiência de remoção de matéria orgânica (ER_{DQOt} e ER_{DQOs}) (Figura 8c), pode-se notar que, embora exista diferença nas concentrações de matéria orgânica na ARS, as eficiências de remoção foram próximas entre os ensaios E1, E2 e E4 (19,0, 17,5 e 21,6%, respectivamente, Tabela 9), não ultrapassando o valor de 23%. O E3 obteve um menor valor de ER_{DQOt}, quando comparado aos outros ensaios (ER_{DQOt}=9,9%). Essa baixa eficiência na remoção de DQO, em todos os ensaios, era esperada, pois esses baixos valores estão ligados somente à fração da matéria orgânica afluyente, que é captada para formação de CO₂ e biomassa. Uma grande parcela é convertida a outros intermediários, como ácidos e álcoois (LOVATO et al., 2015).

Lovato et al. (2015) relataram remoção de DQO máxima de 38% e mínima de 17%, valores mínimos próximos aos obtidos nos quatro ensaios (E1, E2, E3 e E4). Os resultados de Gomes et al. (2015) também convergem com os resultados obtidos neste trabalho, pois os autores reportaram eficiências médias de remoção de matéria orgânica na faixa de 12,7 a 19,2%.

5.1.3 Produção de biomassa e dinâmica da COVe

Na Figura 9, são apresentados os valores de biomassa acumulada nos reatores (g SSV L⁻¹ reator) e de COVe (g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹) para cada ensaio, ao longo do tempo de operação.

A liberação de biomassa nos ensaios E1 e E2 foi menor que nos ensaios E3 e E4. O ensaio E2 acumulou a maior quantidade de biomassa (Figura 9a) e apresentou o melhor desempenho quanto aos parâmetros relacionados à produção de hidrogênio (PVH, VHM e HY). Nessa condição (carga= 48g DQO L⁻¹ d⁻¹; DQO= 4000mg L⁻¹; TDH= 2h), pode-se considerar que a quantidade de biomassa no reator se manteve na faixa adequada à produção de H₂, visto que a concentração de biomassa é um importante parâmetro operacional, que afeta a estabilidade do sistema e o rendimento de hidrogênio.

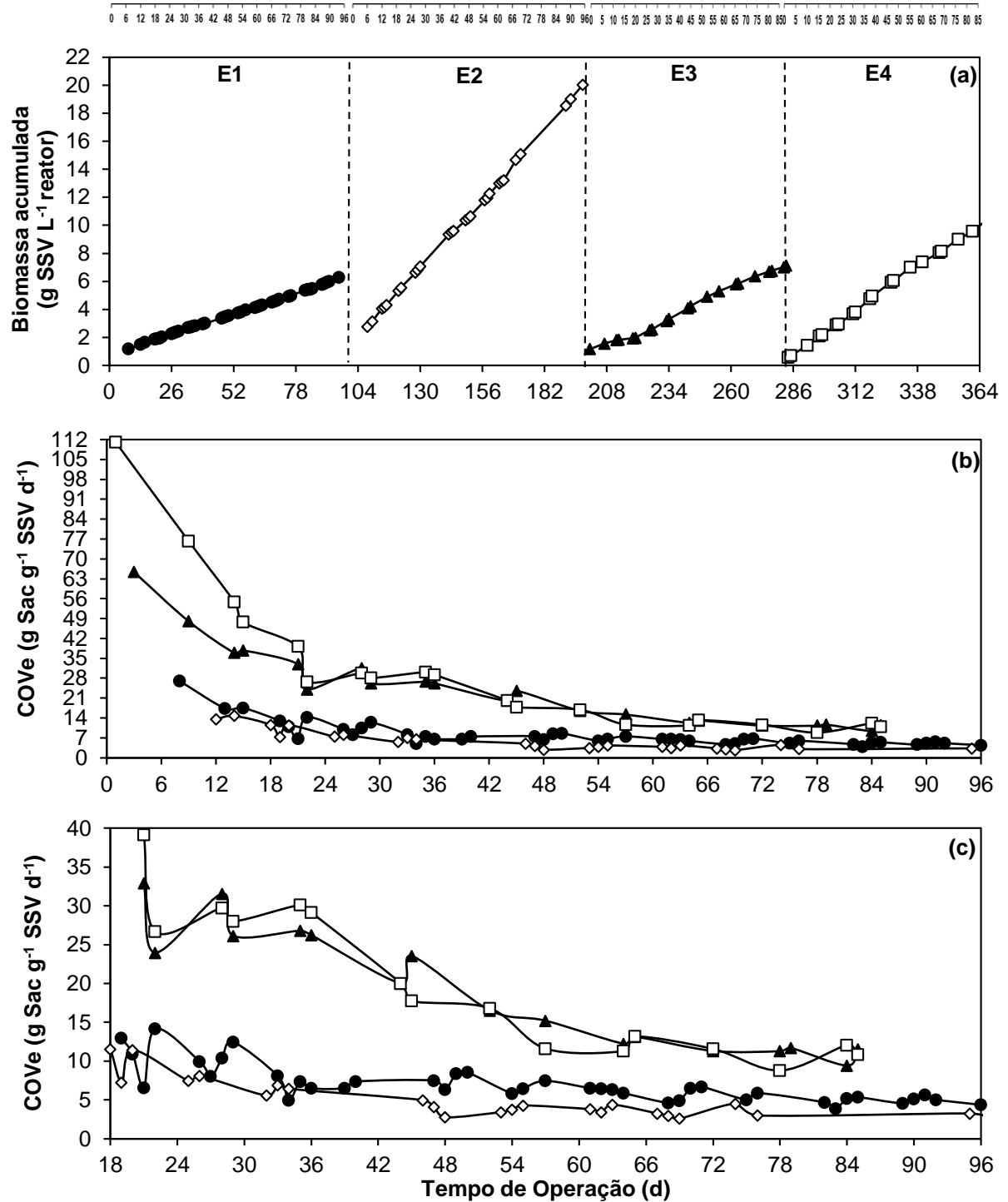


Figura 9 Performance da retenção de biomassa no reator RCTM nos ensaios E1 (-●-) (24 gDQO L⁻¹d⁻¹), E2 (-◇-) (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E3 (-▲-) (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e E4 (-□-) (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 2h: (a) concentração de biomassa retida no reator, (b) carga orgânica volumétrica específica (COVe) e (c) COVe a partir do período de aclimação da biomassa. Legenda: Ensaios (E1-E4).

Os perfis temporais, relativos à COVe de cada ensaio, estão apresentados nas Figuras 9b e 9c; ambas possuem os mesmos dados, no entanto, a 9b mostra o período completo e a

9c mostra após a aclimação da biomassa. Os valores variaram de 27,0 a 3,88; 14,7 a 2,51; 65,4 a 9,43 e 111,0 a 8,79 g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} em E1, E2, E3 e E4, respectivamente.

Em todos os ensaios, o comportamento temporal da COVe, após o período de aclimação da biomassa, considerado posterior ao 15º dia de operação (Figura 9c), teve uma menor variação em relação ao início. Os valores de COVe dos ensaios E1 e E2, ao longo do período experimental, apresentaram um melhor equilíbrio na relação alimento/microrganismo do que nos ensaios E3 e E4; nesses ensaios, os valores de COVe ficaram sempre acima dos recomendados pela literatura.

O valor médio da COVe, no E1, foi de 7,9g DQO g^{-1} SSV d^{-1} ; o E2 apresentou COVe de 5,6g, sacarose g^{-1} SSV d^{-1} , valores próximos ao reportado por Anzola-Rojas et al. (2015) como sendo o que proporciona condição ideal de estabilidade à produção de hidrogênio. Tais autores sugerem que um sistema, que apresente valor da COVe próximo de 6g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} , possui capacidade de manter continuamente a produção de hidrogênio.

Similarmente, Hafez et al. (2010), em estudo avaliando o efeito da carga orgânica volumétrica (6,5; 25,7; 51,4; 103; 154 e 206 g DQO $\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$) na produção de hidrogênio, obtiveram valores de COVe, respectivamente, iguais a 4,4; 6,2; 5,8; 6,4; 8,5 e 12,1 g DQO g^{-1} SSV d^{-1} . Para os valores de COVe de 4,4 a 6,4g DQO g^{-1} SSV d^{-1} , os autores supracitados obtiveram os maiores valores de HY e valores de $Y_{X/S}$ próximos a 0,1 g SSV g^{-1} sac, que é característico de microrganismos produtores de H_2 . A partir da COVe de 8,5g DQO g^{-1} SSV d^{-1} , o valor de $Y_{X/S}$ praticamente dobrou e os valores de HY diminuíram consideravelmente. Diante disso, os autores concluíram que o parâmetro que mais influenciou a produção de hidrogênio não foi a COVa, mas sim, a COVe, a qual desencadeia mudanças à composição das populações microbianas.

Para Anzola-Rojas et al. (2016), as melhores condições para produção de hidrogênio foram associadas a valores de COVe na faixa de 4,3 a 6,9g DQO g^{-1} SSV d^{-1} . Essas noções são também corroboradas nos resultados encontrados por Anzola-Rojas e Zaiat (2015); os autores reportaram um valor de 4,8g Sac g^{-1} SSV d^{-1} , para condições relativamente estáveis de produção de hidrogênio em um reator de leito ordenado e escoamento descendente operado com descartes de biomassa.

Nos ensaios E3 e E4, os valores médios de COVe encontram-se na faixa de 24,37 e 30,33g DQO g^{-1} SSV d^{-1} , respectivamente. De acordo com a literatura (HAFEZ et al., 2010; ANZOLA-ROJAS et al., 2015), esses valores estão bem acima do recomendado para a produção de hidrogênio, indicando quantidade insuficiente de biomassa em relação à matéria orgânica aplicada.

Dessa forma, Gomes et al. (2015) citam a importância de estudos adicionais, considerando alternativas para aumentar a quantidade de biomassa retida no RCTM, por

exemplo, reduzindo as velocidades superficiais com aplicações de valores de TDH maiores e/ou reduzindo a razão C/N das águas residuárias para estimular o crescimento celular. Assim, quaisquer esforços nesse sentido são de grande interesse, na tentativa de melhorar o desempenho do sistema, principalmente, acerca dos aspectos de controle do arraste de biomassa, garantindo um contato adequado de biomassa-substrato.

Por outro lado, é importante ressaltar que o crescimento demasiado da biomassa tende a afetar o padrão de escoamento no reator, limitando a transferência de massa líquido-gás; também, pode propiciar o estabelecimento de microrganismos consumidores de hidrogênio no meio, em específico, as bactérias homoacetogênicas, levando a produções decrescentes de hidrogênio (HAFEZ et al., 2010; PEIXOTO et al., 2011; ANZOLA-ROJAS et al., 2015, FUESS et al., 2016). Além desse efeito adverso, Seifert et al. (2009) e Phowan & Danvirutai (2014) ponderam que as elevadas concentrações de biomassa também podem fazer com que o H₂ produzido venha a ser consumido e desencadeie a formação de outros subprodutos, o que influenciaria diretamente o rendimento da fermentação.

Os resultados obtidos de COVe, ao final da operação dos ensaios E3 e E4 (11,5 e 10,8, respectivamente), apontam para faixa de valores que a literatura tem considerado como desfavorável à manutenção das produções de H₂. Contudo, mesmo assim, nesses ensaios, foi verificada a produção contínua de hidrogênio, demonstrando que a introdução de ranhuras na parte interna dos tubos foi efetiva para essa resposta.

O objetivo das ranhuras foi de fornecer rugosidade às paredes internas dos tubos, os quais representam os elementos estruturais designados a cumprir o papel de induzir a fixação/retenção de biomassa, sem promover um acúmulo excessivo. Silva (2017), em seu trabalho, identificou que as estratégias que buscam evitar o acúmulo excessivo de biomassa são fundamentais para assegurar maior estabilidade à produção de H₂. O autor supracitado utilizou como estratégia o controle sobre o tempo de retenção celular, conseguindo, assim, controlar a remoção/descarga regular de biomassa do reator, o que impactou diretamente sobre o valor da COVe.

Na Tabela 10, são apresentados os dados de biomassa gerada, discriminada entre aderida, suspensa e arrastada, para os ensaios E1 a E4, com TDH de 2h.

Os ensaios E1, E3 e E4 apresentaram comportamento similar em relação à porcentagem de biomassa arrastada e mantida no interior do reator. A fração de biomassa, aderida às paredes dos tubos do reator, correspondeu a 2,82%, 10,56%, 2,90% e 2,54% da biomassa total gerada, nos ensaios E1, E2, E3 e E4, respectivamente.

Nos ensaios E1, E3 e E4, o arraste natural da biomassa foi superior a 90%, enquanto que, no E2, chegou a 72% do total de biomassa produzida. Embora os valores de porcentagem de biomassa arrastada em E1, E3 e E4 tenham sido diferentes, ao obtido em

E2, a produção contínua de H₂, por longos períodos, foi alcançada no RCTM, demonstrando assim que a forma como a biomassa fica distribuída no reator é um fator de grande influência ao comportamento da produção de H₂.

Tabela 10 Balanço de biomassa no RCTM com TDH de 2h.

Biomassa/Substrato	Ensaio			
	(E1) 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	(E2) 48 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	(E3) 72 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	(E4) 96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
Biomassa dentro do reator (g)	5,73	18,44	6,48	10,41
Biomassa aderida (g)	1,72	7,14	3,05	3,75
Biomassa suspensa (g)	4,01	11,30	3,42	6,66
Biomassa arrastada naturalmente (g)	55,42	49,13	98,76	137,14
Total biomassa gerada (g)	61,16	67,57	105,23	147,55
Total sacarose consumida (g)	1844,02	2915,69	2682,42	6988,71
Coefficiente de rendimento celular da biomassa Y_{X/S} (g SSV g⁻¹sac)	0,033	0,023	0,039	0,021
Biomassa arrastada (%)	90,6	72,7	93,8	92,9
Biomassa dentro do reator (%)	9,4	27,3	6,2	7,1
COVe (g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹)	7,93±4,4 (43)	5,66±3,5 (27)	24,37±14,2 (21)	30,33±25,8 (20)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras considerado no cálculo da média.

Os episódios de maiores arrastes de biomassa, associados às cargas de 72 (E3) e 96 g L⁻¹ d⁻¹ (E4), podem ser decorrentes do excesso de matéria orgânica, que, então, promoveu aumento à geração de biomassa. Esse crescimento da biomassa, provavelmente, ocasionou aumento da espessura do filme biológico nas paredes dos tubos e, conseqüentemente, diminuiu a força de atração entre as moléculas, tornando a biomassa mais susceptível à lavagem. Esse comportamento pode justificar o fato de terem sido observados maiores teores de SSV no efluente desses ensaios.

O coeficiente de rendimento celular da biomassa acidogênica (Y_{X/S}, g SSV g⁻¹sac), estimado conforme o item 4.6.1, apresentou valores nos ensaios E1, E2, E3 e E4 de 0,033; 0,023; 0,039 e 0,021 g SSV g⁻¹ sac, respectivamente (Tabela 10), caracterizados como típicos de microrganismos produtores de hidrogênio (ANZOLA-ROJAS et al., 2013; CHEN et al., 2001). Esses valores foram menores do que encontrados por Gomes et al. (2015) de ~0,07g SSV g⁻¹ sac, no qual a produção de hidrogênio diminuiu continuamente até o 22º dia e

praticamente cessou. De acordo com Hafez et al. (2009), aumentos nos valores de $Y_{X/S}$ em reatores acidogênicos indicam alteração na microbiota, com aumento da população de microrganismos não produtores de hidrogênio ou mesmo de seus consumidores.

Para Blanco et al. (2017), quando a biomassa é submetida a condições de retenção desfavoráveis, isto é, quando o arraste é favorecido, o metabolismo das células é direcionado para o crescimento, em um esforço para manter uma alta densidade celular dentro do sistema. Por outro lado, quando a adesão é favorecida, a energia metabólica é utilizada principalmente em diferentes vias, ao invés da síntese celular. Nesse sentido, os maiores valores de $Y_{X/S}$ nos ensaios E1 e E3 (0,033 e 0,039 g SSV g⁻¹sac) podem estar associados ao maior arraste de biomassa. No E4, ao atingir valor inferior (0,021 g SSV g⁻¹sac), pode estar relacionado a uma possível inibição do crescimento das bactérias produtoras de hidrogênio pelo substrato, já que o valor da DQO estava em 8 g L⁻¹.

Com valores médios de rendimento de hidrogênio de cada COVa, estudada no TDH de 2h, encontrou-se o valor ótimo para COVa de 48g DQO L⁻¹ d⁻¹, que resultaria em rendimento de H₂ de 0,5 mol H₂ mol⁻¹ sac, valor igual ao alcançado no ensaio E2 (COVa de 48 g DQO L⁻¹ d⁻¹) (Figura 10).

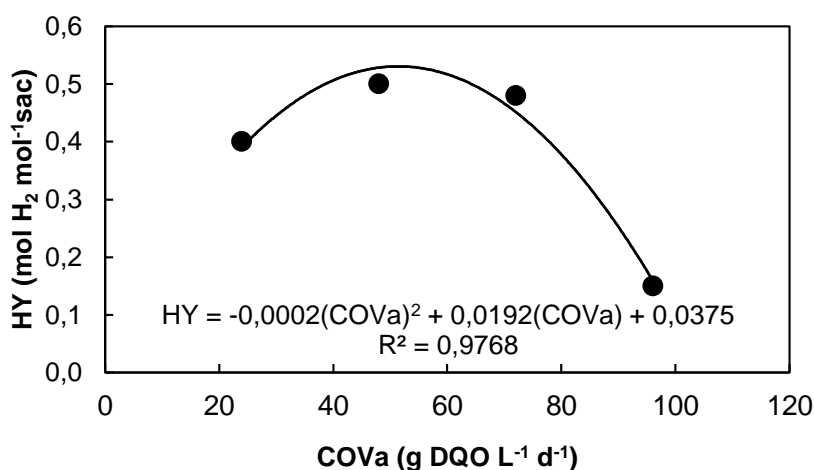


Figura 10 Influência da carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) sobre o rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Pontos experimentais (○), curva polinomial ajustada aos pontos experimentais (—).

No presente trabalho, não foi necessária a utilização de estratégias adicionais de descarte de biomassa, para controlar a competição entre microrganismos produtores e não produtores e/ou consumidores de hidrogênio, como adotadas por Anzola-Rojas e Zaiat (2015), Anzola-Rojas et al. (2016) e Fuess et al. (2016), visto que a produção de hidrogênio se manteve durante todo o período de operação nos quatro ensaios estudados, conforme comprovado pelos resultados de PVH, VMH e HY (Figura 7).

Essa vantagem operacional pode estar associada ao TDH utilizado e às ranhuras produzidas na parede interna dos tubos, as quais contribuíram para o controle do balanço de biomassa no meio e, assim, para o controle efetivo da COVe. Desse modo, estratégias operacionais, tais como frequência e formas de descarte, por retrolavagem ou gravidade, não precisaram ser realizadas no RCTM para cargas aplicadas até 96g DQO L⁻¹ d⁻¹, a partir de ensaios conduzidos com ARS, tendo em vista que a produção de H₂ se manteve por longo período.

5.1.4 Avaliação da Produção de Metabólitos da Fermentação

Os principais produtos intermediários, identificados e caracterizados durante o processo fermentativo da sacarose, compreenderam os ácidos láctico (HLA), acético (HAc), butírico (HBu) e etanol (EtOH), conforme indicado na Tabela 11. Ocasionalmente, observou-se a produção de traços do ácido fórmico (HFo) e propiônico (HPr), sendo este último relacionado com o consumo de hidrogênio. As concentrações (mg L⁻¹) de todos os metabólitos foram crescentes com aumento da COVa.

Tabela 11 Produção média dos produtos intermediários da fermentação no TDH de 2h.

Ensaio	Metabólitos					
	Ácido Láctico (HLA) (mg L ⁻¹)	Ácido Fórmico (HFo) (mg L ⁻¹)	Ácido Acético (HAc) (mg L ⁻¹)	Ácido Propiônico (HPr) (mg L ⁻¹)	Ácido Butírico (HBu) (mg L ⁻¹)	Etanol (EtOH) (mg L ⁻¹)
E1	171,2±110	21,5±5	121,4±76	29,5±29	70,9±55	99,9±14
24 g DQO L⁻¹ d⁻¹	462,6 (30)	28,7 (6)	311,7 (30)	139,9 (22)	228,7 (30)	116,2 (9)
E2	233,0±107	20,4±7	376,1±188	50,4±18	137,2±81	171,2±92
48 g DQO L⁻¹ d⁻¹	483,3 (28)	33,4 (9)	854,4 (28)	71,7 (28)	333,9 (28)	387,8 (14)
E3	264,5±102	38,9±6	567,4±214	58,1±22	190,9±112	338,7±114
72 g DQO L⁻¹ d⁻¹	473,9 (20)	49,0 (12)	1030,7 (20)	101,1 (19)	389,9 (20)	642,7 (17)
E4	302,1±152	37,3±5	517,9±202	75,7±29	201,0±89	340,4±108
96 g DQO L⁻¹ d⁻¹	605,7 (20)	44,5 (9)	912,2 (20)	124,5 (18)	343,5 (20)	621,4 (12)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras considerado no cálculo da média. Valores em *itálico* correspondem aos máximos observados no referido período operacional.

Os resultados da Tabela 11 mostram que a formação do HAc foi predominante durante a fermentação anaeróbia, com concentrações médias de 121,4±76, 376,1±188, 567,4±214 e 517,8±202 mg L⁻¹ em E1, E2, E3 e E4, respectivamente. O aumento da PVH apresentou relação com o aumento da concentração de HAc até o final da operação do reator

(Figuras 7a e 11). De fato, as maiores produções de hidrogênio, a partir da fermentação de substratos ricos em carboidratos, estão associadas à via fermentativa acética, com a formação de ácido acético – Equação (1) – que leva, teoricamente, a maiores rendimentos de H_2 , em comparação à rota associada à produção de ácido butírico – Equação (2).

As Figuras 11a-d evidenciam aumento dos produtos da fermentação em função do aumento da carga de substrato aplicada aos ensaios. Alguns pesquisadores sugerem que altas concentrações de produtos de fermentação, os quais estão relacionados aos altos valores de DQO afluente, podem inibir a atividade da hidrogenase, enzima gerada pelas bactérias produtoras de H_2 , a qual desempenha um papel central na produção desse gás (REIS & SILVA, 2011). A hidrogenase catalisa a redução reversível do íon hidrogênio (H^+) para formar H_2 molecular, como mostrado na Equação (5).

Os resultados da Figura 12 mostram que a presença de HPr foi de aproximadamente 5%, para os quatro ensaios, durante todo o período experimental, o que é desfavorável para a produção de hidrogênio. Entretanto, essa presença de HPr deve ser minimizada, pois não foi observado um aumento considerável nas proporções de HPr, em relação ao aumento da COVa.

Nos ensaios E3 e E4, foram observadas as maiores produções de etanol (23 e 21%, respectivamente). Tais resultados são coerentes com alguns autores, que apontam que o aumento da COVa também favorece a rota de fermentação etanólica, com consumo de carboidratos, produção de etanol e CO_2 (FERNANDES et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; ARANTES et al., 2017), além de consequente redução na produção de H_2 .

Para os quatro ensaios, os valores de pH final variaram entre 3,6 e 4,7. Portanto, essas reduções do pH, cujos valores iniciais correspondiam a 6,5, estão relacionadas à formação intensa de ácidos orgânicos. Tais condições podem afetar as rotas metabólicas, pois é de conhecimento que a acidificação do meio induz rotas de produção de solventes (etanol e butanol).

No E1, foi observada a ocorrência de elevada concentração de HLa (42%), na ARS fermentada, principalmente, no 15^o, 22^o, 27^o e 28^o dia de operação (Figura 11a, com picos de 387,7, 417,9, 462,6 e 419,6 $mg L^{-1}$, respectivamente), o que coincidiu com a redução da produção de hidrogênio (Figura 7a). Essa redução pode ser atribuída à presença de bactérias produtoras de HLa, denominadas pela literatura como LAB (*Lactic acid bacteria*). De acordo com Castelló et al. (2020), LAB são consideradas inibidoras do processo de produção de H_2 , uma vez que suprimem as bactérias produtoras de H_2 , tanto na competição com o substrato quanto na produção de ácido láctico e metabólitos tóxicos. Em termos práticos, sobre a produção de H_2 , Guo et al. (2010) explicam que o HLa, assim como o etanol, estão envolvidos em uma via de equilíbrio zero de hidrogênio.

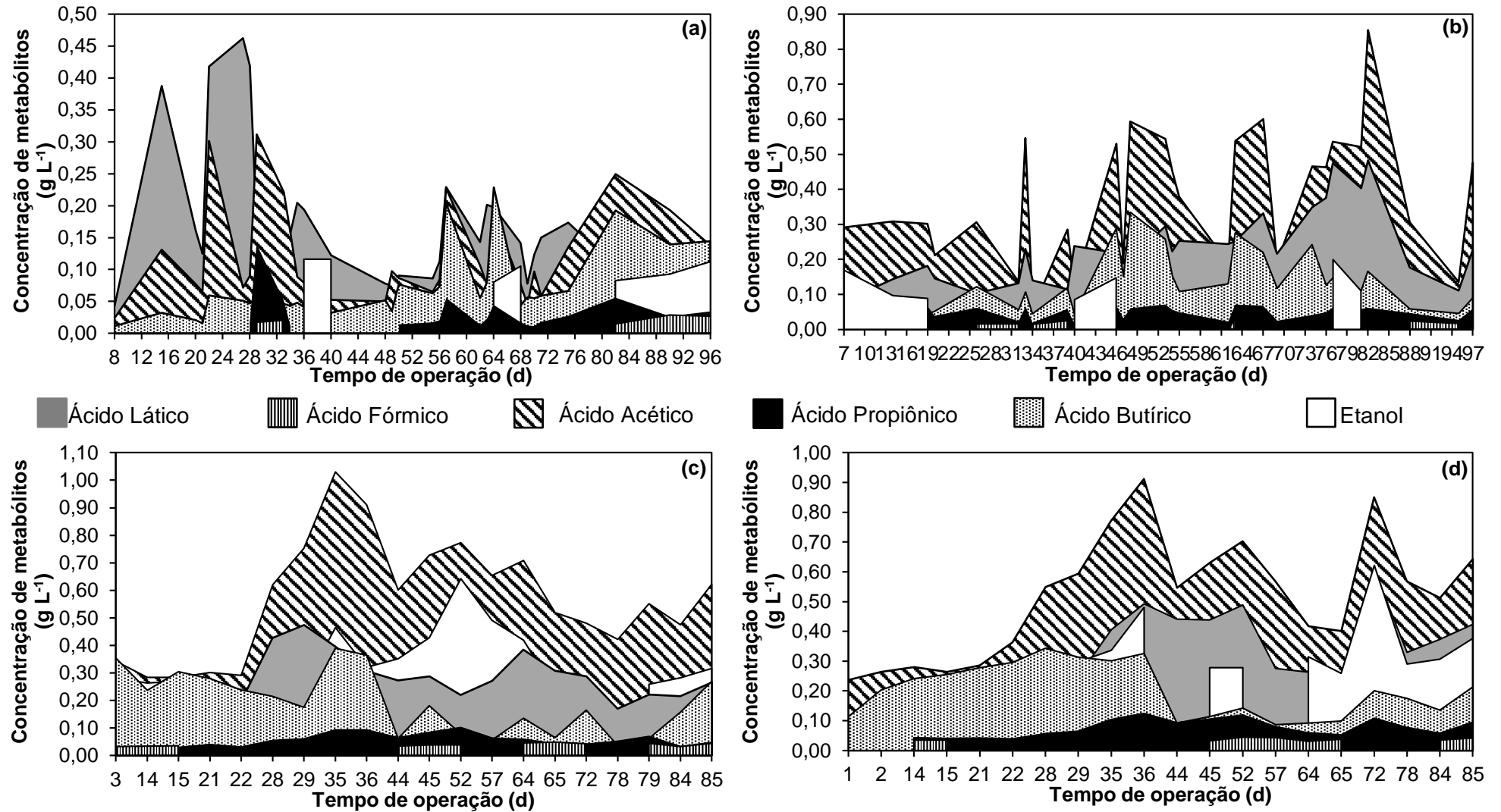


Figura 11 Perfil temporal de concentração de metabólitos ao longo da operação dos ensaios: (a) E1 (24gDQO L⁻¹ d⁻¹), (b) E2 (48gDQO L⁻¹ d⁻¹), (c) E3 (72gDQO L⁻¹ d⁻¹) e (d) E4 (96gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 2h. Legenda: Ensaios (E1-E4).

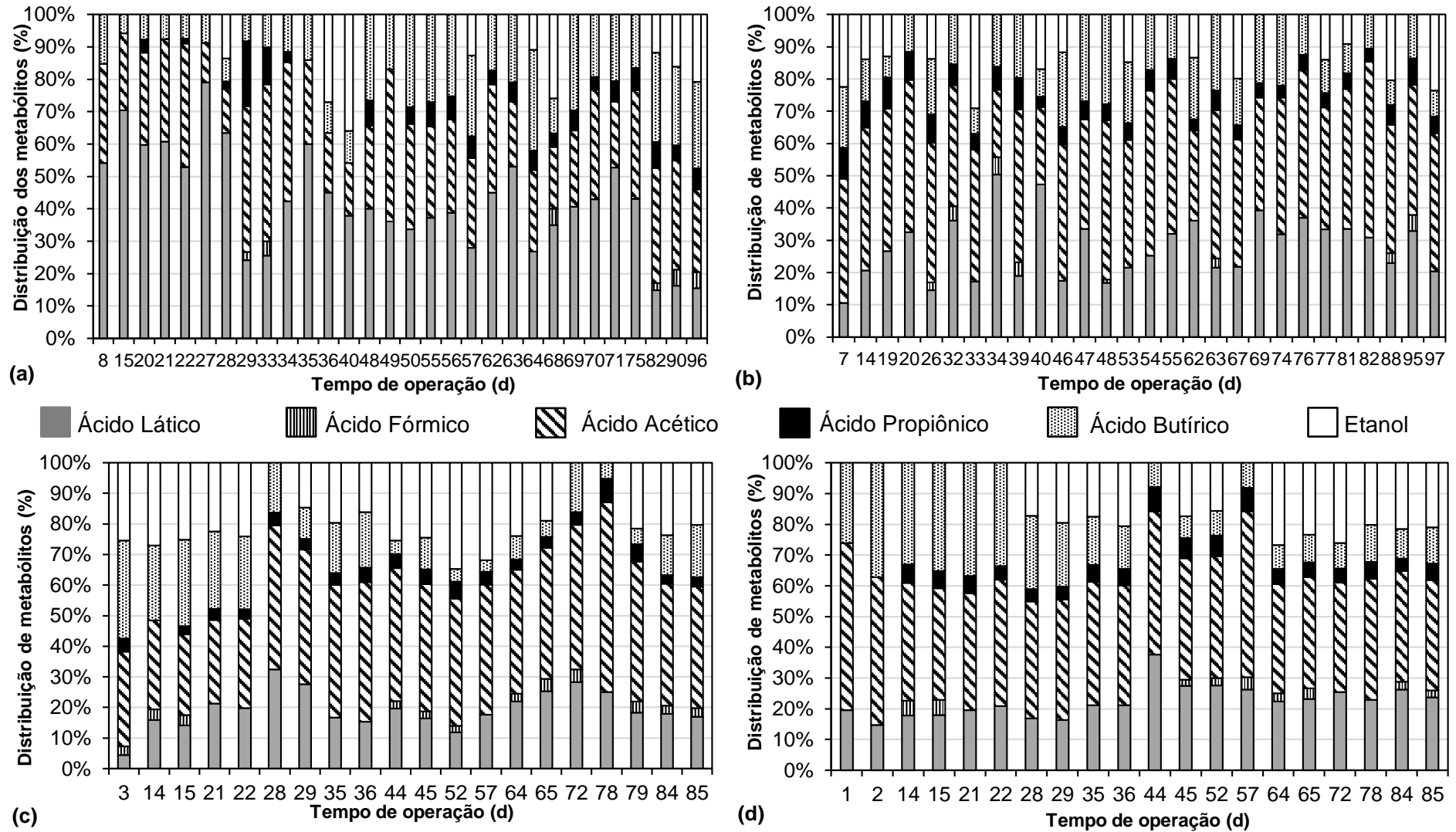
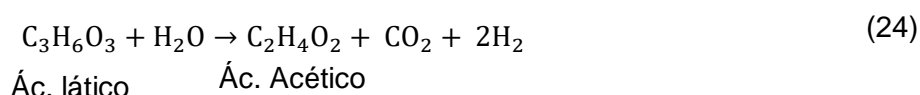


Figura 12 Proporção de metabólitos solúveis quantificados ao longo da operação dos ensaios: (a) E1 (24gDQO L⁻¹ d⁻¹), (b) E2 (48gDQO L⁻¹ d⁻¹), (c) E3 (72gDQO L⁻¹ d⁻¹) e (d) E4 (96gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 2h. Legenda: Ensaios (E1-E4).

Diferentemente do ocorrido em E1, o efeito negativo de HLa sobre a produção de H₂, durante o período de operação dos demais ensaios (E2, E3 e E4), não foi predominante, pois o monitoramento evidenciou uma diminuição da proporção de HLa presente nesses ensaios (28, 19 e 22%, respectivamente), ao mesmo tempo em que a proporção do ácido acético aumentou (Figura 12). Tal comportamento pode indicar a reação de consumo de HLa e sua respectiva conversão em outros produtos da fermentação, por exemplo, o HAc, conforme reação apresentada na Equação (24) (ANZOLA-ROJAS, 2014).



Apesar da interação pouco clara entre HLa com as bactérias produtoras de hidrogênio, na literatura, há trabalhos que associam a presença simultânea de bactérias do ácido láctico e *Clostridium* (KAWANO et al., 2004; ETCHEBEHERE et al., 2016), bem como a produção de hidrogênio por algumas espécies do gênero *Lactobacillus* (YANG et al., 2007). Em Castelló et al. (2017), a operação de um CSTR, a partir de soro de queijo, indicou produção de H₂ e não foi evidente a inibição total por ácido láctico ou bacteriocinas na fermentação de *Clostridium*. Andreani et al. (2019), também, observaram produção de hidrogênio com proporções de ácido láctico no meio de 44 e 57%, em dois dos seus ensaios com COVa de 12 e 14g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

Resultados da literatura têm demonstrado que as maiores produções de H₂, geralmente, estão ligadas a valores da razão H_{Bu}/H_{Ac} menores que 1,0, ou, de outra forma, expressa por razões H_{Ac}/H_{Bu} maiores que 1,0 (KHANAL et al., 2004; HAFEZ et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012; FERRAZ Jr. et al., 2014; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2015). No presente trabalho, os valores das razões H_{Bu}/H_{Ac} foram inferiores a 1,0, mais especificamente, com valores médios iguais a 0,64, 0,40, 0,41 e 0,45 no E1, E2, E3 e E4, respectivamente. Portanto, esse comportamento sugere que a rota fermentativa acética foi a via dominante, associada à produção de H₂.

Durante praticamente todo o período de operação dos ensaios no RCTM, os valores da razão H_{Bu}/H_{Ac} foram menores que 1,0 (Figuras 13a e b), sendo efetivamente possível associar que os períodos de produção crescente de H₂ coincidiram com os menores valores dessa razão. Mariakakis et al. (2011) também associaram valores menores que 1,0 à razão H_{Bu}/H_{Ac}, em condições de operação em que obtiveram os melhores resultados em rendimento de H₂. Hafez et al. (2010) observaram, para as cargas orgânicas em que houve os melhores rendimentos de H₂, valores de H_{Bu}/H_{Ac} entre 0,33 e 0,50. A ocorrência de valores superiores a 1,0 de H_{Bu}/H_{Ac} foi pontual e esteve associada aos ensaios E1 (48°, 63°,

64^o, 69^o e 96^o dia) e E3 (3^o e 15^o dia), os quais apresentam os valores de PVH e HY inferiores aos obtidos em E2 – que teve os melhores resultados, relacionados à produção de H₂, no presente estudo no TDH de 2h.

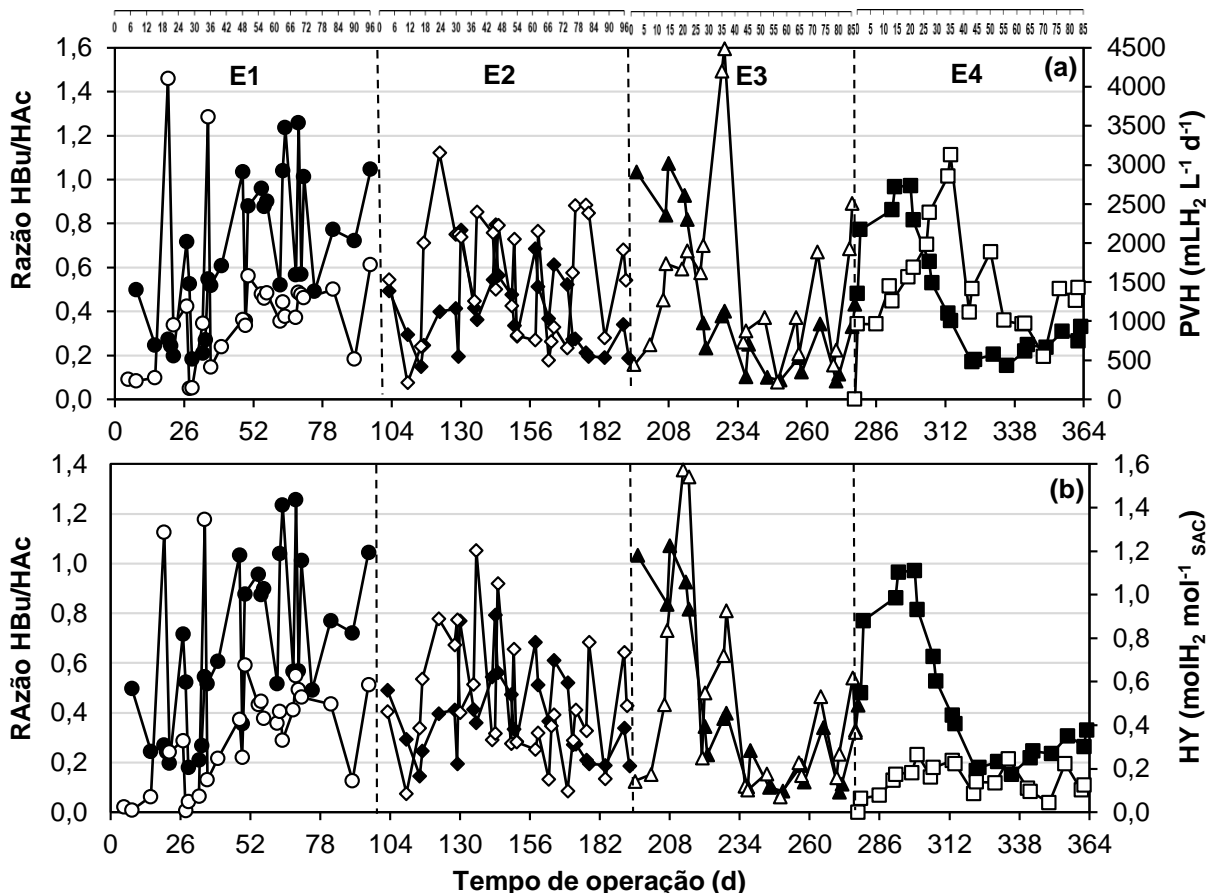


Figura 13 Razão HBU/HAC na ARS fermentada (-●-; -◆-; -▲-; -■-) e (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -○-; -◇-; -△-; -□-) e (b) rendimento de hidrogênio (HY, -○-; -◇-; -△-; -□-) nos ensaios E1 (-●-; -○-) (24 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E2 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E3 (-▲-; -△-) (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e E4 (-■-; -□-) (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH (2h). Legenda: Ensaios (E1-E4).

Os resultados observados nessa etapa validaram a hipótese central do trabalho, no que tange à produção contínua de H₂ no RCTM, durante longos períodos de operação. No TDH de 2h, em todos os ensaios, a produção foi contínua, independentemente do valor da COVe estar próximo ou superior aos valores indicados na literatura como adequados para a produção de H₂.

Do ponto de vista da estabilidade da produção de H₂, observou-se que esta não foi atingida em nenhuma das condições avaliadas, indicando, possivelmente, ser uma característica inerente ao processo acidogênico. Dessa forma, a parte da hipótese que se refere à produção estável de H₂ não foi atendida.

Embora a produção contínua de H_2 tenha sido registrada, para todos os ensaios, no TDH de 2h, os melhores desempenhos na produção foram obtidos nos ensaios com menores valores de COVa, indicando que a concentração do substrato (açúcares) influenciou o desempenho. Dessa forma, a hipótese foi atendida, no que se refere à influência da concentração do substrato.

5.2 Tempo de Detenção Hidráulica de 4h: Avaliação da Estabilidade Operacional, Conversão de Matéria Orgânica e Produção de hidrogênio

Nesta fase, o RCTM foi operado nas cargas orgânicas (COVa) de 24, 48, 72 e 96g DQO $L^{-1} d^{-1}$ e TDH, de 4h referentes, respectivamente, aos ensaios E5, E6, E7 e E8. Destaca-se que são os mesmos valores de COVa dos ensaios E1, E2, E3 e E4, porém, com TDH maior (4h). Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar o comportamento do reator em razão do aumento do TDH de 2h para 4h, mediante a variação da COVa.

O período de operação nos ensaios E5 e E6 foi de 98 dias cada e, nos ensaios E7 e E8, foi de aproximadamente 80 e 85 dias, respectivamente, totalizando um tempo de operação de 361 dias. Assim como nos ensaios E1 a E4, o tempo de operação dos ensaios E5 a E8 foi interrompido, mesmo havendo produção de diária de H_2 . Cada fase consistiu em operar o reator sob uma COVa diferente. As concentrações de substrato nos ensaios E5, E6, E7 e E8 foram de 4, 8, 12 e 16g DQO L^{-1} , perfazendo COVa de 24, 48, 72 e 96g DQO $L^{-1} d^{-1}$, respectivamente.

5.2.1 Desempenho do RCTM na produção de hidrogênio

Os resultados dos parâmetros operacionais e seus respectivos valores médios e máximos (pH, VBG, PVH, VMH e HY), eficiência na remoção de DQO solúvel e total, eficiência de conversão de carboidratos, concentração de sólidos suspensos voláteis da ARS de saída e proporção de H_2 , no biogás, nos ensaios E5, E6, E7 e E8, estão apresentados na Tabela 12.

Na Tabela 12, observa-se que os valores das variáveis PVH, VBG, VMH e HY foram influenciados pela variação da COVa. Os maiores valores foram obtidos nos ensaios E5 e E6. Para os ensaios E7 e E8, essas variáveis apresentaram valores muito reduzidos, indicando que a quantidade de substrato (12 e 16g DQO L^{-1} , respectivamente) desses ensaios pode ter causado inibição aos microrganismos presentes no meio.

No presente estudo, não houve controle do pH (durando o período de operação) e descarte de biomassa. A concentração média de SSV no efluente dos ensaios E5, E6, E7 e

E8 foram de $0,05 \pm 0,03$, $0,11 \pm 0,04$, $0,18 \pm 0,12$ e $0,16 \pm 0,05$, g L^{-1} , respectivamente. Essas concentrações foram maiores do que as obtidas nos ensaios E1 a E4, provavelmente, devido ao aumento da concentração do substrato.

Tabela 12 Desempenho do RCTM nos ensaios realizados com TDH de 4h.

Variável-resposta	Ensaio			
	(E5)	(E6)	(E7)	(E8)
	24 g DQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$	48 g DQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$	72 g DQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$	96 g DQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$
pH	3,7±0,4	3,6±0,5	4,0±0,4	4,2±0,5
	4,4 (18)	4,4 (18)	4,7 (9)	5,2 (8)
ER _{DQOt}	23,2±16,1	27,1±18,5	19,8± 17,2	13,4±11,4
	56,8 (20)	57,1 (15)	52,9 (13)	40,8 (12)
ER _{DQOs}	27,1±16,0	26,9±21,0	15,8±16,4	12,1±12,9
	62,6 (21)	68,3 (16)	63,7 (14)	50,4 (17)
EC _{SAC}	55,1±11,6	41,8±8,9	18,3±10,1	21,9±12,1
	77,9 (25)	62,0 (25)	35,7 (24)	50,4 (25)
SSV _e	0,05±0,03	0,11±0,04	0,18±0,12	0,16±0,05 (26)
	0,11 (27)	0,21(26)	0,54 (26)	0,29 (26)
H ₂ (biogás) (%)	63,0±47,8	64,1±10,3	58,7±23,0	48,8±21,0
	81,1 (25)	75,9 (25)	88,3 (23)	74,6 (25)
VBG	1716,5±917,3	2439,7±1440,8	347,4±295,9	471,6±230,7
	4917,1 (25)	4839,2 (25)	1323,7 (24)	1053,2 (25)
PVH	958,2±407,9	1444,6±881,5	166,7±140,1	209,3±130,6
	2053,9 (25)	2921,0 (25)	620,3 (25)	453,8 (25)
VMH	0,85±0,4	1,53±0,88	0,11±0,1	0,17±0,1
	2,0 (25)	2,9 (25)	0,5 (24)	0,4 (25)
HY	0,63±0,4	0,70±0,5	0,13±0,2	0,10±0,1
	1,7 (25)	1,8 (25)	0,9 (24)	0,4 (25)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras considerado no cálculo da média. Valores em *itálico* correspondem aos máximos observados no referido período operacional.

Variáveis-resposta: pH = pH de saída; ER_{DQOt} = eficiência de remoção de DQO total; ER_{DQOs} = eficiência de remoção de DQO solúvel; EC_{SAC} = eficiência de conversão de sacarose; SSV_e = concentração de sólidos suspensos voláteis na água residuária da saída (efluente); H₂ (biogás) = proporção de hidrogênio no biogás; VBG = vazão de biogás; PVH = produção volumétrica de hidrogênio; VMH = vazão molar de hidrogênio; HY = rendimento de hidrogênio.

Nos ensaios E5 a E7, o biogás foi constituído por fração de H₂ maior que de CO₂ (63,0, 64,1 e 58,7%, respectivamente), porém, no ensaio E8, o teor médio de H₂ foi menor que do CO₂. Em nenhum dos ensaios, houve a produção de metano (CH₄). O aumento da

COVa, no TDH de 4h, afetou negativamente a produção de H₂, sendo observada redução no teor de H₂ de 22,5%, conforme a COVa aumentou de 24 para 96g DQO L⁻¹ d⁻¹ (E5 a E8). Cabe mencionar que, durante os ensaios com TDH de 2h (E1 a E4), o teor de H₂ praticamente não sofreu alteração com o aumento da COVa.

Durante os ensaios E5 e E6, a vazão de biogás aumentou de 1716,5 para 2439,7 mL d⁻¹, quando a carga orgânica passou de 24 para 48g DQO L⁻¹ d⁻¹. Entretanto, quando houve o aumento da COVa de 48 para 72 e 96g DQO L⁻¹ d⁻¹, a VBG diminuiu em 85,7% e 80,6%, respectivamente. No TDH de 2h, a vazão de biogás e a composição foram semelhantes, não havendo diminuição dessas variáveis com o aumento da COVa de 24 para 96g DQO L⁻¹ d⁻¹.

Na Figura 14, são apresentados os perfis temporais da produção volumétrica de hidrogênio e vazão de biogás, composição do biogás (H₂ e CO₂), vazão molar, rendimento de hidrogênio e a carga orgânica aplicada ao reator, ao longo dos ensaios.

Os comportamentos observados para os parâmetros PVH e VMH (Figuras 14a-b) assemelham-se aos observados para o HY (Figura 14d), em especial, após o aumento da COVa para 72 e 96g L⁻¹ d⁻¹ (E7 e E8), em que foram obtidos valores extremamente baixos. Tais comportamentos podem estar associados às limitações impostas pelos altos valores de DQO, aplicados nos ensaios E7 e E8.

Nesse contexto, considerando estudos como os de Hafez et al. (2010) e Anzola-Rojas et al. (2016), que avaliaram a resposta da biomassa nos sistemas acidogênicos, em condições de excesso de substrato ou elevados valores de COVe (reduzidas concentrações de biomassa), pode-se entender que a perda de desempenho, quanto à produção de hidrogênio, nos ensaios E7 e E8, tende a ocorrer em razão da inibição da biomassa pelo substrato (condições de sobrecarga).

Nos ensaios E5 a E8, observa-se que as taxas de produção de H₂ foram baixas no período inicial dos experimentos (Figura 14a), pois o consumo de substrato foi usado, principalmente, para a proliferação microbiana. Esses resultados corroboram a afirmação de Ning et al. (2013), indicando que o primeiro estágio (1-15 dias) foi utilizado para o processo de crescimento microbiano, em ambiente anaeróbio, com baixo desempenho na produção de H₂. Somente após o 9º e 15º dia de operação, o desempenho da produção de H₂ aumentou gradualmente nos ensaios E5 e E6, respectivamente, devido, provavelmente, à diminuição da taxa de crescimento da biomassa. Os ensaios E7 e E8 também apresentaram até o 17º e 16º dia, respectivamente, um período de fase transiente, porém, após essa fase, os valores de PVH, VBG, VMH e HY permaneceram baixos até o final do período de operação.

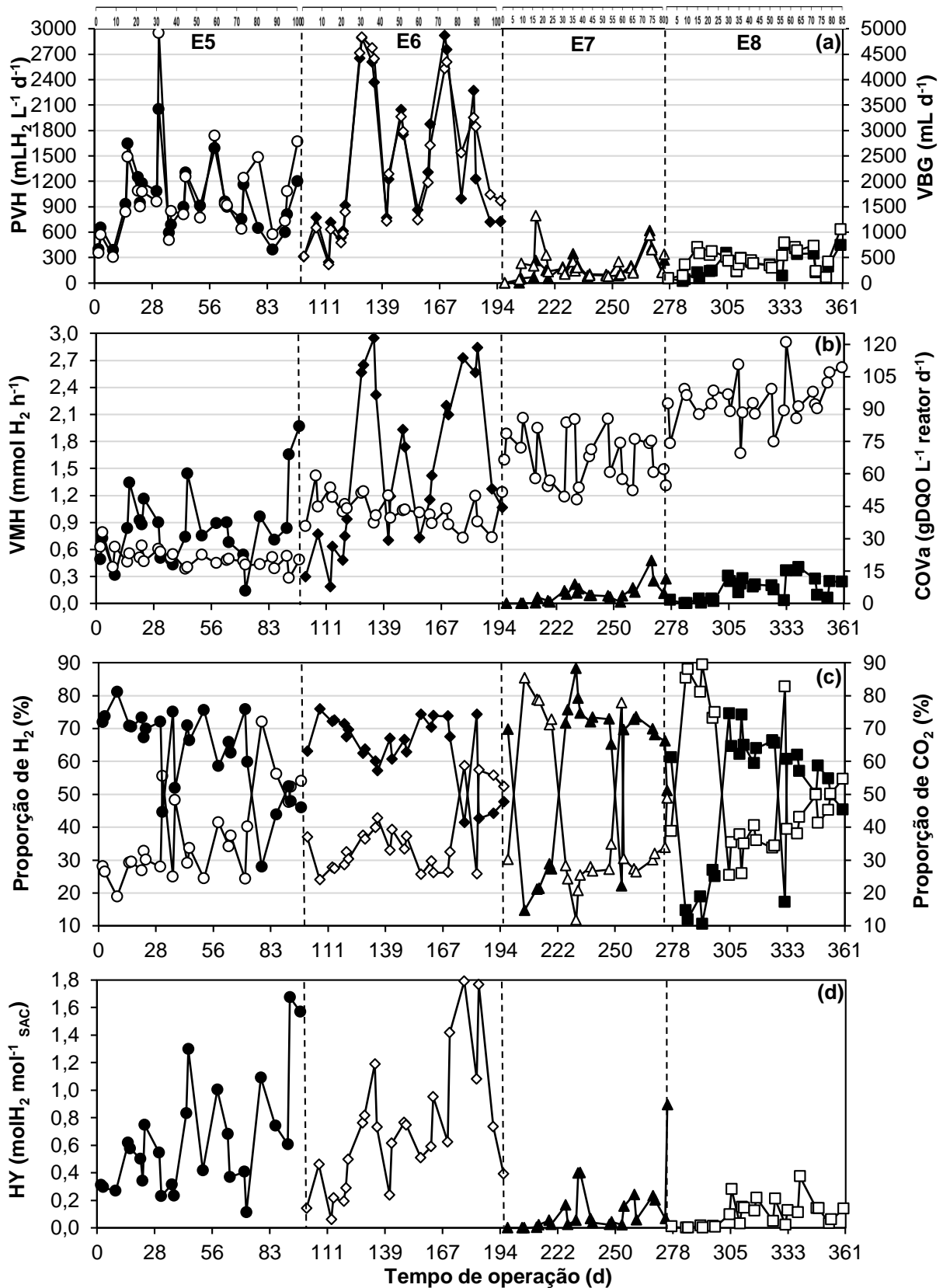


Figura 14 Produção de biogás e hidrogênio nos ensaios E5 (-●-; -○-) ($24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E6 (-◆-; -◇-) ($48 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E7 (-▲-; -△-) ($72 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e E8 (-■-; -□-) ($96 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) no TDH de 4h: (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e vazão de biogás (VBG, -○-; -◇-; -△-; -□-), (b) vazão molar de hidrogênio (VMH, -●-; -◆-; -▲-; -■-) e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa, -○-; -◇-; -△-; -□-), (c) composição do biogás (hidrogênio, -●-; -◆-; -▲-; -■-, gás carbônico, -○-; -◇-; -△-; -□-) e (d) rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Ensaios (E5-E8).

5.2.2 Comportamento do RCTM e conversão do substrato

Na Figura 15, são apresentados os valores de pH, eficiência de conversão da (EC_{SAC}) e eficiência de remoção de DQO total e solúvel (ER_{DQOt} e ER_{DQOs}), durante os ensaios E5 a E8.

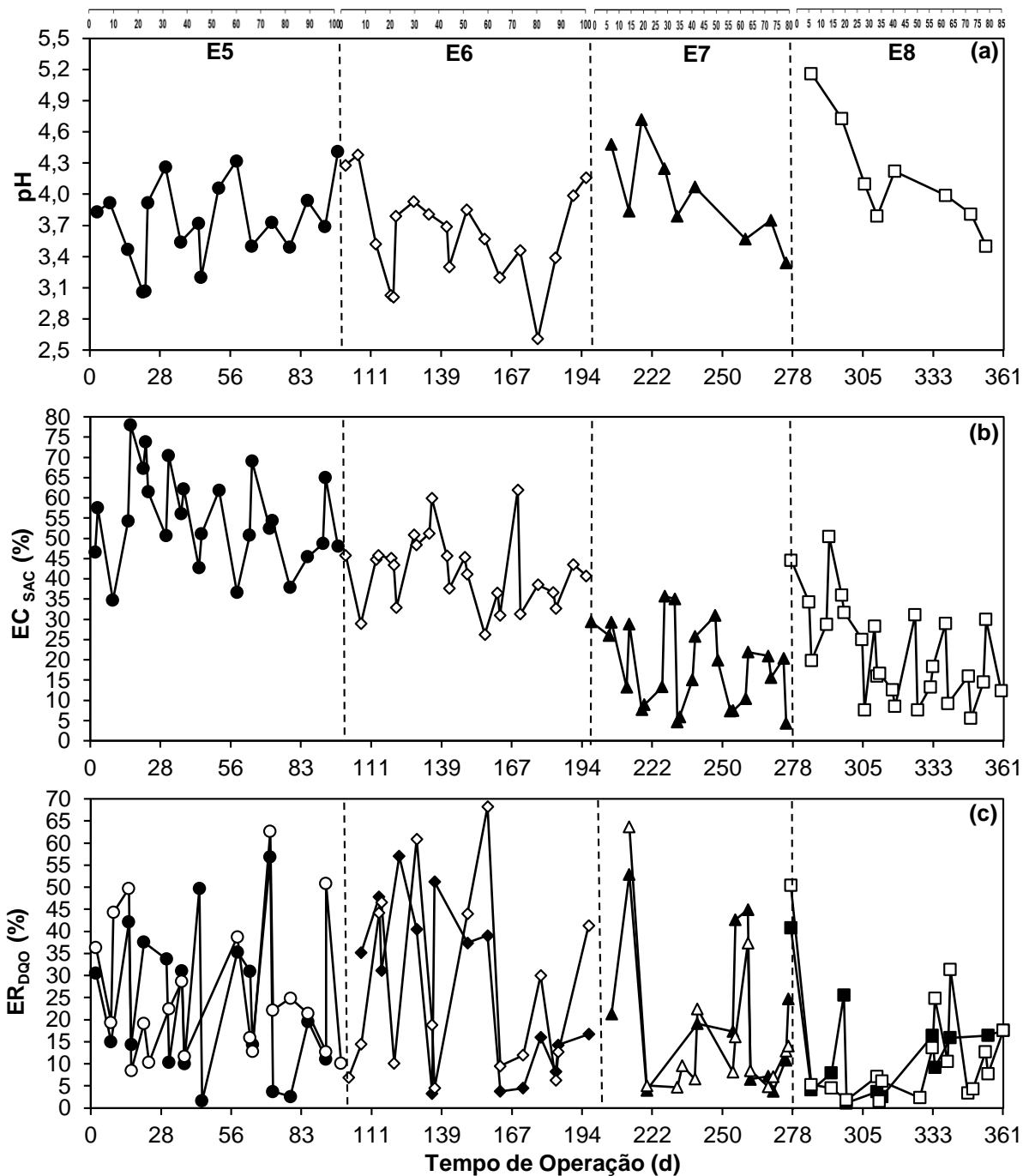


Figura 15 Monitoramento da fase líquida do reator RCTM nos ensaios E5 (-●-; -○-) ($24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E6 (-◆-; -◇-) ($48 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E7 (-▲-; -△-) ($72 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e E8 (-■-; -□-) ($96 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) no TDH de 4h: (a) o pH de saída do reator, (b) eficiência de conversão de sacarose (EC_{SAC}) e (c) eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO} ; total -●-; -◆-; -▲-; -■-, solúvel -○-; -◇-; -△-; -□-). Legenda: Ensaios (E5-E8).

Os valores médios de pH afluente ao RCTM foram ajustados em torno de 6,5. Como mostrado na Figura 15a, no final da fermentação da sacarose, o pH nos ensaios E5 e E6 esteve abaixo de 4,0 e, nos ensaios E7 e E8, em média de 4,1, abaixo do pH adequado de sistemas fermentativos aplicados à produção de H_2 (pH=5,5) (OLIVEIRA et al., 2020). Os resultados mostram que, apesar do aumento da DQO (4 a 16 g L^{-1}) e da COVa (24 a $96 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), nos ensaios E5 a E8, os valores médios do pH efluente foram similares.

Na Figura 14, pode-se observar que os melhores resultados de PVH, VMH e HY foram antecedidos da redução do pH (Figura 15a). Nos ensaios do TDH de 2h (E1 a E4), também foi observada essa relação com o pH ao longo do processo. No 21º e 22º dia de operação do ensaio E5, o valor do pH foi reduzido a 3,1, sendo observado aumento nos valores de PVH, VMH e HY, a partir do 23º dia. Comportamento parecido foi observado nos demais ensaios (E6, E7 e E8), destacando o E6, que apresentou as maiores reduções de pH, entre 3,0 e 2,6, no 21º e 79º dia de operação, respectivamente. Constatou-se, portanto, que após essas reduções de pH, os valores de PVH, VMH e HY foram máximos, considerando o intervalo de tempo analisado (Figura 14). Ferchichi et al. (2005) analisaram a influência do pH em reator batelada, utilizando soro de queijo como substrato, os quais encontraram os melhores resultados de HY e PVH nas faixas que apresentaram tendências de diminuição do pH.

Os comportamentos observados, referentes à conversão de sacarose, apresentados na Figura 15b, foram similares para a condição de TDH de 2h, em que as menores eficiências foram evidenciadas nos ensaios E3 e E7, quando a COVa apresentou valores de $72 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

O ensaio E5 apresentou as melhores eficiências, variando entre 35 e 78% (Figura 15b). Com o aumento das concentrações de DQO (12 e 16 g L^{-1}), as eficiências de conversão, nos ensaios E7 e E8, foram reduzidas, chegando a valores próximos de 5%. Os percentuais de conversão da sacarose, atingidos no TDH de 4h, são menores do que os dos ensaios com TDH de 2h. Por esses resultados, pode parecer que existe uma tendência de que o aumento do TDH tenha influenciado negativamente a conversão de sacarose, no entanto, as conclusões de Manssouri et al. (2013), Inoue et al. (2014) e Anzola-Rojas et al. (2016) indicam não haver tendência de que o TDH afete a conversão de sacarose. Portanto, as menores conversões, obtidas nos ensaios de 4h, estão relacionadas ao aumento da concentração de substrato, em termos de DQO.

Considerando a remoção de DQOt e DQOs, os resultados indicam que o aumento da COVa ocasionou a diminuição da eficiência de remoção de DQO (Figura 15c). A remoção de DQOt apresentou valores superiores em comparação à DQOs, exceto no ensaio E5, porém, a diferença não atingiu 4%. A remoção de matéria orgânica nesse sistema foi

compatível com as expectativas para sistemas acidogênicos (FERNANDES et al., 2010), que se caracterizam pela formação e acumulação da maioria dos metabólitos do processo de digestão anaeróbia.

5.2.3 Produção de biomassa e dinâmica da COVe

Para acompanhamento do desenvolvimento de biomassa nos reatores, análises de SSV dos efluentes acidificados foram realizadas semanalmente. As determinações de COVe foram realizadas ao final de cada ensaio. Os resultados da Figura 16a retratam a dinâmica da retenção de biomassa no RCTM e os das Figuras 16b-c apresentam a variação da COVe ao longo do tempo de operação.

A partir dos resultados da Figura 16a, verifica-se diminuição da concentração de biomassa acumulada nos reatores, nos ensaios E7 e E8, quando comparados com os ensaios E5 e E6. Esses resultados corroboram os apresentados na Tabela 12, em que o E6 apresentou o melhor desempenho na produção de H₂, provavelmente, em função da melhor retenção de biomassa no sistema.

Comparando-se os ensaios de igual COVa (24 g DQO L⁻¹ d⁻¹), E1 (2 h) e E5 (4 h), a retenção de biomassa foi superior no E5, porém, os maiores valores de PVH, VBG e VMH foram obtidos em E1. Cabe mencionar que, embora E5 tenha apresentado maior retenção de biomassa do que E1, as relações de geração de H₂ e consumo do substrato acabaram sendo afetadas negativamente por cargas orgânicas mais elevadas, devido ao acúmulo de biomassa, conforme indicou Manssouri et al. (2013). Esses autores justificaram que a geração de H₂ foi afetada pela maior retenção de biomassa, em função do consumo de substrato provavelmente ter privilegiado rotas metabólicas desfavoráveis à produção de H₂. Os autores chegaram a essa conclusão, pois foi observado, por meio de monitoramento dos metabólitos, que, nos ensaios de maior concentração de substrato, a formação de etanol se mostrou significativa desde o início do ciclo, o que fez com que reduzisse a produção.

Em termos de COVe, os valores obtidos nos ensaios E5, E6, E7 e E8 variaram entre 18,3 a 1,3; 21,2 a 2,5; 31,2 a 5,8 e 61,0 a 11,9g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹, respectivamente. Observa-se, na Figura 16b, que a diminuição dos valores de COVe ocorreu para todos os ensaios ao longo do tempo. Nos ensaios E5 e E6, os valores de COVe, a partir do 16^o dia, foram muito similares até o final da operação, destacando as melhores produções de hidrogênio para esses ensaios (Figura 16c).

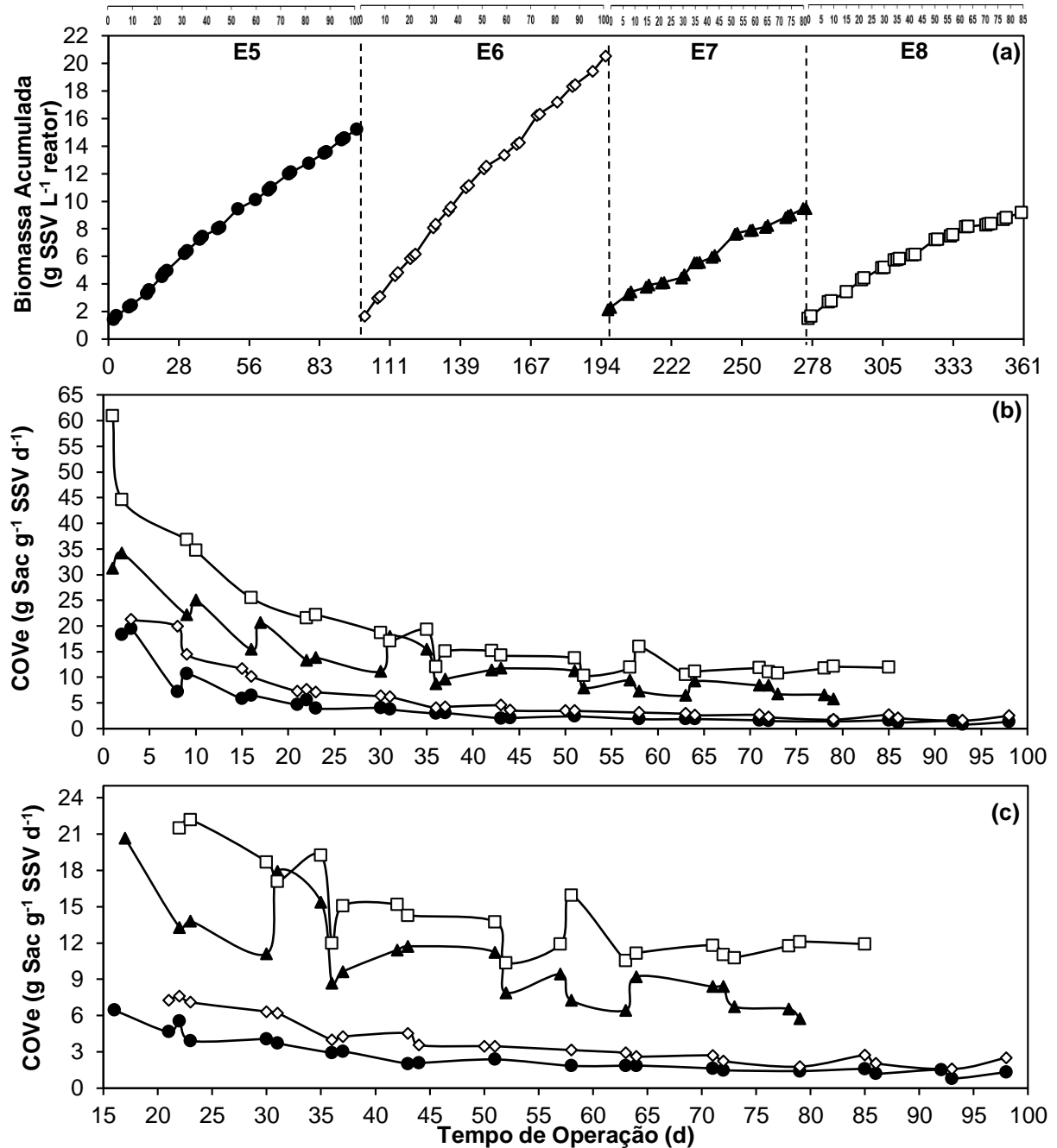


Figura 16 Performance da retenção de biomassa no reator RCTM nos ensaios E5 (-●-) ($24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E6 (-◇-) ($48 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), E7 (-▲-) ($72 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e E8 (-□-) ($96 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) no TDH de 4h: (a) concentração de biomassa retida no reator, (b) carga orgânica volumétrica específica (COVe) e (c) COVe a partir do período de aclimação da biomassa. Legenda: Ensaios (E5-E8).

Os dados da produção e retenção de biomassa para cada ensaio estão resumidos na Tabela 13.

Os valores médios de COVe, para os ensaios E5, E6, E7 e E8, equivalem a 4,39, 6,13, 13,42 e 19,26 $\text{g Sac g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, respectivamente (Tabela 13). Os resultados de COVe, para os ensaios E5 e E6, correspondem aos valores recomendados pela literatura para a

produção de hidrogênio em reatores acidogênicos. Hafez et al. (2010) associaram os maiores valores de HY para valores de COVe entre 4,4 a 6,4g DQOg⁻¹ SSV d⁻¹. Semelhantemente a esses valores, Anzola-Rojas et al. (2016) relataram que as melhores produções de hidrogênio coincidiram com valores de COVe na faixa de 4,3 a 6,9g DQOg⁻¹ SSV d⁻¹. Da mesma maneira, Anzola-Rojas e Zaiat (2015) justificaram o valor de 4,8g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹ como condição ideal para estabilidade na produção de H₂. Por sua vez, os resultados de Anzolas-Rojas et al. (2015) mostraram que os maiores valores de HY foram observados para uma COVe de 6,0g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹.

Tabela 13 Balanço de biomassa no RCTM com TDH de 4h.

Biomassa/Substrato	Ensaio			
	(E5) 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	(E6) 48 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	(E7) 72 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	(E8) 96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
Biomassa dentro do reator (g)	15,48	18,53	8,36	7,73
Biomassa aderida (g)	2,84	4,64	4,40	3,59
Biomassa suspensa (g)	12,63	13,89	3,96	4,14
Biomassa arrastada naturalmente (g)	33,99	64,86	89,65	87,86
Total biomassa gerada (g)	49,47	83,39	98,01	95,59
Total sacarose consumida (g)	1128,53	1784,61	1153,43	1777,22
Coefficiente de rendimento celular da biomassa Y_{X/S} (g SSV g⁻¹sac)	0,044	0,047	0,085	0,054
Biomassa arrastada (%)	68,7%	77,8%	91,5%	91,9%
Biomassa dentro do reator (%)	31,3%	22,2%	8,5%	8,1%
COVe (g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹)	4,39±4,7 (27)	6,13±5,3 (26)	13,42±7,6 (26)	19,26±12,3 (26)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras considerado no cálculo da média.

Blanco et al. (2017) atribuíram que os maiores níveis de produção de H₂ obtidos foram associados à manutenção do COVe dentro da faixa ideal (4,3 e 6,6 g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹), indicando o estabelecimento de condições equilibradas em termos de disponibilidade de substrato e retenção de biomassa no ASTBR de fluxo ascendente alimentado com glicose. Por outro lado, Gomes et al. (2015) associaram baixos níveis de produção de H₂ a altos valores de COVe (> 10 g de DQO g⁻¹ SSV d⁻¹) no RCTM. Esses autores sugeriram que os prejuízos na produção foram acarretados pelo excesso de biomassa arrastada (lavagem

celular) do reator, causando desequilíbrio na relação das quantidades de alimento e microrganismo.

Os ensaios E7 e E8 atingiram valores de COVe (13,42 e 19,26 g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹, respectivamente) superiores aos recomendados pela literatura (HAFEZ et al., 2010; ANZOLAROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2015). Os resultados desses ensaios mostram que a produção contínua e constante de H₂ não é alcançada eficientemente, devido, provavelmente, aos valores de COVe não se situarem em faixas adequadas.

Na Figura 17, são apresentados os valores de biomassa total gerada nos ensaios E1 a E4 e E5 a E8, em função da variação da COVa.

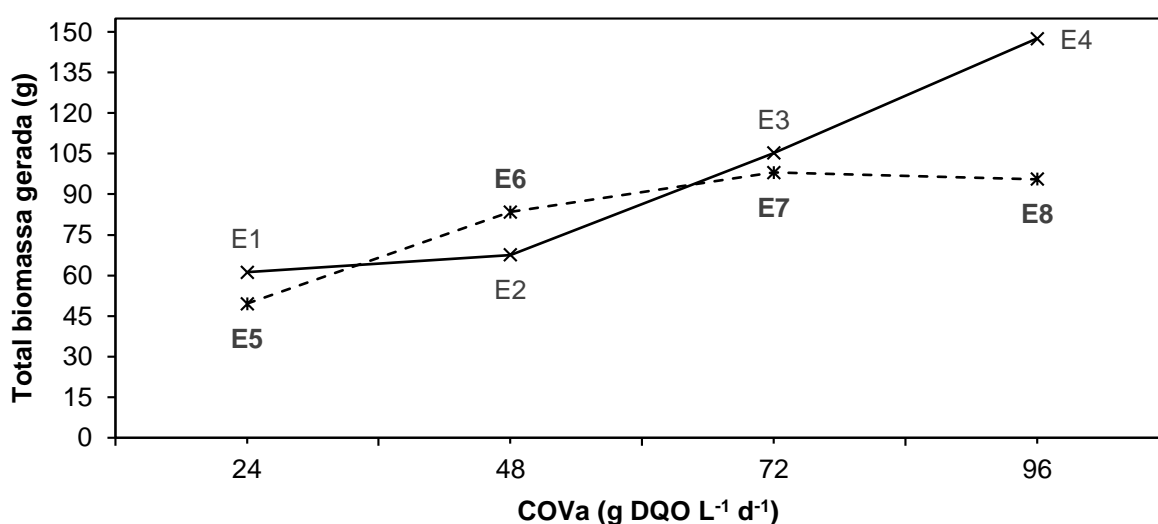


Figura 17 Biomassa total gerada em função da variação da COVa para os ensaios realizados no TDH de 2h (E1 a E4) e de 4 h (E5 a E8). Legenda: E1, E2, E3 e E4 (-x-) e E5, E6, E7 e E8 (--*--).

Nos ensaios E1 a E4, a quantidade de biomassa gerada elevou-se com o aumento da carga orgânica (de 24 para 96g DQO L⁻¹ d⁻¹) e da DQO do substrato (2, 4, 6 e 8g L⁻¹) (Figura 17). Já nos ensaios E5 a E8, o incremento da COVa não favoreceu a geração de biomassa em todos os ensaios. O aumento da DQO do substrato de 4 para 12g DQO L⁻¹ (COVa de 24 para 72g DQO L⁻¹ d⁻¹) manteve a tendência de crescimento da biomassa (ensaios E5, E6 e E7). No entanto, da COVa 72 para 96g DQO L⁻¹ d⁻¹, o crescimento da biomassa não respondeu, atingindo uma região de platô no gráfico. Tal comportamento deve ser decorrente da elevada concentração do substrato (16 g DQO L⁻¹), que pode inibir a biomassa.

Nos ensaios E3 e E4, que foram operados nas mesmas cargas orgânicas (72 e 96g DQO L⁻¹ d⁻¹), a biomassa respondeu ao aumento da COVa, pois, nesses ensaios, as concentrações de DQO no substrato foram de 6 e 8g DQO L⁻¹, correspondendo a 50% do valor dos ensaios E7 e E8 (12 e 16g DQO L⁻¹).

O acúmulo de biomassa, aderida às paredes dos tubos do reator, correspondeu a 5,74%, 5,56%, 4,48% e 3,75% da biomassa total gerada (Tabela 13), respectivamente, nos ensaios E5, E6, E7 e E8. Os ensaios E5 e E6 apresentam um comportamento similar em relação à porcentagem de biomassa aderida ao reator, obtendo melhores resultados de produção de H₂ do que os observados nos E7 e E8.

Além disso, a liberação natural de biomassa nos ensaios E7 e E8 foi superior a 90%. Por outro lado, os ensaios E5 e E6 tiveram apenas 68,7 e 77,8%, respectivamente, da sua biomassa arrastada. Apesar da diferença, em termos de COVa, nos E7 e E8, a biomassa dentro do reator nesses ensaios foi semelhante, correspondendo a menos de 9% da biomassa total, enquanto, nos ensaios E1 e E2, chegou a 31,3% e 22,2%, respectivamente. Os diferentes resultados, em relação à retenção de biomassa nos sistemas, afetaram diretamente os valores de COVe, como mostrado na Figura 16b.

As melhores produções de H₂ podem estar associadas ao melhor controle da biomassa, que ocorreu nos E5 e E6, assim como também foi observado nos ensaios em E1 e E2. O desempenho inferior de PVH, VMH e HY (Figura 14), observados nos ensaios E7 e E8, também pode estar relacionado ao expressivo arraste de biomassa. O arraste em elevado grau tem sido característico de sistemas que apresentam as condições menos adequadas ao controle e crescimento de biomassa.

Os coeficientes de rendimento celular ($Y_{X/S}$), obtidos neste trabalho, correspondem a 0,044, 0,047, 0,085 e 0,054 g SSV g⁻¹ sac para os ensaios E5, E6, E7 e E8, respectivamente, e são considerados característicos de microrganismos produtores de hidrogênio. As menores concentrações de DQO, aplicadas aos ensaios E5 e E6, não prejudicaram o arraste de biomassa nos reatores (Tabela 13, E5= 68,7% e E6= 77,8%), logo, foram mantidas maiores densidades celulares dentro do reator. Consequentemente, menos energia foi empregada para o crescimento celular, o que explica os menores valores de $Y_{X/S}$ nesses ensaios. Por outro lado, as maiores concentrações de matéria orgânica, aplicadas aos ensaios E7 e E8 (12 e 16mg L⁻¹), favoreceram maior arraste de biomassa do reator (Tabela 13, E7= 91,5% e E8= 91,9%), levando a uma produção celular mais alta, ou seja, os maiores $Y_{X/S}$ corresponderam a uma resposta direta dos microrganismos para compensar a perda contínua de atividade biológica com base no arraste.

Nesse sentido, os valores obtidos para o $Y_{X/S}$, neste estudo, estão de acordo com a literatura que descreve sistemas acidogênicos alimentados com sacarose. Para Hafez et al. (2009), rendimentos muito altos de biomassa em reatores acidogênicos são geralmente atribuídos a microrganismos que não produzem hidrogênio. Em Hafez et al. (2010), as melhores condições para produção de H₂ foram observadas para um coeficiente $Y_{X/S}$ igual a 0,1g SSV g⁻¹ CH, enquanto menores rendimentos foram associados a valores de $Y_{X/S}$ de 0,2

e 0,3g SSV g⁻¹ CH. Blanco et al. (2017) associaram maior $Y_{X/S}$ (0,077g SSV g⁻¹ sac) a condições menos favoráveis à retenção de biomassa e menores valores de $Y_{X/S}$ (0,048g SSV g⁻¹ sac) à maior retenção de biomassa em reatores de leito estruturado, alimentados com sacarose e submetidos à dosagem de cálcio. Aquino et al. (2017), tratando águas residuárias ricas em sólidos, relataram que os maiores valores de $Y_{X/S}$ (0,095g SSV g⁻¹ sac) corresponderam à menor retenção de biomassa (13,2%), observada no reator de leito estruturado, e os menores valores $Y_{X/S} = 0,067$ g SSV g⁻¹ sac foram associados ao reator de leito compacto convencional, que, com menor porosidade (72,3%), favoreceu a retenção de biomassa (36,4%) nos interstícios do seu material suporte.

Os valores de $Y_{X/S}$ relatados por Anzola-Rojas et al. (2015) (0,03 e 0,04g de SSV g⁻¹ sac), para reator anaeróbico de leito fixo e fluxo ascendente (alta adesão celular), são semelhantes aos encontrados nos ensaios E5 e E6, além de menores em comparação aos valores obtidos por Gomes et al. (2015) (0,06-0,08g de SSVg⁻¹ de sac), com o RCTM, no qual a adesão celular foi mínima, o que coincide com os valores de $Y_{X/S}$ nos ensaios E7 e E8.

5.2.4 Avaliação da Produção de Metabólitos da Fermentação

Como mostrado na Tabela 14, os principais metabólitos formados nos ensaios E5, E6, E7 e E8 foram acetato, etanol, lactato e butirato. As concentrações de ácido fórmico foram muito baixas e o propionato não se mostrou presente em todos os ensaios.

Tabela 14 Produção média dos produtos intermediários da fermentação no TDH de 4h.

Ensaio	Metabólitos					
	Ácido Láctico (HLA) (mg L ⁻¹)	Ácido Fórmico (HFO) (mg L ⁻¹)	Ácido Acético (HAc) (mg L ⁻¹)	Ácido Propiônico (HPr) (mg L ⁻¹)	Ácido Butírico (HBu) (mg L ⁻¹)	Etanol (EtOH) (mg L ⁻¹)
E5	139,6±43,1	-	381,8±90	84,0±15	231,1±80	478,2±73
24 g DQO L⁻¹ d⁻¹	231,4 (25)	-	572,5 (27)	108,7 (15)	445,3 (27)	578,6 (8)
E6	477,2±159	-	569,1±196	183,2±77	269,2±119	474,0±95
48 g DQO L⁻¹ d⁻¹	689,2 (24)	-	935,4 (26)	294,0 (18)	508,5 (26)	594,2 (12)
E7	462,8±142	83,6±25	347,2±70	-	138,8±101	292,6±132
72 g DQO L⁻¹ d⁻¹	652,8 (26)	112,5 (3)	465,0 (26)	-	548,4 (26)	579,5 (10)
E8	476,1±131	48,8±20	336,4±57	86,3±59	62,9±24	402,2±89
96 g DQO L⁻¹ d⁻¹	709,7 (27)	109,8 (27)	511,4 (27)	192,1 (5)	146,4 (23)	544,8 (13)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras considerado no cálculo da média. Valores em *itálico* correspondem aos máximos observados no referido período operacional.

Para o ensaio E5, os principais produtos foram o ácido acético, o ácido butírico e o etanol. Essa mesma resposta foi encontrada por Anzola-Rojas et al. (2015), operando reator anaeróbico de leite, ordenado com sacarose e COVa de 2g DQO L⁻¹, em TDH de 2 e 4h. Por sua vez, para os ensaios E6, E7 e E8, observou-se, principalmente, a produção de ácido acético, ácido láctico e etanol. Os autores supracitados também encontram essa sequência de proporção de metabolitos, devido ao aumento da concentração do substrato de 4g para 16g DQO L⁻¹, em TDH de 4h.

A concentração máxima de HAc foi de 569,1±196 mg L⁻¹ no E6. Nos ensaios E7 e E8, o HLa foi o principal metabólito produzido em concentrações médias de 462,8±142 e 476,1±131, respectivamente. Por outro lado, no E5, embora a COVe permaneceu dentro da faixa ideal (Tabela 13), uma mudança na via metabólica para a fermentação do EtOH (478,2±73 g L⁻¹) pode ter prejudicado severamente a produção de H₂.

A inibição do crescimento da biomassa, pela elevada concentração do substrato, observado na Figura 17, para os ensaios E7 e E8, pode ser decorrente do aumento da concentração de ácidos orgânicos, gerados na conversão dos açúcares. Dessa forma, como, nos ensaios E7 e E8, foram aplicadas maiores cargas de DQO, isso implicou em maior geração e acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente, os ácidos acético, butírico e láctico (Tabela 14).

Os valores de pKa dos ácidos acético, butírico e láctico equivalem a 4,75, 4,8 e 3,86, respectivamente. Considerando que todos os ensaios apresentaram pH na faixa de 3,6 a 4,7, significa que esses ácidos se apresentam na forma não dissociada, pois esses valores de pH são menores do pKa dos referidos ácidos. Castelló et al. (2020) explicam que, na forma não dissociada, esses ácidos são lipofílicos, conseqüentemente, podem atravessar a membrana celular microbiana. No citoplasma, esses ácidos podem se dissociar e liberar prótons que acidificam o meio. A necessidade de energia é aumentada para manter o pH interno, resultando em um efeito adverso no metabolismo e crescimento microbiano. Portanto, assumindo que os ácidos acético, butírico e láctico são os principais ácidos da fermentação do substrato, o acúmulo significativo desses ácidos pode ter inibido a atividade metabólica da biomassa.

Na Figura 18, são apresentados os perfis temporais das concentrações dos produtos da fermentação e, na Figura 19, a distribuição percentual.

Os valores baixos de PVH, VMH e HY, observados nos ensaios E7 e E8 (Figura 14), associados às porcentagens mais altas de HLa (Figura 18b-c, 43% em ambos os ensaios), corroboram essa tendência, ou seja, os impactos na produção de H₂, devido à formação de HLa, podem resultar da competição entre as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) e as produtoras de H₂, pelo substrato (Equação 25). Além disso, a presença do EtOH nesses

ensaios (Figura 19c-d) pode indicar que o substrato foi convertido diretamente em etanol (Eq. 3), levando a taxas de produção nulas de H₂.



A literatura também indica que a produção de EtOH em sistemas fermentativos tem sido associada com a preferência dos microrganismos produtores de H₂ para produzir solventes em condições de baixos valores de pH, corroborando o comportamento observado neste trabalho (Tabela 12). Ren et al. (2007) informam que a faixa adequada para a fermentação do etanol está entre 4,0-5,0. Algumas espécies de *Clostridium* geralmente produzem etanol após a produção de hidrogênio (ANZOLA-ROJAS & ZAIAT, 2015).

A maior porcentagem de HAc, obtida em E6 (38%), e o valor de COVe ideal (6,13 g Sac g⁻¹ SSV d⁻¹) coincidem com o melhor desempenho em termos de PVH, VMH e HY, durante todo o tempo de operação. Neste ensaio, a produção de HPr foi detectada em alguns períodos (Figura 19b), com um valor médio de 183,2±77 (11%), durante o período operacional. Porém, a via fermentativa propiônica, provavelmente, não impactou a produção de H₂ neste ensaio, pois os níveis mais altos de produção de H₂ foram provavelmente associados à fermentação pela via do ácido acético. Destaca-se que foi observado aumento nas concentrações de HPr nos outros ensaios (~6-8%).

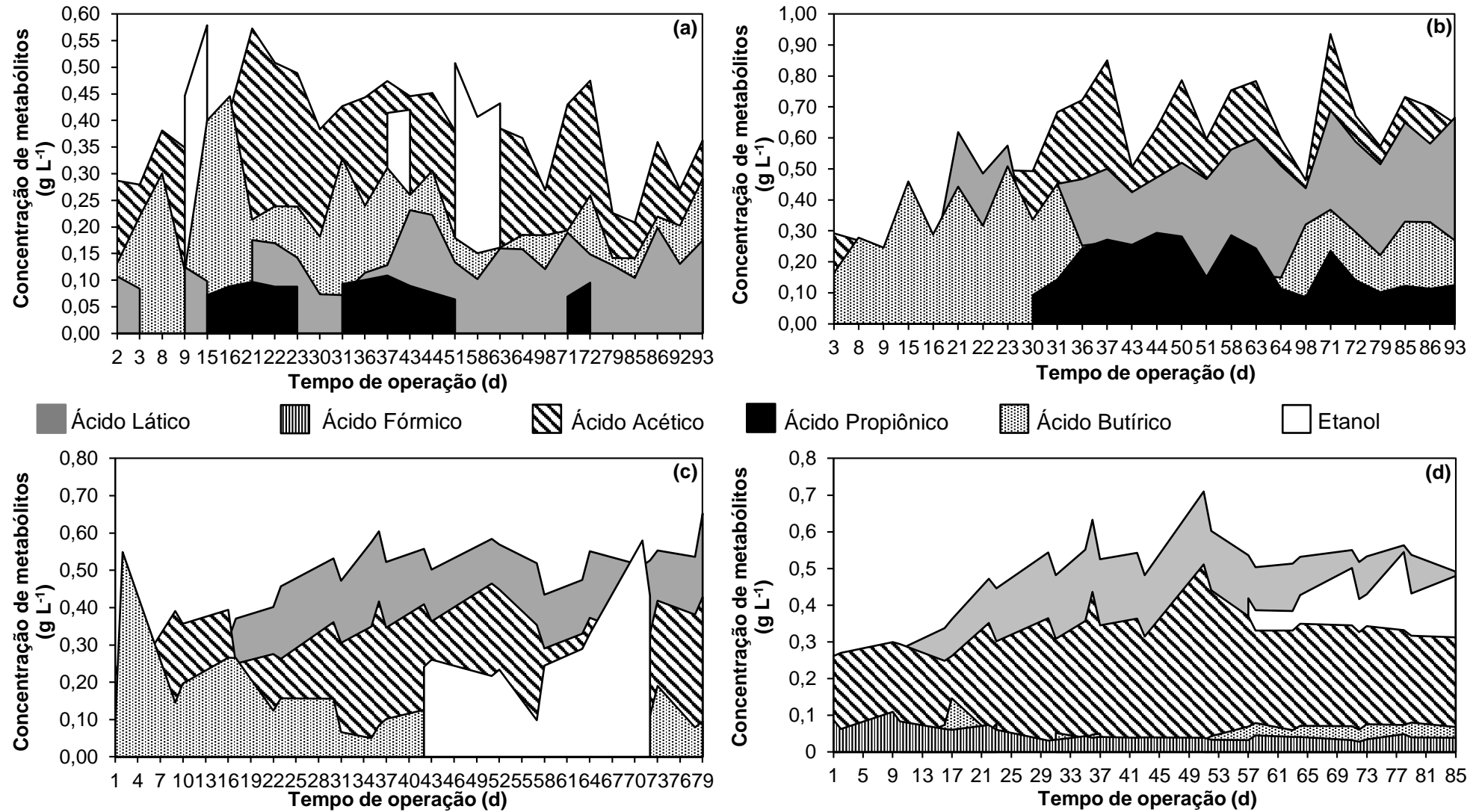


Figura 18 Perfil temporal de concentração de metabólitos ao longo da operação dos ensaios: (a) E5 (24gDQO L⁻¹ d⁻¹), (b) E6 (48gDQO L⁻¹ d⁻¹), (c) E7 (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e (d) E8 (96gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 4h. Legenda: Ensaios (E5-E8).

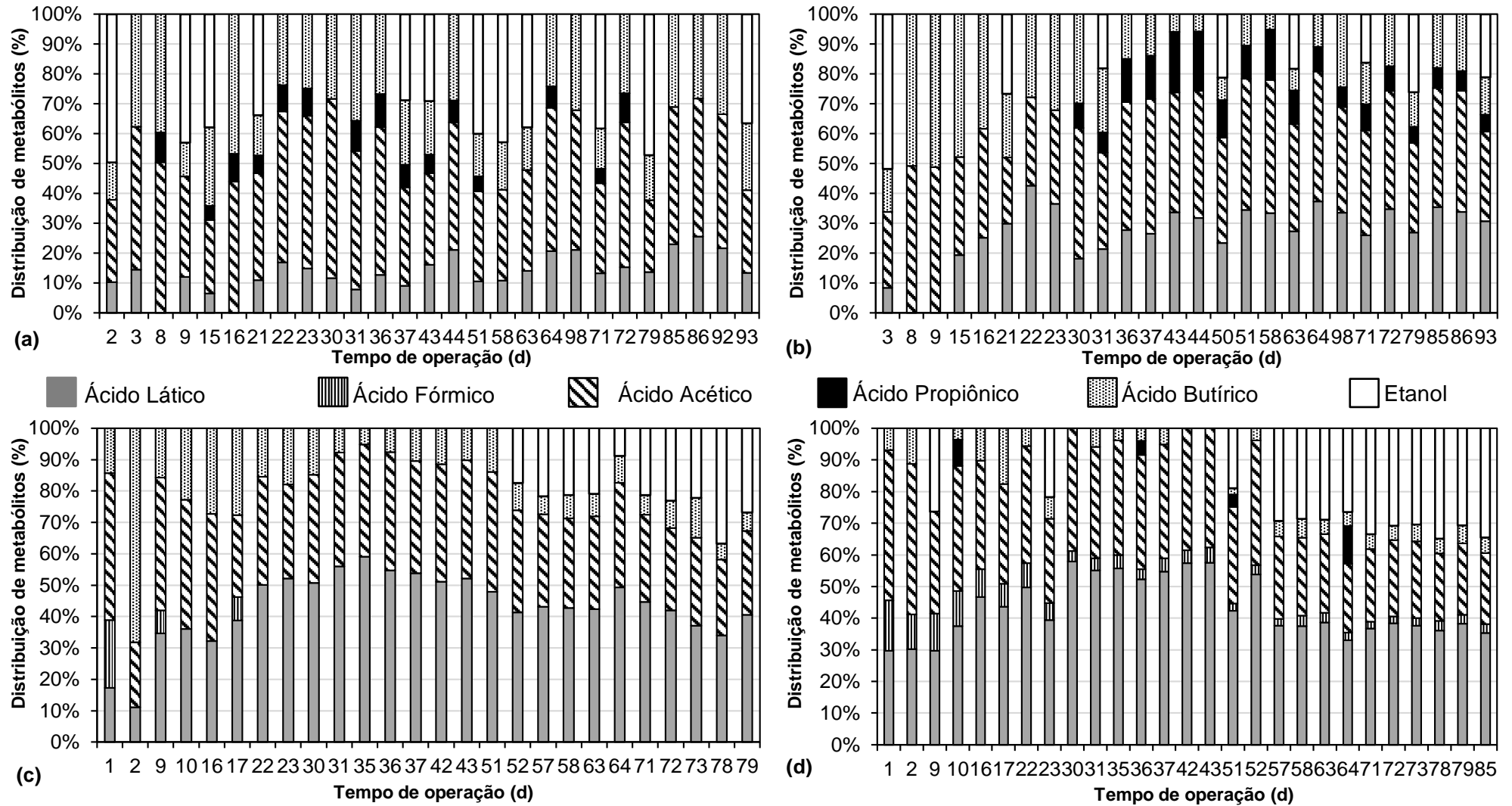


Figura 19 Proporção de metabólitos solúveis quantificados ao longo da operação dos ensaios: (a) E5 (24 gDQO L⁻¹ d⁻¹), (b) E6 (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), (c) E7 (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e (d) E8 (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 4h. Legenda: Ensaios (E5-E8).

Em todos os ensaios com TDH de 4h, os valores da razão HBU/HAC, ao longo da operação, foram menores do que 1,0 (Figura 20). Esse comportamento sugere que a principal rota fermentativa, associada à produção de hidrogênio, neste trabalho, compreendeu a do tipo acética.

Os valores médios dessa razão para os ensaios E5, E6, E7 e E8 foram 0,61, 0,56, 0,47 e 0,20, respectivamente, correspondendo os menores valores aos ensaios com as menores produções de H₂ (E7 e E8). Nos ensaios E5 e E6, os períodos de produção crescente de hidrogênio estiveram associados aos menores valores da razão HBU/HAC (<1,0).

A literatura atribui maiores produções de hidrogênio, a partir de águas residuárias, ricas em carboidratos, a baixos valores da razão HBU/HAC (0,3-0,9) (KHANAL et al., 2004; HAFEZ et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012; ANZOLA-ROJAS et al., 2015). A ocorrência de valores superiores a 1,0 de HBU/HAC foi pontual e esteve presente nos ensaios E5, apenas no 14º e 15º dia, e E6, no 8º, 9º, 15º e 16º dia de operação, os quais correspondem aos dias de aclimação da biomassa em ambos os ensaios.

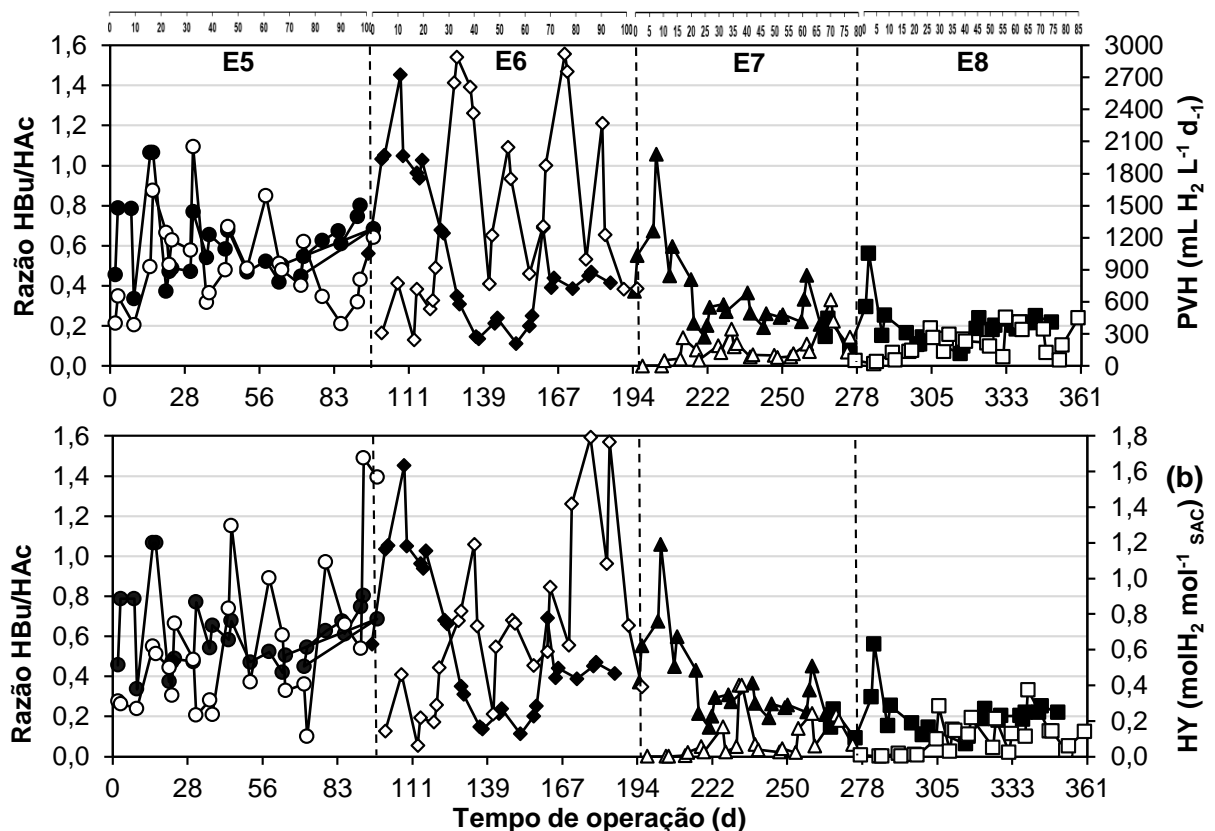


Figura 20 Razão HBU/HAC na ARS fermentada (-●-; -◆-; -▲-; -■-) e (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -○-; -◇-; -△-; -□-) e (b) rendimento de hidrogênio (HY, -○-; -◇-; -△-; -□-) nos ensaios E5 (-●-; -○-) (24 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E6 (-◆-; -◇-) (48 gDQO L⁻¹ d⁻¹), E7 (-▲-; -△-) (72 gDQO L⁻¹ d⁻¹) e E8 (-■-; -□-) (96 gDQO L⁻¹ d⁻¹) no TDH (4h). Legenda: Ensaios (E5-E8).

Nas condições operadas no TDH de 4h (E5 a E8), não foi possível ajustar um modelo matemático que indicasse o valor de COVa, o qual permitisse atingir o valor ótimo de HY, tendo em vista que, nas condições das duas maiores cargas (72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹), a produção de H₂ foi praticamente nula.

Os resultados dessa etapa validaram parcialmente a hipótese central. A operação com o RCTM permitiu evidenciar que a COVe se manteve em faixa adequada à produção de hidrogênio, nos ensaios E5 e E6. Dessa forma, foi possível manter a produção por longos períodos de operação, embora com instabilidade.

O TDH não afetou o desempenho do reator contínuo de tubos múltiplos, invalidando, em parte, a hipótese proposta. No entanto, o excesso de substrato prejudicou a manutenção da COVe em níveis adequados; nos ensaios E7 e E8, os resultados permitem observar que a produção de hidrogênio, em RCTM, aplicando altas cargas (E7 e E8), é inviável, uma vez que o desempenho é muito baixo. Dessa forma, a hipótese central foi atendida parcialmente, no que se refere à influência da concentração do substrato.

6 CONCLUSÕES

O RCTM, com ranhuras no interior dos tubos, no formato rosca sem fim, atingiu a produção contínua de H_2 por longos períodos, sem a necessidade de utilização de estratégias operacionais para o descarte da biomassa.

A produção de H_2 , no RCTM, foi contínua, durante longos períodos de operação (~ 90 dias), mesmo em condições de faixa de valores médios de COVe, entre 4,39 e 19,8g sacarose g^{-1} SSV d^{-1} .

A produção de H_2 se mostrou dependente da concentração do substrato, indicando inibição do processo, a partir da DQO afluente de $12g L^{-1}$ (COVa=72 g DQO $L^{-1} d^{-1}$; TDH=4h).

O melhor desempenho do RCTM, na produção de H_2 (PVH=1593,6 mL $H_2 L^{-1} d^{-1}$; HY=0,50 mol $H_2 mol^{-1}$ sac), foi obtido na condição E2, COVa = 48g DQO $L^{-1} d^{-1}$ (DQO 4000mg DQO L^{-1} ; TDH 2h).

Os principais metabólitos, produzidos durante a operação dos ensaios, foram: ácido acético, ácido láctico, etanol e ácido butírico.

A estabilidade da produção de H_2 não foi atingida em nenhuma das condições avaliadas, indicando, possivelmente, ser uma característica inerente ao processo acidogênico.

O RCTM se mostrou promissor para a produção contínua de hidrogênio, mantendo a biomassa adequada no reator, desde que a COVa não atinja $72g DQO L^{-1} d^{-1}$, com TDH de 4h.

7 CONSIDERAÇÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da avaliação do reator RCTM, na produção de hidrogênio e controle da COVe, algumas recomendações e sugestões são propostas:

- A exploração de diferentes cargas orgânicas volumétricas aplicadas: visto que, no TDH de 4h, houve uma possível inibição da produção de H₂ pelo excesso de substrato (12 e 16g DQO L⁻¹); sugere-se avaliar cargas intermediárias a 48 e 72g DQO L⁻¹ d⁻¹, para evidenciar uma melhor produção de hidrogênio;
- Caracterização das comunidades microbianas: investigar a dinâmica de colonização presente no RCTM, frente a identificar os microrganismos que proliferam sob diferentes COVa e TDH, atribuindo importantes considerações sobre possíveis estratégias operacionais do sistema;
- Diferentes estratégias de inoculação: considerando que o processo de autofermentação possui menor variedade de microrganismos e pode ser mais vulnerável às variações externas, testar outros inóculos, visando aumentar a capacidade de produção de H₂ no RCTM;
- Aplicação de águas residuárias reais ao RCTM: tendo em vista a importância do aproveitamento de efluentes, para fins econômicos, e levando em consideração que, após as modificações realizadas, na parte interna dos tubos, o reator ainda não foi operado com águas residuárias reais, tal estudo forneceria informações sobre o comportamento do RCTM, a partir de efluentes com maiores quantidades de sólidos suspensos;
- Aumento do número de tubos: avaliada a relevância que a concentração de biomassa tem para a produção de hidrogênio, recomenda-se a execução de um RCTM com maior número de tubos, visando aumentar a área de contato para maior adesão da biomassa.

8 REFERÊNCIAS

AMORIM, E. L. C. D.; BARROS, A. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 783-790, 2009.

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

ANDREANI, C.L., TONELLO, T.U., MARI, A.G., LEITE., L.C.C., CAMPANA, H.D., Lopes, D.D., RODRIGUES, J.A.D., GOMES., S.D. Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava starch wastewater rich in lactic acid. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.44, p.1474-82, 2019.

ANZOLA-ROJAS, M. D. P. **Estratégias para produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2014. 161 f. Tese. (Doutorado em engenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

ANZOLA-ROJAS, M. D. P. **Influência relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

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

ANZOLA-ROJAS, M.P., ZAIAT, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.91, p.1551-61,2015.

ANZOLA-ROJAS, M.P., ZAIAT, M., DE WEVER, H., Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 42-49, 2016.

APHA; AWWA; WPCF - **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: Association, American Public Health,1600 p., 2005.

AQUINO, S., FUESS, L.T., PIRES, E.C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 219-228, 2017.

ARANTES, M.K., ALVES, H.J., SEQUINEL, R., SILVA, E.A. Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. **International Journal Hydrogen Energy**, v.42, p. 26243-56, 2017.

ARGUN, H.; KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7443-59, 2011.

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

ARIMI, M. M.; KNODEL, J.; KIPROP, A.; NAMANGO, S. S.; ZHANG, Y.; GEIßEN, S. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, 101-118, 2015.

BABU, V. L.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3305-12, 2009.

BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 3379-88, 2010.

BLANCO, V.M.C., FUESS, L.T., ZAIAT, M. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 12181-96, 2017.

CARMINATO, V. M. **Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. 2013. 82 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

CASTELLÓ, E. et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, 109602, 2020.

CASTELLÓ, E., BRAGA, L., FUENTES, L., ETCHEBEHERE, C. Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.43, p. 2654-266, 2018.

CHANG, J. S.; LEE, K. C.; LIN, P. J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1167-74, 2002.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 695-699, 2004.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 56-64, 2001.

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

CORBARI, S.D.M.L., ANDREANI, C.L., TORRES, D.G.B., ENG, F.; GOMES, S. D. Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. **International Journal Hydrogen Energy**, v. 44, p. 17214-23, 2019.

DAS VEZIROGLU, D. T.N.. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046-57, 2008.

DHAR BR, ELBESHISHY E, HAFEZ H, LEE HS. Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 223-230, 2015.

DONG, L.; ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; XIAOYING, K.; YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 812-820, 2009.

DRAKE, H. E.; GÖBNER, A. S.; DANIEL, S. L. Old acetogens, New light. **New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 100-128, 2008.

DRAKES, H. L., KÜSEL, K., MATTHIES, C. Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 203-213, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, Minnesota, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELBESHISHY, E.; DHAR, B.; NAKHLA, G.; LEE, H. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656-668, 2017.

EROGLU, E.; EROGLU, I.; GÜNDÜZ, U.; TÜRKER, L.; YÜCEL, M. Biological hydrogen production from olive millwastewater with two-stage processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31, p.1527-35, 2006.

ESTEVAM, A.; ARANTES, M.; ANDRIGHETO, C.; FIORINI, A.; SILVA, E.; ALVES, H. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, p. 4276- 83, 2018.

ETCHEBEHERE C, CASTELLO E., WENZEL J., ANZOLA- ROJAS M.P., BORZACCONI L., BUITRON G., et al. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.100, p. 3371-84, 2016.

FERCHICHI, M.; CRABBE, E.; GIL, G. H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v.120, p. 402-409, 2005.

FERNANDES BS, PEIXOTO G, ALBRECHT FR, SAAVEDRA DEL AGUILA NK, ZAIAT M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v.14, p.143-148, 2010.

FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2008. 100 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

FERNANDES, B.S., SAAVEDRA, N.K., MAINTINGUER, S.I., SETTE, L.D., OLIVEIRA, V.M., VARESCHE, M.B.A., ZAIAT, M. The effect of biomass immobilization support material and bed

porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. **Applied Biochemistry. Biotechnology**, v.170, p.1348-66, 2013.

FERRAZ Jr., A. D. N. F.; 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.

FERRAZ JR., A.D.N, WENZEL, J, ETCHEBEHERE, C., ZAIT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p.16852-62, 2014.

FERRAZ Jr., A.D.N., ETCHEBEHERE, C., ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packedbed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v.186, p.81-88, 2015.

FUESS, L.T., KIYUNA, L.S, GARCIA, M.L, ZAIAT, M. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane still age in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.41, p. 8132-45, 2016.

FUESS, L.T., ZAIAT M., NASCIMENTO, C.A.O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 28, 121379, 2019.

GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; AHRING, B. K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 9, p. 1164-75, 2006.

GHIMIRE A, FRUNZO L, PIROZZI F, TRABLY E, ESCUDIE R, LENS PN, ESPOSITO G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v.144, p.73-95, 2015.

GINKEL, V. S. V.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 24, p. 4726-4730, 2001.

GINKEL, V. S. W.; OH, S. E.; LOGAN, B. E. B. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1535-42, 2005.

GOMES, S.D.; FUESS, L.T.; PENTEADO, E.D. ; LUCAS, S.D.M. ; GOTARDO, J.T. ; ZAIAT, M. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p.8120-31, 2016.

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

GORGEÇ, F.; KARAPINAR, I. Production of biohydrogen from waste wheat in continuously operated UPBR: The effect of influente substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.44, p. 17323-17333, 2019.

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

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

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, H. E.; ELBESHISHY, E.; BAGHCHEHSARAEI, B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 81-92, 2010.

HALLENBECK, P.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 1-9, 2012.

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

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p.172-184, 2007.

HUNG, C. H.; CHANG, Y. T.; CHANG, Y. J. Roles of microorganisms other than clostridium and enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 102, p. 8437-44, 2011.

INOUE, R. K., LIMA, D.M., RODRIGUES, J. A. D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M. Effect of Organic Loading Rate and Fill Time on the Biohydrogen Production in a Mechanically Stirred AnSBBR Treating Synthetic Sucrose-Based Wastewater. **Applied Biochemistry. Biotechnology**, v. 174, p.2326-49, 2014.

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

KARADAG, D.; PUHAKKA, J. A. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10245-51, 2010.

KAWANO, T.; WADA, K.; LI, Y.; NOIKE, T. Effect of Substrate Concentration and pH on Hydrogen Fermentation of Mixed Substrate by Microflora. **Journal of Japan Society on Water Environment**, v. 27, p. 473-479, 2004.

KHAN, M.A; NGO, H.H; GUO, W.; LIU, Y.; ZANG, X.; GUO, J.; CHANG, S. W.; NGUTYEN, D.D.; WANG, J. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. **Renewable Energy**, v.129, p. 754-768, 2018.

KHANAL, S. K.; CHEN, W-H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1123-31, 2004.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Effects of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 199-207, 2006.

KYAZZE, G., MARTINEZ-PEREZ, N., DINSDALE, R.M., HAWKES, F.R., HAWKES, D.L. AND GUWY, A.J. Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 971-979, 2006.

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

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

LEE, K. S.; LO, Y. S.; LO, Y. C.; LIN, P. J.; CHANG, J.S. H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactor. **Biotechnology Letter**, v. 25, p. 133-138, 2003.

LEITE JAC, FERNANDES BS, POZZI E, BARBOZA M, ZAIAT M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **Internacional Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.579-86, 2008.

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

LI, C.; FANG, H.H.P.; Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science Technology**, v.37, p.1-39, 2007.

LIMA, D. M. F., 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, p. 9630-35, 2012.

LO, Y. C.; CHEN, W. M.; HUNG, C. H.; CHEN, S. D.; CHANG, J. S. Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. **Water Research**, v. 42, n. 4, p. 827-842, 2008.

LO, Y.; SU, Y.; CHEN, C.; CHEN, W.; LEE, K.; CHANG, J. Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5802-07, 2009.

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

LUCAS, S.D.M.; PEIXOTO, G.; MOCKAITIS, G.; ZAIAT, M.; GOMES, S.D. Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. **Renewable Energy**, v. 75, p. 496-504, 2015.

MAINTINGUER, S; FERNANDES, B.; DUARTE, I.; SAAVEDRA, N.; ADORNO, M.; VARESCHE, B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4309 - 4317, 2008.

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

MARIAKAKIS, I.; BISCHOFF, P.; KRAMPE, J.; MEYER, C.; STEINMETZ, H. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p.11690-700, 2011.

MU, Y.; YU, H.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. **Chemosphere**, v. 64, p. 350-358, 2006.

NING YY, WANG SF, JIN DW, HARADA H, SHI XY. Formation of hydrogen-producing granules and microbial community analysis in a UASB reactor. **Renew Energy**, v.53, p,12-7, 2013.

OLIVEIRA, C. A., FUESS, L.T., SOARES, L. A., DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.45, p. 4182-4192, 2020.

PEIXOTO G, SAAVEDRA NK, VARESCHE MBA, ZAIAT M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal Hydrogen Energy**, v.36, p.8953-66, 2011.

PEIXOTO, G., PANTOJA-FILHO, J.L.R., AGNELLI, J.A.B., BARBOZA, M., ZAIAT, M. Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.168, p. 651-71, 2012.

PENTEADO, E. D. **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. 2012. 165 f. Dissertação. (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6137-45, 2013.

PERNA, V.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; LIMA, D. F.; BORZACCONI, L.; AMP; ETCHEBEHERE, C. 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.

PHOWAN, P.; DANVIRUTAI, P. Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. **Biomass and Bioenergy**, v. 64, p.1-10, 2014.

PREETHI., USMAN, T.M.M., BANU, J. R., GUNASEKARAN, M., KUMAR, G. Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. **Bioresource Technology Reports**, v.7, 100287, 2019.

RAHMAN, S. N. A.; MASDAR, M. S.; ROSLI, M. I.; MAJLAN, E. H.; HUSAINI, T.; KAMARUDIN, S. K.; DAUD, W. R. W. Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.66, p.137-162, 2016.

REIS, C.; SILVA, E. L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. **Chemical Engineering Journal**, v.172, p. 28-36, 2011.

REN, N., XING, D., RITTMANN, B.E., ZHAO, L., XIE, T., ZHAO, X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1112-1125, 2007.

REN, N.; GUO, W.; LIU, B.; CAO, G.; DING, J. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scale-up production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 365-370, 2011.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTAC, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

SALEM, A. H., BRUNSTERMANN, R., MIETZEL, T., WIDMANN, R. Effect of pre-treatment and hydraulic retention time on biohydrogen production from organic wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 10, p. 4856-4865, 2018.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p. 3671-3678, 2009.

SHEN, L.; BAGLEY, D. M.; LISS, S. N. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3689-3696, 2009.

SHOW K.Y., LEE D.J., CHANG J.S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v.102, p.8524-33, 2011.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p. 1-16, 2012.

SILVA., M.C.A. **Avaliação do regime operacional semi-contínuo em fermentador anaeróbio para a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis utilizando glicerol como substrato**. 2017. 152 f. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2017.

SIVAGURUNATHAN P, ANBURAJAN P, KUMAR G, KIM SH. Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. **International Journal Hydrogen Energy**, v.41, p. 21670-21677, 2016.

SREETHAWONG, T.; SUCHAVADEE, C.; PRAMOCH, R.; SUMAETH, C. Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 4092-4102, 2010.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.5, p.1000-1013, 2009.

VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 824, p. 159-167, 1998.

WANG J.L.; WAN W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5392-5397, 2008.

WANG, G.; MU, Y.; YU, H. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p.175-184, 2005.

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

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

ZHANG, Z.; SHOW, K.; TAY, J.; LIANG, D.; LEE, D.; JIANG, W. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2118-2123, 2006.

ZHAO QB, YU HQ. Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. **Bioresource Technology**, v. 99, p.1353-8, 2008.