APLICAÇÃO DO CONCEITO DE BIORREFINARIA A ESTAÇÕES DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: O CONTROLE DA POLUIÇÃO AMBIENTAL ALIADO À RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA E ENERGIA

ANAIS DO III SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO

2 de Agosto de 2019, EESC-USP, São Carlos, SP

Projeto Financiado pela

FAPESP

APRESENTAÇÃO

Este evento tem como principal objetivo a apresentação dos resultados obtidos no terceiro ano de desenvolvimento do Projeto Temático "***Aplicação do Conceito de Biorrefinaria a Estações de Tratamento Biológico de Águas Residuárias: O Controle da Poluição Ambiental Aliado à Recuperação de Matéria e Energia***", financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2015/06.246-7) com vigência de 01/07/2016 a 30/06/2021.

O projeto é desenvolvido conjuntamente pelo Laboratório de Processos Biológicos (Escola de Engenharia de São Carlos, USP), pelos Laboratórios de Controle Ambiental e de Simulação e Controle de Processos (Universidade Federal de São Carlos, UFSCar), pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (Escola de Engenharia Mauá, IMT), pelo Laboratório de Catálise (Instituto de Química de São Carlos, USP) e pelo Laboratório de Tratamento de Águas e de Resíduos (Instituto de Geociências e Ciências Exatas, UNESP).

Este Projeto Temático visa avaliar a aplicação do conceito de biorrefinaria em estações de tratamento biológico de águas residuárias. Tal concepção é muito recente e inovadora, na qual uma estação de tratamento seria encarada como uma indústria produtora de biocombustíveis e de produtos de alto valor agregado tendo sempre despejos como matéria-prima. Essa concepção fica mais atrativa quando reatores anaeróbios são empregados como unidades principais da estação de tratamento, principalmente pelo fato desse processo ter como produtos finais uma grande variedade de ácidos orgânicos e solventes na fase líquida, além de hidrogênio e metano na fase gasosa. Nessa nova concepção, águas residárias predominantemente orgânicas são as matérias-primas do processo (biomassa), a estação de tratamento com seus equipamentos e reatores constituem a rede de instalações para geração de produtos e subprodutos de alto valor agregado. No entanto muitos desafios devem ser superados com essa nova concepção a começar pelas baixas concentrações de matérias orgânicas encontradas em águas residuárias o que leva a geração de produtos também em baixas concentrações. A esse desafio se soma a complexidade da composição das águas residuárias, com variações temporais e espaciais. O uso de culturas microbianas mistas, embora seja uma grande vantagem para a biotecnologia anaeróbia, passa a ser um outro desafio para a concepção de biorrefinaria pois o controle do processo pode se tornar difícil.

Nesse contexto os objetivos gerais desse projeto são:

- Aprofundar nos fundamentos de geração de biohidrogênio e biometano em sistemas anaeróbios combinados acidogênicos e metanogênicos com foco principal em cinética de conversão e de crescimento celular, além de estudos de biologia molecular;
- Avaliar a produção de biohidrogênio e biometano em sistemas anaeróbios combinados acidogênicos e metanogênicos para variadas águas residuárias com a busca das melhores condições ambientais e operacionais para maximização da geração de energia;
- Avançar no conhecimento na área de tratamento de águas residuárias com aprimoramento de reatores consolidados e propostas de novas configurações, principalmente no tema de remoção de nutrientes e adequação dos efluentes à legislação vigente;
- Avaliação da remoção de compostos tóxicos e persistentes de interesse ambiental contidos em águas residuárias em reatores anaeróbios;
- Avaliar a geração de ácidos orgânicos, álcoois e outros produtos intermediários da digestão anaeróbia;
- Valorização do biogás, bem como do metano e do dióxido de carbono provenientes do tratamento de águas residuárias via processos catalíticos heterogêneos;
- Consolidar todos os resultados obtidos em uma biorrefinaria alimentada com águas residuárias, buscando a integração do processo produtivo com a função principal de controle da poluição ambiental.

ANAIS DO III SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO

APLICAÇÃO DO CONCEITO DE BIORREFINARIA A ESTAÇÕES DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: O CONTROLE DA POLUIÇÃO AMBIENTAL ALIADO À RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA E ENERGIA

2 de Agosto de 2019
Escola de Engenharia de São Carlos
Universidade de São Paulo

Marcelo Zaiat
(editor)

Organizadores:
José Alberto Domingues Rodrigues
Suzana Maria Ratusznei

Departamento de Hidráulica e Saneamento
Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) – Universidade de São Paulo (USP)

Departamento de Engenharia Química
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia (CCET) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Departamento de Engenharia Química e de Alimentos
Escola de Engenharia Mauá (EEM) – Instituto Mauá de Tecnologia (IMT)

Departamento de Físico-Química
Instituto de Química de São Carlos (IQSC) – Universidade de São Paulo (USP)

Centro de Estudos Ambientais
Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE) – Universidade Estadual Paulisa (UNESP)

Projeto Financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FAPESP

ANAIS DO III SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO

APLICAÇÃO DO CONCEITO DE BIORREFINARIA A ESTAÇÕES DE TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: O CONTROLE DA POLUIÇÃO AMBIENTAL ALIADO À RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA E ENERGIA

2 de Agosto de 2019
Escola de Engenharia de São Carlos
Universidade de São Paulo

Marcelo Zaiat
(editor)

Organizadores:
José Alberto Domingues Rodrigues
Suzana Maria Ratusznei

Equipe:

EESC-USP
- **Prof. Dr. Marcelo Zaiat – Coordenador geral**
- **Prof. Dr. Eugenio Foresti**
- **Prof. Dr. Eduardo Cleto Pires**
- **Profa. Dra. Marcia Helena Zamariolli Damianovic**
- **Prof. Dr. Juliano José Corbi**
- **Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche – Coordenadora local**

IQSC-USP
- **Profa. Dra. Elisabete Moreira Assaf – Coordenadora local**
- **Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto**

DEQ-UFSCar
- **Prof. Dr. Edson Luiz Silva – Coordenador local**
- **Prof. Dr. José Mansur Assaf**
- **Prof. Dr. Wu Hong Kwong**

EEM-IMT
- **Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues – Coordenador local**
- **Profa. Dra. Suzana Maria Ratusznei**
- **Profa. Dra. Roberta Albanez**
- **Profa. Dra. Giovanna Lovato**

IGCE-UNESP
- **Prof. Dr. Marcelo Loureiro Garcia**

Projeto Financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo
FAPESP

III SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO FAPESP
2 de Agosto 2019

Dia 02/08/2019 (sexta-feira)

Sessão 1: 7:45-8:00
Abertura do Seminário
Coordenador Geral: Marcelo Zaiat

Sessão 1: 8:00-09:45
Apresentação dos trabalhos do grupo de pesquisa
EESC-USP
Coordenadora Local: Maria Bernadete Amâncio Varesche

09:45-10:15 – Intervalo para "coffee break"

Sessão 2: 10:15-12:00
Apresentação dos trabalhos do grupo de pesquisa
EESC-USP / IGCE-UNESP
Coordenadora Local: Maria Bernadete Amâncio Varesche

12:00-14:00 – Intervalo para almoço

Sessão 3: 14:00-15:00
Apresentação dos trabalhos do grupo de pesquisa
EEM-IMT
Coordenador Local: José Alberto Domingues Rodrigues

Sessão 4: 15:00-16:00
Apresentação dos trabalhos do grupo de pesquisa
DEQ-USFSCar
Coordenador Local: Edson Luiz Silva

16:00-16:30 – Intervalo para "coffee break"

Sessão 5: 16:30-17:30
Apresentação dos trabalhos do grupo de pesquisa
IQSC-USP
Coordenadora Local: Elisabete Moreira Assaf

Sessão 6: 17:30-18:00
Encerramento do Seminário
Coordenador Geral: Marcelo Zaiat

CONTEÚDO

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO ESTRUTURADO A PARTIR DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: COMPREENDENDO O PAPEL DO LEITO FIXO E SUA INFLUÊNCIA NA MICROBIOTA ACIDOGÊNICA
Matheus Neves de Araujo; Marcelo Zaiat 1-5

PRODUÇÃO DE METANO EM REATOR DE LEITO FIXO ESTRUTURADO A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM CODIGESTÃO MESOFÍLICA COM GLICEROL BRUTO
André, V. Borges; Márcia, H.R.Z. Damianovic 6-10

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE Ba NA PRODUÇÃO DE H2 E ECOTOXICIDADE DA VINHAÇA
Adriana F. M. Braga, Mara R. Lima e Silva, Mayara C. Felipe, Juliano J. Corbi, Fernando G. Fermoso, Marcelo Zaiat..... 11-19

EFEITOS DA ESPESSURA DO BIOFILME E DA RELAÇÃO C/N EM REATOR DE BIOFILME FIXO AERADO SUBMETIDO À CONTRA-DIFUSÃO NA REMOÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS
Bruno Garcia Silva; Eugenio Foresti 20-27

CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCOCCUS SP. ISOLADO DE RESÍDUO SÓLIDO DE CITROS
Franciele Pereira Camargo; Iolanda Cristina Silveira Duarte; Isabel Kimiko Sakamoto; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete Amâncio Varesche..... 28-37

MONITORAMENTO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE COBRE, FERRO E MANGANÊS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MELAÇO E VINHAÇA
Camila M. R. Silva; Lauren N. M. Yabuki; Marcelo L. Garcia..... 38-47

IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE TRANSFORMAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E CIPROFLOXACINA EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO ESTRUTURADO
Rodrigo B. Carneiro; Tanare C. R. Ferreira; Carolina A. Sabatini; Guilherme M. Titato; Álvaro J. dos Santos Neto; Marcelo Zaiat..... 48-55

SISTEMAS MBBR EM ESCALA PILOTO OPERADOS EM BATELADAS SEQUENCIAIS PARA REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO DE ESGOTO SANITÁRIO: IMPACTO DO MATERIAL SUPORTE NA ESTABILIDADE DO SISTEMA E NA GERAÇÃO DE LODO
Jamille Sandes de Carvalho; Letícia de Aquino Bagatta; Valéria Del Nery; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic..... 56-65

APLICAÇÃO DA DIET NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA: PRODUÇÃO DE ENERGIA E AMPLIAÇÃO DO CONCEITO DE BIORREFINARIA ALIADA À CADEIA PRODUTIVA DA CANA-DE-AÇÚCAR
Willame de Araújo Cavalcante; Marcelo Zaiat 66-70

DESENVOLVIMENTO E CALIBRAÇÃO DE MODELO BASEADO NO ADM1 APLICADO AO PROCESSAMENTO DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REATOR BATELADA ACIDOGÊNICO
Pâmela T. Couto; Felipe E. Sanchez; Ingmar Nopens; Marcelo Zaiat; Wouter Naessens; Rogers Ribeiro 71-80

TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA EM PLATAFORMAS DE PETRÓLEO E GÁS, UTILIZANDO DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA COM SULFETO, ASSOCIADA À LAVAGEM DE BIOGÁS PRODUZIDO EM REATOR ANAERÓBIO
Cristiane A. de Oliveira; Márcia H. R. Z. Damianovic..... 81-86

INFLUÊNCIA DOS METAIS (FERRO, COBRE, ZINCO, MANGANÊS, MAGNÉSIO E NÍQUEL) NO ESTABELECIMENTO DO PROCESSO SULFETOGÊNICO
Mirabelle Perossi Cunha; Adriana Ferreira Maluf Braga; Rachel Biancalana Costa; Renata Piacentini Rodriguez; Marcelo Zaiat 87-94

METATRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF ANAEROBIC DIGESTERS TREATING ANIONIC SURFACTANT CONTAMINATED WASTEWATER
Tiago Delforno; Thais Macedo; Cédric Midoux; Gileno Lacerda; Olivier Rué; Mahendra Mariadassou; Valentin Loux; Maria Bernadete Varesche; Théodore Bouchez; Ariane Bize; Valéria Oliveira 95-102

AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE METANO, DE ÁCIDOS VOLÁTEIS E DA ATIVIDADE METANOGÊNICA NO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE REATORES.
Valéria Del Nery; Marcia H. R. Z. Damianovic; Moacir, M. Araujo Jr., Eduardo C. Pires 103-107

CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTE TÊXTIL SALINO COM LEVEDURA RESIDUAL ORIUNDA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, VISANDO REMOÇÃO DE COR E PRODUÇÃO DE BIOGÁS
Heitor Róger Alves e Dias; Márcia H. R. Z. Damianovic 108-112

CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA DA DEGRADÇÃO DE 4-NONILFENOL EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFCADO EM ESCALA AUMENTADA
Henrique S. Dornelles; Fabrício Motteran; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete A. Varesche 113-122

CARBOXYLIC ACIDS PRODUCTION BY DARK FERMENTATION FROM SUGARCANE VINASSE AND ACIDOGENIC MIXED CULTURE: EFFECT OF THE ETHANOL AND LACTATE ADDITION AS SUBSTRATES
Felipe Eng Sánchez; Lucas T. Fuess; Guilherme Soares Calvacante; Maria A.T. Adorno; Marcelo Zaiat 123-132

DEVELOPMENT OF A LOW-COST SENSOR APPLIED IN ANAEROBIC PROCESS WASTEWATER COMPONENTS QUANTIFICATION
Rafael Frederico Fonseca; Marcelo Zaiat..... 133-137

MELAÇO vs. CALDO: MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM BIORREFINARIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO À DIVERSIFICAÇÃO DA GERAÇÃO DE ENERGIA RENOVÁVEL
Lucas Tadeu Fuess; Marcelo Zaiat; Claudio Augusto Oller do Nascimento 138-147

FERTILIDADE E MINERALOGIA DO SOLO SUJEITO À DISPOSIÇÃO DE VINHAÇA DE UMA FAZENDA EM SANTA CRUZ DAS PALMEIRAS
Larissa R. Galdeano; Cibele Montibeller; Guillermo R. B. Navarro; Marcelo L. Garcia..... 148-157

CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL COM ESGOTO SANITÁRIO EM REATOR HÍBRIDO VISANDO AO AUMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS
Caroline de Cassia Banci Garcia; Marcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic; Eugenio Foresti 158-167

IMPACTO DA HIDRÓLISE POR PRESSÃO TÉRMICA DO LODO ATIVADO EXCEDENTE NA GERAÇÃO DE METANO E NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DO DIGESTATO POR PROCESSO ANAMMOX
Guilherme Lelis Giglio; Julius Bernardus van Lier; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic 168-172

PRODUÇÃO DE METANO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DO BAGAÇO DE MALTE SUBMETIDO A DIFERENTES SEVERIDADES DE PRÉ-TRATAMENTO EM SISTEMA HIDROTÉRMICO
Marina Mauro Gomes; Maria Bernadete Amâncio Varesche 173-182

AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES DICLOFENACO, IBUPROFENO, PROPRANOLOL E TRICLOSAN EM ESGOTO SANITÁRIO NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS COSSUBSTRATOS ETANOL, METANOL E FUMARATO
Caroline F. Granatto; Guilherme Grosseli; Pedro S. Fadini; Maria Bernadete A. Varesche 183-192

AVALIAÇÃO DE REATORES CONTÍNUOS TUBULARES PARA A PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA SINTÉTICA COM BASE EM SACAROSE
Luana Cardoso Grangeiro; Lucas Tadeu Fuess; Marcelo Zaiat; Kelly Johana Dussán Medina 193-201

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMASSA ADERIDA E EM SUSPENSÃO ASSOCIADO À DESCOLORAÇÃO DE CORANTE AZO EM REATORES ANAERÓBIOS
Ivo Gabriel Guedes Alves; Eugenio Foresti 202-206

REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE EFLUENTES DE REATORES UASB VIA NITRIFICAÇÃO SEGUIDA DE DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA
Renata de Bello Solcia Guerrero; Marcelo Zaiat 207-213

EFEITO DAS TAXAS DE RECIRCULAÇÃO E DAS CARGAS ORGÂNICAS NOS GRÂNULOS DA MANTA DE LODO DE REATORES UASB UTILIZADOS NO PROCESSAMENTO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
Inaê Alves; Valéria Del Nery; Eduardo C. Pires 214-223

REMOÇÃO DE DQO E NITROGÊNIO TOTAL EM ALAGADOS CONSTRUÍDOS COM AERAÇÃO INTERMITENTE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA
Isabela Pires da Silva; João Gabriel Thomaz Queluz; Marcelo Loureiro Garcia 224-232

APLICAÇÃO DE AERAÇÃO INTERMITENTE PARA A BIODEGRADAÇÃO DE CORANTE AZO
Jean M. S. Oliveira, Mara R. de Lima e Silva; Carina G. Issa, Juliano J. Corbi, Márcia H. R. Z. Damianovic, Eugenio Foresti 233-242

TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ESGOTO DOMÉSTICO EM UM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO ESTRUTURADO: PERFORMANCE E ESTABILIDADE
Julliana Alves da Silva; Fernando G. Fermoso, Marcelo Zaiat, Adriana Ferreira Maluf Braga, Gustavo Henrique Ribeiro da Silva 243-252

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM REATOR DESENVOLVIDO PARA O TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO EM AMBIENTES DE BAIXAS TEMPERATURAS
Elias de Lima Neto; Eduardo Cleto Pires 253-259

ESTUDO DO TRANSPORTE DE MASSA DA AMÔNIA EM BIOFILME ADERIDO A ESPUMA DE POLIURETANO APLICADO À NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS
Mário Berni De Marque; Bruno Garcia Silva; Eugênio Foresti 260-269

TRATAMENTO DE EFLUENTE DE LATICÍNIO COM ELEVADO TEOR DE GORDURA EM SISTEMA COMBINADO COMPOSTO POR REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM FUNGOS FILAMENTOSOS SEGUIDO DE REATOR ANAERÓBIO
Alex Marquiti Alves; Rafael Brito de Moura; Márcia Helena R. Zamariolli Damianovic 270-274

ISOLAMENTO DE BACILLUS sp. A PARTIR DE RESÍDUOS DE BANANA E ANÁLISE DE ROTAS METABÓLICAS EM SISTEMAS ACIDOGÊNICOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO
Raissa C. da Silva Mazareli; Isabel Kimiko Sakamoto; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete Amâncio Varesche 275-284

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA NO ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO
Fabricio Motteran, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic 285-289

ROTAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA REMOÇÃO DE ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO (LAS) EMPREGANDO ÁLCOOL ETOXILADO DE CADEIA LINEAR E ETANOL COMO COSSUBSTRATOS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO EM ESCALA AUMENTADA
Fabricio Motteran; Bianca Marques Nadai; Juliana Kawanishi Braga; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete Amâncio Varesche..... 290-299

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES E ANÁLISE FILOGENETICA DA BIOMASSA DE REATORES EM BATELADA OPERADOS SOB CONDIÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA
Fabricio Motteran; Maria Bernadete Amâncio Varesche; Pablo Antonio Lara-Martin..... 300-309

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA NO ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO
Fabricio Motteran; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic 310-314

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO E NÍQUEL NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO
Alana G. L. de Moura; Camila A. B. S. Rabelo; Edson L. Silva; Maria B. A. Varesche 315-323

SIMULTANEOUS BIOLOGICAL TREATMENT AND REY (RARE EARTH ELEMENTS AND YTTRIUM) REMOVAL FROM AN ACID MINE DRAINAGE
Elis Watanabe Nogueira; Leandro Augusto Gouvêa de Godoi; Gunther Brucha; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic..... 324-330

SISTEMA COMBINADO ANAERÓBIO AERÓBIO/ANÓXICO PARA REMOÇÃO DE MATÉRIA CARBONÁCEA E NITROGENADA DE ESGOTO SANITÁRIO SALINO
Carolina T. Paula; Márcia H. R. Z. Damianovic 331-335

PRODUÇÃO DE CÉLULAS RICAS EM PROTEÍNAS A PARTIR DO CULTIVO DE BIOMASSA MICROBIANA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO A VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
Rafaela Carvalho Paula; Marcelo Zaiat 336-340

EVALUATION OF CONCENTRATION TECHNOLOGIES IN THE DESIGN OF BIOREFINERIES FOR THE RECOVERY OF RESOURCES FROM VINASSE
Fernanda S. Peiter; Nicholas P. Hankins; Eduardo Cleto Pires 341-349

DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITROSO EM REATORES CONTÍNUOS CONTENDO BIOMASSA GRANULAR ANAMMOX
Tiago Duarte Santos Pereira; Renan Haddad Spindola; Natália Carolina da Silveira; Guilherme Lelis Giglio; Eduardo Cleto Pires; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic 350-356

DINÂMICA DA REDUÇÃO DE SULFATO NA FERMENTAÇÃO TERMOFÍLICA DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR
Michael Antonio Piffer; Marcelo Zaiat; Lucas Tadeu Fuess 357-362

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DESNITRIFICANTE DO INÓCULO DE LODOS ATIVADOS EM REATORES DE BATELADA NA PRESENÇA DE DICLOFENACO
Luciana de Melo Pirete; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete Amâncio Varesche 363-372

AJUSTE DE MODELOS HIRÁULICOS DE PRIMEIRA ORDEM EM ALAGADOS CONSTRUÍDOS DE FLUXO SUBSUPERFICIAL HORIZONTAL AERADOS INTERMITENTEMENTE
João G. T. Queluz; Isabela P. Silva; Gabriela B. Costa; Marcelo L. Garcia 373-382

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR PARA QUATIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CELULASES DURANTE A BIOCONVERSÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM H2 POR PARACLOSTRIDIUM SP
Camila Abreu Borges da Silva Rabelo; Cíntia Hiromi Okino; Isabel Kimiko Sakamoto; Maria Bernadete Amâncio Varesche 383-392

AVALIAÇÃO DE REATORES ANAERÓBIOS ACIDOGÊNICOS NO TRATAMENTO DE VINHAÇA E SORO DE QUEIJO SEM ALCALINIZAÇÃO
Jaqueline Cardoso Ribeiro; Marcelo Zaiat 393-402

TRATAMENTO DE EFLUENTE DE FÁBRICA DE RAÇÃO ANIMAL EM SISTEMA COMPOSTO POR REATORES DE LEITO ESTRUTURADO E LEITO GRANULAR CONTENDO BIOMASSA ANAMMOX
Natália C. da Silveira; Eugênio Foresti 403-412

ANÁLISE INTEGRADA DA DEGRADAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E LICOR DE PENTOSES EM UM INOVADOR REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO COMPARTIMENTADO TERMOFÍLICO
Laís Américo Soares; Edson Luis Silva; Maria Bernadete Amâncio Varesche 413-422

ADSORÇÃO DO NONILFENOL EM LODO ANAERÓBIO GRANULAR SOB CONDIÇÕES ASSÉPTICAS
Rômulo Mota Teixeira; Maria Bernadete Amâncio Varesche 423-432

EFEITOS DA DOSAGEM DE ETANOL, VAZÃO DE RECIRCULAÇÃO E TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA NA REMOÇÃO DE SURFACTANTE EM REATOR DE LEITO FLUIDIFICADO COM ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA
Thais Z. Macedo; Gabriele G. F. Jorge; Ana Luiza V. Marques; Henrique Dornelles; Tiago P. Deforno; Vitor B. Centurion, Valéria M. Oliveira; Edson L. Silva; Maria B. A. Varesch 433-442

ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO LICOR DE PENTOSES GERADO A PARTIR DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO
Liliane Folli Trindade; Marcelo Zaiat 443-451

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITORIO ASSOCIADO À MONENSINA SÓDICA E AOS β-ÁCIDOS DE LÚPULO NA BIODIGESTÃO ANAEROBIA DA VINHAÇA NO CONTEXTO DA INDUSTRIA SUCROALCOOLEIRA BRASILEIRA
Oscar Daniel Valmaña Garcia; Ana Maria Pereira Neto; Mercia Regina Domingues Moretto; Marcelo Zaiat 452-456

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS TERMÓFILAS PARA OBTENÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
Vanessa Silva; Isabel Sakamoto; Maria Bernadete A Varesche 457-466

REMOCÃO E DEGRADACÃO DE NONILFENOL ETOXILADO EM CO-DIGESTÃO COM ESGOTO DOMÉSTICO E ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVANDERIA COMERCIAL EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO
Jeny Elihut Ventura Gutiérrez; Maria Bernadete Amâncio Varesche..... 467-476

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E HOMOACETOGÊNESE DURANTE A CO-DIGESTÂO DE RESIDUOS DE CAFÉ
Alejandra Carolina Villa Montoya; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete A. Varesche 477-486

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGENIO A PARTIR DE RESIDUOS DE CAFÉ E CONSORCIO DE MICRORGANISMOS AUCTOCTONES
Alejandra Carolina Villa Montoya; Edson Luiz Silva; Maria Bernadete A. Varesche 487-496

SISTEMA COMBINADO PARA A DEGRADAÇÃO DO TETRABROMOBISFENOL A (TBBPA) POR DIGESTÃO ANAERÓBIA E PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS
Williane Vieira Macêdo; Eduardo Bessa Azevedo; Marcelo Zaiat 497-501

MONITORAMENTO DE METAIS EM BIORREATORES PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES
Lauren N. M. Yabuki; Camila M. R. Silva; Amauri A. Menegário; Marcelo Zaiat; Marcelo L. Garcia .. 502-511

EFEITO DA CARGA ORGÂNICA NA PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELO TRATAMENTO DE SORO E GLICERINA EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA
Juliane N. Albuquerque; Marina Chiara Hallak; Suzana M. Ratusznei; José Alberto D. Rodrigues..... 512-520

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO PELO TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (SORO E GLICERINA) EM AnSBBR OPERADO EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA
Giovanna Lovato; Isabela M. G. Augusto; Marcelo Zaiat; Suzana M. Ratusznei; José Alberto D. Rodrigues 521-525

SUCROSE-DERIVED CARBOHYDRATES AS CO-SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF MCL-PHA WITH ENRICHED DOMINANT MONOMER CONTENT
Guilherme H. Duarte de Oliveira; Marcelo Zaiat; José Alberto D. Rodrigues; Juliana Akit Ramsay; Bruce Alexander Ramsay 526-535

EFFECTS OF THE ORGANIC LOADING RATE ON POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCTION FROM SUGARCANE STILLAGE BY MIXED MICROBIAL CULTURES
Guilherme H. Duarte de Oliveira; Mirian Yasmine Krasupenhar Niz; Marcelo Zaiat; José Alberto D. Rodrigues 536-545

EFEITO DA COMPOSIÇÃO AFLUENTE E DA ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELO TRATAMENTO DE SORO E GLICERINA EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA
Juliane N. Albuquerque; Ana Paula Paulinetti; Suzana M. Ratusznei; José Alberto D. Rodrigues 546-555

PRODUÇÃO DE BIOCELULOSE UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO
Pedro Victor Maciel Pozzani; Leticia Giuliani Yashiki; José Alberto Domingues Rodrigues; Suzana Maria Ratusznei 556-565

PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELA CO-DIGESTÃO DE VINHAÇA E SORO
Sandro P. Sousa; Suzana Maria Ratusznei; José Alberto D. Rodrigues 566-575

PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELO TRATAMENTO DE SORO E GLICERINA EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA
Juliane N. Albuquerque; Juliane Ventura; Suzana M. Ratusznei; José Alberto D. Rodrigues 576-585

PRODUÇÃO DE METANO EM REATOR ANSBBR TERMOFÍLICO A PARTIR DA CO-DIGESTÃO DE GLICERINA E VINHAÇA
Juliane N. Albuquerque; Suzana M. Ratusznei; José Alberto D. Rodrigues 586-595

CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE SORO DE QUEIJO E GLICEROL EM PROCESSO DOIS ESTÁGIOS UTILIZANDO REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO (RALF)
Priscilla de Souza Almeida; Edson Luiz Silva 596-605

PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE BIOCOMBUSTÍVEIS EM REATORES ANAERÓBIOS EM BATELADA, A PARTIR DO GLICEROL BRUTO E DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ
Andreza Borba da Silva; Maria Bernadete Amâncio Varesche; Edson Luiz Silva 606-610

PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE BIOGÁS UTILIZANDO SORO DE QUEIJO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO
Schayanna C. de A. Macário; Edson Luiz Silva 611-619

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO EM TEMPERATURAS MESOFÍLICA E TERMOFÍLICA
Lívia Maciel Massula; Edson Luiz Silva 620-628

CO-DIGESTÃO DE GLICEROL E VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO
Camila Aparecida de Menezes; Edson Luiz Silva 629-637

IMPACTO DA DQO NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE VINHAÇA EM DOIS ESTÁGIOS DE REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIFICADO TERMOFÍLICOS E MESOFÍLICO
Lucas Rodrigues Ramos; Edson Luiz Silva 638-647

PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE BIOCOMBUSTÍVEIS, EM REATORES EM BATELADA, A PARTIR DE BIOMASSA VEGETAL SOB CONDIÇÕES MESOFÍLICAS
Alexandre Rodrigues Ribeiro; Maria Bernadete Amâncio Varesche; Edson Luiz Silva 648-655

OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A REAÇÃO DE AOM COM CATALISADOR DO TIPO PEROVSKITA SUBSTITUÍDO COM MG
Larissa de Bessa Lopes; José Mansur Assaf; Elisabete Moreira Assaf 656-665

EFEITO DA CARGA DE Ni EM CATALISADORES Ni-PIROCLORO-PEROVSKITA APLICADOS NA REFORMA SECA DO METANO
Adriana P. Ramon; Elisabete M. Assaf; José M. Assaf 666-673

EFEITOS INDIVIDUAIS E SINÉRGICOS ORIGINADOS DA DOPAGEM COM ÍNDIO EM CATALISADORES CU/CEO2 APLICADOS À HIDROGENAÇÃO DE CO2 A METANOL
Marco Aurélio de Lima Silva Rossi; Elisabete Moreira Assaf 674-683

SÍNTESE DE CH3OH A PARTIR DA HIDROGENAÇÃO DO CO2 EM CATALISADORES DE Cu/Zn PROMOVIDOS POR Al, Cr, Ga, Nb OU Zr
Cássia S. Santana; Janaína F. Gomes; Elisabete Moreira Assaf; José Mansur Assaf 684-691

HIDROGENAÇÃO DE CO2 A METANOL EM CATALISADORES DE Cu E Pd MISTURADOS FISICAMENTE
Alisson H. M. da Silva; Janaína F. Gomes; José M. Assaf 692-701

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO ESTRUTURADO A PARTIR DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: COMPREENDENDO O PAPEL DO LEITO FIXO E SUA INFLUÊNCIA NA MICROBIOTA ACIDOGÊNICA

Matheus Neves de Araujo [1]; Marcelo Zaiat [2]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Apesar da viabilidade comprovada dos processos fermentativos dentro do conceito de biorrefinaria, vários aspectos ainda requerem investigações adicionais que forneçam viabilidade técnico-econômica efetiva ao processo, tal como o estabelecimento de níveis contínuos e estáveis de produção de biohidrogênio (bioH_2). Dentre as diferentes configurações de reatores disponíveis, reatores anaeróbios de leito estruturado (AnSTBR – do inglês Anaerobic Structured-Bed Reactor) demonstraram o potencial de manter níveis estáveis e contínuos de produção de bioH_2, uma vez que proporcionam melhor controle na dinâmica do acúmulo de biomassa. Esta configuração de reator tende a impedir o estabelecimento de vias metabólicas indesejáveis quando em comparação com reatores convencionais de leito empacotado. No entanto, estudos em andamento levaram a questionamentos sobre o papel efetivo do leito fixo em sistemas AnSTBR voltados a produção de bioH_2, mostrando uma conversão massiva de substrato fresco (açúcares) antes da região do leito fixo. Neste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar o papel do leito fixo na produção termofílica de bioH_2 utilizando o AnSTBR como sistema acidogênico. Dinâmica de crescimento e distribuição de biomassa, produção de metabólitos e caracterização microbiana serão estudados em sistemas contínuos com diferentes alturas de leito fixo, proporcionando uma compreensão holística do processo fermentativo.*

Introdução

Em estudo recente (ainda em desenvolvimento) realizado no LPB/EESC/USP, vinculado ao projeto de pós-doutorado FAPESP 2017/00080-5[1], buscou-se avaliar a COVa ótima para produção de bioH_2 a partir da operação de um AnSTBR alimentado com melaço de cana-de-açúcar em condições termofílicas (55ºC). Após o término da operação, o reator foi desmontado e drenado em partes (câmara de alimentação, porções inferior e superior do leito estruturado e câmara de saída) e análises de parâmetros como concentrações de ácidos orgânicos voláteis, sólidos suspensos voláteis (SSV) e carboidratos totais foram conduzidas para cada compartimento. Os resultados mostraram a presença de quantidades equivalentes de biomassa na câmara de alimentação e no leito (aproximadamente 10 g-SSV em cada), além de indicar o consumo de 90% dos carboidratos afluentes ainda na câmara de alimentação do AnSTBR, i.e., comprovando uma baixa disponibilidade de substrato nas porções superiores do reator. Análises do perfil de metabólitos indicaram uma elevada produção de ácido butírico na câmara de alimentação, a qual se manteve constante em praticamente todo o restante do reator, além da identificação de atividade lática apenas no leito. Finalmente, ensaios de atividade hidrogenogênica associaram um potencial de produção de bioH_2 duas vezes superior à biomassa coletada na câmara de alimentação em comparação à coletada no leito.

Braga (2014) avaliou três configurações de reatores acidogênicos alimentados com água residuária sintética a base de sacarose em condições termofílicas para produção de hidrogênio em escala de bancada. As operações foram compostas por um reator do tipo UASB (do inglês – *upflow anaerobic sludge blanket*) e dois reatores tubulares de fluxo ascendente, sendo estes, distintos pela presença ou não de um leito fixo empacotado. Em relação aos reatores tubulares, foi avaliada a influência do leito fixo empacotado em duas condições de operação (TDH de 2 e 0,5 h) sobre variáveis resposta previamente estabelecidas. Entre as variáveis avaliadas, as

eficiências de conversão de sacarose observadas apresentaram diferenças significativas entre os sistemas com e sem leito fixo. De acordo com Braga (2014), a existência ou não do leito fixo empacotado nos reatores impacta diretamente na eficiência de conversão de sacarose e, consequentemente, nas rotas metabólicas e na produção de bioH_2.

A partir das informações apresentadas, pode-se realizar o questionamento de qual é o papel do leito estruturado nos sistemas acidogênicos direcionados à produção de bioH_2, uma vez que os resultados citados anteriormente sugerem que a atividade hidrogenogênica se concentra na porção inferior do reator, i.e., anteriormente ao leito. Além disso, a ausência do leito impacta negativamente no processo de produção de biohidrogênio. Em outras palavras, a retenção de biomassa no leito exerce algum tipo de influência na produção de hidrogênio e ou afeta apenas a dinâmica de acúmulo/lavagem de biomassa dos reatores? Um ponto relevante a ressaltar é que ao determinar o papel do leito e suas implicações no processo de produção de bioH_2, pode ser possível alterar o volume útil dos reatores e assim configurar sistemas mais compactos e eficientes.

Portanto, o presente projeto tem como objetivo principal avaliar o papel do leito estruturado nos AnSTBR e sua influência na produção de hidrogênio a partir da operação de sistemas com diferentes variações na altura e existência do leito, de maneira a possibilitar resultados comparativos e por fim, conclusivos.

Materiais e Métodos

O presente projeto de pesquisa será executado em três etapas com intuito de cumprir o objetivo previamente definido por meio dos procedimentos metodológicos descritos a seguir. Todas as etapas serão constituídas pela operação de reatores em escala de bancada.

Aparato experimental: reatores e condições de operação

A presente pesquisa será constituída por meio da análise de seis reatores (quatro reatores de leito fixo estruturado distintos de acordo com a variação da altura de cada um dos leitos, um reator sem leito e com zona de sedimentação e um reator sem leito e sem zona de sedimentação) operados de forma independente e alimentados continuamente em condições acidogênicas e termofílicas de temperatura (55ºC) por um período de 60 dias, visando avaliar a influência do leito estruturado na produção de bioH_2.

Os reatores serão construídos em material acrílico transparente, sendo os sistemas definidos como: [i] R_{SL}, reator sem leito estruturado (câmara reacional funcionando como zona de sedimentação) com volume total de aproximadamente 2 L; [ii] R_1, reator com leito estruturado de comprimento h_L e volume total de aproximadamente 2 L; [iii] R_2, reator com leito estruturado de comprimento $0{,}75 \cdot h_L$ e volume total de aproximadamente 1,5 L; [iv] R3, reator com leito estruturado de comprimento $0{,}5 \cdot hL$ e volume total de aproximadamente 1 L; [v] R_4, reator com leito estruturado de comprimento $0{,}25 \cdot h_L$ e volume total de aproximadamente 0,5 L; e; [vi] R_5, reator sem leito estruturado e sem zona de sedimentação e volume total de aproximadamente 0,25 L.

As operações serão realizadas em três etapas: [E1] – operação simultânea do R_{SL} e R_1. Nesta etapa espera-se obter resultados que possibilitem avaliar a influência do leito estruturado por meio das variáveis respostas obtidas a partir dos parâmetros aferidos durante as operações, principalmente os que relacionem a dinâmica de biomassa destes sistemas. Vale ressaltar que a operação de R_{SL} possibilitará avaliar a influência de uma possível zona de sedimentação (câmara reacional sem leito) e, posteriormente, comparar com os resultados obtidos em R_5; [E2] – operação simultânea do R_2 e R_3. A partir desta etapa espera-se, a partir das mesmas variáveis respostas supracitadas, aferir de maneira comparativa a influência da altura do leito estruturado no processo de produção de bioH_2 nos AnSTBR; e, [E3] – operação simultânea de R_4 e R_5. Nesta etapa, R_4 configurará a última alteração no leito fixo estruturado afim de comparar com os resultados obtidos nas operações anteriores. E por fim, espera-se da operação de R_5, a

avaliação de um sistema operado sem leito e sem zona de sedimentação, simultaneamente, em contraposição a R_{SL}, R_1, R_2, R_3 e R_4.

Portanto, espera-se, por meio da realização das três etapas supracitadas, avaliar de forma racional o papel do leito fixo estruturado na produção de bioH_2 para as condições operacionais pré-estabelecidas. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta o desenho esquemático dos reatores e as respectivas etapas de projeto.

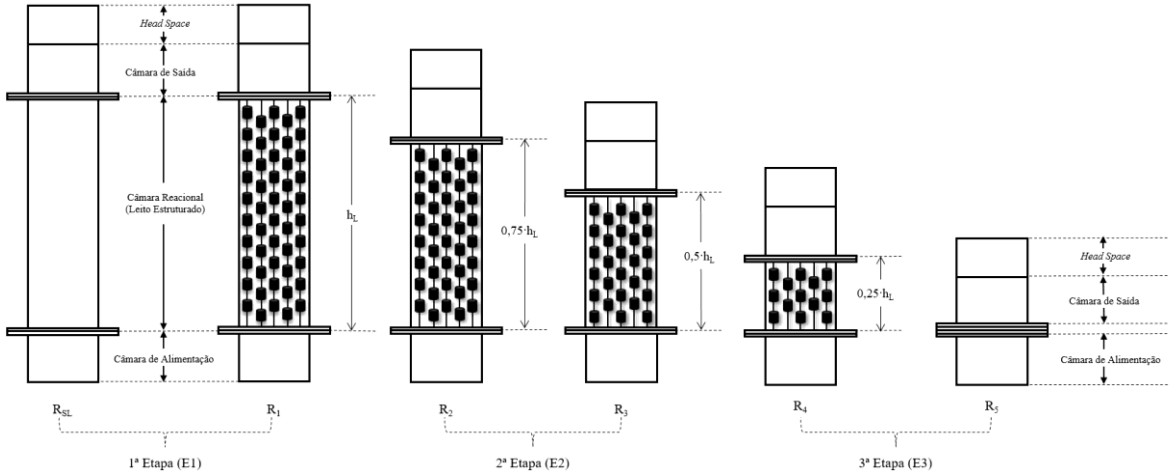


Figura 1: Esquema dos reatores propostos e etapas de projeto.
Fonte: Elaboração própria.

Previamente a operação dos sistemas propostos, serão realizados ensaios hidrodinâmicos a fim de verificar o comportamento do escoamento estabelecido em cada um dos reatores. Vale ressaltar que a configuração construtiva adotada para o R_1 é a comumente adotada nos estudos desenvolvidos no LPB/EESC/USP referente à temática de sistemas AnSTBR acidogênicos (Anzola-rojas e Zaiat, 2015; Anzola-rojas et al., 2016; Blanco et al., 2017; Blanco et al., 2019).

Os leitos serão constituídos de material PEBD (polietileno de baixa densidade) e ordenados por meio de fixação em hastes metálicas, sendo estes parâmetros baseados na adequabilidade deste material para produção de bioH_2 a partir de microbiota acidogênica em estudos conduzidos com vinhaça de cana-de-açúcar (Fernandes et al., 2013), sendo este fato estendido para o estudo em questão.

A inoculação dos reatores será realizada de acordo com protocolo apresentado por Leite et al. (2008) e a alimentação dos sistemas com efluente sintético constituído de sacarose e nutrientes de acordo com a composição apresentada por Fontes Lima e Zaiat (2012).

A velocidade superficial (Vsuperficial), estimada a partir da razão entre a vazão do sistema (Qs) e a área da seção transversal antes do leito estruturado dos reatores (Ast), i.e., da câmara de alimentação, e a concentração de DQO afluente aos sistemas serão mantidas constante em todos os reatores a fim de garantir homogeneidade experimental tendo em vista sua influência na dinâmica da biomassa dos sistemas.

Monitoramento e análise de desempenho dos sistemas

Serão realizadas coletas periódicas das fases liquida (afluente e efluente) e gasosa para realização do monitoramento dos sistemas. Em relação à fase liquida, o monitoramento será dado a partir das seguintes variáveis: concentração de matéria orgânica total e solúvel (demanda química de oxigênio – DQO_t e DQO_s); carboidratos totais (CH); teor de sólidos suspensos voláteis (SSV); ácidos orgânicos voláteis (AOVs - ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico), solventes (metanol, etanol e n-butanol), ácido lático (HLa) e pH. Além das correntes afluente e efluente dos sistemas, serão realizados perfis espaciais para determinação do consumo de carboidratos, distribuição de metabolitos e pH nas

diferentes segmentações do reator (i.e., câmara de alimentação, zona inferior do leito estruturado, zona superior do leito estruturado e câmara de saída). Para a fase gasosa, serão monitoradas a vazão e a composição do biogás.

Os sistemas serão avaliados por meio de variáveis-resposta mensuradas a partir dos parâmetros de monitoramento, sendo elas: eficiência de remoção de DQO_t e DQO_s (ER_{DQO}, em %); eficiência de conversão de carboidratos (EC_{CH}, em %); vazão de biogás (VBG, em mL d^{-1}); produção volumétrica de hidrogênio (PVH, em mLH_2 L^{-1} d^{-1}); vazão molar de hidrogênio (VMH, em $mmolH_2$ h^{-1}); rendimento de hidrogênio (HY, em $molH_2$ $mol^{-1}CH$); conteúdo de hidrogênio no biogás ($\%H_2$, em %); e, razão ácido butírico-ácido acético (HBu/HAc). Em relação ao parâmetro de SSV monitorado periodicamente nas linhas de corrente (afluente e efluente) e ao teor de sólidos, também monitorado a partir do parâmetros SSV (biomassa), retido no interior dos sistemas ao término de cada operação, será realizado o cálculo da COVe a partir da metodologia apresentada por Anzola-Rojas et al. (2015).

Métodos analíticos e frequência de análises

Os métodos analíticos empregados para o aferimento dos parâmetros de monitoramento supracitados, suas respectivas referências e as frequências de análise estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Métodos Analíticos e Frequência de Análises.

Variáveis	Frequência Semanal	Método	Referência
pH	Diária	Potenciometria	(APHA et al., 2017)
DQO_t, DQO_s	3x	Digestão/Espectrofotometria	(APHA et al., 2017)
SSV	2x	Gravimetria/Calcinação	(APHA et al., 2017)
AOVs e Solventes	2x	Cromatografia gasosa	(Adorno et al., 2014)
Vazão de Biogás	Diária	-	-
Composição de Biogás	3x	Cromatografia gasosa	(Perna et al., 2013)
CH	3x	Carboidratos totais	(Dubois et al., 1956)
HLa	3x	Cromatografia liquida	(Taylor, 1996)

Fonte: Elaboração própria.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC / FID : Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 5, 406–414.

Anzola-rojas, M.P., Zaiat, M., 2015. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H2 energy production from wastewater. J. Chem. Technol. Biotechnol. https://doi.org/10.1002/jctb.4754

Anzola-rojas, P., Gonçalves, S., Canedo, C., Maia, V., Oliveira, D., Zaiat, M., 2015. The use of the carbon / nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. Biotechnol. Reports 5, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010

Anzola-rojas, P., Zaiat, M., Wever, H. De, 2016. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. Bioresour. Technol. 202, 42–49. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.084

APHA, AWWA, WEF, 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd ed. APHA, Washingtion DC.

Blanco, V.M.C., Fuess, L.T., Zaiat, M., 2017. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. Int. J. Hydrogen Energy 42, 12181–12196. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.180

Blanco, V.M.C., Oliveira, G.H.D., Zaiat, M., 2019. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. Renew. Energy. https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029

Braga, A.F.M., 2014. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios termofílicos. USP.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Am. J. Anal. Chem. 28, 350–356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

Fernandes, B.S., Saavedra, N.K., Maintinguer, S.I., Sette, L.D., Oliveira, V.M., Varesche, M.B.A., Zaiat, M., 2013. The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. Appl. Biochem. Biotechnol. 170, 1348–1366. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0262-7

Fontes Lima, D.M., Zaiat, M., 2012. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 37, 9630–9635. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.097

Leite, J.A.C., Fernandes, B.S., Pozzi, E., Barboza, M., Zaiat, M., 2008. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. Int. J. Hydrogen Energy 33, 579–586. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.009

Perna, V., Castello, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy 38, 54–62. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022

Taylor, K.A.C.C., 1996. A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. Appl. Biochem. Biotechnol. 56, 49–58.

PRODUÇÃO DE METANO EM REATOR DE LEITO FIXO ESTRUTURADO A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM CODIGESTÃO MESOFÍLICA COM GLICEROL BRUTO

André, V. Borges [1]; Márcia, H.R.Z. Damianovic [2]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A compreensão das tecnologias de codigestão a partir dos resíduos de biocombustíveis constitui um passo importante na busca por melhorias nas condições operacionais dos sistemas anaeróbios, potencializando a recuperação energética na forma de biogás. O glicerol se apresenta como uma alternativa interessante para a geração de biogás, dado o seu volume de produção excedente, baixa demanda de mercado e conteúdo energético. Assim, o presente estudo propõe avaliar as condições operacionais e a produção de metano a partir da codigestão mesofílica da vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto em reator de leito fixo estruturado, buscando-se determinar o potencial da biomassa na produção de metano frente às variações nas proporções volumétricas e carga orgânica aplicada. O estudo experimental será conduzido em três etapas, com ensaios em reatores operados em batelada e continuamente, em que a produção de metano será a variável de interesse. A primeira etapa prevê a determinação da produção de metano a partir da combinação de diferentes proporções volumétricas dos cossubstratos; na segunda etapa, será utilizada a estratégia de aumento progressivo de carga orgânica até 5 kg.m^{-3}.L^{-1} e, na terceira etapa, serão realizadas variações nas concentrações dos substratos, de modo a avaliar estabilidade e eficiência do sistema.*

Introdução

As preocupações ambientais com a premissa de um futuro com "baixo carbono" têm ganhado expressiva notoriedade nas sociedades. Esforços legais, nacionais e internacionais, têm reunido as nações do mundo na busca por alternativas sustentáveis de energia aliadas ao progresso econômico. Como ponto de partida para muitos destes esforços, surge o compromisso firmado entre os países com a redução de gases nocivos a partir da diversificação de suas matrizes energéticas atuais por fontes alternativas de energia limpa. Hoje, os investimentos na produção de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, despontam como uma das alternativas ao uso dos combustíveis fósseis, constituindo uma realidade no setor energético brasileiro, dada a quantidade de resíduos de biomassa gerada no país (Braga e Braga, 2012).

No período recente, o Brasil se destaca como líder mundial na produção de etanol a partir da biomassa de cana-de-açúcar, representando 18% do total dos recursos renováveis de energia que compõem a matriz energética brasileira (Conab, 2015). Em paralelo, o país ocupa a segunda posição mundial em produção e consumo de biodiesel, tendo a soja como matéria-prima responsável por 64,8% da produção nacional (Viegas e Arantes, 2018). Apesar do cenário otimista que acompanha as mudanças no setor sucroenergético brasileiro, estudiosos alertam sobre as preocupações com a disposição adequada dos subprodutos gerados nos processos produtivos do álcool e biodiesel — a vinhaça e o glicerol, respectivamente.

A vinhaça de cana-de-açúcar constitui o principal resíduo proveniente da destilação do bioetanol, com produção volumétrica estimada em 12 litros para cada litro do biocombustível produzido nas destilarias. Em termos gerais, este composto rico em matéria orgânica apresenta potencial tóxico quando disposto no meio ambiente sem tratamento adequado,

causando impactos ambientais significativos nos ambientes aquáticos, como a anoxia e a eutrofização, e ambientes terrestres, como a salinização e acidificação do solo e águas subterrâneas e a contaminação com metais tóxicos (Fuess e Garcia, 2014).

O glicerol compreende o principal subproduto da cadeia produtiva do biodiesel, com potencial para geração de energia graças à presença de compostos orgânicos prontamente biodegradáveis. Devido à sua elevada carga orgânica, a disposição do glicerol bruto nos corpos hídricos compromete a vida aquática e sua queima libera substâncias nocivas, como a acroleína (Peiter et al., 2016). Apesar do elevado volume de produção, a demanda atual de mercado pelo glicerol é insuficiente e os custos com a purificação são elevados (Ciriminna et al., 2014).

A codigestão anaeróbia de águas residuárias com elevado teor de matéria orgânica constitui uma tecnologia promissora no setor sucroenergético, aparecendo como uma alternativa interessante à destinação de subprodutos energéticos. Em linhas gerais, o processo de codigestão propõe melhorias no balanço nutricional dos cossubstratos envolvidos, na diluição de componentes tóxicos e aumento na cinética de produção de metano (Esposito et al., 2012). Ante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as condições operacionais e a produção de metano a partir da codigestão mesofílica da vinhaça, utilizando-se proporções variáveis de glicerol bruto e vinhaça em reator de leito fixo estruturado, a fim de manter a estabilidade do reator e a geração de biogás. Busca-se, ainda, compreender a resiliência da biomassa frente às variações propostas na proporção volumétrica dos substratos.

Material e Métodos

Para atender aos objetivos deste trabalho, esta seção direciona-se ao desenvolvimento da etapa experimental, a partir de ensaios em reatores biológicos conduzidos no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da USP, na Área 2.

Caracterização das amostras de vinhaça

A vinhaça a ser utilizada será coletada na Usina Rio Pardo, localizada no município de Cerqueira César, São Paulo. As amostras de vinhaça coletadas serão acondicionadas em reservatórios plásticos (volume de 10 L) e mantidas a temperatura de 5°C. Para a realização dos experimentos em laboratório, a vinhaça, cuja DQO inicial é de 200 $mg.L^{-1}$, precisará ser diluída a 18-20 $gDQO.L^{-1}$, a fim de manter a carga orgânica próxima do valor obtido na produção do álcool, e peneirada para a remoção de sólidos grosseiros.

A vinhaça apresenta elevada concentração de matéria orgânica e pH de 4,72. Em função do caráter ácido do composto, faz-se necessária a adição de álcali na alimentação dos reatores até atingir valores de pH próximos da neutralidade, preservando-se a atividade metanogênica (Wang et al., 2014).

Glicerol bruto

O glicerol bruto a ser utilizado será proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada no município de Brotas. O composto servirá como fonte de carbono no processo de codigestão da vinhaça de cana-de-açúcar, visando a produção de metano. Em função de sua elevada DQO (1.600.000 $mg.L^{-1}$), serão preparadas soluções diluídas do glicerol com menor concentração de DQO, a fim de padronizar a carga afluente a ser adicionada no reator.

Inóculo

No processo de inoculação do reator ASTBR (da sigla em inglês *Anaerobic Structured-Bed Reactor*).será utilizado lodo de reator UASB operado em escala plena, aplicado ao tratamento de água residuária do abatedouro de aves Ideal Ltda, localizado no município de Pereiras, São Paulo, sob condição mesofílica.

A inoculação seguirá o protocolo descrito por Zaiat et al. (1994), em que o lodo mesofílico será diluído em água e posteriormente triturado. Adiante, o meio suporte permanecerá submergido na mistura por 2 h, com posterior drenagem do excesso de lodo.

Reator ASTBR: Sistema de fase única

Durante a etapa experimental será empregado um único reator acidogênico/metanogênico de leito fixo estruturado (ASTBR). O reator foi confeccionado em tubos de acrílico, com diâmetro interno de 8,1 cm, diâmetro externo de 13,9 cm, 69,6 cm de comprimento total e volume útil total aproximado de 3,42 L, incluindo o headspace. O leito fixo ordenado será composto por 13 tiras de espuma de poliuretano, fixadas em telas de aço inoxidável junto à estrutura do acrílico. O reator será continuamente operado em condições controladas de temperatura (30°C), com fluxo ascendente por auxílio de uma bomba peristáltica e a vazão de gás monitorada por meio de um gasômetro da marca Ritter®.

Etapas do procedimento experimental

O delineamento experimental deste estudo será dividido em três etapas:

Etapa I – Ensaios em Batelada: Determinação da proporção volumétrica dos substratos vinhaça e glicerol, com o objetivo de verificar a ocorrência e limitações do processo metanogênico frente às diversas características do despejo a ser tratado;

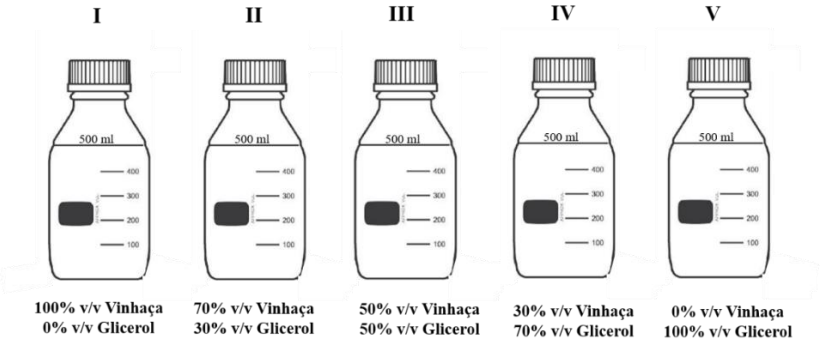
Etapa II – Partida e Estabilização do Reator ASTBR: Início do processo de codigestão até a estabilização do sistema, na proporção dos cossubstratos em que ocorreu a maior geração de metano. Será utilizada a estratégia de aumento progressivo de carga orgânica;

Etapa III – Variações na Concentração dos Substratos: Mudanças na proporção da vinhaça e glicerol visando interpretar o desempenho do reator às condições impostas.

Etapa I: Ensaios em batelada

Os ensaios serão preparados em frascos Duran® de 500 mL, contendo 40% de headspace (200 mL), volume reacional de 300 mL e preenchidos com inóculo, mantendo-se a relação $gDQO.gSSV^{-1}$ em 0,3. Ainda, serão adicionados solução de bicarbonato de sódio na proporção de $1g.gDQO^{-1}$ e meio nutricional, conforme a metodologia descrita por Angelidaki e Sanders (2004). O objetivo desta etapa será determinar a produção de metano nas condições descritas na Figura 1. Os ensaios em batelada serão executados em duplicata, mantidos sob agitação de 130 rpm e temperatura de 30°C.

Figura 1. Ensaios em batelada.



Fonte: Autor

Nesta etapa serão coletadas amostras da biomassa para a realização do teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) e técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) para análise da diversidade microbiana.

Etapa II: Partida e estabilização do reator ASTBR.

Dar-se-á início a partida do reator alimentado com vinhaça e glicerol, na proporção que resultar maior produção de metano, conforme resultados obtidos nos ensaios II, III e IV da Etapa I. A temperatura da câmara permanecerá em torno de 30°C e o tempo de detenção será mantido entre 24 e 48h, definido após a realização de ensaios preliminares. Será utilizada a estratégia de aumento progressivo de carga orgânica, associada à eficiência de conversão de matéria orgânica da ordem de 70%, conforme descrito por Del Nery et al., 2018. A variação de carga orgânica aplicada será de 1,0 a 5,0 $kg.m^{-3}.L^{-1}$.

Etapa III: Variações na concentração dos substratos no meio reacional.

Nessa etapa, após a partida e estabilização do reator, serão realizadas mudanças nas concentrações dos substratos. Deste modo, a proporção volumétrica de vinhaça deverá diminuir com o aumento gradual na proporção do glicerol bruto, ambos com DQO inicial de 20 $g.L^{-1}$. Ressalta-se que para cada mudança na proporção volumétrica dos substratos, deverá ser aplicada uma COV inicial de 1,0 $kg.m^{-3}.L^{-1}$ até atingir o valor de 5,0 $kg.m^{-3}.L^{-1}$. A duração de cada fase será determinada pela resposta do reator com respeito à sua estabilização e à eficiência de remoção de DQO superior a 70%. Destaca-se, ainda, que caso haja queda na eficiência de remoção, a condição inicial será restabelecida e, após a estabilização do reator em termos de remoção de DQO, uma nova proporção proposta será aplicada.

Métodos analíticos

A Tabela 1 apresenta os métodos analíticos a serem empregados na elaboração da etapa experimental. A fase gasosa dos reatores deverá ser monitorada continuamente por meio dos gasômetros Ritter® e a análise da composição do biogás será executada em cromatógrafo gasoso GC 2010 (Shimadzu®). O desempenho do reator será avaliado em termos de: eficiência de DQOt e DQOs; eficiência de conversão de carboidratos; vazão do biogás; razão entre alcalinidade parcial e intermediária (AI/AP); produção volumétrica de metano (PVM); vazão molar de metano (VMM); rendimento de metano (MY) e conteúdo de metano no biogás (%).

Tabela 1: Frequência dos métodos analíticos para o monitoramento do reator ASTBR.

Parâmetro	Frequência (na semana)	Método	Referência
Ácidos Orgânicos	1x	Cromatografia gasosa	Adorno et al. (2014)
Ácidos Voláteis	2x	Titulometria/Potenciometria	Dillalo, R. e Albertson (1961)
Alcalinidade	2x	Titulação Potenciométrica	Ripley et al. (1956)
Carboidratos	2x	Carboidratos Totais	Dubois et al. (1956)
Composição do biogás	2x	Cromatografia gasosa	Perna et al. (2013)
DQO	2-3x	Digestão/Espectrofotometria	APHA (2005)
Glicerol	2-3x	Enzimático	Greenhill (2003)
pH	diária	Potenciometria	APHA (2005)
SSV	quinzenal	Gravimetria/Calcinação	APHA (2005)
Vazão do biogás	diária	-	-

Fonte: Autor

Biologia molecular

Amostras da biomassa serão coletadas no final de cada etapa operacional para a realização de ensaios microbiológicos, por meio das seguintes técnicas moleculares: Extração do DNA Total (Griffiths et al., 2000), Reação em Cadeia Polimerase (PCR) (Nubel et al., 1996) e Denaturating Gradiente Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer e Smalla, 1998).

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). American Journal of Analytical Chemistry, v. 5, n. 7, p. 406–414.

Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. Environmental Science and Bio/Technology, v. 3, p. 117–129.

APHA, AWWA, WEF., 2005. Standard methods for examination of water and wastewater. 21st. ed. Washington, D.C.

Braga, C.F.G.V., Braga, L.V., 2012. Desafios da energia no Brasil: panorama regulatório da produção e comercialização do biodiesel. Cad. EBAPE.BR, v. 10, nº 3, opinião 4, Rio de Janeiro.

Cirimina, R., Pina, C.D., Rossi, M., Pagliaro, M., 2014. Understanding the glycerol market. European Journal of Lipid Science and Technology, v.116, p. 1432-1439.

CONAB, 2015. Acompanhamento da Safra brasileira: cana de acucar. v. 5. – Safra 2018/2019. N. 3 – Terceiro Levantamento. Dezembro/2018. Brasilia, CONAB. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso: 08 jan. 2019.

Del Nery, V., Alves, I.; Damianovic, M.H.R.Z. Pires, E.C., 2018. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. Biomass and Bioenergy, v. 119, p. 411-417.

Dilallo, R., Albertson, O.R., 1961. Volatile acids by Direct Titration. Journal Water Pollution Control Federation, v. 23, n. 4, p. 353–365.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, v. 28, n. 3, p. 350–356.

Esposito, G., Frunzo, L., Giordano, A., Liotta, F., Panico, A., Pirozzi, F., 212. Anaerobic co-digestion of organic wastes. Rev Environ Sci Biotechnol, v. 11, p. 325–341.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. Journal of Environmental Management, v. 145, p.210-229.

Greenhill, S., 2013. Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. U.S. Patent Application 10/744,272.

Griffiths, R. I., Whiteley, A.S., O'donnell, A.G., 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. Applied and Environ. Microb., v. 66, p. 5488–5491.

Muyzer, G.; Smalla, C., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, v.73, p. 127–141.

Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol, v. 178, p. 5636–5643.

Peiter, G.C., Alvez, H.J., Sequinel, R., Bautitz, I.R., 2016. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. Revista Brasileira de Energias Renov., v. 5, n. 4, p. 519-537.

Perna, V. Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes lima, D. M., Borzacconi, V., Margarita, L., Varesche, M.B.A., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. 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.

Ripley, A.L.E.; Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strength wastes. v. 58, n. 5, p. 406–411.

Viegas, T.O.C., Arantes, L.S., 2018. Políticas públicas para a ampliação da produção de biodiesel no Brasil. Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana.

Wang, K., Yin, J., Shen, D., Li, N., 2014. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH. Bioresour. Technol. v. 161, p. 395–401.

Zaiat, M., Cabral, A.K.A., Foresti, E., 1994. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. REBEQ v. 11(2), p. 33-42.

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE Ba NA PRODUÇÃO DE H_2 E ECOTOXICIDADE DA VINHAÇA

Adriana F. M. Braga[1], Mara R. Lima e Silva[1], Mayara C. Felipe[2], Juliano J. Corbi[3], Fernando G. Fermoso[4], Marcelo Zaiat[5]

[1] Pós-doutoranda do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Doutoranda do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP
[4] Instituto de la Grasa (C.S.I.C.), Campus universitario Pablo de Olavide – Edificio 46, Ctra. de Utrera, km. 1 - 41013, Sevilla, Spain
[5] Professor do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais da EESC/USP.

Resumo. *Experimentos foram executados em modo batelada para avaliar o efeito da adição de 0.5 e 1g.L^{-1} de Ba na produção de H_2 a partir da vinhaça. Ensaios ecotoxicológicos utilizando Daphnia magna foram efetuados como ferramenta adicional para avaliar tanto o impacto do descarte da vinhaça quanto do efeito da suplementação de Ba. Ensaios químicos também foram realizados para avaliar a precipitação do sulfato presente na vinhaça diante dos fatores velocidade de mistura, tempo de mistura, tempo de sedimentação, pH e concentração de Ba. Os resultados demonstraram que o Ba nas concentrações até 1g.L^{-1} não possui efeito benéfico ou deletério para a produção de H_2 a partir da vinhaça. No entanto, ficou demonstrado que o Ba pode ser utilizado na relação [Ba]/[SO_4^{-2}] de 1.16 em sistemas de DA de duas fases em águas ricas em sulfato, como a vinhaça, para precipitar acima de 90% do sulfato presente e aumentar a relação DQO/SO_4^{-2} e, consequentemente, aumentar a produção de CH_4 sem afetar a produção de H_2 do primeiro reator. No entanto, devido ao aumento da toxicidade à D. magna causado pela suplemtação de Ba, o correto gerenciamento da planta de tratamento e manutenção adequada devem garantir a segurança ambiental.*

Introdução

A vinhaça é a água resiuária gerada por usinas durante a produção de açúcar e álcool. A vinhaça possui carga orgânica, em geral, de 35 a 100 vezes a do esgoto doméstico, apresenta altas concentrações de sulfato (1000 a 2000mg$SO_4.L^{-1}$) e é, em quase todos os casos, aplicada a fertirrigação do solo (Fuess e Garcia, 2014). A implantação do processo da digestão anaeróbia (DA) para o tratamento da vinhaça, em plantas de produção de etanol e açúcar, é uma opção visando uma matriz energética sustentável, além de diminuir a emissão de gases do efeito estufa (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

O sulfato presente na vinhaça é proveniente da adição de H_2SO_4 no pré-tratamento das leveduras utilizadas nos tanques de fermentação, com a finalidade de inibir a contaminação por outros microorganismos (Barth et al., 2014). O sulfato presente nas água residuárias tratadas anaerobiamente desencadeia a competição entre as arqueas e as bactérias redutoras de sulfato (BRS) por doadores de elétron, além do produto da redução do sulfato, o sulfeto, apresentar toxicidade para as arqueas archaea (Paulo, Stams e Souza, 2015).

O bário tem sido estudado para a aperfeiçoamento da DA, no entanto, há incertezas sobre sua função principal. Muñoz et al. (2016) observou o aumento da atividade de hidrólise enzimática (celulase e esterase) adicionando 10mMBa^{+2}. Serrano et al. (2017) estimaram a especiação de metais e EDTA para a AD de resíduo de fábrica de azeite de oliva e demonstraram a possibilidade de formação de $BaHCO_3^+$, $BaCl^+$, e $BaCO_{3(aq)}$, nessas condições. Os resultados encontrados pelos autores indicaram a possibilidade de se evitar a homoacetogenese ao capturar o CO_2 dissolvido, aumentando, assim, a produção de H_2. Rue et al. (2002), adicionaram 2mM $BaCl_2$ em ensaio potencial bioquímico acidogênico para a inibição de BRS.

Do ponto de vista ambiental, é rara a inclusão de ensaios de ecotoxicidade como ferramenta de avaliação de impactos em estudos com suplementação de metais, no entando, a importância desses ensaios deve ser destacada pelo potencial nocivo que os metais pode ter sobre o meio ambiente. Assim, realizar ensaios de toxicidade em efluentes agroindustriais antes e após cada etapa do tratamento com adição de suplementos pode ajudar a quantificar os riscos do descarte inadequado ou mesmo acidental.

Dessa forma, experimentos foram executados em modo batelada para avaliar o efeito da adição de Ba na produção de H_2 a partir da vinhaça. Ensaios ecotoxicológicos utilizando test using *Daphnia magna* foram efetuados como ferramenta adicional para avaliar tanto o impacto do descarte da vinhaça quanto do efeito da suplementação de Ba. Ensaios químicos também foram realizados para avaliar a precipitação do sulfato presente na vinhaça.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados em batelada para avaliar o efeito da adição de Ba na produção de H_2 e, posteriormente, identificar condições que afetem seu efeito químico de precitação de sulfato.

Teste de potencial bioquímico de hidrogênio (PBH)

Os ensaios em modo batelada foram realizados utilizando vinhaça bruta, coletada na usina São Martinho, Pradópolis/SP, produtora de álcool e açúcar. A vinhaça foi rmazenada à -18°C até sua utilização. Os ensaios foram realizados em duplicata, em frascos de boro-silicato com volume total de 600 mL e útil de 360 mL, mantidos em câmara Multitron (Infors HT, Suíça) com agitação de 100rpm à temperatura termofílica (55°C). As concentrações de Ba estudadas foram: 0 $g.L^{-1}$ (Ba0), 0,5 $g.L^{-1}$ (Ba0,5) e 1 $g.L^{-1}$ (Ba1). A biomassa utilizada foi priveniente de reator acidogênico alimentado com vinhaça, adotando uma relação biomassa/substrato ($gDQO.gSTV^{-1}$) adotada foi de 10, indicada para biomassa acidogênica floculenta. Antes de fechar as garrafas com o auxílio de uma tampa de butila, o pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 50% e para garantir a condição anaeróbia, foi realizada a purga do meio líquido e, em seguida, do *headspace*, por 3 minutos cada um com N_2.

Durante o ensaio, foram coletadas seis amostras líquidas (S1, S2, S3, S4, S5 e S6) através de um tubo de poliuretano preso a tampa de butila, o qual possuia uma ponta permanentemente mergulhada no líquido dentro da garrafa e a outra ponta era mantida fechada com o auíxilio de uma válvula de 4 vias (Figura 1). A produção de biogás foi acompanhada pela medição de pressão nas garrafas com o transdutor de pressão TPR-18 acoplado à interface BS 2200 (Desin instruments, Espanha) através de válvulas Mininert (Sigma Aldrich, Alemanha), posicionadas nas tampas de butila (Figura 1). Utilizando a lei dos gases ideais, a pressão medida (P) foi transformada em número de mols (n), utilizando o volume do headspace das garrafas e a temperatura da câmara. Depois, o número de mols de biogás encontrado foi transformado em mols de H_2 utilizando a fração molar de H_2 obtida no cromatógrafo.

Figura 1: Aparato experimental dos ensaios em batelada.

Teste ecotoxicológico

Um ensaio agudo de ecotoxicidade foi utilizado para avaliar a toxicidade da vinhaça bruta nas condições Ba0, Ba0,5 and Ba1 antes e após o processo acidogênico. *Daphnia magna* de até 24h de vida foram expostas a seis diluições (1:1000, 1:20, 1:10, 1:2 e 1:1) de vinhaça por 48h (OECD, 2004). Durante o período de exposição, a imobilidade foi avaliada e os resultados foram calculados como dose-resposta de diluição nas quais 10 ou 50% do população exibia resposta, ou EC10 e EC50, respectivamente (Hodgson, 2004).

Teste de precipitação de sulfato com Bário

Três ensaios de precipitação do sulfato presente na vinhaça acidificada, produzida em reator acidogênico, foram realizados com adição de $BaCl.2H_2O$ (Sigma-Aldrich, Alemanha). Para o primeiro, foi utilizado o delineamento fatorial fracionado (DFF) para determinar os parâmetros que poderiam ter efeito sobre a precipitação química do sulfato com o Ba, sendo eles: VM – velocidade de mistura (rpm); TM – tempo de mistura; pH; TS – tempo de sedimentação; e concentração de Ba, cuja matriz resultante é apresentada na tabela 1. A partir dos reasultados o DFF, um segundo ensaio foi realizado testando 5 concentrações de Ba variando de 900 a 2500 $mg.L^{-1}$, cuja relação $[Ba^{+2}]/[SO_4^{-2}]$ variou de 0,6 a 1,7. Os ensaios de foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250mL, com volume líquido de 62mL e agitados na câmara Multitron (Infors HT, Suíça) e o líquido foi coletado com pipeta, evitando a retirada do corpo de fundo formado. Para a validação dos resultados em volumes maiores de vinhaça, foi realizado o último ensaio de teste de jarros com agitação por pás. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Matriz de delineamento fatorial fracionado para avaliar a influência parâmetros na precitação de sulfato, presente na vinhaça, com bário.

Ensaio	Parâmetros				
	VM (rpm)	TM (s)	[Ba] ($mg.L^{-1}$)	TS (min)	pH*
1	40	20	1120	25	7,4
2	40	20	2020	25	3,4
3	40	420	1120	5	7,4
4	40	420	2020	5	3,4
5	120	220	1570	15	5,4
6	200	20	1120	5	3,4
7	200	20	2020	5	7,4
8	200	420	1120	25	3,4
9	200	420	2020	25	7,4

*O pH original de vinhaça acidificada, 5,4, foi alterado para 7,4 com NaOH 50% e para 3,4 com HCl 1M.

Métodos físico-químicos e cromatográficos

Para determinação de sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SVT), demanda química de oxigênio (DQO) e sulfato (SO_4^{-2}) foram utilizados os métodos descritos por APHA, AWWA e WEF (2012). Os ácidos orgânicos voláteis foram determinados em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 (Adorno, Hirasawa e Varesche, 2014).

A composição do biogás, tanto nos ensaios em modo batelada quanto contínuo, foi determinada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 equipado com coluna capilar Carboxen 1010 (30m x 0,53 mm x 0,30 µm), utilizando argônio como gás de arraste e operando nas condições de temperatura inicial do injetor igual a 200°C; temperatura inicial do detector de 230°C e com vazão do gás de make up (Ar) de 12 $mL.min^{-1}$.

Análise de dados

Os parâmetros cinéticos nos ensaios em modo batelada foram determinados através do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990), utilizando o software Statistica 13.4.0.14® (TIBCO Software Inc., EUA), sendo assim obtidas como respostas as produções específicas de H_2. As matrizes de parâmetros dos ensaios DFF foram construídas a partir do mesmo software, bem como a análise dos resultados.

Resultados e Discussão

Efeito da adição de Ba no PBH da vinhaça

Os resultados do ensaio acidogênico com adição de Ba são apresentados na figura 2. A figura 2A apresenta os dados de produção máxima de H_2 por DQO adicionada, na qual é possível verifcar pequena diferenção entre as condições, sendo os rendimentos máximos obtidos iguais a 2,63 ± 0,18, 2,54 ± 0,041 e 2,32 ± 0,17 $mmolH_2.gDQO_{ad}^{-1}$, respectivamente para Ba0, Ba0,5 e Ba1. Por outro lado, não foi prossível verificar diferenças entre as condições no consumo de carboidratos e nem na remoção ou formação de fenóis durante o ensaio (Figuras 2 B e D, respectivamente).

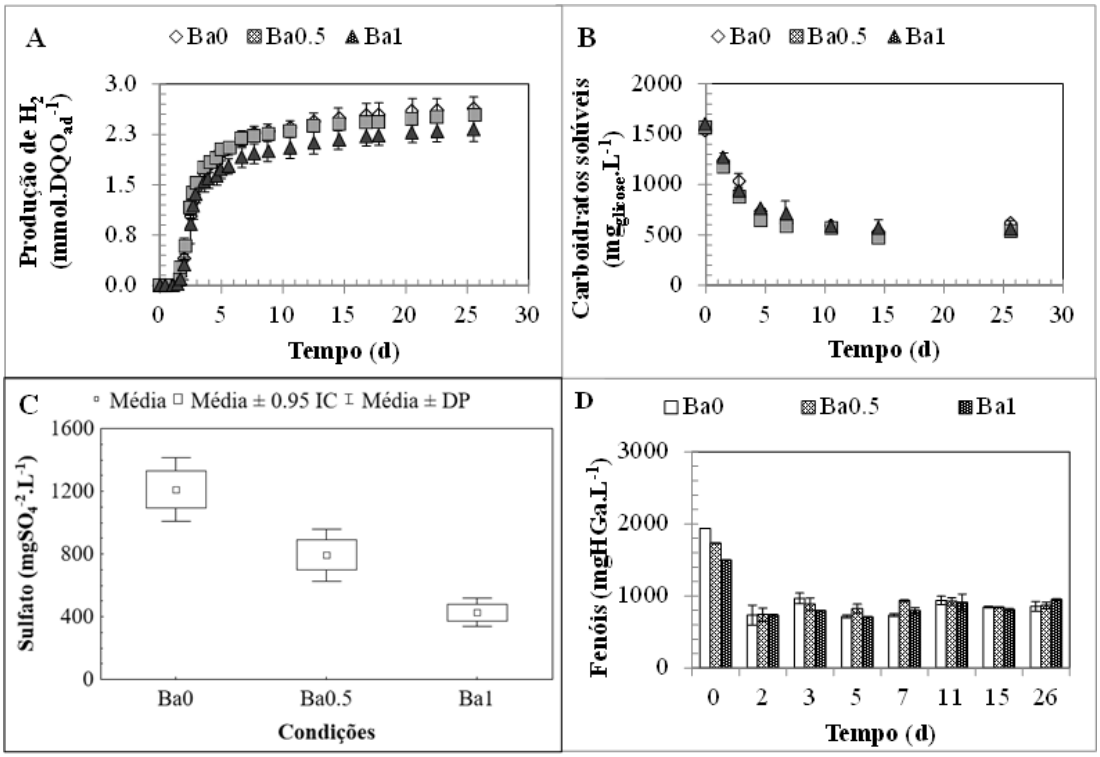


Figura 2: Resultados do efeito da adição de Ba nas concentrações Ba0,5 – 0,5 $g.L^{-1}$ de Ba e Ba1 – 1 $g.L^{-1}$ de Ba, em realção a condição controle Ba0 – sem adição, sobre a produção de H_2 (A), consumo de carboidratos (B), sulfato no meio líquido (C) e fenóis (D).

O maior efeito da adição de Ba nas condições analisadas foi na concentração de sulfato solúvel (figura 2C). A diferença entre as médias 1178,6 ± 208,4, 768,9 ± 166,8 e 417,5 ± 90,0 é estatisticamente significativa utilizando o teste de Tukey (p-valor 0.0001), indicando a precipitação de parte do sulfato dissolvido, em 47,2 ± 11,5 e 71,3 ± 6,2%, comparando as condições Ba0,5 e Ba1, respectivamente, com o controle Ba0.

Esses resultados demonstram que o Ba pode ter papel mais importante na fase metanogênica de produção de energia a partir da vinhaça. Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017) demonstraram que razões DQO/SO_4^{-2} de 12, 10 e 7,5 causam pequena inibição na atividade de arqueas em ensaios em batelada utilizando vinhaça como substrato. Os autores observaram o acúmulo de ácido acético e uma produção de CH_4 35% menor na condição de maior concentração inicial de sulfato. Baseado na média de sulfato solúvel e DQO iniciais de cada

condição, as razões DQO/SO_4^{-2} foram de 13,1, 20,0 e 37,1 para Ba0, Ba0,5, e Ba1, respectivamente.

Os parâmetros estimados através do ajuste dos dados de produção de H_2 ao modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990) são apresentados na tabela 2. O modelo foi ajustado duas vezes ao ser observado que a aplicação de um único modelo não resultava em ajuste adequado do máximo rendimento obtido experimentalmente, sendo este subestimado. Assim, através dos dados observado se delimitou o primeiro ajuste (M1) do ia 0 até dia 4,6 e o segundo (M2) do dia 5,0 até dia 25,5. Dessa forma, M1 fornece os parâmetros mais adequados para a velocidade de produção (Rm), uma vez que a produção é mais expressiva na etapa, e o tempo de fase lag (λ), pois representa o tempo necessário para a biomassa se adaptar, e M2 fornece valores mais adequados para o potencial máximo de produção de H_2 (P). Analisando os parâmetros estimados, é possível destacar que os valores de P estimados para Ba0 e Ba0,5 não apresentam diferença expressiva, estando muito próximo dos intervalos de confiança um do outro, no entanto, a condição Ba1 apresenta valor inferior e fora dos intrvalos das outras condições, e não compreende os valores de P das outras condições dentro de seus limites. Quanto às velocidades Rm, não foi observado diferença entre os valores ajustados para as condições testadas, indicando que o menor rendimento de Ba1 pode ser devido a variação de rotas metabólica ou outro efeito secundário mas não inibitório. O consórcio microbiano na condição Ba0,5 apresentou uma adaptação um pouco mais rápida com valor de λ igual a 1,53, comparada as condições Ba0 e Ba1 que apresentaram, respectivamente, 1,68 e 1,76.

Tabela 2: Pârametros do modelo de Gompertz modificado ajustados paras as condições controle e com adição de Ba, considerando duas cinéticas: 1ª – dia 0 até dia 4,6; 2ª – dia 5,0 até dia 25,5. Sendo VE o valor estimado, e LCI e LCS o limites de confiança inferior e superior, respectivamente.

	Ajuste	**P ($mmolH_2.DQOad^{-1}$)**			**Rm ($mmolH_2.DQOad^{-1}.d^{-1}$)**			**λ (d^{-1})**		
		VE	**LCI**	**LCS**	**VE**	**LCI**	**LCS**	**VE**	**LCI**	**LCS**
Ba 0	1º	1,82	1,77	1,87	1,26	1,16	1,35	1,68	1,62	1,73
	2º	2,64	2,49	2,78	0,17	0,06	0,27	-8,48	-17,46	0,51
Ba 0,5	1º	1,89	1,83	1,95	1,25	1,15	1,35	1,53	1,48	1,59
	2º	2,53	2,48	2,58	0,15	0,10	0,19	-11,05	-15,94	-6,16
Ba 1	1º	1,63	1,51	1,74	1,30	1,01	1,60	1,76	1,61	1,91
	2º	2,33	2,16	2,50	0,13	0,04	0,23	-9,58	-20,78	1,63

Apesar da indição de possíveis diferenças em rotas metabólicas, resultando em menor rendimento na condições Ba1, a figura 3 demonstra que não houve diferenças expressivas em relação aos metabólitos produzidos, com exceção do valor superior de ácido butítico em Ba0,5 ao final do ensaio (figura 3B) e duas ocorrências de concentrações de ácido butítico superior a 3000$mg.L^{-1}$ nos dia 11 e 26 na condição Ba1 (figura 3C). O ácido butírico é a principal rota em todas as condições a partir do dia 3, no qual supera o etanol, proviniente da vinhaça bruta inicial, cuja concentração era 1253,74 ± 246,33 $mgEtOH.L^{-1}$.

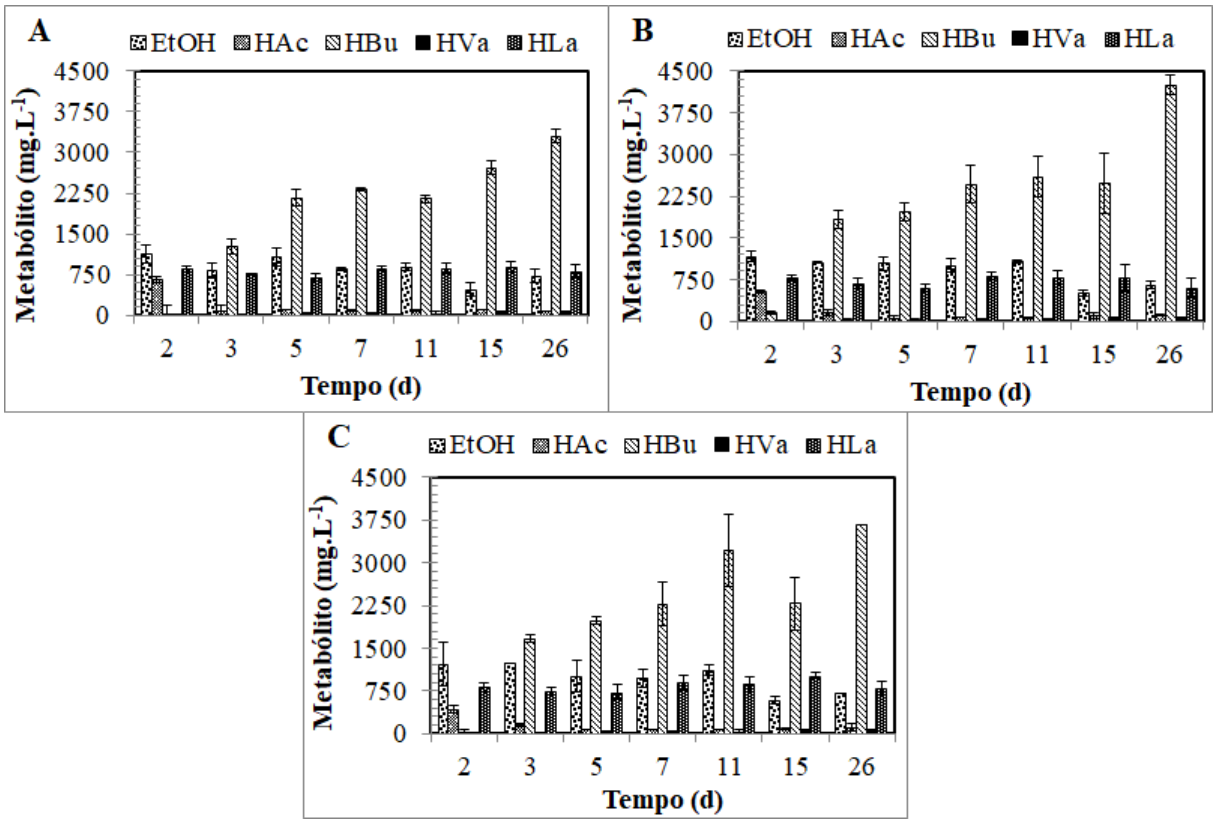


Figura 3: Metabólitos produzidos ao longo do ensaio de produção de H_2 a partir da vinhaça. A: sem adição de Ba; B: adição de 0,5g.L^{-1} de Ba; C: adição de 1g.L^{-1} de Ba. Sendo, EtOH: etano; HAc: ácido acético; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HLa: ácido lático.

Efeito do Ba na ecotoxicidade da vinhaça digerida

Os efeitos da suplementação de Ba sobre a ecotoxicidade foram categorizados e analisados para calcular os coeficientes EC10 e EC50 (p=0,95) para cada grupo (tabela 3). A interação do fator de diluição e a concentração de Ba foi estatisticamente significativa com efeito sobre a mobilidade. Os resultados do teste ANOVA com dois fatores (ANOVA *two-way*) demonstram que houve diferença estatisticamente significativa entre todas as concentrações (p-valor <0,0009). Dessa forma, os resultados mostraram que a adição de Ba pode aumentar a toxicidade de vinhaça e a *D. magna* apresentou maior sensibilidade ao ser exposta a concentração maior de Ba (Ba1), indicando a necessidade de um gerenciamento correto da planta de tratamento para evitar vazamentos. No entanto, mesmo a vinhaça bruta sem adição de Ba (Ba0) apresentou alta toxicidade, resultando em 10 ou 50% de imobilidade na diluições 6,68 ou 8,63%.

Tabela 3: Resultados de porcentagem de diluição nos quais 10% ou 50% da poulação apresentou a resposta (EC10 e EC50).

Condição	EC10	EC50
Ba0	6,68%	8,63%
Ba0,5	4,72%	7,22%
Ba1	2,87%	5,64%

A vinhaça bruta apresentou toxicidade a *D. magna*, demonstrando que a prática de aplicação no solo para fertirrigação pode ser danosa ao meio ambiente.

Precipitação química do sulfato presente na vinhaça com Ba

Por apresentar apenas efeito significativo para a precipitação do sulfato, na etapa acidogênica, foram realizados testes utilizando o DFF para definir condições adequadas a serem

adotadas para a remoção de sulfato da vinhaça após a sua passagem por reator acidogênico e antes de sua entrada no reator metanogêncio, para sistemas de duas fases.

Os parâmetros utilizados como resposta foram: velocidade de mistura, tempo de mistura, tempo de sedimentação, pH e concentração de Ba. A análise da matriz do delineamento com os resultados dos ensaios indicou, com 95% de confiança, que os tempos de agitação e sedimentação não tiveram efeito significativo sobre o modelo linear, que ajustou os dados com R^2 igual a 0,9985 e cuja falta de ajuste não apresentou significância (p-valor de 0,9537). Através do digrama de pareto (figura 4A), é possível ver que o aumento do pH foi prejudical a resposta e que a maior agitação e maiores concentrações de Ba permitem maiores remoções de sulfato.

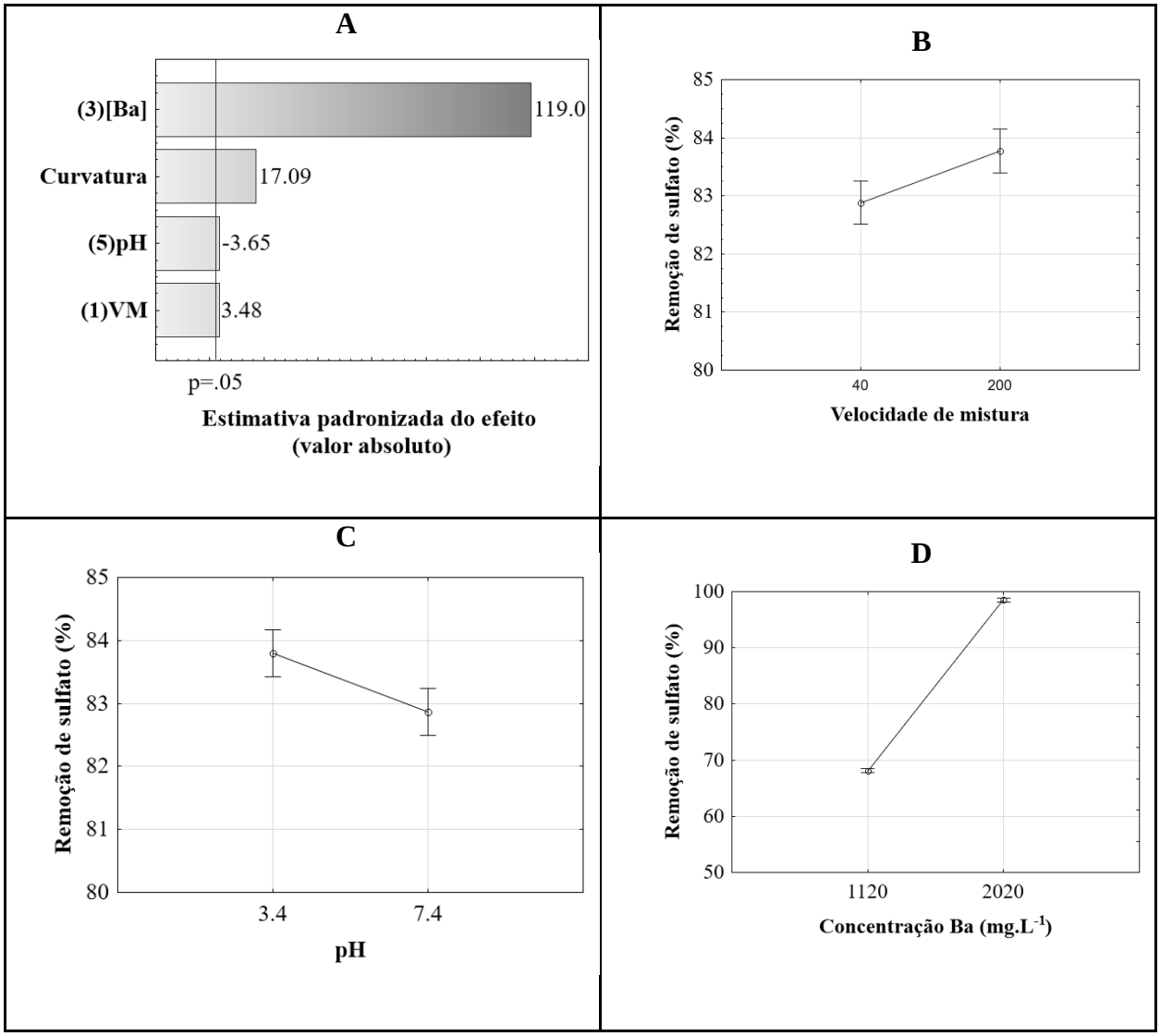


Figura 4: Resultados obtidos com o delineamento factorial fracionado (DFF): Diagrama de pareto com os fatores dignificativos (A) e gráficos das médias marginais para os fatores velocidade de mistura (B); pH (C) e concentração de Ba adicionado (D).

É possível notar ainda, que a estimativa do efeito da concentração de Ba é duas ordens grandeza superior aos outros dois fatotres. As figuras 4 B-D, que apresentam os gráficos das médias marginais para cada fator, permitem observar que o ganho em aumentar a velocidade de agitação em 5 vezes aumenta a remoção de sulfato em apenas 1%, assim como alterar o pH de 3.4 para 7.4. Uma vez que tanto o aumento da agitação quanto a diminuição do pH da vinhaça, de seu valor de 5.4 após o reator acidogênico para 3.4, implicaria em aumento de custos sem ganho expressivo na remoção de sulfato, prosseguiu-se com a avaliação apenas da concentração de bário a ser adicionado para a remoção de sulfato.

Foi realizado após as conclusões dos ensaios de DFF um ensaio de adição de Ba de 900 a 2500 mg.L^{-1}, com velocidade de 120 rpm por 5min e pH de 5.4, condições do ponto central do DFF. As concentrações foram escolhidas de forma a resultar em razões de concentração [Ba^{+2}]/[SO_4^{-2}] de 0,62, abaixo do necessário estequiometricamente (relação em mols igual a 0,43), até 1,72, acima da relação estequiomética para precipitar todo o sulfato presente na vinhaça (relação em mols igual a 1,20).

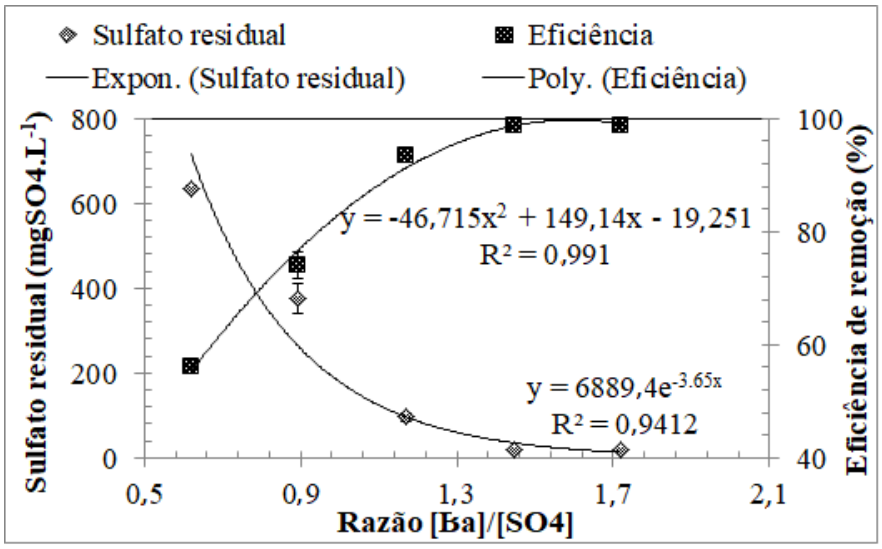


Figura 5: Resultados de precipitação química do sulfato presente na vinhaça acidificada com cloreto de bário.

Os resultados indicaram que remoções de sulfato acima de 90% são obtidas com relações de concentrações [Ba^{+2}]/[SO_4^{-2}] acima de 1.17, no entanto, quando se considera a estequimetria da reação com BaCl com o sulfato presente na vinhaça, a remoção de 93,35 ± 0,67% foi obtida para uma relação estequiométrica de 0.82 molBa^{+2}/molSO_4^{-2}. Assim, a concentração de 1600mg.L^{-1}, por ser uma concentração com remoção próxima de 90%, foi avaliada em teste de jarros para validar o resultado. Nas condições de agitação de 120rpm e pH 5.4 a remoção de sulfato obtida foi de 90,5 ± 0.04%, próxima da obtida nos ensaios com câmara agitadora. Assim, a concentração de sulfato na vinhaça, após a adição e agitação com solução de BaCl e coleta sem corpo de fundo, foi de 138.74 ± 0.56 mgSO_4^{-2}.L^{-1}, resultando em uma relação de DQO/ SO_4^{-2} de 140.7, bastante segura para se evitar a competição entre as arqueas e as BRS por doador de elétrons.

Conclusões

Os resultados demonstraram que o Ba nas concentrações até 1g.L^{-1} não possui efeito benéfico ou deletério para a produção de H_2 a partir da vinhaça, No entanto, ficou demonstrado que o Ba pode ser utilizado em sistemas de DA de duas fases em águas ricas em sulfato, como a vinhaça, para aumentar a relação DQO/SO_4^{-2} e, consequentemente, aumentar a produção de CH_4 sem afetar a produção de H_2 do primeiro reator. No entanto, devido ao aumento da toxicidade à *D. magna* causado pela suplemtação de Ba, o correto gerenciamento da planta de tratamento e manutenção adequada devem garantir a segurança ambiental.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 5, 406–414.

APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541.

Barth, D., Monteiro, A.R. de S., da Costa, M.M., Virkajärvi, I., Sacon, V., Wilhelmsom, A., 2014. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production. Brazilian J. Microbiol. 45, 323–325.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. J. Environ. Manage. 145, 210–229.

Hodgson, E., 2004. A textbook of modern toxicology, Wiley-Interscience.

Hodgson, E., 2004. A textbook of modern toxicology, Wiley-Interscience.

Muñoz, C., Fermoso, F. G., Rivas, M., and Gonzalez, J. M., 2016. Hydrolytic enzyme activity enhanced by Barium supplementation. AIMS Microbiol. 2, 402–411.

OECD, 2004. Test No. 202: *Daphnia sp*. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

Paulo, L.M., Stams, A.J.M., Sousa, D.Z., 2015. Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. Rev. Environ. Sci. Bio/Technology 14, 537–553.

Ruel, S.M., Comeau, Y., Héduit, A., Deronzier, G., Ginestet, P., Audic, J.M., 2002. Operating conditions for the determination of the biochemical acidogenic potential of wastewater. Water Res. 36, 2337–2341.

Serrano, A., Pinto-Ibieta, F., Braga, A.F.M., Jeison, D., Borja, R., Fermoso, F.G., 2017. Risks of using EDTA as an agent for trace metals dosing in anaerobic digestion of olive mill solid waste. Environ. Technol. (United Kingdom) 38, 3137–3144.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1875–1881.

EFEITOS DA ESPESSURA DO BIOFILME E DA RELAÇÃO C/N EM REATOR DE BIOFILME FIXO AERADO SUBMETIDO À CONTRA-DIFUSÃO NA REMOÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS

Bruno Garcia Silva [1]; Eugenio Foresti [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A contra-difusão de doadores e receptores de elétrons foi avaliada em reator de leito fixo em espuma de poliuretano para o tratamento de água residuária sintética contendo 40 mg.L^{-1} de nitrogênio amoniacal. Foram avaliadas espumas com espessuras de 10, 5 e 2 mm e relações C/N de 5 e 2,5. Acetato foi utilizado como fonte de carbono. O reator com 2 mm de espessura de espuma apresentou dificuldades em manter a biomassa aderida. Os reatores com 5 e 10 mm apresentaram eficiências médias de remoção de nitrogênio total de 42 ± 13% e 46 ± 10% respectivamente, sendo a eficiência de desnitrificação igual a 100% durante todo o período experimental. Menores espessuras de espuma de poliuretano e carga de DQO aplicada não proporcionaram maior taxa de nitrificação como o esperado. Os dados permitem inferir que a maior limitação está associada à resistência a transferência de massa que, embora não esteja diretamente relacionada à espessura da espuma, possivelmente está relacionada com o desenvolvimento da biomassa no interior dos poros. Este desenvolvimento proporcionou queda na eficiência de remoção de nitrogênio total, e a operação de descarte de excesso de biomassa se mostrou efetiva para a recuperação do desempenho do reator.*

Introdução

O tratamento biológico para a remoção do nitrogênio consiste em converter o nitrogênio amoniacal e orgânico da fase líquida em nitrogênio gasoso. Essa conversão é realizada por diferentes microrganismos e ocorre em etapas; primeiro a oxidação da amônia a nitrito e nitrato e depois sua redução a nitrogênio gasoso. A amônia é oxidada, ou seja, doa elétrons em ambiente aeróbio quando não há disponibilidade de matéria orgânica como doadora de elétrons. As formas oxidadas de nitrogênio, o nitrito e o nitrato, são reduzidos na presença de matéria orgânica e na ausência de oxigênio por serem aceptores de elétrons em ambiente anóxico.

A disponibilidade adequada de matéria orgânica e oxigênio é, portanto, crucial para a completa remoção de compostos nitrogenados da fase liquida. A nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS), ou seja, em uma única unidade de tratamento, ocorre quando há formação de biofilme (aderido a material suporte, granulo ou floco) capaz de criar ambientes favoráveis para comunidades anóxicas (desnitrificantes heterotróficas) e aeróbias (nitrificantes autotróficas). Usualmente, o oxigênio é inserido diretamente no meio líquido. Assim, a matéria orgânica (doadores de elétrons) proveniente do afluente e o oxigênio (aceptor de elétrons) transportam-se para o biofilme no mesmo sentido (co-difusão)

Reatores com biofilme aderido à espuma de poliuretano e geometria de co-difusão vêm sendo amplamente estudados para a NDS. Eficiências superiores a 80% de remoção de nitrogênio total quando há disponibilidade adequada de matéria orgânica (Moura et al., 2012). No entanto, efluentes com baixas relações entre matéria orgânica e nitrogênio, como efluentes pré-tratados anaerobiamente, apresentam baixas taxas de desnitrificação no processo de NDS (Silva et al., 2018). Tal fato ocorre porque a matéria orgânica é consumida na zona aeróbia do biofilme por bactérias heterotróficas durante seu processo de difusão através do biofilme (He et al., 2009).

Para otimizar a utilização do substrato orgânico para a desnitrificação heterotrófica, a estratégia de contra-difusão de aceptores e doadores de elétrons vem sendo utilizada em reatores de biofilme aderido em membrana (membrane biofilm reactor - MBfR) (Hasar et al., 2008; Hasar, 2009; Martin e Nerenberg, 2012; Nerenberg, 2016). Nestes sistemas, o oxigênio é transferido através da membrana que serve de material suporte para o crescimento da biomassa, enquanto que a matéria orgânica é fornecida pelo meio liquido.

Neste trabalho, a geometria de contra-difusão foi aplicada a um reator de biofilme fixo em espuma de poliuretano. O reator é composto por dois compartimentos separados por uma camada de espuma, sendo um deles aerado, enquanto o outro recebe o afluente. O impacto da espessura de espuma utilizada na separação dos compartimentos e da relação C/N da água residuárias foram avaliados.

Material e Métodos

Aparato experimental

O reator biológico (Figura 1) foi construído em tubo de acrílico com diâmetro interno de 14 cm e 40 cm de altura. A unidade possui volume útil de 5 litros, foi operada com tempo de detenção hidráulica de 24 horas e mantida a 30ºC. No interior, há um cilindro de PVC de 63,5 mm de diâmetro, preso à estrutura de fechamento no topo do reator. Neste cilindro, está fixada uma estrutura de aço inox perfurada e revestida por uma camada de espuma de poliuretano. A base dessa estrutura é fechada com placa de PVC.

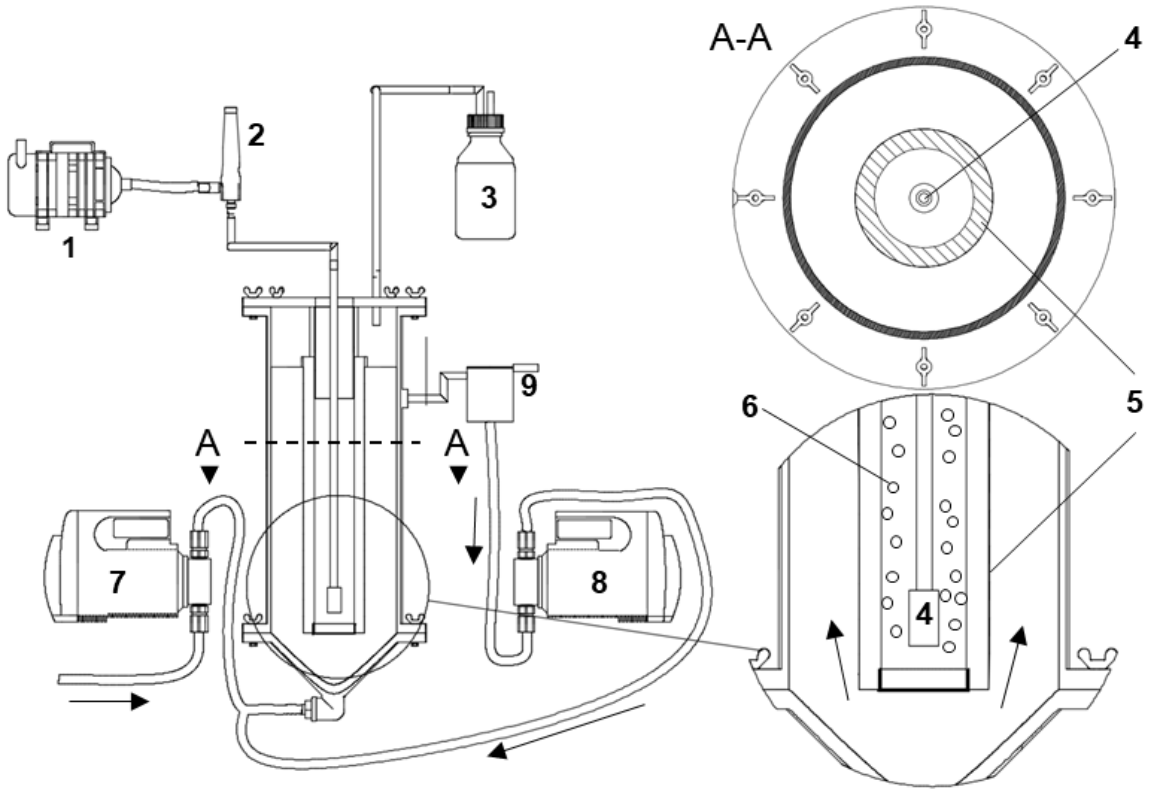


Figura 1. Reator de biofilme fixo aerado. 1. Compressor de ar 2. Medidor de vazão de ar 3. Selo hídrico 4. Pedra porosa 5. Espuma de poliuretano. 6. Zona de aeração (compartimento interno) 7. Bomba de alimentação 8. Bomba de recirculação 9. Efluente.

O compartimento interno do tubo é aberto para a atmosfera, sendo a aeração efetuada por meio de compressor de ar acoplado a uma pedra porosa situada próxima à base do tubo. É possível o ajuste da vazão de ar (1,0 - 15,0 $L.min^{-1}$) por meio do medidor de fluxo de ar instalado na linha de aeração. O reator foi submetido à recirculação do efluente com razão de

recirculação igual a 3. A recirculação permite manter condições de mistura completa na zona anóxica (compartimento externo), enquanto que a aeração mantém a condição de mistura completa no compartimento interno, A recirculação também tem como objetivo estabelecer um biofilme homogêneo por toda a extensão do reator. No experimento, foram utilizadas três espessuras de espuma, de 10, 5 e 2 mm, correspondentes aos ensaios *R-10mm*, *R-5mm* e *R-2mm* respectivamente.

Água residuária

Durante todo o período experimental, o reator foi alimentado com água residuária sintética. Os principais constituintes da água foram: acetato de sódio como fonte de doador de elétrons que foi adicionado nas concentrações de 200 e 100 mg $DQO.L^{-1}$; cloreto de amônia como fonte de nitrogênio (40 mg $N.L^{-1}$) e bicarbonato de sódio para garantir a alcalinidade (300 mg$CaCO_3.L^{-1}$). Além desses componentes, macro e micronutrientes foram adicionados para suprir as necessidades nutricionais e promover o desenvolvimento dos microrganismos presentes no sistema, conforme utilizado por Torres (1992).

Inóculo

O reator foi inoculado segundo a metodologia de Santos et al. (2016), com uma mistura de lodo biológico anaeróbio da estação de tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar e lodo proveniente de um sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP). Para a inoculação, a espuma foi disposta em recipiente plástico, adicionando-se, então, a mistura de lodos de maneira a garantir o contato de todo o meio suporte. Após um período de 2 horas, retirou-se o excesso de lodo do cilindro de espuma, inserindo-o no reator.

Análises físico-químicas

As variáveis analisadas durante o experimento, tanto para amostras afluentes quanto efluentes do reator e do compartimento interno, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1. Métodos das análises físico-químicas.

Variáveis	Metodologia
Demanda Química de Oxigênio	Colorimétrico (APHA, 2005)
Oxigênio Dissolvido	Luminescência, sonda Hach LDO HQ101.
Nitrogênio Amoniacal	Colorimétrico (APHA, 2005)
Nitrito	Colorimétrico (APHA, 2005)
Nitrato	Ultravioleta (APHA, 2005)

Resultados e Discussão

Avaliação da espessura do biofilme

A Figura 2 apresenta as concentrações de DQO e compostos nitrogenados no afluente e efluente durante a operação dos reatores R-10 mm, R-5mm e R-2mm alimentados com água residuária com relação C/N próximas a 5. Após a inoculação, houve um período de adaptação da biomassa, durante o qual não foram adicionados compostos orgânicos para evitar competição entre as bactérias nitrificantes (AOB) e heterotróficas aeróbia (HB). Após obter significantes taxas de nitrificação, iniciou-se a adição de acetato de sódio como fonte de matéria orgânica e doadores de elétrons para a desnitrificação (evento de operação 1). A adição de acetato proporcionou uma queda imediata das concentrações de nitrato no efluente em todos os casos.

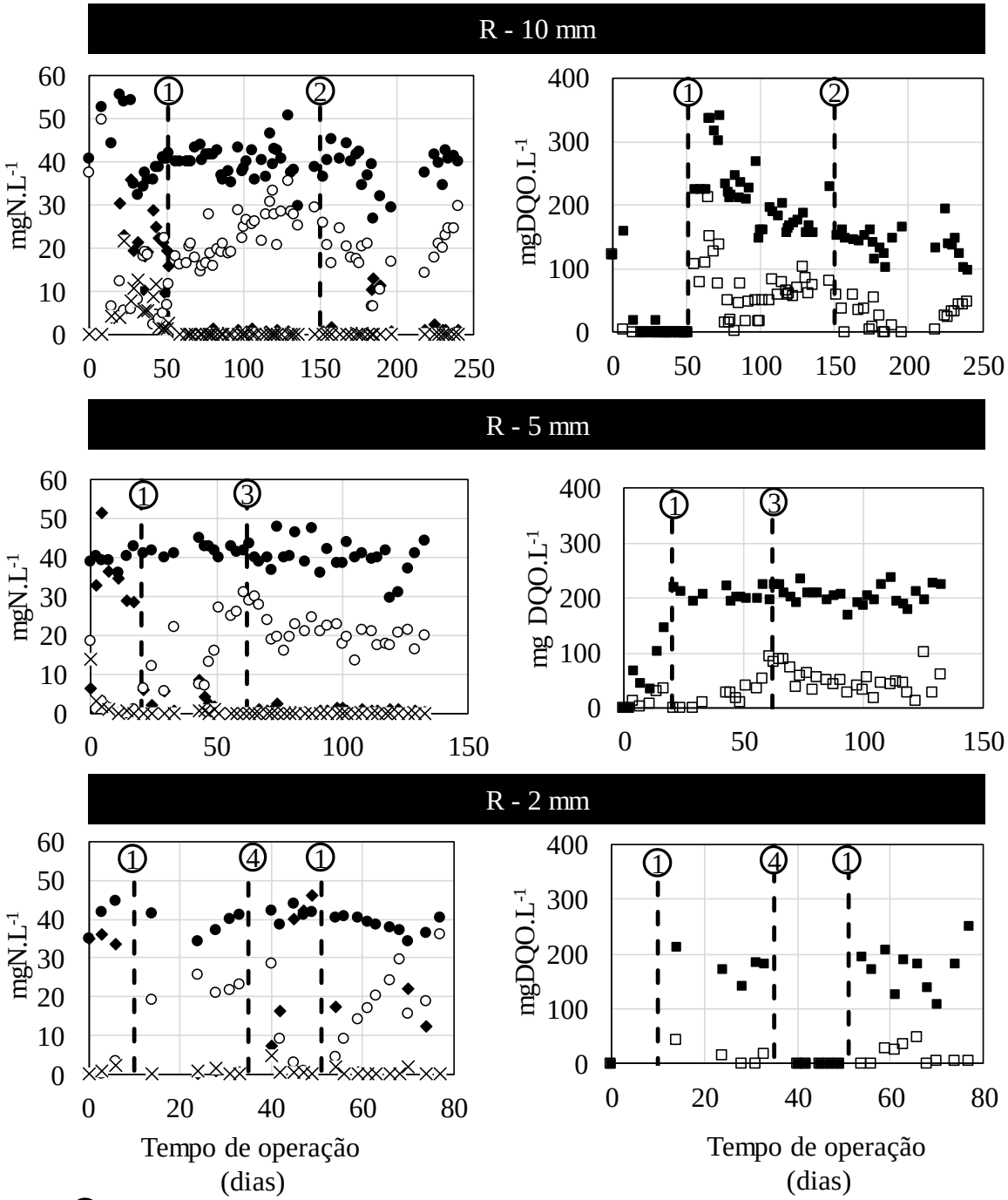


Figura 2. Concentrações de compostos nitrogenados e DQO no afluente (C/N=5) e efluente. (•) concentração de amônia afluente, (○) concentração de amônia afluente, (◆) concentração de nitrato efluente, (X) concentração de nitrito efluente, (■) concentração de DQO afluente, (□) concentração de DQO efluente.

No R-10mm, a eficiência de remoção de nitrogênio total caiu de 60% (70º dia) para 40% (100º dia). Nesse mesmo período, houve tendência de aumento da concentração de nitrato no compartimento interno (Figura 3), indicando o aumento da atividade nitrificante no interior do biofilme. Esses resultados levaram à formulação da hipótese de que houve um

aumento da resistência à transferência de massa entre os compartimentos. Este aumento foi atribuído à colmatação dos poros da espuma pelo crescimento da biomassa. Para testar essa hipótese, foi realizado um descarte de biomassa (Evento de operação 2). O descarte consistiu na raspagem manual do biofilme externo. Após o descarte, a eficiência de remoção de N-total voltou ao patamar anterior (60%), porém, novamente, após cerca de 50 dias a eficiência voltou a decrescer.

No R- 5mm, a partir do 50º dia de operação, a eficiência de remoção de N-total caiu para patamares de 30 a 40% e altas concentrações de amônia foram detectadas no compartimento interno (aproximadamente 30mg.L^{-1}). Houve, portanto, queda da eficiência de remoção de N-total no compartimento interno, mesmo mantendo-se elevadas as concentrações de oxigênio dissolvido (aproximadamente 6,8 mg.L^{-1}) e alcalinidade (aproximadamente 240 mg.L^{-1}). Atribui-se esse fato, então, a uma limitação da própria biomassa, que não foi capaz de consumir toda a amônia disponível. No dia 62º, foi realizada uma recirculação pontual da biomassa depositada no fundo do reator para o compartimento interno (evento de operação 3). A biomassa depositada no fundo do reator estava pouco ativa, devido às baixas concentrações de oxigênio nesta região do reator. Após a transferência da biomassa para o compartimento interno, ocorreu um aumento da atividade nitrificante durante cerca de 10 dias. O aumento de biomassa no compartimento interno proporcionou queda na concentração de amônia no mesmo, além de acúmulo de nitrato, que ficou entre 10 e 18 mgN.L^{-1} (Figura 3). Esta recirculação também foi capaz de restaurar parte da eficiência de remoção de N-total, que foi para cerca de 50%. Em comparação com o R-10 mm, o R-5 mm obteve efluente mais estável, o que significa que não foi possível observar o mesmo problema de acumulo de biomassa, e consequente perda de eficiência, dentro do período estudado.

O R-2 mm passou pelo mesmo período de adaptação da biomassa que os anteriores. No entanto, a adição de acetato prejudicou mais intensamente a nitrificação em relação ao R-10mm e ao R-5mm. Assim como com R-5mm, tal fato foi atribuído à falta de biomassa ativa no compartimento interno, uma vez que as condições de oxigênio dissolvido (6,5 mg.L^{-1}) e alcalinidade (200 mg.L^{-1}) não eram limitantes. Por isso, no dia 34º houve uma re-inoculação do reator (evento de operação 4). Apesar da re-inoculação ter elevado as taxas de nitrificação e eficiência de remoção de N-total de 80%, as concentrações de amônia, tanto no efluente quanto no compartimento interno, foram consistentemente aumentando até o 70º dia de operação.

No 70º dia, observou-se desprendimento da biomassa aderida à espuma de poliuretano, evidenciado, também, pela turbidez do meio líquido no compartimento externo. O desprendimento da biomassa elevou a concentração de oxigênio dissolvido no compartimento externo para 5,8 mg.L^{-1}. Apesar do aumento na eficiência de nitrificação, houve acúmulo de nitrato no sistema, ou seja, o reator se tornou aeróbio em ambos os compartimentos. Tem sido relatado que as bactérias heterotróficas tendem a permanecer suspensas por terem mais contato com carbono orgânico e oxigênio em flocos suspensos do que no biofilme (Shao et al., 2017). Esse fenômeno explica o desprendimento, uma vez que, durante todo o período, as eficiências de remoção de DQO se mantiveram elevadas, indicando elevada atividade heterotrófica.

A espuma de poliuretano pode proteger o biofilme contra cisalhamento e colisão de fluido, fornecendo pontos de ancoragem protegidos, por apresentar elevado volume de poros por unidade de volume de espuma. Entretanto, a espessura de 2 mm pode não ter sido suficiente para reter a biomassa, principalmente os microrganismos nitrificantes, por um longo período, impedindo assim, que o biofilme submetido à contra-difusão se mantivesse.

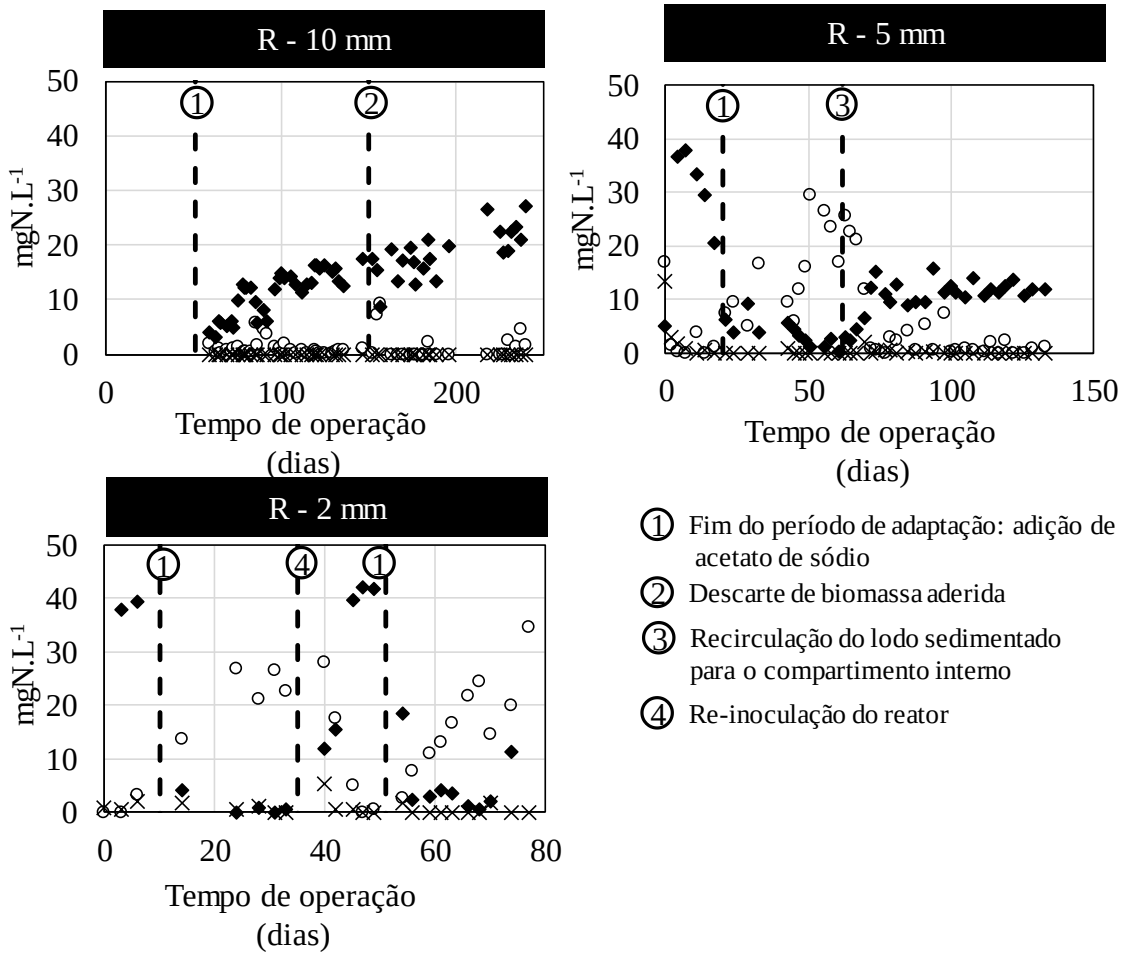


Figura 3. Concentrações de compostos nitrogenados no compartimento interno aerado (C/N=5), (○) concentração de amônia, (◆) concentração de nitrato, (X) concentração de nitrito.

Todas as espessuras testadas foram capazes de garantir ambientes anóxicos e aeróbios. Entretanto, o R-2 mm apresentou dificuldade de manter a biomassa aderida após a adição de acetato de sódio. Os R-10mm e R-5mm apresentaram eficiências máximas de remoção de nitrogênio total de 80 e 60% respectivamente. Todavia, o R-10mm não permaneceu estável, devido ao desenvolvimento do biofilme, e a eficiência de remoção de nitrogênio total caiu para 20%, tendo sido necessário realizar descarte de biomassa.

Em todos os reatores, quando estabelecido o biofilme submetido à contra-difusão, a eficiência de desnitrificação foi próxima a 100% no tratamento de água residuária com relação C/N igual a 5. A redução da espessura de poliuretano utilizada possivelmente afetou o processo de colonização do material suporte e o tempo necessário para a realização do descarte de biomassa. Quanto à capacidade de transferência de massa, os resultados são equivalentes, uma vez que as diferenças de concentrações de amônia, nitrato e DQO entre os compartimentos do reator foram similares no R-10 mm e no R-5 mm.

Redução da relação C/N

O R-10 mm também foi alimentados com relação C/N igual a 2,5. A Figura 4 apresenta as concentrações de DQO e compostos nitrogenados no afluente, efluente.

Apesar de a eficiência de remoção de nitrogênio total ter alcançado cerca de 60% após a adição de acetato, o reator apresentou comportamento semelhante à operação anterior, com relação C/N igual a 5. As concentrações de amônia do aumentaram constantemente até o dia 150º. Novamente, o descarte de biomassa proporcionou recuperação da eficiência do sistema. A concentrações de DQO no efluente também se manteve similar à da operação anterior.

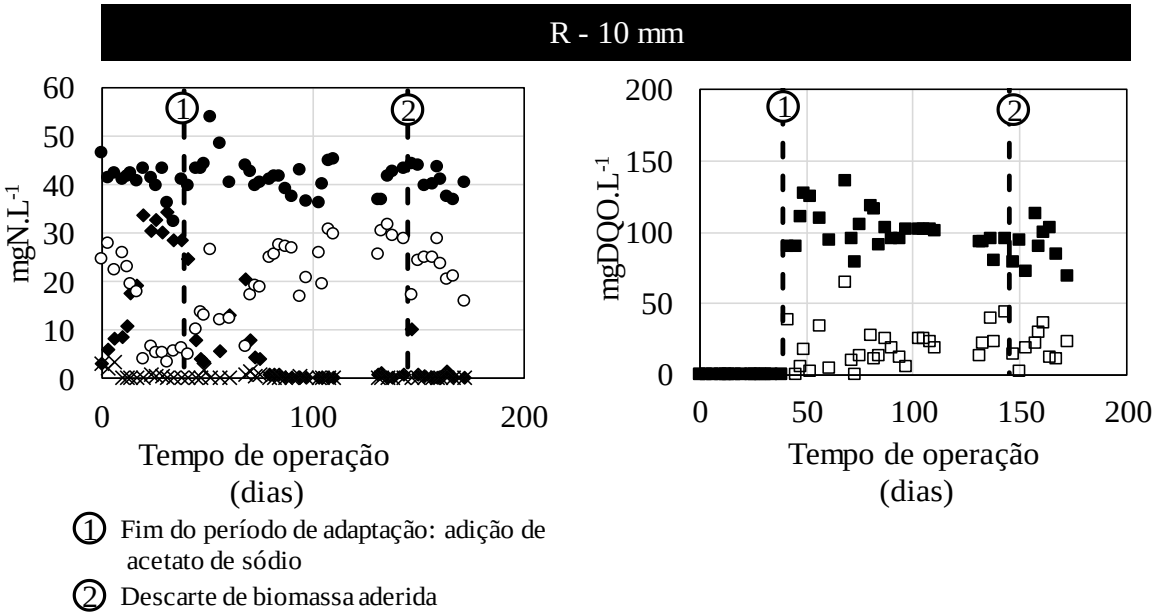


Figura 4. Concentrações de compostos nitrogenados e DQO no afluente (C/N=2,5). e efluente, (•) concentração de amônia afluente, (○) concentração de amônia afluente, (◆) concentração de nitrato efluente, (X) concentração de nitrito efluente, (■) concentração de DQO afluente, (□) concentração de DQO efluente.

A oxidação da amônia continuou sendo a etapa limitante, mesmo com a diminuição da carga orgânica aplicada. Entretanto, a desnitrificação permaneceu com eficiências acima de 90%. A transferência de massa continuou sendo limitante nestas condições. A Tabela 2 compara os resultados obtidos neste estudo com outros estudos que utilizaram reatores contendo espuma de poliuretano como material suporte (co-difusão) e reatores de membrana aerada (contra-difusão). A taxa de nitrificação correlaciona a carga de amônia oxidada pela área disponível de biofilme. Apesar da baixa eficiência de nitrificação neste estudo, a taxa de nitrificação e carga de nitrogênio aplicada foram as maiores. A maior taxa de nitrificação encontrada neste estudo pode ser atribuída à maior concentração de amônia no efluente. Isso significa maior diferença de concentração entre os compartimentos e, portanto, maior transferência de massa.

Tabela 2. Desempenho deste estudo e de estudos anteriores na remoção de compostos nitrogenados

Reator	C/N	Carga de nitrogênio ($gN.m^{-2}.d^{-1}$)	Taxa de nitrificação ($gN.m^{-2}.d^{-1}$)	Oxidação de NTK	Remoção de N-Total	Fonte
STBR	11,6	0,5	0,2	82%	89%	(Moura;et al., 2012)
STBR	5,9	0,8	0,2	82%	29%	(Silva et al., 2018)
HMBP	5,0	1,6	1,0	61%	41%	(Downing e Nerenberg, 2008)
HMBP	12,5	1,3	1,0	75%	74%	(Downing e Nerenberg, 2008)
MABR	10,0	0,3	0,2	95%	95%	(Lin et al., 2015)
MABR	10,0	0,6	0,4	78%	72%	(Lin et al., 2015)
R-10mm	4,9	5,2	2,4	46 ± 15 %	42 ± 13 %	Este estudo
R-10mm	2,5	5,3	2,5	46 ± 17 %	40 ± 12 %	Este estudo
R-5mm	5,2	5,1	2,5	48 ± 10 %	46 ± 10 %	Este estudo

STBR – structured bed reactor, HMBP – hybrid membrane biofilm process, MABR – membrane aerated reactor.

Outra abordagem para o aumento da transferência de massa pode ser através do aumento da área de biofilme disponível, diminuindo-se assim a carga de nitrogênio aplicada por área de biofilme. O desenvolvimento do biofilme no interior dos poros da espuma também necessita de uma investigação mais detalhada.

Conclusões

A diminuição da espessura de espuma de poliuretano e a redução da carga de DQO aplicada não proporcionaram maior taxa de nitrificação como o esperado. Estudos sobre a forma de colonização da espuma e de transferência de massa devem ser realizados para elucidar as razões desse comportamento. O desenvolvimento do biofilme ao longo do tempo impactou negativamente a eficiência de remoção de nitrogênio, sendo que o descarte de biomassa se mostrou efetivo para a recuperação do desempenho do reator. A espessura de 5 mm de espuma mostrou-se a mais adequada dentre as testadas, promovendo maior estabilidade do reator, enquanto que 2 mm de espessura não permitiu boa adesão da biomassa.

Referências Bibliográficas

APHA., 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Downing, L. S.; Nerenberg, R., 2008. Effect of oxygen gradients on the activity and microbial community structure of a nitrifying, membrane-aerated biofilm. Biotechnol Bioeng. 101, pp. 1193–1204.

Hasar, H., Xia, S., Ahn, C., Rittmann, B. E., 2008. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen compounds by an aerobic/anoxic membrane biofilm reactor. Water Res. 42, pp. 109–16.

Hasar, H., 2009. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen compounds by combining a membrane bioreactor and a membrane biofilm reactor. Bioresour. Technol. 100. pp. 2699–2705.

He, S., Xue, G., Wang, B., 2009. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. J Hazard Mater. 168, pp. 704–710.

Lin, J., Zhang, P., Yin, J., Zhao, X., Li, J., 2015. Nitrogen removal performances of a polyvinylidene fluoride membrane-aerated biofilm reactor. Int Biodeterior Biodegradation. 102, pp. 49–55.

Martin, K. J., Nerenberg, R., 2012. The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments. Bioresour. Technol. 122, pp. 83–94.

Moura, R. B., Damianovic, M. H. R. Z., Foresti, E., 2014. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. J environmental manage. 98, pp. 163–167.

Nerenberg, R., 2016. The membrane-biofilm reactor (MBfR) as a counter-diffusional biofilm process. Curr Opin Biotechnol. 38, pp. 131–136.

Santos, C. E. D., Moura, R. B., Damianovic, M. H. R. Z., Foresti, E, 2016. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). J environmental manage. 166, pp. 519–524.

Shao, Y., Shi, Y., Mohammed, A., Liu, Y., 2017. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. Int Biodeterior Biodegradation.116. pp. 38–47.

Silva, B. G., Damianovic, M. H. R. Z., Foresti, E., 2018. Effects of intermittent aeration periods on a structured-bed reactor continuously fed on the post-treatment of sewage anaerobic effluent, "Bioprocess Biosyst Eng. 20, pp. 1–6, 2018.

Torres, P., 1992. Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário, Universidade de São Paulo.

CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SP. ISOLADO DE RESÍDUO SÓLIDO DE CITROS

Franciele Pereira Camargo [1]; Iolanda Cristina Silveira Duarte [2]; Isabel Kimiko Sakamoto [3]; Edson Luiz Silva [4]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [5]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Biologia da UFSCar Sorocaba;
[3] Técnica do Laboratório de Processos Biológicos da USP São Carlos;
[4] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar São Carlos;
[5] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *O objetivo deste estudo foi caracterizar uma cepa isolada a partir da autofermentação de resíduos de citros (CPW). A cepa foi identificada a partir do sequenciamento 16S rRNA pelo método de Sanger como 99% similar à* Enterococcus casseliflavus*. Foram avaliados diversos substratos (glicose, frutose, sacarose, xilose, amido, glicerol, celobiose, celulose e lactose) e CPW a fim de obter H_2 e ácidos orgânicos (AOV). O substrato simples a partir do qual houve maior produção de H_2 foi a xilose (10,3 mmol.L^{-1}). Avaliou-se sua concentração ótima a partir do método de Planejamento Experimental, no intervalo de 0,5-6,5 g.L^{-1}. Foi possível observar que o aumento da fonte de carbono não teve efeito significativo a partir de 3,5 g.L^{-1}. O principal metabólito foi o ácido acético (365 mg.L^{-1}), indicando a prevalência da via acetogênica. O uso de CPW como substrato, com adição da cepa isolada, resultou em maior produção de H_2 (*P*=13,9 mmol.L^{-1};* Rm*=1,09 mmol.h^{-1}, λ=2,12 h) em comparação à glicose (*P*= 9,1 mmol.L^{-1};* Rm*= 1,99 mmol.h^{-1}; λ= 4,08 h).*

Introdução

A determinação da prevalência de microrganismos presentes em citros torna-se informativa no estudo de grupos resistentes aos potenciais inibidores deste substrato, como a matriz lignocelulósica e, ainda, o limoneno, que vem sendo relatado como um dos obstáculos ao seu reuso. A possibilidade de uso de consórcios como inóculo ao invés de culturas puras pode ser vantajosa, uma vez que há redução de custos em manutenção de cepas e meios específicos. Entretanto, o entendimento da composição do inóculo é fundamental, uma vez que os isolados podem ser aplicados em processos de bioaumentação, visando a melhoria de processos biotecnológicos e na produção biológica de H_2 (Maintinguer et al., 2017).

Além disso, a compreensão das particularidades ecológicas e fisiológicas dos microrganismos que compõe um determinado inóculo é de grande importância para o controle operacional em reatores, pois, uma vez que o principal objetivo do processo fermentativo é a obtenção de H_2 como produto final, as vias metabólicas predominantes devem ser àquelas que tem como metabólitos principais os ácidos acético e butírico, com baixa produção de ácido propiônico, assim como álcoois e ácido lático (Hawkes et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi isolar e identificar e caracterizar uma cepa potencialmente celulolítica a partir da autofermentação de CPW *in natura*. Além disso, avaliou-se o potencial biotecnológico da cepa obtida para produção de H_2 e AOV a partir de CPW.

Material e Métodos

Coleta e armazenamento do resíduo

O CPW *in natura* utilizado para obtenção do consórcio autofermentativo e como fonte de carbono foi produzido conforme descrito em Calabrò et al. (2016), utilizando laranjas do tipo pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio).

Obtenção de consórcio autofermentativo

Para a obtenção do consórcio autofermentativo foi utilizada metodologia adaptada de Wang et al. (2011), onde 15 $g.L^{-1}$ de CPW *in natura* (cascas + bagaço) foram acondicionados em frascos de 500 mL com volume reacional de 250 mL contendo meio *Peptone Cellulose Solution* (PCS) (peptona 5 $g.L^{-1}$, extrato de levedura 1 $g.L^{-1}$, $CaCO_3$ 5 $g.L^{-1}$, NaCl 5 $g.L^{-1}$) com pH ajustado para 7,0 com HCl (*p.a*) e NaOH 1M. N_2 (100%) foi fluxionado durante 10 minutos nos frascos para promover a anaerobiose do sistema.

Os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados em estufa com temperatura ajustada a 37°C e sob condições estáticas. Amostras de aproximadamente 500 µL do headspace foram coletadas utilizando seringas de *gastight* equipadas com trava, durante 48 horas ou até a estabilização da produção de H_2.

Ao final da fase exponencial, o meio fermentado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado durante 5 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e a biomassa precipitada foi transferida para um novo frasco contendo meio PCS fresco. Repetiu-se esse procedimento aproximadamente cinco vezes, até o aumento da densidade da biomassa e a produção de H_2 se mantivesse constante.

Isolamento de bactérias anaeróbias

Bactérias fermentativas produtoras de H_2 e potencialmente celulolíticas foram isoladas de acordo com Wang et al. (2011). Realizou-se diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-30}) do consórcio em frascos contendo meio PCS e incubados sob condições estáticas a 37°C por um período de 24 horas. A presença de H_2 foi adotada como parâmetro de crescimento, uma vez que a menor diluição onde houve produção de H_2 foi plaqueada em meio sólido (meio PCS acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico) pela técnica de *pour plate*.

As placas foram incubadas em Jarra Gas-Pack com sache de anaerobiose (Oxoid™ AnaeroGen™) durante 48 horas. Diferentes colônias foram transferidas do meio sólido para frascos Duran® contendo meio PCS e incubadas novamente por um período de 48 horas.

Atividade celulolítica

Um volume de 10% (v/v) do inóculo foi transferido para frascos com 50% de volume reacional e meio PCS, com 5 $g.L^{-1}$ de papel filtro de celulose. A atividade celulolítica foi avaliada por meio da desintegração da celulose após 21 dias de incubação. A cultura foi filtrada e a fração sólida ressuspendida em 100 mL de solução de ácido acético-ácido nítrico (1:1) a 100°C por 30 minutos, a fim de remover o material biológico (Wang et al., 2011).

O ensaio controle foi realizado substituindo-se o inóculo por água destilada. O material celulósico restante foi lavado com água destilada e centrifugado. A taxa de degradação foi determinada por análise gravimétrica, de acordo com a Equação 1

$$\text{Taxa de degradação } (\%) = \frac{M_t - M_r}{M_t} \times 100 \qquad (1)$$

sendo,
Mt= Massa Total de material celulósico;
Mr= Massa Residual.

Análise da comunidade microbiana

A identificação das colônias foi realizada via análise Amplicon 16S do DNA genômico, utilizando para extração o kit Pure Link TM Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen) e para amplificação da região de rRNA 16S os iniciadores 27F e 1492R.

O material genético amplificado foi purificado utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Os resultados foram observados em eletroforese em gel de agarose (1%; 80 V; 1 hora), por meio de comparações utilizando o *Low DNA Mass Ladder* (Thermo Fisher Scientific®) e o DNA foi quantificado por espectrometria (Nanodrop 2000). As sequências foram analisadas e alinhadas com o software BioEdit e foram comparadas com sequências disponíveis, através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequencias mais similares (maior identidade, menor E-valor e maior cobertura) foram incluídas para fins comparativos.

Para inferência das relações da árvore filogenética, utilizou-se a estimativa por máxima verossimilhança (ML), por meio do *software* MEGA versão 6 e com ramificações calculadas utilizando 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo de substituição foi escolhido via Critério de Informação Akaike (AIC), ainda via MEGA versão 6. O grupo externo foi escolhido de acordo com a similaridade com os gêneros obtidos.

Caracterização nutricional

A cepa foi caracterizada como descrito em Maintinguer et al. (2017) quanto aos seus requerimentos nutricionais por meio de ensaios em batelada com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, xilose, amido, glicerol, celobiose, celulose e lactose) em meio PCS modificado, contendo 2 $g.L^{-1}$ da respectiva fonte de carbono e esterilizado em sistema de membrana (0,22 Millipore®), utilizando 10% (v/v) da cultura isolada como inóculo.

Para avaliação dos efeitos da concentração de xilose, foram analisadas concentrações entre 0,5-6,5 $g.L^{-1}$ em meio PCS com pH ajustado para 7,0 e incubado sob condições estáticas e mesofílicas (37°C). O intervalo da concentração de substrato foi estabelecido a fim de avaliar a condição ótima de crescimento da cepa isolada em relação à variável de fonte de carbono, por meio do método estatístico de Planejamento Experimental (Rodrigues e Iemma, 2014).

O isolado produtor de H_2 foi adicionado ao consorcio autofermentativo para avaliar se o processo de bioaumentação poderia favorecer a obtenção de H_2. Foram realizados ensaios em batelada em meio PCS, com 15 $g.L^{-1}$ de CPW e 10% (v/v) da cepa isolada e identificada como semelhante a *Enterococcus casseliflavus* (número de acesso MH999448).

Métodos analíticos

A determinação dos AOV e álcoois foi conduzida em cromatógrafo de gás Shimadzu® (GC-2010) de acordo com Adorno et al. (2014). A análise da composição do biogás foi realizada em cromatógrafo de gás (GC-2010), equipado com detector de condutividade térmica (DCT). A coluna utilizada foi Carboxen 1010 PLOT, 30 m x 0,53 mm. A temperatura do injetor, do forno e do detector foram 220°C, 130°C e 230°C, respectivamente. Utilizou-se gás argônio como arraste, com fluxo na coluna de 5,66 $mL.min^{-1}$ com volume de Make-up de 12 $mL.min^{-1}$.

Análises e ajuste dos dados

Para a determinação do tempo de início da produção de H_2, taxa de crescimento e produção de H_2, utilizou-se o modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1994), específico para a modelagem preditiva de crescimento microbiano. Os parâmetros foram calculados por meio da Equação 2 no software OriginPro 9.0.

$$Y(t) = P.\exp\{-\exp(\frac{Rm.e}{A}[\lambda - t] + 1)\} \quad (2)$$

sendo,
Y(t)= razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo t e a contagem inicial,
Rm= velocidade específica máxima de crescimento ($mmol.h^{-1}$),

e= constante de Euler (2,71828182)
λ= tempo de início da produção de H_2 (h),
P= amplitude da curva sigmoidal (mmol.L^{-1}).

Os dados foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis no software PAST versão 2.17c para o intervalo de confiança de 95%. Os dados experimentais foram ajustados para valores médios obtidos de réplicas de reatores.

A curva de crescimento microbiano foi construída a partir da relação entre a biomassa produzida (densidade óptica e massa seca) com o tempo de incubação utilizado. A partir do logaritmo natural (ln) da fase exponencial do ensaio cinético, o crescimento específico (μ) obtido por dados experimentais sobre a concentração celular (OD_{600}) em função do tempo foi ajustado com curvas polinomiais (R^2= 0,9882). A partir destas curvas obteve-se um conjunto de valores de X = f (t), onde calculou-se o μ da reação (0,3497) e o tempo de geração celular (Tg) (Equação 3).

$$Tg = \frac{ln2}{\mu} = \frac{0{,}693}{\mu} \qquad (3)$$

Resultados e Discussão

Identificação das cepas isoladas

Os isolados foram identificados a partir da análise filogenética do gene 16S RNAr (Figura 1). O isolado IS1 apresentou 98% de similaridade com a sequência da espécie *Clostridium butyricum* (número de acesso 113244.1), os IS2 e IS3 apresentaram maior semelhança com sequências da espécie *Enterococcus casseliflavus* (número de acesso 119280.1) com 99% e 98% de similaridade, respectivamente.

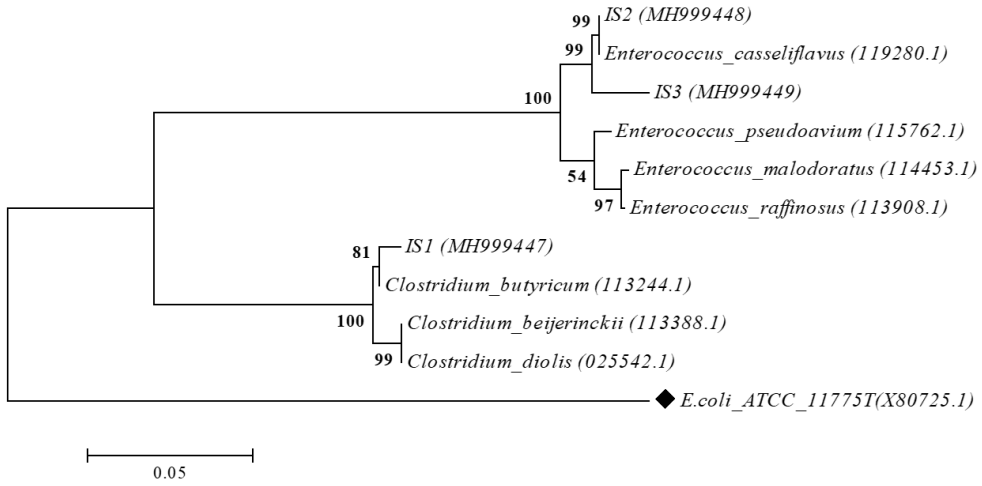


Figura 1: Análise filogenética do gene 16S RNAr de bactérias isoladas a partir de CPW *in natura*. A escala representa o número de substituições por posição de nucleotídeo para cada árvore. Os números de acesso de cada sequência estão representados entre parênteses. Os valores dos nós representam os valores de *bootstrap* (500 réplicas, máxima verossimilhança). Utilizou-se a sequência do gene 16S rRNA de *E. coli* (X80725.1) como grupo externo (♦).

Parâmetros cinéticos

Após o isolamento e identificação das bactérias fermentativas, optou-se por caracterizar a cepa similar à *E. casseliflavus* (MH999448), uma vez que sua taxa de degradação de celulose foi similar à de *C. butyricum* (p≥0,05) e não há dados na literatura

descrevendo seus parâmetros cinéticos, e trabalhos relatando seu potencial de produção de H_2 a partir de resíduos lignocelulósicos são escassos quando comparados à *C. butyricum*.

A partir do logaritmo natural (ln) da fase exponencial de crescimento, o crescimento específico (μ) obtido por dados experimentais sobre a concentração celular (OD_{600}) em função do tempo foi ajustado com curvas polinomiais (R^2= 0,9882), a partir das quais se obteve um conjunto de valores de X = f (t), onde obteve-se o μ da reação (0,35 horas) e o tempo de geração celular (*Tg*) da cepa isolada (1,98 h^{-1}).

Uma vez que a massa seca celular (MSC) formada pela cepa de *E. casseliflavus* nas condições de isolamento foi proporcional à absorbância utilizada (OD_{600}), pode ser calculada seguindo a proporção de $MSC_{E.casseliflavus}$:29,537 OD_{600}. A taxa de crescimento obtida neste estudo (μ=0,35) foi inferior à obtida no trabalho de Parente et al. (1997), de μ=1,85 h^{-1} para *E. faecium*, em pH 5,5 e 0,5% de glicose a 37°C.

Uma das possíveis explicações para esta menor taxa de crescimento obtida, além de se tratar de diferentes espécies, é que Parente et al. (1997) utilizaram uma cepa padrão de *Enterococcus* (*E. faecium* DPC1146) para a realização desta caracterização, enquanto no presente estudo utilizou-se uma cepa selvagem, nativa de CPW, que poderia estar menos adaptada às condições de cultivo. Até o momento, não há dados para comparação de caracterização de *E. casseliflavus* na literatura.

Orandi et al. (2005) obtiveram valores similares de *Tg* para uma cepa isolada de soro de queijo, *Enterococcus faecium* (1,21 h^{-1}), indicando, ainda, uma relação direta entre este valor e os parâmetros operacionais de temperatura (25-37°C) e pH (5,0-6,5), sendo que houve aumento do *Tg* proporcional e significativo ao decaimento do pH (de 0,85 para 1,21 h^{-1}) e também da temperatura, de 0,44 para 0,67 h^{-1} com o aumento de 25 para 37°C. Para outra cepa estudada pelos mesmos autores, *E. faecalis*, o comportamento foi similar, entretanto, esta cepa foi mais sensível ao aumento de temperatura, chegando a 1,50 h^{-1} nos ensaios a 37°C.

Corroborando com os dados obtidos por Orandi et al. (2005), Martínez et al. (2003) demonstraram que *E. faecium* é capaz de manter seu desenvolvimento celular em baixas temperaturas, contudo, reduzindo consideravelmente seu tempo de geração celular, para 37 e 30 h a 5 e 10°C, respectivamente, e 1,5 h em condição mesofílica, a 30°C, de acordo com a utilizada no presente estudo.

Caracterização nutricional e obtenção de AOV

A cepa isolada filogeneticamente semelhante à *Enterococcus casseliflavus* foi caracterizada quanto a sua capacidade de assimilação de nove diferentes fontes de carbono (amido, celobiose, celulose, frutose, glicerol, glicose, lactose, sacarose e xilose), e CPW. Após período de incubação de aproximadamente 30 horas, verificou-se presença de H_2 na composição do em todos os ensaios. A produção máxima de H_2 foi de 10,32 mmol.L^{-1} a partir da xilose como substrato em aproximadamente 30 horas de fermentação.

A produção máxima dos principais metabólitos observados foram o ácido acético de 365 mg.L^{-1} a partir de xilose; etanol, de 345 mg.L^{-1} a partir de glicose; ácido lático, de 178 mg.L^{-1} a partir da glicose; ácido propiônico, de 184 mg.L^{-1} a partir do CPW e, ácido butírico, com 70 mg.L^{-1} a partir da lactose como substrato.

Entre os substratos avaliados, a xilose é um dos principais monômeros encontrados em CPW (Choi et al., 2015), o que pode justificar sua maior assimilação por microrganismos autóctones deste tipo de substrato. Possui estrutura com menos átomos de carbono ($C_5H_{10}O_5$), quando comparado à glicose e a frutose ($C_6H_{12}O_6$), além da sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e demais substratos utilizados, como os dissacarídeos lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e celobiose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), os polissacarídeos celulose e amido [$(C_6H_{10}O_5)_n$] e o álcool glicerol ($C_3H_8O_3$).

A rota predominante a partir dos diferentes substratos foi a via acetogênica, uma vez que o ácido acético foi observado em concentrações superiores aos demais compostos orgânicos. No ensaio com maior produção de H_2 (10,32 mmol.L^{-1}) foram observadas também

a maior produção de ácido acético (364 mg.L^{-1}) e menores produções de etanol (61 mg.L^{-1}) e ácido lático (12 mg.L^{-1}) (compostos relacionados à diminuição da produção de H_2). Para a produção de dois mols de ácido acético gera é consumido um mol de glicose, enquanto a para produção de um mol de ácido butírico é consumido um mol de glicose (Hawkes et al., 2002).

Apesar de a maior produção total de compostos orgânicos ter ocorrido a partir da glicose como fonte de carbono, a produção de H_2 a partir deste substrato foi menor (7,70 mmol.L^{-1}), provavelmente devido à maior produção de etanol (345 mg.L^{-1}) e de ácido lático (178 mg.L^{-1}), pois há competição por substrato (piruvato) entre as vias metabólicas para formação destes compostos e as vias de formação de H_2.

A assimilação de substratos complexos, como a biomassa lignocelulósica, por espécies de *Enterococcus* vem sendo apontada como uma possibilidade. Valdez-Vazquez et al. (2015) utilizaram palha de trigo tanto como fonte de carbono quanto como substrato autofermentativo, obtendo um consórcio de três espécies epifíticas do gênero *Enterococcus*, capaz de produzir um máximo de H_2 de 79,54 mL por grama de palha de trigo. Cibis, Gneipel e König (2016) observaram diferentes microrganismos do filo Firmicutes, bactérias semelhantes à *Enterococcus casseliflavus* em sistemas mesofílicos e termofílicos de biogás alimentadas com silagem de milho e esterco bovino e suíno, sendo que os principais metabólitos produzidos foram os ácidos acético, butírico e propiônico.

No estudo cinético da produção de AOV e álcoois a partir de glicose e xilose, observou-se que os principais metabólitos produzidos foram os ácidos acético, butírico, propiônico e etanol. O composto acumulado em menor concentração ao longo de ambos os ensaios foi o ácido propiônico, atingindo a produção máxima de 14 mg.L^{-1} e 151 mg.L^{-1} a partir da glicose e xilose, respectivamente. A diferença entre os ensaios para este ácido foi considerada significativa ($p= 0,0003$) dentro do intervalo de confiança de 95%.

A produção de etanol não foi significativamente diferente entre as fontes de carbono avaliadas ($p= 0,0670$), entretanto, observou-se que a maior média acumulada foi de 89 mg.L^{-1} e 289 mg.L^{-1} no ensaio contendo glicose e xilose, respectivamente. No entanto, a produção de etanol no ensaio com glicose manteve-se constante, enquanto no ensaio contendo xilose foi crescente ao longo do período de incubação de aproximadamente 12 horas.

A maior diferença observada foi na produção dos ácidos acético e butírico a partir de diferentes fontes de carbono. O ácido butírico foi o principal metabólito no ensaio contendo glicose (758 mg.L^{-1} em aproximadamente 14 horas de experimento), enquanto a produção de o ácido acético foi de 362 mg.L^{-1}. A partir da xilose como fonte de carbono, foi possível observar uma mudança de rota metabólica, uma vez que o principal ácido produzido exponencialmente ao longo do período de incubação foi o ácido acético (897 mg.L^{-1}), e o ácido butírico manteve-se em 600 mg.L^{-1}, atingindo seu platô em aproximadamente 8 horas de incubação.

Efeito da concentração inicial de carboidratos

A fim de avaliar a condição ótima de crescimento da cepa em relação à variável de fonte de carbono, realizou-se ensaios cinéticos com variação na inicial de xilose, nas concentrações entre 0,5-6,5 g.L^{-1} deste monômero. Os ensaios foram analisados por meio do método estatístico de Planejamento Experimental (Rodrigues e Iemma, 2014). Os dados obtidos para as respostas de *P*, *Rm*, λ, pH, OD_{600} (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados das análises cinéticas dos reatores do ensaio de assimilação de diferentes concentrações de xilose.

Xilose (g.L^{-1})	***P*** **(mmol.L^{-1})**	***Rm*** **(mmol.h^{-1})**	**λ (horas)**	**pH**	**OD_{600}**
0,53	3,01	3,01	0,28	4,49	0,93
1,0	6,88	6,88	0,26	6,30	0,98

3,5	11,50	11,50	0,46	6,45	0,99
6,0	12,88	12,88	0,48	10,26	0,99
6,47	12,94	12,94	0,53	10,02	0,98

Nota: Potencial de produção de H_2 (*P*), taxa máxima de produção de H_2 (*Rm*), tempo de início da produção de H_2 (λ) e R^2 obtidos da equação de Gompertz modificada.; OD_{600}= densidade óptica.

A partir da ANOVA dos dados obtidos, foi possível avaliar o efeito da concentração de substrato, bem como obter os modelos de regressão referentes a cada uma das diferentes respostas analisadas e que foram consideradas significativas dentro do intervalo de confiança de 95%. Os modelos cujos termos lineares + quadráticos foram significativos chegaram a um platô, enquanto nos modelos quadráticos foi possível obter o ponto de inflexão da curva, e para os modelos apenas lineares não foi possível obter este ponto de inflexão, indicando que a faixa experimental para tal resposta deveria ser estendida.

Em relação à resposta *P*, observou-se que tanto o termo linear quanto o termo quadrático foram significativos (x_1 e x_1^2, respectivamente), sendo que a variável de concentração de substrato foi considerada positiva (3,69 $mmol.L^{-1}$) para produção acumulada de H_2. O valor máximo de *P* previsto pelo modelo de regressão obtido (Equação 4) foi de 13,14±0,90 $mmol.L^{-1}$ com 5,68 $g.L^{-1}$ de substrato.

De acordo com a ANOVA, o modelo de regressão para a resposta *P* foi considerado significativo. O gráfico para esta resposta indica um platô na concentração de substrato, ou seja, a partir deste ponto a adição de substrato não afetou a produção de H_2. Yin e Wang (2016), apontam que o aumento na concentração de substrato pode ocasionar em proporcional aumento da obtenção de H_2, entretanto, a partir de um dado momento este aumento não causa mais efeito e pode até mesmo afetar a atividade bacteriana, sendo que em sua pesquisa com uma cepa de *Enterococcus faecium*, o aumento da concentração de glicose (de 5 $g.L^{-1}$ para 20 $g.L^{-1}$) acarretou em redução de 40% da produção de H_2 em ensaios em batelada a 35°C e pH 7,0.

$$P = 11{,}71 + 3{,}69\ x_1 - 2{,}37\ x_1^2 \qquad (4)$$

Na resposta *Rm*, apenas o termo linear foi considerado significativo (x_1), indicando que o aumento da concentração de substrato foi proporcional ao aumento da velocidade da reação, ou seja, teve efeito positivo (0,11 $mmol.h^{-1}$). Desta forma, a velocidade máxima prevista foi de 0,54±0,03 $mmol.h^{-1}$ na concentração máxima de substrato analisada. O R^2 obtido para esta resposta foi de 85,70%, indicando que os dados previstos podem não ter se ajustado completamente aos dados experimentais.

Assim como para *Rm*, obteve-se significância apenas no termo linear (x_1) para a resposta λ, indicando um tempo de início para produção de H_2 máximo de 9,92±0,64 h^{-1} na concentração máxima de substrato analisada. Entretanto, sabe-se que o aumento de λ não é desejável para o processo, uma vez que aumenta o tempo necessário de reação. O modelo obtido foi considerado significativo, entretanto, o R^2 foi de 86,75%, indicando que este modelo não teve um bom ajuste.

O pH teve efeito contrário ao ocorrido nas respostas *Rm* e λ, uma vez que apesar de apenas o termo linear ter sido significativo (x_1), seu efeito foi negativo (-0,43), ou seja, quanto maior a concentração de substrato, maior o decréscimo do pH da reação (5,52±0,13), provavelmente devido à maior produção de AOV oriundos do processo fermentativo. A síntese de AOV pode levar ao seu acúmulo e diminuição extrema do pH, o que pode acarretar em inibição da biomassa fermentativa e, consequentemente, menor rendimento de H_2 (Fonseca et al., 2018). Da mesma forma, a OD_{600} teve o termo x_1 significativo, apresentando efeito linear. Observou-se que quanto maior a concentração inicial de substrato do meio reacional, maior a absorbância (1,12±0,09), devido ao crescimento celular.

Por fim, o consumo de carboidratos foi a única resposta cujo modelo de regressão apresentou apenas o termo quadrático como significativo e negativo (-4,50), indicando que apesar de o aumento da concentração de substrato ter aumentado o consumo de carboidratos durante o período de incubação, a partir de 3,5 $g.L^{-1}$ de substrato este efeito passa a ser negativo, diminuindo o consumo da fonte de carbono.

Com base nos dados apresentados, é possível inferir que apesar de o aumento da concentração de substrato ser positivo tanto à produção de H_2 quanto ao aumento da biomassa, a partir de uma determinada concentração sua adição não foi mais significativa para o aumento da produção de H_2, atingindo um platô, e para o consumo de carboidratos, indicando que este substrato não foi consumido na mesma proporção.

Com base na Figura 2, observou-se a tendência de que os ensaios com menor concentração de substrato (0,53 e 1,0 $g.L^{-1}$) atingiram o seu platô em menor tempo quando comparados aos ensaios com maiores concentrações (3,5; 6,0 e 6,45 $g.L^{-1}$). O ensaio contendo 0,53 $g.L^{-1}$ de xilose atingiu o seu ponto máximo de produção de H_2 em aproximadamente 10 horas, enquanto o ensaio contendo 6,45 $g.L^{-1}$ estabilizou apenas em aproximadamente 40 horas de incubação. Houve maior produção de H_2 ao aumentar a concentração de substrato de 0,53 para 3,5 $g.L^{-1}$, entretanto, não foi observada esta diferença de 3,5 para 6,45 $g.L^{-1}$. Isso ocorre devido às necessidades microbianas na fase de adaptação da biomassa, uma vez que a fonte de carbono disponível no meio é assimilada inicialmente para o crescimento celular. Guo et al. (2014) indicam que altas concentrações de matéria orgânica podem influenciar tanto na redução do tempo de início para produção de H_2 quanto positivamente ao longo do processo fermentativo.

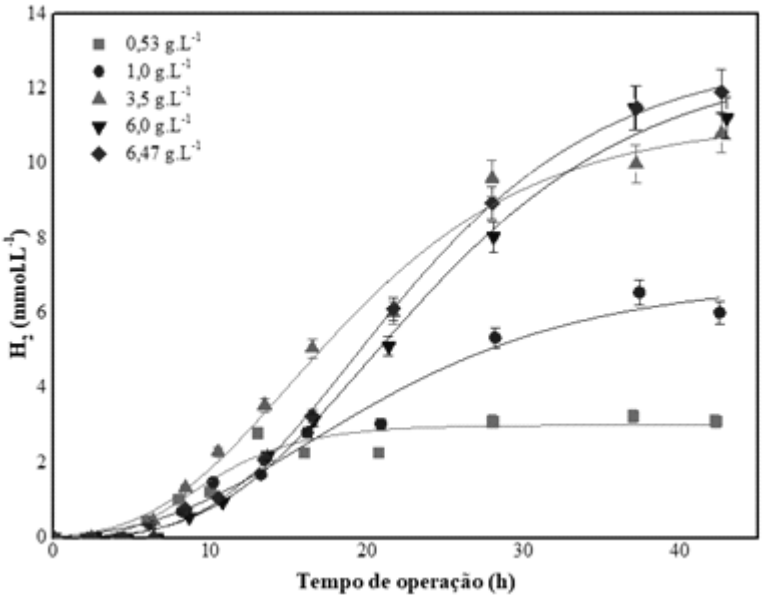


Figura 2: Produção acumulada de H_2 a partir de diferentes concentrações de xilose.

Aplicação em CPW e bioaumentação

A partir da glicose como fonte de carbono, o valor máximo de H_2 produzido (*P*) foi de 9,1 $mmol.L^{-1}$, a velocidade da reação (*Rm*) foi de 0,14 $mmol.h^{-1}$ e o tempo necessário para início da produção de H_2 foi de 4,08 horas. A produção de H_2 atingiu o seu platô em aproximadamente 12 horas de incubação, assim como o consumo de glicose, única fonte de carboidratos deste experimento. Experimentos usando *Enterobacter* sp. isolada de água residuária de cervejaria, o consumo de glicose não foi completo e ao final do experimento, foi possível observar 14,4% da concentração inicial de glicose (2 $g.L^{-1}$), enquanto no presente estudo, ao final do experimento, aproximadamente 95% da glicose foi degradada.

No ensaio contendo glicose houve maior obtenção de H_2 tanto no ensaio contendo CPW + consórcio autofermentativo (7,52 $mmol.L^{-1}$) quanto no ensaio de bioaumentação,

contendo CPW + consórcio autofermentativo e a cepa isolada de *E.casseliflavus* (13,90 $mmol.L^{-1}$). Os resultados obtidos podem ser justificados tanto devido às diferenças estruturais da fonte de carbono, uma vez que um dos principais monômeros presentes em citros é a xilose (Choi et al., 2015), quanto aos microrganismos autóctones presentes no CPW, que podem aumentar a degradação da celulose e, consequentemente, a disponibilidade de açúcares fermentáveis no meio reacional.

É possível inferir que o aumento da biomassa da cepa isolada conciliada à comunidade autóctone do CPW afetou positivamente a obtenção de H_2, aumentando a sua biodegradação. De acordo com Lin et al. (2017) as bactérias autóctones tem maior afinidade ao seu resíduo de origem do que quando aplicadas em outros tipos de substratos, o que justifica a importância do estudo da microbiota específica do CPW.

A velocidade da reação (*Rm*) foi maior nos ensaios contendo glicose como substrato (1,99 $mmol.h^{-1}$) quando comparado aos demais, (1,03 e 1,01 $mmol.h^{-1}$), devido à facilidade de assimilação deste monômero. Braga et al. (2017) realizaram um estudo de caracterização com uma cepa de *Clostridium cellulolyticum* e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado via hidrotermólise como fonte de carbono, obtendo 3,9 mmol de H_2 por grama de bagaço, enquanto Ratti et al. (2015) obtiveram 1,2 mol por grama do mesmo substrato (pré-tratado por hidrotermólise seguido de deslignificação alcalina), indicando que, além da origem do substrato e condições operacionais, a presença de consórcios autóctones pode aumentar a obtenção de H_2 e a biodegradação de resíduos lignocelulósicos.

Conclusões

Foi possível isolar uma cepa anaeróbia facultativa e 99% similar à espécie *E. casseliflavus* a partir de um consórcio obtido por meio da autofermentação de CPW *in natura*. Obteve-se os parâmetros de taxa de crescimento e tempo de geração celular (*Tg*) de 0,35 horas e 1,98 h^{-1}, respectivamente. Além disso, obteve-se a partir de estudo cinético, os parâmetros *P* (9,1 mmol $H_2.L^{-1}$), *Rm* (1,99 $mmol.h^{-1}$) e λ (4,08 h), além de 61,34% de taxa de degradação de celulose nas condições de isolamento, ou seja, a partir de glicose como substrato e incubação a 37°C.

A cepa *E. casseliflavus* foi capaz de assimilar e produzir H_2 a partir de diferentes fontes de carbono, sendo que a maior obtenção de H_2 ocorreu a partir da xilose (10,3 mmol $H_2.L^{-1}$). Houve aumento na produção de H_2 ao aumentar a concentração de substrato de 0,53 para 3,5 $g.L^{-1}$, entretanto, não foi observada esta diferença ao aumentar esta concentração de 3,5 para 6,45 $g.L^{-1}$, provavelmente devido ao acúmulo de AOV e consequente redução do pH. Os principais metabólitos obtidos foram ácido acético, ácido butírico e etanol.

Observou-se maior *P* a partir de CPW como substrato, com *P*= 13,9 mmol $H_2.L^{-1}$, além de maior *Rm* (1,09 $mmol.h^{-1}$) e λ (2,12 h), indicando que *E. casseliflavus* possui potencial de aplicação na biodigestão de substratos complexos visando a obtenção de H_2 e demais produtos de interesse biotecnológico.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 05, 406–414.

Braga, J.K., Abreu, A.A., Motteran, F., Pereira, M.A., Alves, M.M., Varesche, M.B.A., 2017. Hydrogen Production by *Clostridium cellulolyticum* a Cellulolytic and Hydrogen-Producing Bacteria Using Sugarcane Bagasse. Waste and Biomass Valorization 0, 1–11.

Calabrò, P.S., Pontoni, L., Porqueddu, I., Greco, R., Pirozzi, F., Malpei, F., 2016. Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. Waste Manag. 48, 440–447.

Choi, I.S., Kim, J.H., Wi, S.G., Kim, K.H., Bae, H.J., 2013. Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. Appl. Energy 102, 204–210.

Choi, I.S., Lee, Y.G., Khanal, S.K., Park, B.J., Bae, H.J., 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. Appl. Energy 140, 65–74.

Cibis, K.G., Gneipel, A., König, H., 2016. Isolation of acetic , propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. J. Biotechnol. 220, 51–63.

Fonseca, B.C., Schmidell, W., Reginatto, V., 2018. Impact of Glucose Concentration on Productivity and Yield of Hydrogen Production by the New Isolate *Clostridium beijerinckii* Br21. Can. J. Chem. Eng. 9999, 1–8.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J.P., 2014. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. Int. J. Hydrogen Energy 39, 7476–7485.

Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. Int. J. Hydrogen Energy 27, 1339–1347.

Lin, C., Lay, C., Sung, I., Sen, B., Chen, C., Al, L.I.N.E.T., Ioeng, J.B.I.B., 2017. Anaerobic hydrogen production from unhydrolyzed mushroom farm waste by indigenous microbiota. J. Biosci. Bioeng. 124, 425–429.

Maintinguer, S.I., Lazaro, C.Z., Pachiega, R., Varesche, M.B.A., Sequinel, R., de Oliveira, J.E., 2017. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. Int. J. Hydrogen Energy 42, 152–160.

Martínez, S., López, M., Bernardo, A., 2003. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. Lett. Appl. Microbiol. 37, 475–481.

Orandi, S.M., Rasca, M.B., Lfieri, P.A., Odi, R.L., Amburini, A.T., 2005. Original article Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Lait 85, 181–192.

Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A., Addario, G., 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18, 62–67.

Ratti, R.P., Delforno, T.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2015. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. Int. J. Hydrogen Energy 40, 6296–6306.

Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2014. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, 3rd ed. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, Campinas, São Paulo.

Rosa, P.R.F., Silva, E.L., 2017. Review of Continuous Fermentative Hydrogen- Producing Bioreactors from Complex Wastewater. Front. Bioenergy Biofuels Hydrog. 257–284.

Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., Amaya-Delgado, L., 2015. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. Fuel 159, 214–222.

Wang, W., Yan, L., Cui, Z., Gao, Y., Wang, Y., Jing, R., 2011. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. Bioresour. Technol. 102, 9321–9324.

Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., Cameron, R.G., 2007. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. Bioresour. Technol. 98, 1596–1601.

Yin, Y., Wang, J., 2016. Characterization and hydrogen production performance of a novel strain *Enterococcus faecium* INET2 isolated from gamma irradiated sludge. Int. J. Hydrogen Energy 41, 22793–22801.

Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Cuppers, H.G.A.M., Van't Riet, K., 1994. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. Appl. Environ. Microbiol. 60, 204–213.

MONITORAMENTO DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE COBRE, FERRO E MANGANÊS NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE MELAÇO E VINHAÇA

Camila M. R. Silva[1]; Lauren N. M. Yabuki[2]; Marcelo L. Garcia[3]

[1] Aluna de Iniciação Científica do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[2] Pós-Doutoranda do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[3] Professor do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP).

Resumo. *Atualmente a busca por fontes sustentáveis que supram o aumento da demanda energética mundial é imprescindível, tendo em vista que o uso dos combustíveis fósseis e a emissão excessiva dos gases do efeito estufa impactam diretamente a qualidade do meio ambiente. Uma possibilidade é a produção de bioenergia em biorrefinarias que, por meio de bioprocessos anaeróbios, digerem a matéria orgânica das águas residuárias e geram biogás. A biodigestão pode ser influenciada pela quantidade de elementos-traço na água residuária. As concentrações totais dos metais-traços cobre, ferro e manganês nas águas residuárias foram investigadas neste trabalho, bem como o seu efeito no desempenho da digestão anaeróbia. Não foi observada uma redução na produção de metano e na eficiência de remoção de matéria orgânica para as seguintes faixas de concentração de entrada de cobre (36,78 - 449,38 µg.L^{-1}), ferro (154,61 - 2160,31 µg.L^{-1}) e manganês (25,79 - 391,83 µg.L^{-1}), em um reator de leito fixo alimentado com melaço. As faixas das concentrações de cobre, ferro e manganês na vinhaça foram, respectivamente, 41,18 - 889,63 µg.L^{-1}, 960,44 - 5952,93 µg.L^{-1}, 228,29 - 2554,15 µg.L^{-1}.*

Introdução

A poluição ambiental é um problema crescente com impacto direto na qualidade do meio. O consumo de combustíveis fósseis é responsável por grande parte da poluição ambiental e, desde o século passado, a humanidade vem sofrendo os efeitos negativos do seu uso como, por exemplo, as mudanças climáticas associadas ao aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera terrestre (NASA, 2017; IPCC, 2014). Neste cenário, uma alternativa à dependência dos combustíveis fósseis do modelo econômico atual e à crescente demanda energética é a produção de energia a partir da biomassa (International Energy Agency, 2016).

No Brasil, a produção de biocombustível a partir da cana-de-açúcar desenvolveu-se de maneira impressionante e em 2015 o estado de São Paulo produziu 13,7 bilhões de litros de etanol a partir da cana-de-açúcar e, para cada litro de etanol produzido, gerou 11,8 litros de vinhaça (Instituto de Economia Agrícola, 2016; Torquato e Jesus, 2015; Fuess e Garcia, 2014). Assim, mesmo com as vantagens do uso do etanol, a enorme quantidade de vinhaça produzida pode contribuir para o aumento da poluição, sendo um empecilho.

A vinhaça é uma água residuária marrom-escura da produção de etanol com elevada: carga orgânica e concentração de macronutrientes e elementos-traços (Fuess e Garcia, 2012, Fuess e Garcia, 2014). A produção de açúcar também gera um resíduo orgânico, o melaço, um líquido viscoso e com alto teor de açúcares (Pugliano et al., 2014; Janke et al., 2015; Detman et al., 2017). No Brasil, são produzidos cerca de 50 quilos de melaço por tonelada de cana-de-açúcar processada, contendo altos níveis de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) (Embrapa, 2017; Li et al., 2007; Wilkie et al., 2000). Para empregar a enorme quantidade de vinhaça e melaço pode-se produzir biogás a partir do seu tratamento anaeróbio (Moraes et al., 2014).

O tratamento das águas residuárias evita a poluição do solo e das águas e danos aos ecossistemas (von Sperling, 2005) e, quando realizado em reatores anaeróbios, tem a vantagem das bactérias anaeróbias consumirem a matéria orgânica presente na

vinhaça/melaço e gerarem biogás, o que permite lucratividade na biorrefinaria (Rajeshwari et al., 2000; Li et al., 2007). O tratamento anaeróbio da vinhaça também apresenta baixa produção de lodo e conversão de quase 50% da DQO total da vinhaça em biogás, e do melaço proporciona remoção de 13% da DQO do melaço (Pugliano et al., 2014; Han et al., 2012). A velocidade de biodegradação anaeróbia está relacionada com a concentração de metais-traço que estimulam a atividade metanogênica e, quando há deficiência dos metais, o crescimento dos microrganismos no reator é limitado, podendo levar à instabilidade ou falha do processo (Janke et al., 2016; Fermoso et al., 2008; Fermoso et al., 2009; Thanh et al., 2016). Portanto, o estudo das concentrações totais dos elementos-traço da geração de biogás é muito importante.

Em especial, foram escolhidos o cobre, o ferro e o manganês, para realização deste estudo, pois, depois dos macronutrientes, são estes metais inorgânicos que estão presentes em maior concentração nos solos tropicais brasileiros (Costa et al., 2016) e, consequentemente, na vinhaça e no melaço (Mutton, Rossetto e Mutton, 2010; Valduga et al., 2007).

O objetivo deste trabalho é monitorar as concentrações totais dos elementos-traço cobre, ferro e manganês nas correntes afluentes e efluentes dos reatores metanogênicos e investigar uma possível relação da concentração dos metais com o desempenho do tratamento anaeróbio de melaço e de vinhaça de cana-de-açúcar, de modo que favoreça a eficiência da produção de biogás contribuindo para o reequilíbrio dos ciclos de matéria e energia.

Material e Métodos

Análises, obtenção das amostras e reatores estudados

As determinações analíticas dos biorreatores foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP) e a digestão das amostras e a determinação da concentração dos elementos traço Cu, Fe e Mn foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA/IGCE/UNESP, Rio Claro-SP). Nas correntes afluentes e efluentes dos reatores pesquisados foram feitas análises físico-químicas para pH, DQO, SSV e SST segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) e Blundi e Gadêlha (2001). Continuamente monitorou-se a vazão de biogás com auxílio de um gasômetro Ritter®. A análise da composição do biogás (H_2, N_2, CH_4 e CO_2) foi realizada por um cromatógrafo gasoso (GC 2014AT, Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica, com coluna, Carboxen® 1010 Plot 30 m x 0,53 mm de diâmetro interno x 40,0 μm de espessura de filme) e tendo como gás de arraste o argônio (Perna et al., 2013).

No CEA, a concentração total dos metais foi analisada por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (iCAP 6000 Series, Thermo Scientific), após prévia digestão ácida em sistema aberto por bloco aquecedor (Dimpe et al., 2014; Krug e Rocha, 2016).

O melaço e a vinhaça bruta utilizados neste trabalho são provenientes da Usina São Martinho (Pradópolis, São Paulo, Brasil) e foram coletadas entre 2015 e 2017 em reservatórios plásticos de polipropileno, mantidos em freezer (-20°C) antes do uso, a fim de preservar as características físico-químicas do efluente. As amostras de melaço foram obtidas do reator metanogênico de leito fixo (ASTBR- MI) com espuma de poliuretano fixa em tela de aço inoxidável, com um volume útil de 1,65 L, diâmetro interno de 60 mm, 800 mm de comprimento total, 500 mm de comprimento e fluxo ascendente. O reator foi operado à 55°C em nove fases com carga orgânica volumétrica (COV) de entrada variando entre 2,5 e 10,0 $g.L^{-1}.d^{-1}$ e o tempo de detenção hidráulica (TDH) constante e igual a 28 h. O reator ASTBR-MI foi operado por 188 dias, os metais foram monitorados por 94 dias e a alimentação do reator foi realizada com diluição de 12 $g.L^{-1}$ de melaço em água de abastecimento. Houve adição de bicarbonato de sódio (com concentração variando de 1 a $gNaHCO_3.g^{-1}DQO$), solução de nutrientes e solução de vitaminas durante a sua operação. (Oliveira, 2018).

As amostras de vinhaça foram coletadas do reator metanogênico de leito fixo estruturado (ASTBR) com espuma de poliuretano fixa em aço inoxidável, com um volume

útil, já com o leito de espuma, de 2,4 L, diâmetro interno de 72 mm, diâmetro externo de 75 mm e 800 mm de comprimento. O reator foi operado por 172 dias à 70°C, com COV de entrada variando entre 3,3 e 6,9 $g.L^{-1}.d^{-1}$ e adição de bicarbonato de sódio como alcalinizante em todo o período operacional (Niz, 2019). Neste reator, monitoraram-se os metais por 144 dias.

Preparo das amostras e digestão ácida

As amostras de melaço/vinhaça foram retiradas diretamente das correntes afluentes e efluentes do reator, acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas em uma geladeira (4°C) até serem digeridas. O procedimento da digestão foi executado segundo Dimpe et al. (2014) e Krug e Rocha (2016). O volume de 10 mL da amostra de águas residuárias foi colocado em um tubo macro de vidro de borosilicato graduado. Adicionou-se 3mL da mistura ácida: aqua régia ($HCl:HNO_3$, 3:1) e a mistura (amostra de água + aqua régia) foi deixada durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte, a amostra foi digerida em bloco de aquecedor durante aproximadamente 4 horas a temperatura máxima de 150°C. Os tubos de digestão no bloco foram tampados para reduzir a perda de analito devido à vaporização da amostra. Durante a digestão, o branqueamento da amostra indicou o consumo da matéria orgânica. Após esfriar, a solução foi transferida para um tubo de polipropileno e diluída com água ultrapura até o volume de 30 ml.

As amostras foram digeridas em duplicata para cada procedimento para quantificar a proximidade (precisão) dos resultados obtidos nas mesmas condições. A validação do método de digestão foi realizada com soluções chamadas branco (porção de água ultrapura processada exatamente como a amostra, incluindo exposição a todos os equipamentos, vidros, procedimentos e reagentes), branco fortificado (porção de água ultrapura processada exatamente como a amostra, na qual é adicionada uma quantidade conhecida dos metais), e amostra fortificada (processamento padrão da amostra seguida de adição de uma quantidade conhecida dos metais) (Zhang, 2007).

Resultados e Discussão

Melaço de cana-de-açúcar

A concentração de entrada de cada metal mostrou-se, na maioria das amostras, maior que a concentração de saída (Figura 1 e 2), com eficiências médias de remoção de cobre, ferro e manganês respectivamente iguais a 43,17 ± 25%, 49 ± 12% e 58 ± 22%. Porém, em algumas amostras, a concentração de saída foi maior que a de entrada, indicando que após algum tempo de operação o reator pode acumular metais no seu interior liberando-os em um tempo subsequente durante a operação (Zandvoort et al., 2006).

O monitoramento dos metais-traço nas amostras de melaço afluentes no biorreator permite observar que os valores de concentração afluente de cobre variaram de 36,78 a 449,38 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 183,23 ± 136,24 $\mu g.L^{-1}$ (Tabela 1). Para o ferro, os valores de concentração afluente analisados variaram de 154,61 a 2160,31 $\mu g.L^{-1}$ (Figura 2), com concentração média igual a 1240,97 ± 606,58 $\mu g.L^{-1}$ (Tabela 1). O manganês apresentou valores de concentração afluente variando de 25,79 a 391,83 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 264,57 ± 113,36 $\mu g.L^{-1}$ (Tabela 1).

A produção volumétrica de metano (*PVM)* e a eficiência de remoção de DQO (E) podem estar associadas com a concentração dos metais do melaço. As concentrações afluentes dos metais analisados não causaram uma redução no desempenho do biorreator (na Figura 2, apresentamos o resultado obtido para o ferro, cobre e manganês similares), não exercendo um efeito de inibição na produção de metano ou restringindo a eficiência de remoção de DQO no biorreator. Dessa forma, não foi verificada uma relação de influência das faixas de concentração dos metais analisadas e a eficiência de remoção de matéria orgânica e a *PVM* (Silva et al., 2019).

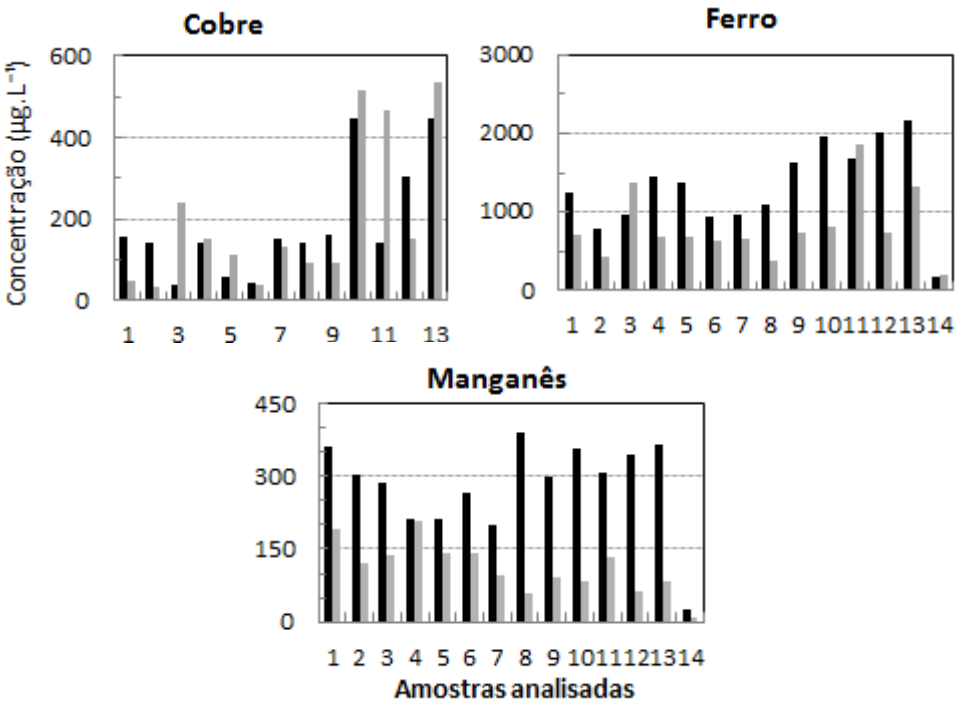


Figura 1: Comparação entre a concentração afluente (■) e efluente (■) dos metais nas amostras analisadas.

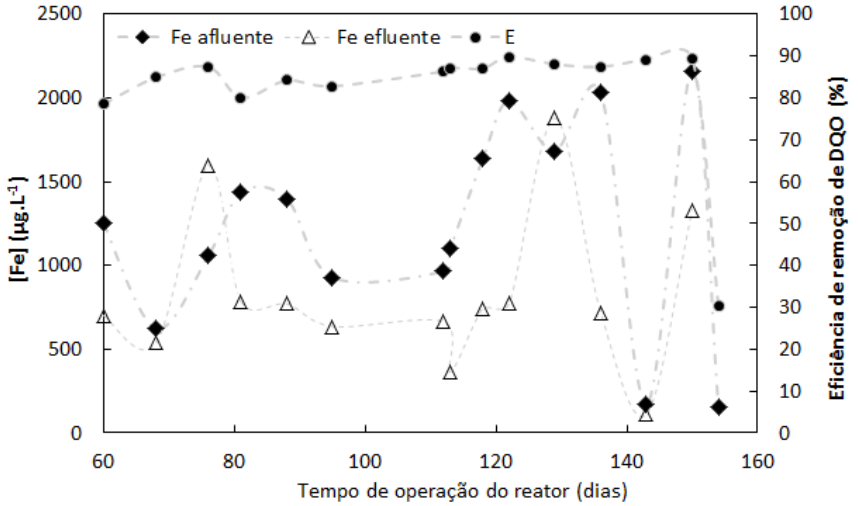


Figura 2: Variação temporal da concentração de ferro e da eficiência de remoção de DQO.

A distribuição dos dados da concentração de entrada dos metais traço apresentou grande amplitude (Fig. 3 e Tabela 1). Por exemplo, os valores de concentração de entrada do ferro possuem amplitude de 4011,41. Também se pode observar uma grande variação de concentração dos metais comparada à grande variação dos valores de *PVM*, amplitude igual a 1266,44. Para a eficiência de remoção há uma grande variação dos valores igual a 59,54%, pois há único dado de eficiência de remoção igual a 30,30%, os outros valores variam entre 89,84 e 78,50 %. Este fato deve-se à mudança da operação do reator, retirando o alcalinizante, acidificando o sistema e prejudicando as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas produzirem CH_4 (Oliveira, 2018).

Tabela 1: Tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos para o melaço.

	[entrada] (µg.L^{-1})			[saída] (µg.L^{-1})			*PVM* (mLCH$_4$.L^{-1}.d^{-1})	ε (%)
	Cu	Fe	Mn	Cu	Fe	Mn		
Máximo	449,38	2160,31	391,83	535,74	1865,81	207,47	2917,28	89,84
Q3	233,33	1668,59	357,93	353,58	932,55	142,38	2482,28	88,30
Média	183,23	1240,97	264,57	200,75	799,71	111,04	2166,10	82,42
Mediana	144,21	1249,91	298,70	131,89	695,26	107,42	2243,58	87,12
Q1	99,03	928,45	212,37	69,57	585,68	76,77	1964,89	83,83
Mínimo	36,78	154,61	25,79	33,20	206,35	8,00	827,65	30,30
DP	136,24	606,58	113,36	183,69	438,63	53,16	516,97	14,72
Amplitude	412,61	2005,70	366,05	502,55	1659,47	199,47	2089,63	59,54

*Q3 = terceiro quartil e Q1= primeiro quartil.

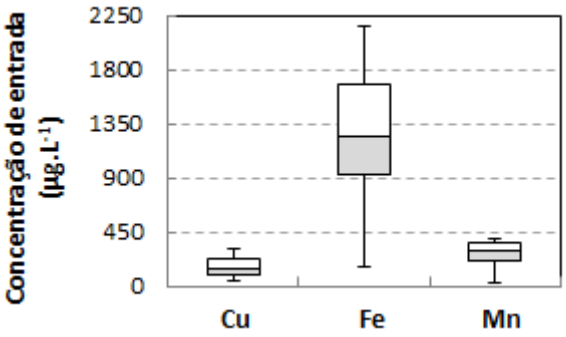


Figura 3: Box plot da concentração de entrada dos elementos-traço ▢ Q1 e ☐ Q3.

Vinhaça de cana-de-açúcar

O monitoramento dos metais-traço nas 4 amostras afluentes no biorreator permite observar que os valores de concentração (Tabela 2 e Figuras 4 a 8) de: A) cobre variaram de 41,18 a 889,63 µg.L^{-1} e concentração média igual a 378,72 ± 364 µg.L^{-1} ; B) ferro variaram de 960,44 a 5952,93 µg.L^{-1} e concentração média de 3767,68 ± 2225 µg.L^{-1}; e C) manganês variaram de 228,29 a 2554,15 µg.L^{-1} e concentração média de 1512,45 ± 1191 µg.L^{-1}. Os ensaios deste reator apresentam menos dados da entrada (apenas 4 pontos, mostrados nos gráficos das Figuras 4, 5, 6, 7 e 8), pois as correntes de entrada partiram de um lote único de vinhaça coletado no início de operação do reator, assim não foi caracterizado todas as correntes de entrada.

A concentração de entrada de cada metal mostrou-se, na maioria das amostras, maior que a concentração de saída (gráficos da Figura 4). As eficiências médias de remoção de cobre, ferro e manganês são respectivamente iguais a 55,04 ± 42%, 33,23 ± 35% e 24,06 ± 48%. Da mesma forma como nos resultados do melaço, em algumas amostras, a concentração de saída foi maior que a de entrada, indicando o reator pode acumular metais no seu interior liberando-os em um tempo subsequente durante a operação (Zandvoort et al., 2006). O manganês apresentou concentrações de saída maiores que a de entrada para 3 das 4 amostras comparadas, indicando uma baixa remoção de Mn pela digestão anaeróbia (Üstün, 2009).

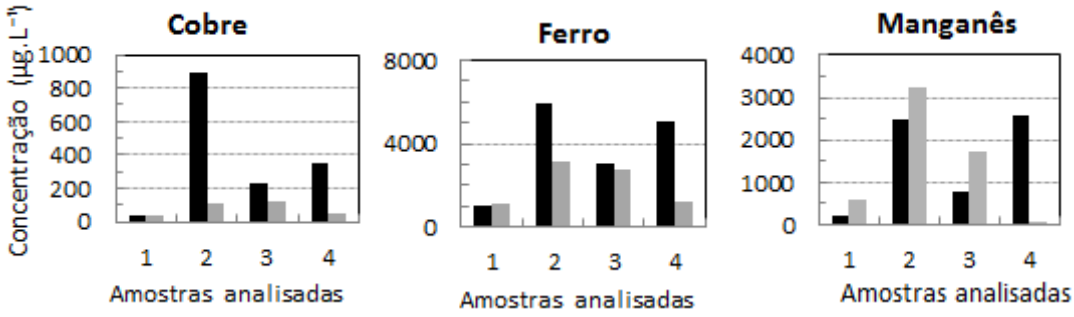


Figura 4: Concentração de entrada (■) e de saída (■) dos metais nas amostras analisadas.

O monitoramento da corrente efluente do reator constatou em 16 amostras valores de concentração total variando entre: i) 15,61 e 124,84 µg.L^{-1} para o cobre e concentração média igual a 60,30 ± 40 µg.L^{-1} ; B) 897,28 e 12725,43 µg.L^{-1} para o ferro e concentração média de 3124,84 ± 3315 µg.L^{-1}; e C) 27,75 e 4259,26 µg.L^{-1} para o manganês e concentração média de 1080,02 ± 1497 µg.L^{-1} (Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2: Tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos para a vinhaça.

	[entrada] (µg.L^{-1})			[saída] (µg.L^{-1})			*PVM* (mLCH$_4$.L^{-1}.d^{-1})	ε (%)
	Cu	Fe	Mn	Cu	Fe	Mn		
Máximo	889,63	5952,93	2554,15	124,84	12725,43	4259,26	333,80	37,47
Média	378,72	3767,68	1512,45	60,30	3124,84	1080,02	135,88	14,46
Mediana	292,02	4078,68	1633,68	45,53	2092,82	176,23	113,29	17,18
Mínimo	41,18	960,44	228,29	15,91	897,28	27,75	9,82	0,00
DP	364,43	2225,19	1191,05	40,03	3315,08	1497,12	114,00	11,92
Amplitude	848,45	4992,50	2325,86	108,93	11828,15	4231,52	323,99	37,47

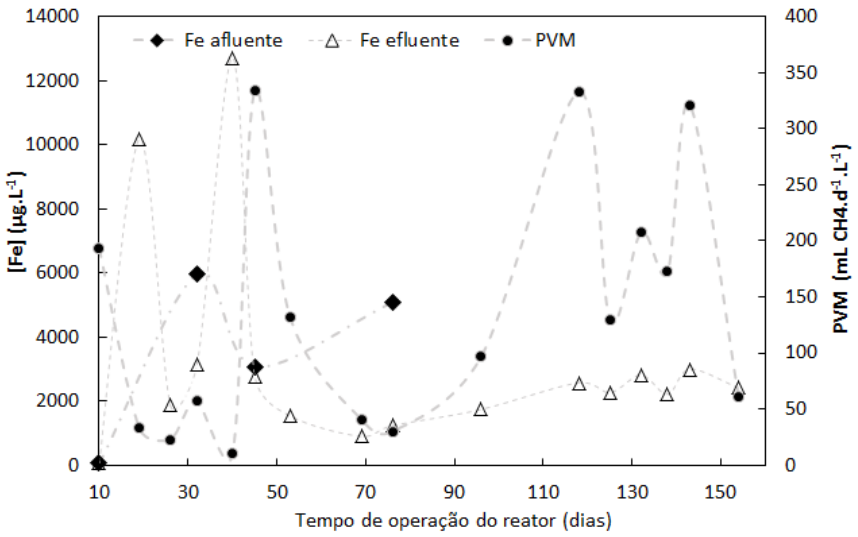


Figura 5: Variação temporal da concentração de ferro e da PVM.

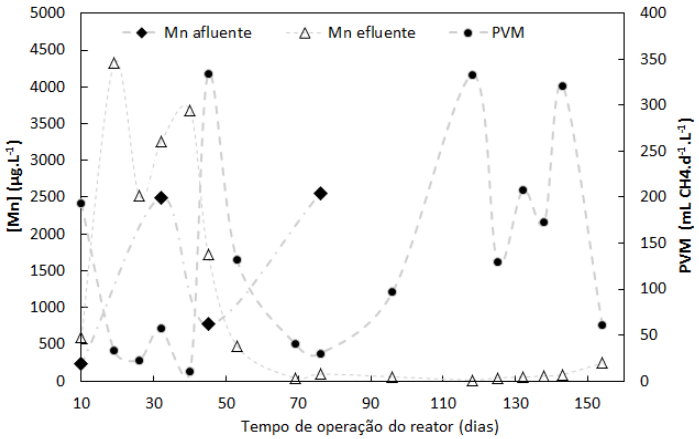


Figura 6: Variação temporal da concentração de manganês e da PVM.

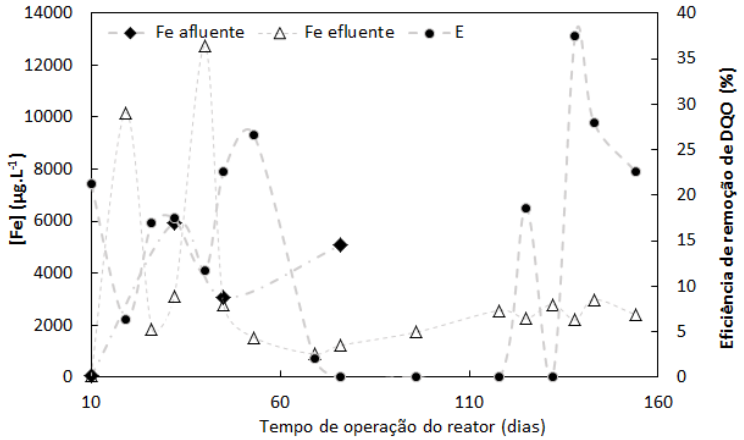


Figura 7: Variação temporal da concentração de ferro e da eficiência de remoção de DQO.

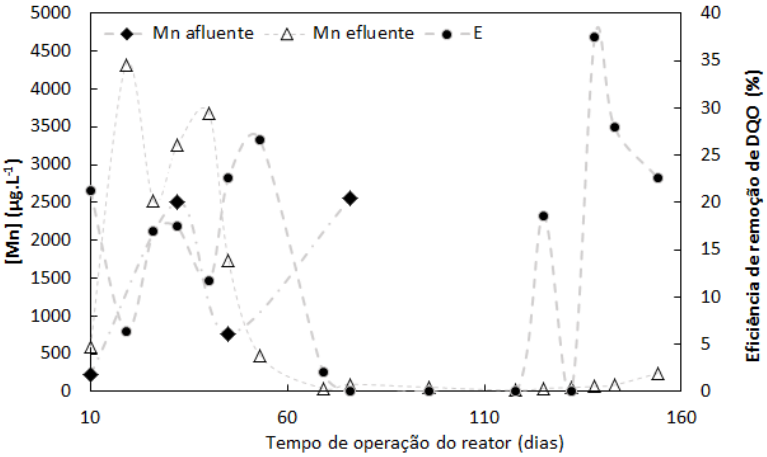


Figura 8: Variação temporal da concentração de manganês e da eficiência de remoção de DQO.

A *PVM* apresentou valor médio igual a 135,88 ± 114 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$, um valor muito baixo quando comparado ao obtido para o biorreator de melaço analisado (Tabela 2, Figuras 5 e 6). A remoção de DQO nas amostras analisadas de vinhaça mostrou-se ineficiente, obtendo o valor máximo de 37,47% (Tabela 2, Figuras 7 e 8). Esse resultado deve-se à condição de operação do reator metanogênico em extrema temperatura (70°C), o que prejudicou a etapa da metanogênese da digestão anaeróbia, na qual ocorre a produção de CH_4, devido ao acúmulo de ácido acético no reator (Niz, 2019).

Conclusões

Diante do que foi exposto, pode-se concluir que as faixas de concentração total de cobre, ferro e manganês presentes nas amostras de melaço analisadas não causaram uma redução no desempenho do biorreator, não exercendo um efeito de inibição na produção de metano ou restringindo a eficiência de remoção de DQO no biorreator. Portanto, para as concentrações dos metais de entrada analisadas para o melaço (cobre 36,78 a 449,38 $\mu g.L^{-1}$, ferro 154,61 a 2160,31 $\mu g.L^{-1}$ e manganês 25,79 a 391,83 $\mu g.L^{-1}$) não foi verificada uma correlação de influência entre as faixas de concentração dos metais e a eficiência de remoção de matéria orgânica e a *PVM*. Para vinhaça as faixas de concentração afluentes avaliadas do cobre, ferro e manganês foram, respectivamente, 41,18 a 889,63 $\mu g.L^{-1}$, 960,44 a 5952,93 $\mu g.L^{-1}$ e 228,29 a 2554,15 $\mu g.L^{-1}$, mas, devido a condição de operação do reator metanogênico com temperatura extrema, juntamente com a complexidade desta água residuária, que possui frações de difícil digestão, não foi possível a verificação do efeito das concentrações dos metais no desempenho do biorreator.

Referências Bibliográficas

Blundi, C.E., Gadêlha, R.F., 2001. Metodologia para determinação de matéria orgânica específica em águas residuárias. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: metodologias, v. 2, Belo Horizonte: FINEP, Cap. 1, p. 9-17.

Costa, M.C.G., Miotti, A.A., Ferreira, T.O., Romero, R.E., 2016. Teor de nutrientes e viabilidade da bananicultura em Cambissolos com diferentes profundidades. Bragantia, vol.75, n.3, Campinas, Maio, p. 335-343.

Detman, A., Chojnacka, A, Błaszczyk, M., Kaźmierczak, W., Piotrowski, J., Sikora, A., 2017. Biohydrogen and Biomethane (Biogas) Production in the Consecutive Stages of Anaerobic Digestion of Molasses. Pol. J. Environ. Stud. 26 (3), 1023-1029.

Dimpe, K.M., Ngila, J.C., Mabuba, N., Nomgongo, P.N., 2014. Evaluation of sample preparation methods for the detection of total metal content using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in wastewater and sludge. Phys. Chem. Earth, 76-78, 42-48.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2017. Árvore do conhecimento, cana-de-açúcar. Disponível em: <https://goo.gl/Jrmypb>. Acesso em 20 out. 2017.

Fermoso, F.G., Bartacek, J., Jansen, S., Lens, P.N.L., 2009. Metal supplementation to USAB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. Sci. Total Environ. 407 (12), 3652–3667.

Fermoso, F.G., Bartacek, J., Chung, C., Lens, P., 2008. Supplementation of cobalt to UASB reactors by pulse dosing: CoCl2 versus CoEDTA2− pulses. Biochem. Eng. J. 42 (2), 111–119.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2012. Qual o valor da vinhaça? Mitigação de impacto ambiental e recuperação de energia por meio da digestão anaeróbica. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, 130 p.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. J. Environ. Manage. 145, 210-229.

Han, W., Bing Wang, B., Zhou, Y., Wang, D., Wang, Y., Yue, L., Li, Y., Ren, N., 2012. Fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. Bioresour. Technol. 110, 219–223.

IEA - Instituto de Economia Agrícola, 2016. Setor sucroenergético do Estado de São Paulo frente à crise econômica. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=14060>. Acesso em 17 out. 2017.

IEA - International Energy Agency, 2016. World Energy Outlook 2016 - Executive Summary. Paris, França. Disponível em: <https://goo.gl/Ctbdpa>. Acesso em 17 out. 2017.

IPCC- Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014. Climate Change 2014 - Synthesis Report. Disponível em: <https://goo.gl/kKXHm4>. Acesso em 16 out. 2017.

Janke, L, Leite, A.F., Nikolausz, M., Schmidt, T., Liebetrau, J., Nelles, M., Stinner, W., 2015. Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing. Inte. J. Mol. Sci. 16, 20685-20703.

Janke, L., Leite, A.F., Batista, K., Silva, W., Nikolausz, M., Nelle, M., Stinner, W., 2016. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. Bioresour. Technol. 217, 10-20.

Krug, F.J., Rocha, F.R.P. (Orgs.), 2016. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. São Paulo: EditSBQ, v. 1, p. 572.

Li, J., Li, B., Zhua, G., Rena, N., Boa, L., Hea, J., 2007. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). Int. J. Hydrogen Energy, 32, 3274 - 3283.

Moraes, B.S., Junqueira, T.L., Pavanello, L.G., Cavallet, O., Mantelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M., 2014. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? Appl. Energy, 113, 825–835.

Mutton, M.A., Rossetto, R., Mutton, M.J.R., 2010. Utilização agrícola da vinhaça. In: Cortez, L.A.B. (Cord.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher: FAPESP, cap. 10.

NASA - National Aeronautics and Space Administration, 2017. Climate Change and Global Warming, Vital Signs of the Planet. EUA. Disponível em: <https://climate.nasa.gov/>. Acesso em 16 out. 2017.

Niz, M.Y.K., 2019. Produção biológica de hidrogênio e metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento), EESC, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 144.

Oliveira, C.A.,2018. Digestão anaeróbia termofílica do melaço de cana-de- açúcar em reatores de leito fixo estruturado de duas fases e fase única para a produção de biogás. 132p. Dissertação (mestrado), EESC, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Pereira, C.C., Souza, A.O., Oreste, E.Q., Vieira, M.A., Ribeiro, A. S., 2018. Evaluation of the use of a reflux system for sample preparation of processed fruit juices and subsequent determination of Cr, Cu, K, Mg, Na, Pb and Zn by atomic spectrometry techniques. Food Chem. 240, 959-964.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D.M.F., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy, 38 (1), 54-62.

Pinheiro, A.C.A., Lisboa, M.T., Ribeiro, A.S., Nunes, A.M., Yamasaki, A., 2014. Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS. Quím. Nova, 37 (1), 6-9.

Pugliano, L.M., Barros, V.G., Duda, R.M., Oliveira, R.A., 2014. Produção de biogás a partir da vinhaça e melaço utilizando reatores UASB. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 6, n.1, p. 49-53.

Rajeshwari, K., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V.N., 2000. State-of-the-art anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. Renew. Sust. Energ. Rev. 4, 135-156.

Silva, C.M.R., Yabuki, L.N.M., Garcia, M.L, 2019. Monitoramento das Concentrações Totais de Cobre, Ferro e Manganês na Digestão Anaeróbia de Melaço. Holos Environment, artigo em fase de edição, p. 19.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2005. 21st ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Thanh, P.M., Ketheesan, B., Yan, Z., Stuckey, D., 2016. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: A review. Biotechnol. Adv. 34, 122-136.

Torquato, S.A., Jesus, K.R.E, 2015. Complementaridade da matriz energética brasileira: o potencial da cana-de-açúcar e seus co-produtos. Embrapa, Meio Ambiente. Disponível em: <https://goo.gl/9JQRgy>. Acesso em 17 out. 2017.

Üstün, G.E., 2009. Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants. J. Hazard. Mater. 172, 833–838.

Valduga, E., Valério, A., Treichel, H., Di Luccio, M., 2007. Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. Quím. Nova, 30 (8), 1860-1866.

Von Sperling, M., 2005. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA, Universidade Federal de Minas Gerais. v. 1, 3. ed.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass Bioenergy, 19 (2), 63-102.

Zandvoort, M. H.; van Hullebusch, E. D.; Fermoso, F. G.; Lens, P. N. L. 2006. Trace Metals in Anaerobic Granular Sludge Reactors: Bioavailability and Dosing Strategies. Eng. Life Sci. 6 (3), 293–301.

Zhang, C. 2007. Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis, Wiley & Sons, New Jersey.

IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE TRANSFORMAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E CIPROFLOXACINA EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO ESTRUTURADO

Rodrigo B. Carneiro[1]; Tanare C. R. Ferreira[2]; Carolina A. Sabatini[3]; Guilherme M. Titato[4]; Álvaro J. dos Santos Neto[4]; Marcelo Zaiat[5]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Doutora em Química Analítica e Inorgânica pelo IQSC/USP;
[3] Técnica do Laboratório de Processos Biológicos da EESC/USP;
[4] Técnico do Laboratório de Cromatografia do IQSC/USP;
[4] Professor do Departamento de Química e Física Molecular do IQSC/USP;
[5] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Neste trabalho buscou-se identificar os produtos de transformação (TPs) dos antibióticos Sulfametoxazol (SMX) e Ciprofloxacina (CIP) em reator anaeróbio de leito fixo estruturado (ASBR) alimentado com esgoto lab-made e concentração de SMX e CIP de 400 ng.L^{-1}. Inicialmente, foram realizados ensaios em batelada com biomassa metanogênica aplicando alta concentração dos fármacos (5 mg.L^{-1} de SMX e CIP) para possível identificação das massas dos metabólitos formados a partir da comparação com controle (sem biomassa). Com as transições de massas desses TPs propostos, foi realizado o monitoramento das amostras ao longo do perfil espacial do ASBR. A análise das amostras foi feita por SPE-LC-ESI-MS/MS, sendo utilizados detectores de massa QqToF e QTrap para as amostras do ensaio em batelada e reator contínuo, respectivamente. Os seguintes TPs foram identificados: m/z 256 ($C_{10}H_{14}N_3O_3S$) e m/z 270 ($C_{10}H_{12}N_3O_4S$) para SMX; m/z 161 ($C_9H_6NO_2^-$), m/z 276 ($C_{14}H_{12}FN_2O_3^-$) e m/z 316 ($C_{17}H_{18}FN_3O_2$) para CIP. As estruturas moleculares propostas para esses TPs a partir de SMX indicaram alterações no anel isoxazol e estabilidade do anel anilina. Já para a CIP, foi evidenciado alterações no anel piperazina, no grupo ciclopropil e carboxílico, e quebra da ligação C - F.*

Introdução

Para se entender o destino dos fármacos em uma estação de tratamento de esgotos (ETE) deve-se avaliar os principais mecanismos de remoção atuantes, que por sua vez são definidos pelas propriedades físico-químicas dos microcontaminantes, pela configuração dos sistemas de tratamento, pelas condições ambientais e pelos parâmetros operacionais das unidades de tratamento (Aquino et al., 2013). Os principais mecanismos envolvidos na remoção de fármacos nas ETEs compreendem a sorção e a degradação microbiana (Carballa et al., 2005; Li and Zhang, 2010), sendo que, para grande parte dos estudos reportados, a biotransformação tem-se mostrado de maior relevância na remoção dos micropoluentes orgânicos, como os antibióticos (Achermann et al., 2018; Oliveira et al., 2016).

Ao serem parcialmente degradados nas ETEs os compostos farmacêuticos geram produtos de degradação que podem se tornar moléculas mais ou menos tóxicas do que os compostos originais (De Witte et al., 2011; Majewsky et al., 2014). Os estudos recentes a respeito dos produtos de degradação dos antibióticos estão mais focados em processos oxidativos avançados e fotólise, sendo a concentração inicial empregada da ordem de mg.L^{-1}, o que geralmente não reflete os níveis encontrados nas matrizes ambientais. Estudos acerca das rotas metabólicas de biotransformação de antibióticos se mostra incipiente (Alvarino et al., 2016) e há poucos estudos considerando as concentrações ambientalmente relevantes desses fármacos em sistemas anaeróbios.

Por se apresentaram em concentrações traço nos diversos compartimentos ambientais (de $ng.L^{-1}$ a $\mu g.L^{-1}$), a identificação dos TPs constitui um grande desafio analítico. Devido à complexidade da matriz do esgoto, contendo diversos compostos orgânicos do metabolismo microbiano, são requeridas técnicas altamente eficientes de preparo de amostra, com altos fatores de concentração, acopladas a métodos analíticos de alta seletividade e sensibilidade. A maioria das estratégias de identificação de metabólitos a partir da biotransformação de antibióticos tem-se baseado na cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (e.g., ToF, Orbitrap, QToF and LTQ-Orbitrap) (Bletsou et al., 2015).

Diante deste contexto, o presente estudo buscou identificar os produtos de transformação dos antibióticos SMX e CIP em reator anaeróbio de leito estruturado tratando efluente sintético simulando esgoto doméstico.

Material e Métodos

Ensaios em batelada

Como um teste preliminar foram conduzidos ensaios em batelada para avaliação dos produtos intermediários da degradação anaeróbia de SMX e CIP em alta concentração, facilitando a detecção dos produtos de transformação. Para esse ensaio foi utilizado biomassa imobilizada em espuma de poliuretano adaptada em reator anaeróbio sem aplicação de antibiótico no substrato de alimentação (meio adaptado conforme Lima Gomes et al. (2015) - descrito a seguir). Ao atingir condições estáveis de operação (> 80% remoção de DQO), as espumas com biomassa imobilizada foram sacadas do reator e transferidas para frascos Duran de 500 mL. Adicionou-se em cada frasco solução contendo o meio adaptado com os antibióticos na concentração de 5 $mg.L^{-1}$. Um frasco com biomassa inativada (NaN_3 20 $g.L^{-1}$ por 24 h) foi utilizado para cada antibiótico a fim de avaliar a sorção dos fármacos na biomassa. Também foi feito um frasco controle sem antibiótico e também um controle abiótico sem a biomassa para cada fármaco. A fim de permitir que o meio ficasse totalmente anaeróbio foi aplicado um fluxo de N_2 em cada frasco durante 20 minutos. Então, os frascos foram tampados e colocados sob agitação ao abrigo da luz em shaker a 125 rpm.

Para o sulfametoxazol foi avaliado os produtos de degradação após 72 h, enquanto que para a ciprofloxacina, as amostras foram retiradas após, 24, 48 e 72 h. As amostras ao final do ensaio foram centrifugadas para separação da fase líquida e filtradas em 0,22 µm. A biomassa aderida na espuma foi retirada por meio de lavagem com água destilada e agitação com pérolas de vidro em tubo falcon. Parte da biomassa foi utilizada para o cálculo do teor de sólidos e parte foi armazenada em freezer para posterior extração com solventes e análise de antibióticos. A fase líquida passou primeiramente por um preparo de amostra por meio de extração em fase sólida (SPE) utilizando solventes acetonitrila e metanol, para então ser analisada no sistema LC/MS-MS (QToF) no Laboratório de Cromatografia do IQSC (CROMA). Através destes experimentos foi possível identificar as massas dos possíveis produtos intermediários da biodegradação anaeróbia dos antibióticos SMX e CIP, juntamente com suas transições de massa.

Reator contínuo

Para a identificação dos metabólitos de SMX e CIP nas concentrações ambientalmente relevantes (em torno de 400 $ng.L^{-1}$ conforme Lima Gomes et al. (2015)) foi empregado um reator anaeróbio de leito fixo estruturado (ASBR) em escala de bancada, utilizando espuma de poliuretano como material suporte - Figura 1. A espuma foi cortada em tiras prismática de 1 cm de aresta e 35 cm de comprimento. O reator foi confeccionado em acrílico com diâmetro interno de 8 cm, altura do leito reacional de 30 cm e um volume total útil de 2,69 L, considerando o volume na base cônica e no cabeçote do reator. O reator foi inoculado com lodo granular proveniente de um reator UASB em operação tratando água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dacar S.A.), localizado na cidade de Tietê/SP. O teor de sólidos voláteis totais do

inóculo foi de 26,5 gSTV.L^{-1}. O procedimento de inoculação seguiu a metodologia proposta por Zaiat et al. (1994). A alimentação do reator foi realizada continuamente e em fluxo ascendente através de bomba peristáltica (Gilson MINIPULS® 3), aplicando como substrato meio sintético (descrito a seguir) simulando esgoto sanitário. O reator foi mantido em câmara mesofílica sob temperatura controlada em 30ºC. O TDH aplicado foi de 4 h.

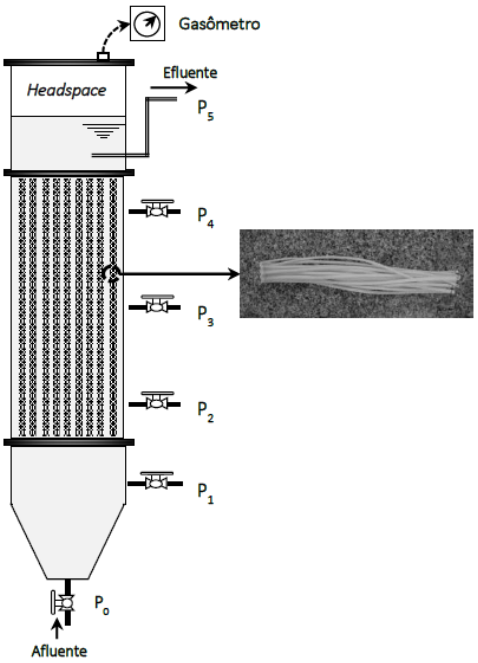


Figura 1: Desenho esquemático do ASBR

Com as transições de massa identificadas no ensaio em batelada será possível monitorar a presença dos metabólitos nas amostras ao longo do perfil espacial do reator. Para esse experimento será utilizado preparação de amostra por SPE e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas LC/MS-MS (QTRAP) no Laboratório de Processos Biológicos (LPB). As amostras resultantes desses ensaios ainda não foram processadas e serão analisadas posteriormente.

Descrição da água residuária sintética

O substrato sintético simulou a fração solúvel do esgoto sanitário, com 50% de proteína (extrato de carne), 40% de carboidratos (20% de sacarose, 60% de amido e 20% de celulose) e 10% de lipídeo (óleo de soja emulsionado com solução detergente). A composição do meio sintético foi adaptada de Lima Gomes et al. (2015) e compreende (em mg.L^{-1}): sacarose (43); amido (135); celulose (42.5); extrato de carne (219); óleo de soja (31); $NaHCO_3$ (300); KH_2PO_4 (15); NaCl (250); $CaCl_2.2H_2O$ (7); $MgCl_2.6H_2O$ (4.5); tensoativo – alquibenzeno sulfonado (15).

Resultados e Discussão

Ensaios em batelada

Através da comparação com as amostras controle (sem biomassa), foi possível identificar três TPs para SMX e três para CIP, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1: Produtos de Transformação identificados por LC–QTOF (ESI (+) MS) para SMX e CIP nos ensaios em batelada

Composto original	Produto de Transformação Fórmula Molecular proposta	m/z [M+H]
SMX	$C_{10}H_{12}N_3O_3S^+$	254,0585
SMX	$C_{10}H_{14}N_3O_3S^+$	256,0747
SMX	$C_{10}H_{12}N_3O_4S^+$	270,0940
CIP	$C_9H_6NO_2^-$	161,1100
CIP	$C_{14}H_{12}FN_2O_3^-$	276,1735
CIP	$C_{17}H_{18}FN_3O_2$	316,2154

As Figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, os cromatogramas com os íons extraídos do composto no tempo inicial e para cada subproduto de SMX identificado após 72 h, e os espectros de MS/MS realizados para confirmar as estruturas propostas para cada produto de degradação detectado. Todos os produtos identificados oriundos da biodegradação do sulfametoxazol apresentaram mudanças no anel isoxazole e não foram observadas mudanças no anel anilina.

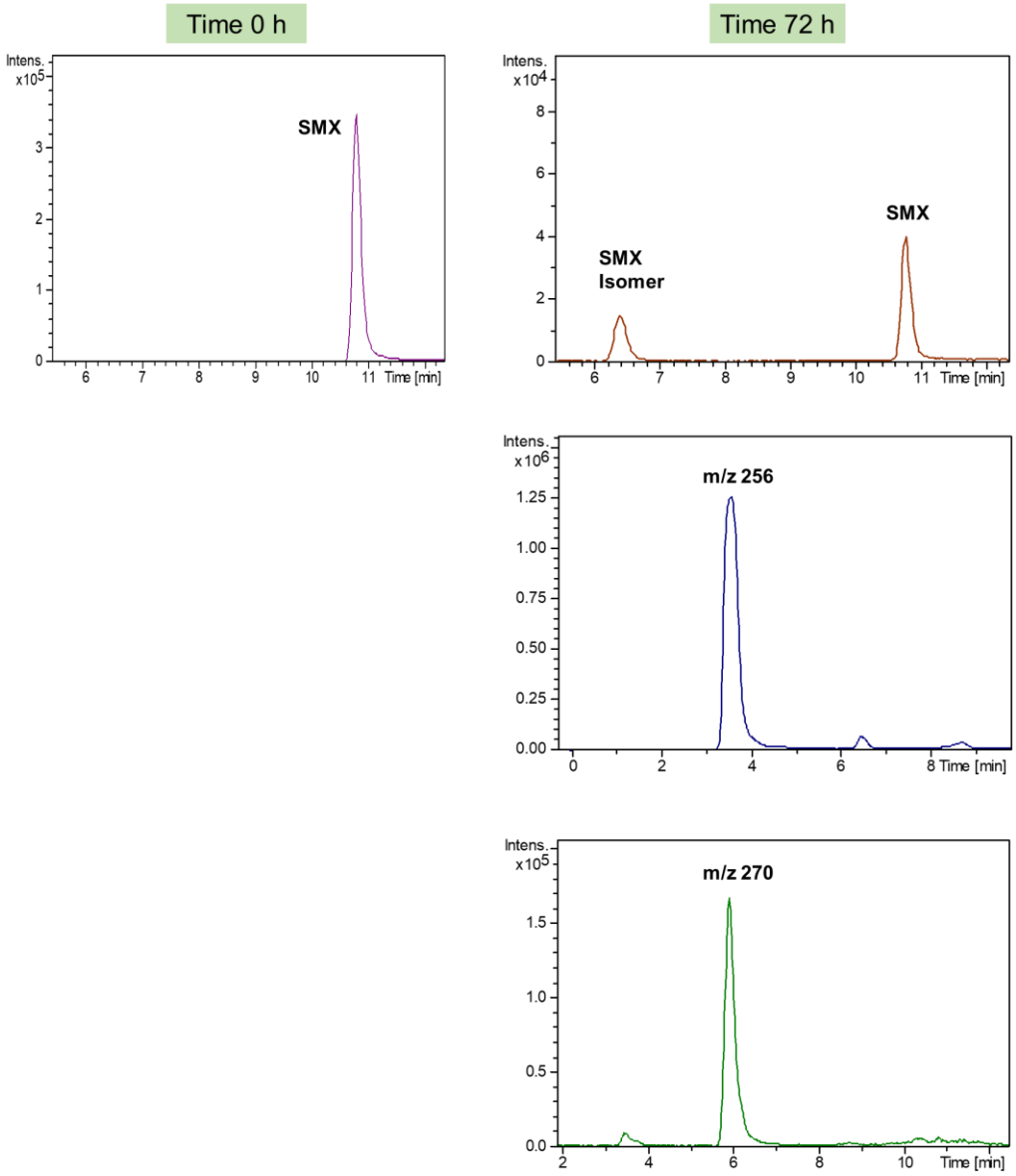


Figura 2: Cromatograma (íon extraído) dos intermediários *m/z* 254, 256 e 270 obtidos a partir de análises realizadas por LC–QTOF (ESI (+) MS). Biodegradação do sulfametoxazol após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio.

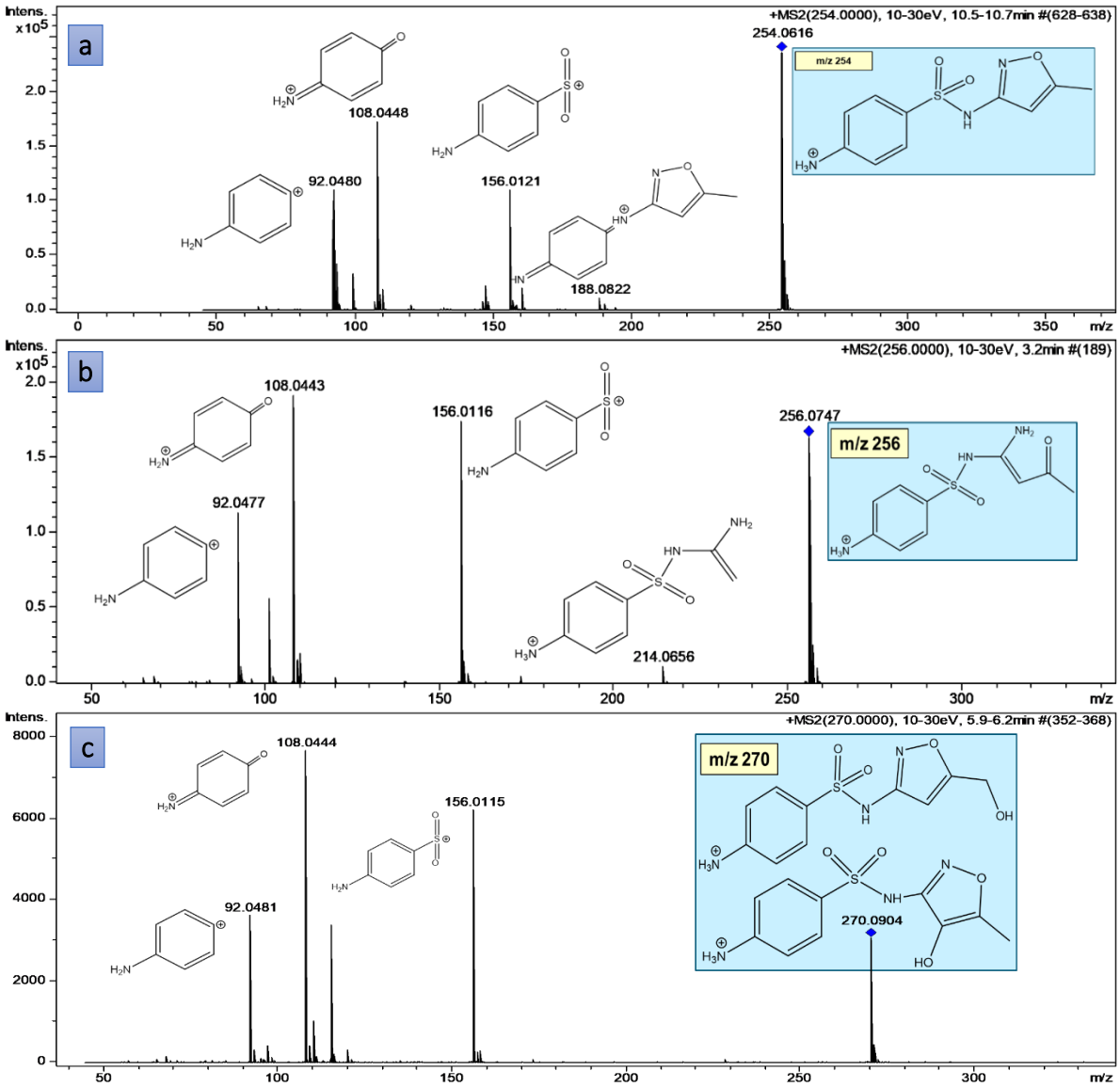


Figura 3: Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) após 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura dos intermediários de *m/z* 254 (a), *m/z* 256 (b) e *m/z* 270 (c).

As Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, os cromatogramas com os íons extraídos do composto no tempo inicial e para cada subproduto de CIP identificados após 24, 48 e 72 h, e os espectros de MS/MS realizados para confirmar as estruturas propostas para cada produto de degradação detectado. Os produtos identificados mostraram clivagem no anel piperazina (m/z 161, 276), no grupo ciclopropil e na ligação C-F (m/z 161). Já o produto de m/z 316 mostrou quebra no grupo carboxílico.

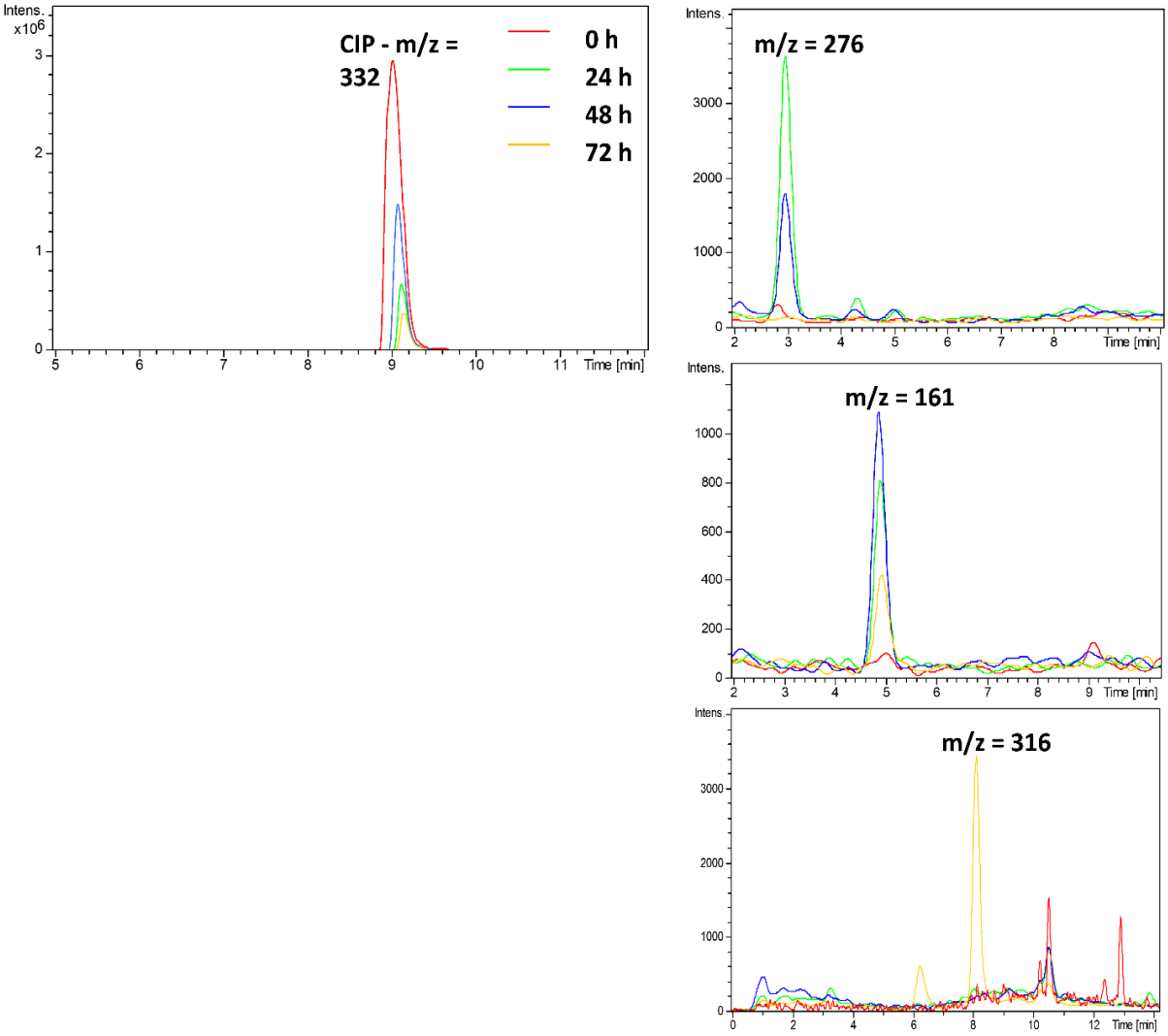


Figura 4: Cromatograma (íon extraído) dos intermediários *m/z* 276, 161 e 316 obtidos a partir de análises realizadas por LC–QTOF (ESI (+) MS). Biodegradação de CIP após 24, 48 e 72 horas de exposição ao reator anaeróbio.

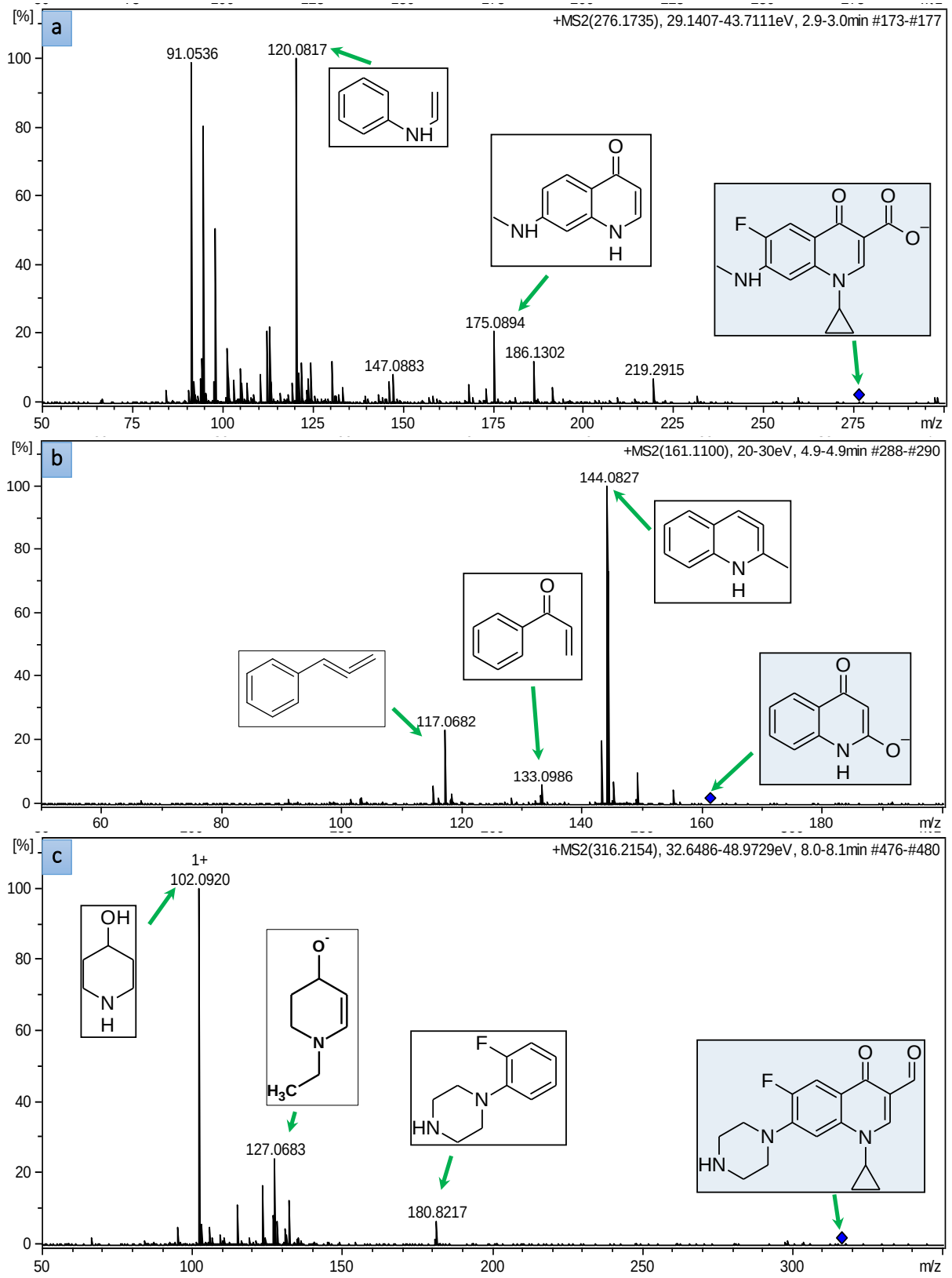


Figura 5: Espectros de massas obtidos a partir de análises realizadas por LC–QqToF (ESI (+) MS/MS) após 24, 48 e 72 horas de exposição ao reator anaeróbio para identificação da estrutura dos intermediários de *m/z* 276 (a), *m/z* 161 (b) e *m/z* 316 (c).

Conclusões

O reator de leito fixo estruturado com espuma de poliuretano como material suporte representa uma alternativa potencial ao tratamento de águas residuárias domésticas e que

apresentem fármacos em sua composição, notadamente antibióticos das classes sulfonamida e fluoroquinolona. Através deste estudo foi possível evidenciar que a remoção de SMX e CIP no reator foi devida a sua biotransformação, sendo possível a identificação de alguns produtos de transformação ainda não reportados na literatura. A aplicação de LC-MS/MS de alta resolução de massa (QTOF) foi essencial para a elucidação dos produtos de transformação. Todos os produtos identificados oriundos da biodegradação do sulfametoxazol apresentaram mudanças no anel isoxazol e não foram observadas mudanças no anel anilina. Já para a ciprofloxacina, os produtos de transformação identificados apresentaram alteração no anel piperazina, no grupo ciclopropil e carboxílico, e quebra na ligação C-F. São necessários estudos posteriores a respeito do impacto desses metabólitos gerados a partir da biodegradação dos antibióticos SMX e CIP sobre o meio ambiente e à saúde humana.

Referências

Achermann, S., Bianco, V., Mansfeldt, C.B., Vogler, B., Kolvenbach, B.A., Corvini, P.F.X., Fenner, K., 2018. Biotransformation of Sulfonamide Antibiotics in Activated Sludge: The Formation of Pterin-Conjugates Leads to Sustained Risk. Environ. Sci. Technol. 52, 6265–6274. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06716

Alvarino, T., Nastold, P., Suarez, S., Omil, F., Corvini, P.F.X., Bouju, H., 2016. Role of biotransformation, sorption and mineralization of 14C-labelled sulfamethoxazole under different redox conditions. Sci. Total Environ. 542, 706–715. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.140

Aquino, S.F., Brandt, E.M.F., Chernicharo, C.A.D.L., 2013. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto : revisão da literatura. Eng. Sanit. e Ambient. 18, 187–204.

Bletsou, A.A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., Thomaidis, N.S., 2015. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. TrAC - Trends Anal. Chem. 66, 32–44. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.009

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2005. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. Water Res. 39, 4790–4796. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.018

De Witte, B., Van Langenhove, H., Demeestere, K., Dewulf, J., 2011. Advanced oxidation of pharmaceuticals: Chemical analysis and biological assessment of degradation products. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 41, 215–242. https://doi.org/10.1080/10643380902728698

Li, B., Zhang, T., 2010. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. Environ. Sci. Technol. 44, 3468–3473. https://doi.org/10.1021/es903490h

Lima Gomes, P.C.F., Tomita, I.N., Santos-Neto, Á.J., Zaiat, M., 2015. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 407, 8787–8801. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9038-y

Majewsky, M., Horn, H., Yargeau, V., Wagner, D., Bräse, S., Delay, M., 2014. Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para Position. Chem. Res. Toxicol. 27, 1821–1828. https://doi.org/10.1021/tx500267x

Oliveira, G.H.D., Santos-Neto, A.J., Zaiat, M., 2016. Evaluation of sulfamethazine sorption and biodegradation by anaerobic granular sludge using batch experiments. Bioprocess Biosyst. Eng. 39, 115–124. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1495-3

Zaiat, M., Cabral, A.K.A.., Foresti, E., 1994. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Para Tratamento de Águas Residuárias: Concepção e Avaliação Preliminar de Desempenho. Rev. Bras. Eng. QUÍMICA 11, 33–42.

SISTEMAS MBBR EM ESCALA PILOTO OPERADOS EM BATELADAS SEQUENCIAIS PARA REMOÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA E NITROGÊNIO DE ESGOTO SANITÁRIO: IMPACTO DO MATERIAL SUPORTE NA ESTABILIDADE DO SISTEMA E NA GERAÇÃO DE LODO

Jamille Sandes de Carvalho [1]; Letícia de Aquino Bagatta [2]; Valéria Del Nery [3]; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic [4]

[1] Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento – EESC/USP;
[2] Aluna de Iniciação Científica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Pós-doutoranda do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[4] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Foram comparados os desempenhos de três reatores operados em batelada sequencial, inoculados com lodo aeróbio com potencial nitrificante: um contendo meio suporte Mutag Biochip, um cintendo Biobob® e um com biomassa livre. Os três reatores apresentaram desempenho similar na remoção de DQO para tempo de ciclo de 6 horas, com eficiências de remoção média de até 90% e remoção de nitrogênio de 20 a 30%. Foi possível reduzir o TDH para 4 horas nos reatores com biomassa imobilizada, enquanto o reator com biomassa livre foi ao colapso. Nessa condição, as eficiências médias de remoção de DQO foram de 84% (Mutag Biochip) e 90% (Biobob®), e as eficiências de remoção de nitrogênio foram de 25% para ambos os reatores. A redução do período de aeração de 3 para 2 horas para os reatores com biomassa imobilizada, visando disponibilizar doadores de elétrons para a desnitrificação, não foi efetiva. O reator contendo Biobob®, em que a eficiência dos processos foi creditada à biomassa aderida, apresentou menor desvio dos dados de eficiência de remoção em relação à média, mostrando-se mais adequado ao tratamento de esgoto sanitário visando à remoção de matéria orgânica e nitrogênio.*

Introdução

Os sistemas aerados são opções para o nível secundário de tratamento de efluentes, quando se deseja elevada qualidade do efluente, com respeito à remoção de matéria orgânica e nitrogênio. Isso é conseguido com o custo de maior mecanização e consumo de energia, associado à elevada produção de lodo (Metcalf; Eddy, 2003).

A produção de lodo no tratamento de esgotos é intrínseca aos processos biológicos, de modo que o método para sua disposição final deve ser contemplado na concepção do sistema.

A imobilização de biomassa pode ser adotada em sistemas de lodos ativados, aumentando o tempo de retenção celular dos microrganismos e, consequentemente, a eficiência de remoção de matéria orgânica do processo (Huang et al., 2017). A imobilização da biomassa também contribui para a formação de biofilmes com capacidade de nitrificação e desnitrificação, em que o gradiente de oxigênio ocorre ao longo da profundidade do biofilme. Essa estratificação favorece a atividade das bactérias nitrificantes, que utilizam o oxigênio em seus processos de conversão, bem como das bactérias desnitrificantes, presentes em camadas internas do biofilme, que convertem nitrato a nitrogênio gasoso em ambiente anóxico (Münch; Lant; Keller, 1996; Zhao et al., 2017).

O processo MBBR – Moving Bed Biofilm Reactors tem como objetivo reunir as principais vantagens dos processos de lodos ativados e reatores com biofilmes. Assim, o MBBR utiliza todo o volume do reator para crescimento de biomassa e não requer recirculação do lodo, o que é conseguido, com a utilização de suportes móveis, inertes e com elevada área superficial para retenção da biomassa (Ødegaard, 2006).

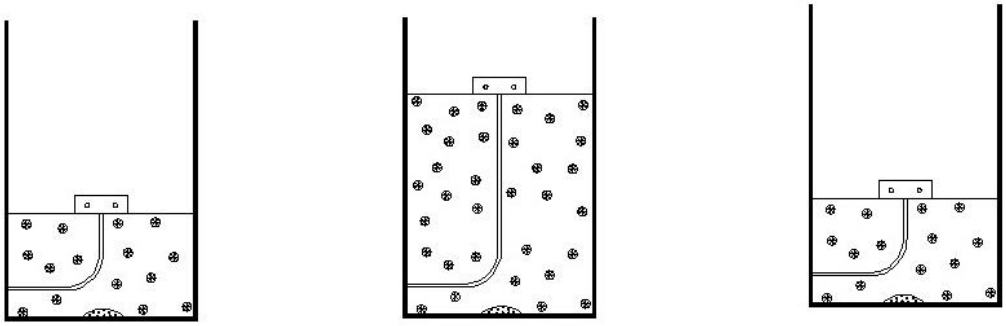
Neste contexto, o presente trabalho avaliará a remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário, bem como a produção de lodo em 3 reatores com alimentação

em batelada. Um deles apresentou biomassa livre e os outros 2 foram operados como MBBR, utilizando diferentes meios para adesão da biomassa. Os meios suportes utilizados foram Kaldnes e Biobob®), uma vez que o primeiro é utilizado usualmente nesse tipo de tecnologia, e o segundo é uma nova proposta que apresenta uma configuração favorável aos objetivos a serem alcançados.

Material e Métodos

Instalações experimentais

O experimento foi executado utilizando em reatores plásticos cilíndricos, cada um com volume total de 202 litros, cujas dimensões são: 54 cm de diâmetro e 85 cm de altura. O volume útil será de 120 L, garantindo borda livre de 52 cm. Os reatores foram alimentados em regime de bateladas sequencias. A Figura 1 ilustra as etapas de funcionamento do sistema.



Etapa de alimentação | Etapa de aeração | Etapa de sedimentação e descarga

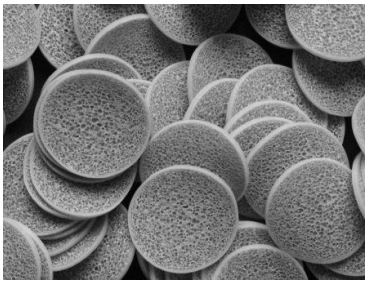
Figura 1: Etapas de funcionamento do sistema.

Os tanques foram ligados a um sistema de aeração intermitente, composto por um soprador, e dois difusores de ar tipo disco, com 32 cm de diâmetro. No soprador, foram conectadas três tubulações: uma para cada reator e uma para esgotamento da vazão de ar excedente. As tubulações ligadas aos reatores foram conectadas a válvulas de gaveta, para que houvesse o controle da quantidade de ar que está sendo fornecida. O ar entrava no difusor por meio da conexão roscada de ¾'' e era lançado no meio líquido através de perfurações existentes na membrana, ocasionando o surgimento de microbolhas.

A água residuária adotada foi o esgoto doméstico coletado dos bairros próximos à Área 2 da Universidade de São Paulo – Campus São Carlos. Este era coletado da rede pública e conduzido da caixa de alimentação aos reatores através de uma mangueira plástica e, quando tratado, era retirado por um vertedor composto por um Cap de PVC de 150 mm com 8 furos de 1'' de diâmetro, uma boia para manter o Cap no nível da água e uma mangueira corrugada ligada ao fundo do Cap, de onde saía o efluente. Essa mangueira foi conectada a um tubo de PVC, acoplando, numa extremidade, uma válvula de gaveta e uma automática ao sistema.

Meios suportes

Os meios suportes utilizados foram o Biobob® e Mutag Biochip (Figura 2) e a Tabela 1 mostra algumas de suas características físicas.



(a) (b)

Figura 2: Os materiais suportes (a) Biobob® e (b)Mutag Biochip.

Tabela 1: Características dos meios suportes.

	Mutag Biochip	Biobob®
Material	Polietileno	Polipropileno e poliuretano
Diâmetro (mm)	30	45
Área Superficial ($m^2.m^{-3}$)	5.500	270.000

Fases experimentais

Os reatores foram inoculados com 120 L de biomassa suspensa e os reatores R1 e R2 com 30 L dos suportes estudados, ou seja, Mutag Biochip e Biobob, respectivamente. O R3 permaneceu apenas com biomassa suspensa (Tabela 2).

Tabela 2: Conteúdo dos reatores.

Reator	Conteúdo
R1	Mutag Biochip
R2	Biobob®
R3	Biomassa suspensa

Na Fase 1, os reatores foram submetidos a ciclos operacionais de 6 horas, em que a fase de enchimento era de 30 minutos, a de reação (aeração) de 240 minutos, a sedimentação de 1h e 40 min e a de descarte de 20 minutos.

Na Fase 2, o ciclo de 6 horas foi dividido em 30 minutos de enchimento, 180 minutos de reação (aeração), sedimentação de 1 hora e 40 minutos e descarte de 20 minutos.

Na Fase 3, o tempo de ciclo foi de 4 horas, sendo 30 minutos de alimentação com aeração, 1 hora e 30 minutos de apenas aeração, 1 hora e 40 minutos de decantação e 20 minutos de descarte do efluente tratado.

A Tabela 3 mostra as características das fases operacionais da pesquisa.

Tabela 3: Características das fases operacionais.

Fase operacional	Reatores	Duração das operações durante os ciclos (h)				
		Enchimento	Aeração	Sedimentação	Descarte	Ciclo
1	R1, R2, R3	0,5	4	1,7	0,3	6
2	R1, R2, R3	0,5	3	1,7	0,3	6
3	R2, R3	0,5	2	1,7	0,3	4

Análises laboratoriais

Amostras de material em suspensão foram coletadas para que fosse feita a série de sólidos, verificando a produção de lodo livre em cada reator. As amostras foram coletadas após 3 horas de aeração do ciclo, para que houvesse regime de mistura completa no reator e

suas características fossem iguais em todos os pontos do tanque, nas fases 1 e 2. Na Fase 3, com menor período de aeração, as amostras foram coletadas no fim das 2 horas.

Amostras de material suporte foram coletadas nas fases, ao longo do período experimental. As amostras de biofilme foram extraídas por maceramento e compressão do suporte Biobob®. No caso do Mutag Biochip, foram feitas análises de ST apenas, por diferença de massa do suporte com biomassa aderida e do suporte "limpo". Para diminuir o erro relativo à diferença de massa entre cada suporte, coletaram-se 10 unidades do suporte com biomassa e a mesma quantidade do suporte in natura.

Foram realizadas análises de NTK, N-amoniacal, N-nitrito e N-nitrato para verificar a ocorrência dos processos envolvidos na remoção de nitrogênio. Alcalinidade, pH e DQO também foram monitorados.

A Tabela 4 apresenta os métodos utilizados na determinação dos parâmetros analisados.

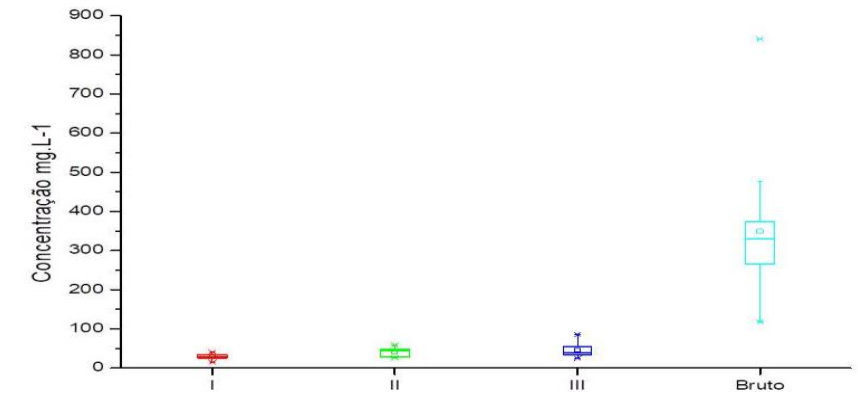
Tabela 4: Análises físico-químicas realizadas e suas respectivas metodologias.

Parâmetro	Método
pH	Potenciométrico (APHA, 2005)
Oxigênio Dissolvido ($mg.L^{-1}$)	Luminescência (Modelo LDO 1100 HACH)
ST ($mg.L^{-1}$)	Gravimétrico (APHA, 2005)
STV ($mg.L^{-1}$)	Gravimétrico (APHA, 2005)
NTK ($mg.L^{-1}$)	Kjedahl (APHA, 2005)
$N\text{-}NH_4^+$ ($mg.L^{-1}$)	Espectrofotométrico (APHA, 2005)
$N\text{-}NO^{-2}$ ($mg.L^{-1}$)	Espectrofotométrico (APHA, 2005)
$N\text{-}NO^{-3}$ ($mg.L^{-1}$)	UV (APHA, 2005)
Alcalinidade (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	Titulométrico (Dilallo e Albertson, 1961 modificado por Ripley et al., 1986)
DQO ($mg.L^{-1}$)	Espectrofotométrico (APHA, 2005)

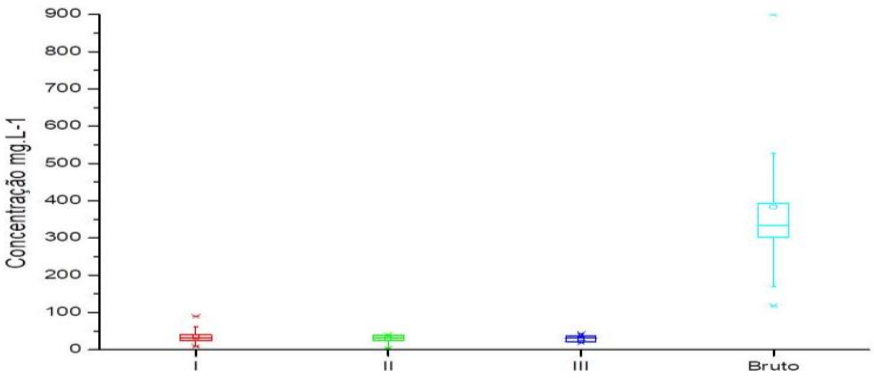
Resultados Parciais e Discussão

A fase experimental teve duração de 214 dias, dividida em três fases em função dos ciclos operacionais.

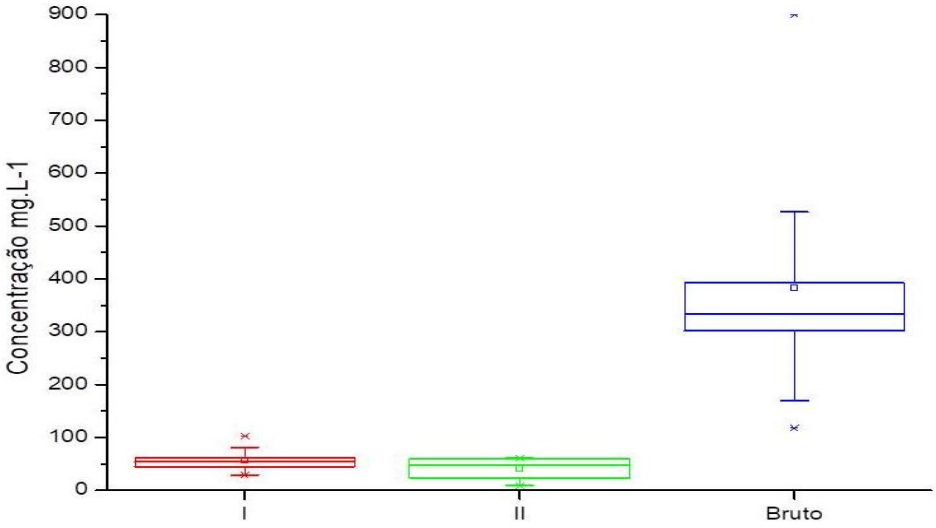
Os resultados do desempenho dos reatores com respeito à remoção de matéria orgânica, como DQO, estão apresentados na Figura 3. Destaca-se que para avaliação da DQO dos reatores foi considerada a fração solúvel, e para o esgoto bruto foi quantificada a DQO total.



(a)



(b)



(c)

Figura 3: Concentração de DQO nas fases I, II e III e no esgoto bruto em (a)R1; (b) em R2; (c) em R3.

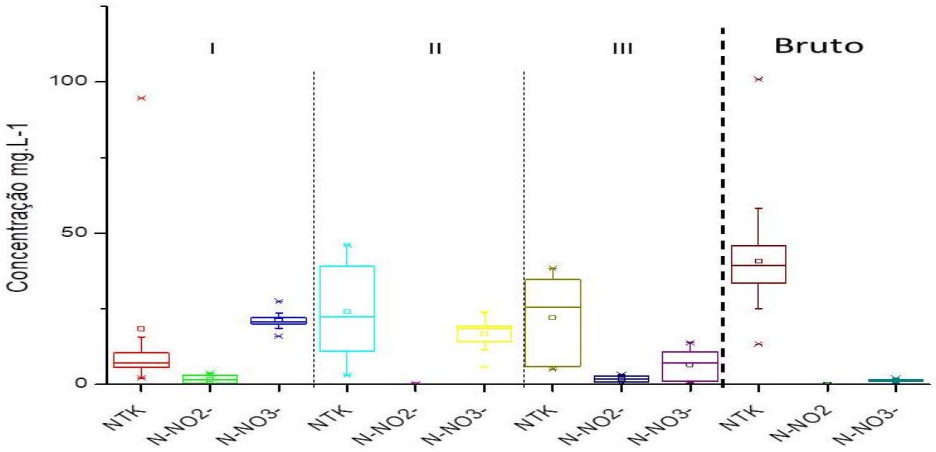
O reator R1 apresentou eficiências de remoção de DQO entre 80 e 90%, sob período aerado de 4 horas (Fase 1), mantendo o desempenho com a redução para 3h (Fase 2) e para fases 2h (Fase 3).

O desempenho dos reatores foi comparado em função da qualidade final do efluente, uma vez que a variação na concentração afluente foi reduzida durante o período de operação do reator R3. Observou-se que os três reatores apresentaram qualidades similares do efluente no que diz respeito ao efluente filtrado, indicando que o processo de remoção de matéria orgânica foi adequado, mesmo sem a utilização de material suporte (Figura 3a,b,c).

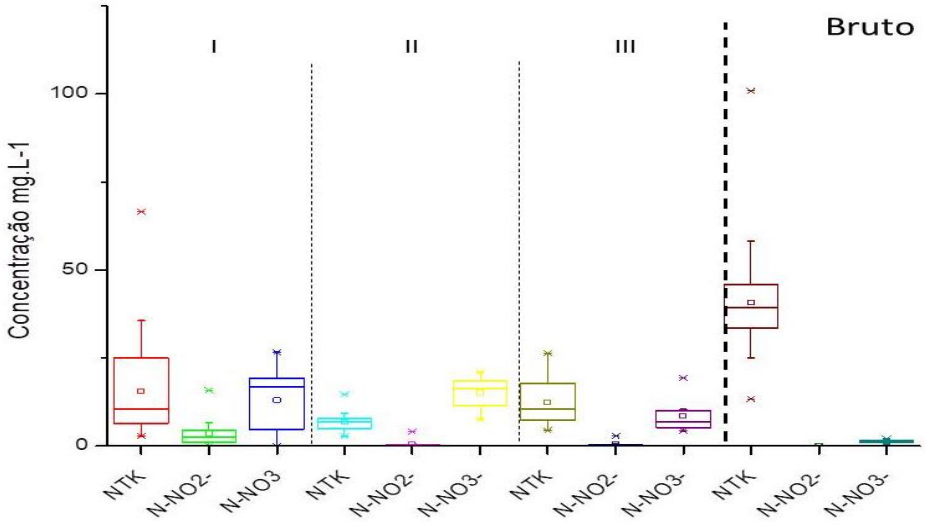
Na Fase 1, observou-se maior conversão do NTK no reator R1, assim como maior estabilidade com respeito aos compostos nitrogenados formados, indicando a capacidade do

sistema em oxidar o nitrogênio amoniacal (Figura 4a,b,c). No entanto, em R3 (Figura 4c), ocorreu menor conversão de nitrogênio, que permaneceu como NTK, mostrando que a biomassa suspensa teve mais dificuldade de estabelecer a nitrificação do que a biomassa aderida. Em R1 e R2 (Figura 4a,b), observou-se que a nitrificação foi estabelecida, entretanto houve acúmulo de N-nitrato em ambos os reatores.

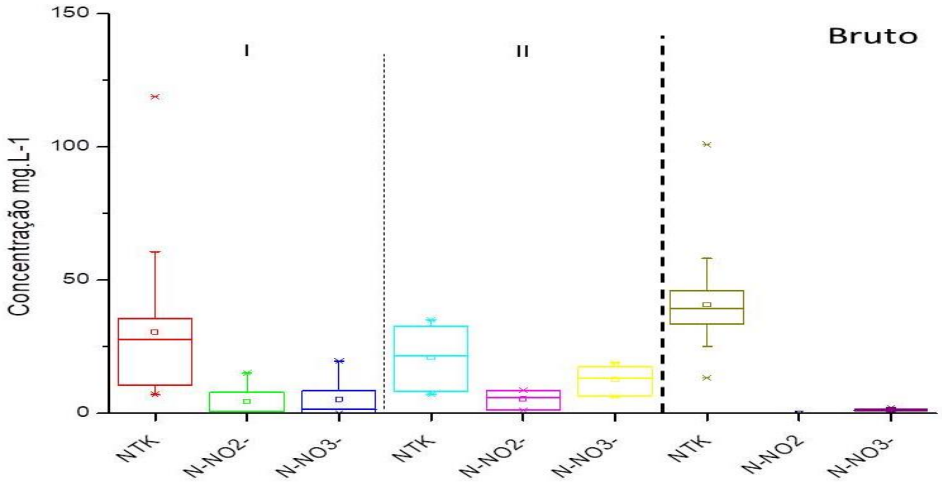
Na Fase 2, com redução do período aerado, observou-se em R1 e R3 maior acúmulo de NKT em relação à Fase 1, enquanto em R2 observou-se maior eficiência média de remoção de N (Figura 5) e menor variabilidade da qualidade do efluente com respeito às espécies nitrogenadas presentes no efluente. A redução da aeração na Fase 3, evidenciou que R2 manteve o desempenho de remoção de N próximo a 30% (Figura 5), entretanto, a nitrificação foi afetada, em relação à Fase 2, em função da redução do período de aeração (Figura 4b). Como a remoção global foi mantida, a redução do período de aeração foi considerada positiva em função do menor consumo de energia. Destaca-se que o R2 apresentou menos variabilidade das espécies nitrogenadas e da eficiência de remoção dessas em relação aos outros reatores.



(a)



(b)



(c)

Figura 4: Espécies nitrogenadas nas fases I, II e III e no esgoto bruto: (a) R1; (b) R2; e fases I e II e no esgoto bruto (c) R3.

O Reator 1 apresentou eficiência média de remoção de N-total entre 20 e 30% nas 3 fases. A maior eficiência obtida na Fase 2, em que o tempo de aeração era de 3 horas, pode ser devido à uma maior ocorrência de desnitrificação, quando comparada às outras fases. O R2 também apresentou eficiência média em torno de 30%, mas com uma variância mais baixa do que a observada em R1, evidenciando a maior estabilidade no reator contendo Biobob®, sendo a Fase 1 aquela com melhores resultados para esse meio suporte.

A redução do período de aeração na Fase 3, com o intuito de manter residuais de matéria orgânica para atuarem como doadores de elétrons para desnitrificação, não forneceu os resultados esperados. Em ambos os reatores, a eficiência média de remoção de N-total foi de 25% (Figura 5), pode-se concluir que tanto a nitrificação quanto a desnitrificação foram limitantes para a remoção de N, uma vez que foi observado acúmulo das espécies oxidadas de nitrogênio. A hipótese da escassez de doadores de elétrons pode ser confirmada.

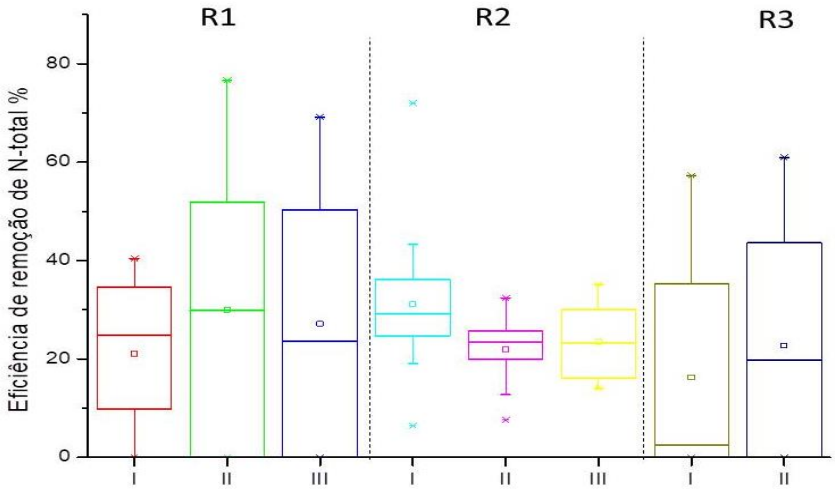


Figura 5: Eficiência de remoção de N-total em R1, R2 e R3 nas fases de operação.

O reator R1 apresentou maior concentração de sólidos em suspensão no líquido de mistura do que R2 (Figura 6a,b), o que pode ser explicado pela menor área superficial do primeiro para aderência dos microrganismos. De acordo com os resultados apresentados nas **Erro! Fonte de referência não encontrada.** 6b e 7b, o reator R2, contendo Biobob®, apresentou melhor desempenho com respeito à retenção de sólidos, em que a maior parte da biomassa ativa encontrava-se imobilizada.

O reator R3 apresentou baixa concentração de SSV no meio líquido, o que pode ter acontecido devido à perda de sólidos no efluente tratado. Observam-se alguns episódios de grandes perdas de sólidos (Figura 7c), de modo que o reator se manteve com baixas concentrações de SSV ao longo de sua operação.

Na Fase 3, as concentrações de SSV foram menores do que na Fase 2 nos reatores R1 e R2, embora as eficiências médias de remoção de DQO e N-total tenham sido mantidas. R1 ainda apresentou valores maiores no efluente do que R2 em todas as análises, devido à capacidade do suporte de R2 em reter mais biomassa.

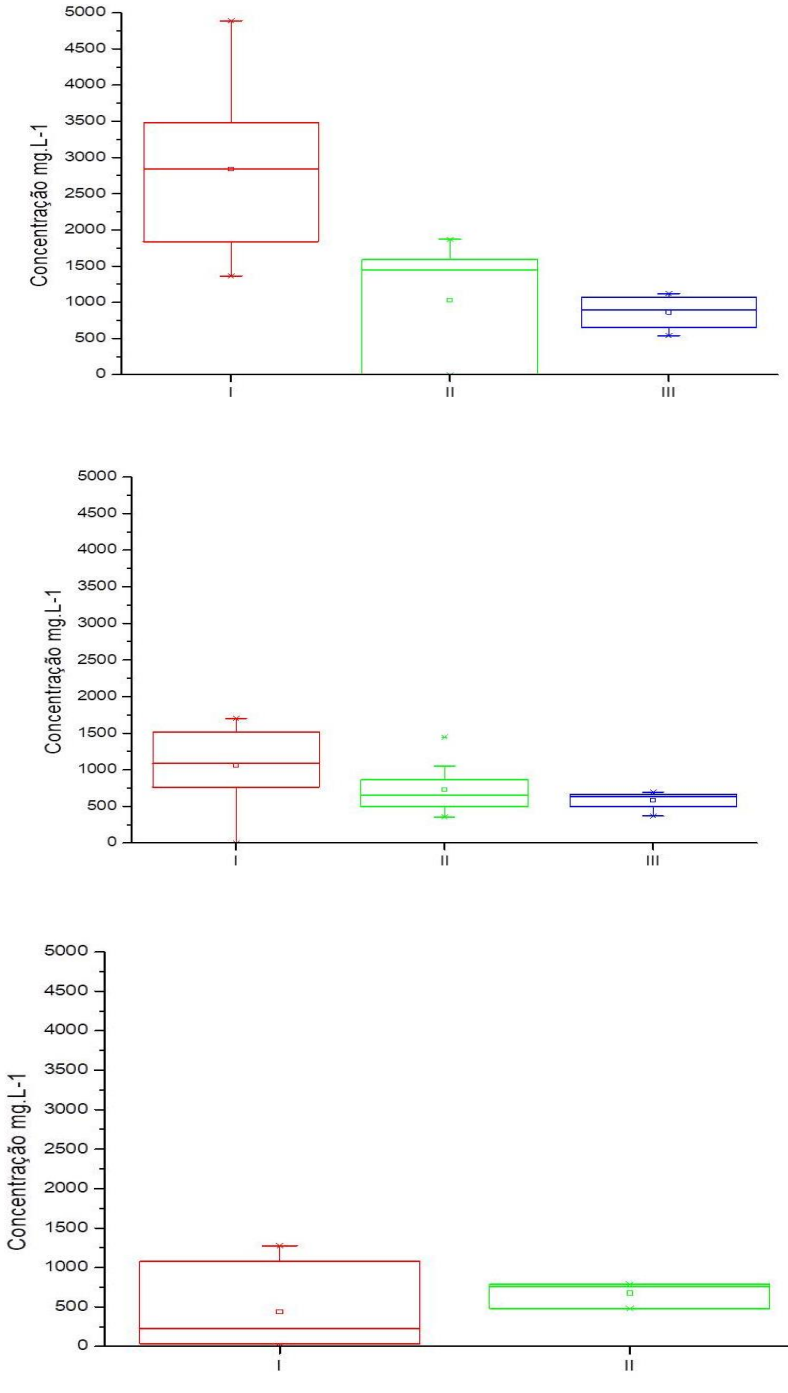
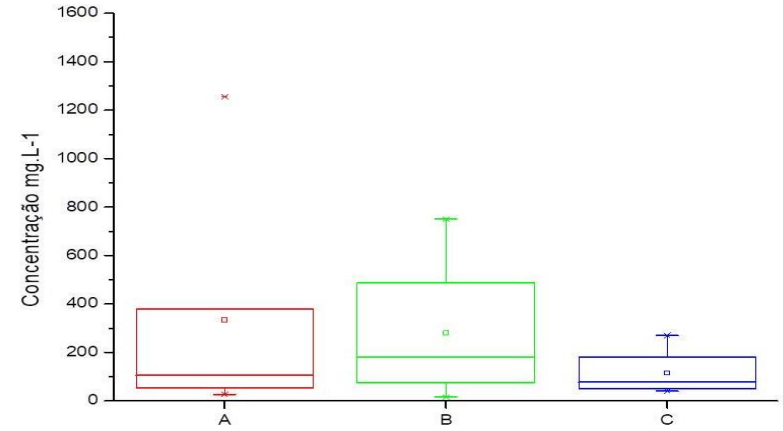
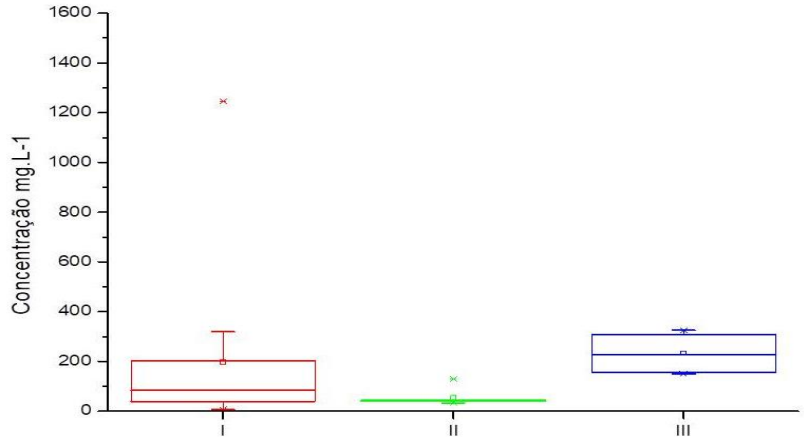


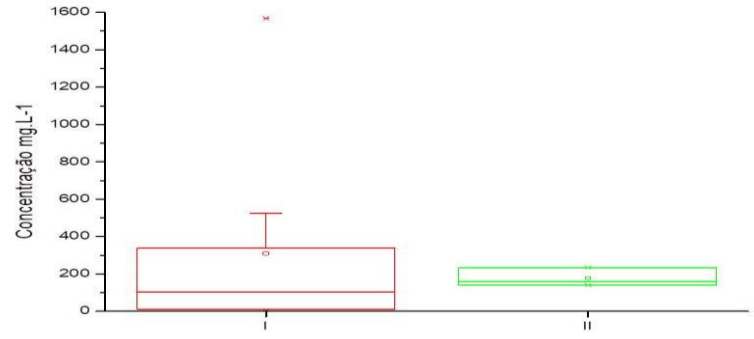
Figura 6: Concentração de sólidos (SSV) no líquido de mistura durante a aeração: (a) R1; (b) R2; (c) R3.



(a)



(b)



(c)

Figura 7: Concentração de SSV no efluente tratado: (a) R1; (b) R2; (c) R3.

Conclusões Parciais

A remoção de matéria orgânica nos 3 reatores foi semelhante. A remoção de matéria nitrogenada em R2, com Biobob®, apesar de ser semelhante aos outros reatores em termos de eficiência média, mostrou-se menos variável, de modo que a biomassa aderida a esse meio suporte se mostrou mais estável, o que é desejável para implantação do sistema de tratamento de esgoto.

A desnitrificação não foi adequada em nenhuma das fases estudadas, possivelmente em função da baixa disponibilidade de doador de elétrons. A estratégia de redução do período de aeração não favoreceu esse processo, indicando da matéria orgânica preferencialmente pela via heterotrófica.

Referências Bibliográficas

Andreoli, C. V.; Von Sperling, M.; Fernandes, F. Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. 2. ed. Belo Horizonte – MG.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 2005.21. Ed. Washington: American Public Health Association.

Dilallo, R.; Albertson, O. E., 1961. Volatile acids by direct titration. J. Water Pollut. Control Fed. 33. 356-365.

Huang, C., Shi, Y., Xue, J., Zhang, Y., El-din, M.G., Liu, Y., 2017. Comparison of biomass from integrated fixed-film activated sludge (IFAS), moving bed biofilm reactor (MBBR) and membrane bioreactor (MBR) treating recalcitrant organics : Importance of attached biomass. J. Hazard. Mater. 326, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.12.015

Münch, E. V., Lant, P., Keller, J., 1996. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. Water Res. 30, 277–284. https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00174-3

Ødegaard, H., 2006. Innovations in wastewater treatment : the moving bed biofilm process 17–33. https://doi.org/10.2166/wst.2006.284

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. J. Water Pollut. Control Fed. 58, 406–411.

Zhao, J., Feng, L., Yang, G., Dai, J., Mu, J., 2017. Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. Bioresour. Technol. 243, 800–809. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.127

APLICAÇÃO DA DIET NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE VINHAÇA: PRODUÇÃO DE ENERGIA E AMPLIAÇÃO DO CONCEITO DE BIORREFINARIA ALIADA À CADEIA PRODUTIVA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Willame de Araújo Cavalcante [1]; Marcelo Zaiat [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental;
[2] Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental da EESC/USP.

Resumo. *A vinhaça de cana-de-açúcar é um resíduo líquido oriundo da produção de bioetanol. No Brasil, a vinhaça é disposta nas lavouras de cana-de-açúcar (fertirrigação) como forma de recuperação de nutrientes. Porém, a fertirrigação pode trazer sérios problemas de contaminação do solo e da água, devendo ser substituída por um método de disposição mais adequado. O aproveitamento energético da vinhaça via produção de metano (CH_4) desperta grande interesse biotecnológico como proposta de mitigação ambiental. O aumento do rendimento da produção de CH_4 em reatores anaeróbios de alta taxa alimentados com vinhaça representa um dos maiores desafios para a ampliação desse bioprocesso. Estudos recentes revelaram que em sistemas sintrófico avançados de transferência direta de elétrons interespécie (DIET) a produtividade de CH_4 chega a valores superiores a 50% do convencional. O uso de sistemas bioeletroquímicos (BES) do tipo eletrometanogênico aliados ao DIET garante maior otimização. Portanto, o objetivo desse projeto de pesquisa é investigar as potencialidades de sistemas sintróficos avançados no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores batelada para: descrever modelo cinéticos e termodinâmicos, investigar a eficiência de remoção de matéria orgânica em BES adaptados com DIET e definir parâmetros de operação para o dimensionamento de reatores contínuos eletrometanogênicos.*

Introdução

A vinhaça proveniente da destilação alcoólica do fermentado de caldo de cana e/ou melaço é um resíduo que contém concentração elevada de matéria orgânica, de 20 a 90 $gDQO.L^{-1}$ (España-Gamboa et al., 2011), além de ferro, nitrogênio, fósforo, sulfato e outros compostos (Wilkie; Riedesel; Owens, 2000). Estima-se que a cada litro de etanol produzido, gera-se de 10 a 15 L de vinhaça (van Haandel, 2005). No Brasil, a disposição de vinhaça nas lavouras de cana-de-açúcar (fertirrigação) representa risco de contaminação do solo e da água (Fuess; Garcia, 2014). Por outro lado, a possibilidade de revalorizar a vinhaça a partir da produção de CH_4 tem impulsionado uma série de estudos em reatores metanogênicos de alta taxa (Ferraz Júnior et al., 2016; Fuess et al., 2017).

Atualmente, tem-se desenvolvido estudos sobre os mecanismos sintróficos avançados como estratégia biotecnológica para aumentar a velocidade de conversão de substratos orgânicos em CH_4 (Zhao et al., 2015; Shen et al., 2016; Lovley, 2017). O mecanismo sintrófico avançado de transferência direta de elétrons interespécies (DIET) cria condições termodinâmicas e metabólicas favoráveis dentro de sistemas anaeróbios, permitindo aumentar a produtividade volumétrica de metano em valores superiores a 50%, quando comparado a sistema tradicional metanogênico (Feng et al., 2017). Na DIET, os elétrons são transferidos de um organismo doador para um outro organismo receptor por meio de ligações elétricas biológicas (Rotaru et al., 2014) ou por meio de condutores abióticos (meio suporte) como:

carvão ativado, magnetita, grafite dentre outros (Park et al., 2018). Estudos mostraram que a adição de biocarvão (*biochar*) e magnetita aumentam as taxas de produção de CH_4 em 1,15 e 1,33 vezes a partir da oxidação de ácido propanoico e ácido *n*-butírico em reator batelada (Cruz-Viggi et al., 2014; Zhao et al., 2016). Do ponto de vista metabólico, a DIET representa maior vantagem em relação ao sintrofismo natural, pois não precisa de etapas enzimáticas complexas para produzir, consumir e difundir mediadores redox (BAEK et al., 2018)

A DIET pode ser combinada a sistemas bioeletroquímicos (BES) como forma de potencializar a eletrometanogênese. Nesse caso, o bioeletrodo polarizado intermedeia a transferência de elétrons para a produção de CH_4 entre bactérias de fermentação exoeletrogênicas e arqueias metanogênicas eletrotróficas (Cheng et al., 2009). Segundo Lovley, (2017), os estudos sobre os mecanismos sintróficos avançados estão ainda em fase de descoberta e necessitam de maiores contribuições para possibilitar a aplicação deles em processes de engenharia. Em vista disso, esta proposta de pesquisa visa ampliar estratégias para a produção de CH_4 via aplicação do mecanismo sintrófico DIET aliado a sistemas eletrometanogênicos no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Para a segurança no desenvolvimento dessa pesquisa, os experimentos serão conduzidos, inicialmente, em reatores batelada com intuito de definir variáveis cinéticas e termodinâmicas para o dimensionamento de reatores contínuos operados com o mecanismo DIET para a produção de CH_4 a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Designer dos reatores em batelada

Os ensaios de atividade anaeróbia para produção de CH_4 serão conduzidos em unidades hermeticamente fechadas com volume operacional de 0,250 L. Os ensaios serão conduzidos em triplicata e serão divididos em três grupos de experimentos: controle metanogênico (G1), metanogênico-DIET (G2) e eletrometanogênico (G3).

- G1: Reator metanogênico confeccionado com leito estruturado em material não condutor.
- G2: Reator metanogênico-DIET confeccionado com leito estruturado em carvão ativado e/ou magnetita.
- G3: Reator eletrometanogênico confeccionado com câmara catódica e câmara anódica, separadas por membrana catiônica (Nafion 117; DuPont Co., Wilmington, DE, USA). Como biocátodo será usado material a base de grafite e como bioânodo material a base de carvão ativado. Será utilizado eletrodo de referência de Ag/AgCl (*electrodes*, 3M KCl - Sigma-Aldrich). Será aplicado um potencial de trabalho no biocátodo variando de -0,5 a -0,8 V (*vs* EHP).

Todos os testes em batelada serão conduzidos em temperatura de 35 ± 2 °C, pH de 6,8 e agitação constante em 120 rpm. Para manter restritas condições anaeróbias será necessário a expurga do oxigênio a partir da injeção de gás composto de nitrogênio ou argônio.

Inóculo e alimentação

Todos os reatores batelada serão inoculados com lodo metanogênico oriundo de cervejaria (admitindo concentrações de biomassa entre 5 e 10 $gSV.L^{-1}$). Lodo de cervejaria é o mais indicado para *start-up* de sistemas anaeróbios metanogênicos com desenvolvimento de DIET (Shrestha et al., 2014). Para atender às hipóteses dessa pesquisa, os ensaios G1, G2 e G3 ocorrerão simultaneamente, mantendo a concentração de DQO estabelecida para cada condição

de alimentação. Serão avaliados duas fases de operação: 1) com substrato sintético composto por ácido acético (HAc), ácido lático (HLa), ácido propiônico (HPr) e ácido bútirico (HBu), mantendo uma proporção de DQO próxima à encontrada em efluentes de reatores acidogênicos alimentados com vinhaça e; 2) com vinhaça de cana-de-açúcar diluída em água (Figura 1).

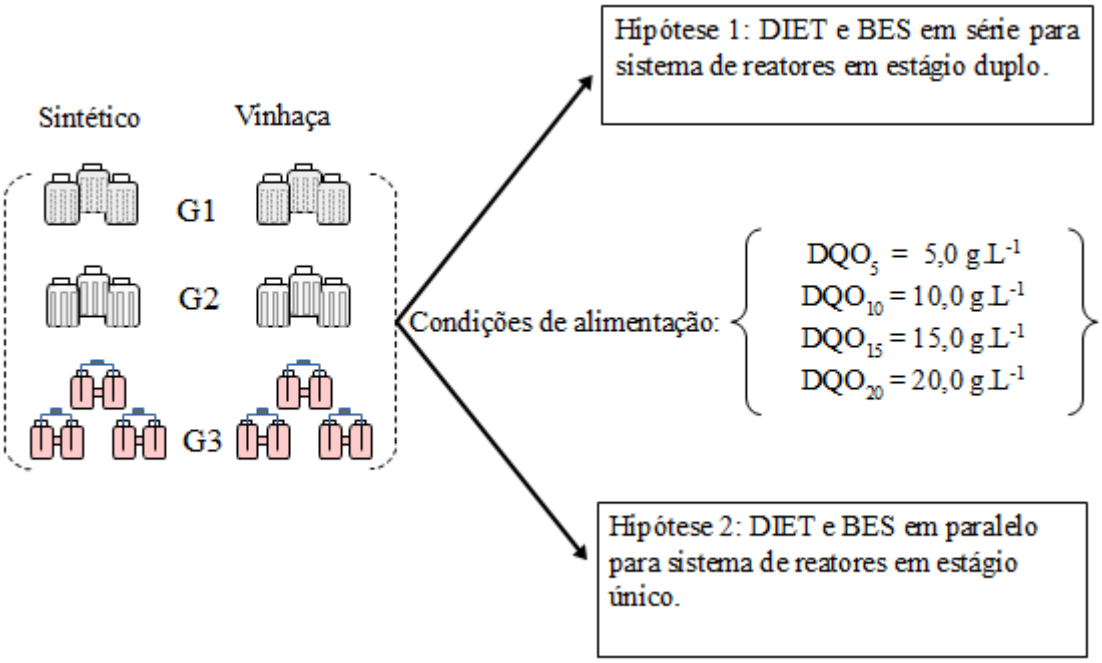


Figura 1: Esquema dos ensaios em batelada com efluente sintético e com vinhaça sob diferentes concentrações de DQO para responder as hipóteses propostas nesta pesquisa.

Monitoramento

Os sistemas biológicos serão monitorados a partir da determinações de: DQO, alcalinidade, pH, condutividade elétrica, temperatura, compostos nitrogenados (nitrito, nitrato e amônia), fósforo inorgânico (ortofosfato), enxofre (sulfato e sulfetos) proteínas, sólidos suspensos fixos (SSF), voláteis (SSV) e totais (SST) (Eaton et al., 2005). A produção de metabólitos na fase líquida será monitorada pela retirada de amostras do líquido para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O biogás produzido será quantificado e analisado por cromatografia gasosa (CG) para determinação da concentração de CH_4, CO_2, H_2 e H_2S. Será realizado análise microbiológica como etapa de identificação das espécies majoritárias no processo sintrófico avançado.

Modelagem matemática

Será desenvolvido modelo matemático a partir da estrutura proposta em *Anaerobic Digestion Model* No.1 (ADM1) (Batstone et al., 2002). Diversas modificações serão necessárias para adequar as descrições dos processos bioelétricos apresentados nessa proposta de pesquisa. Dentre elas, a descrição das limitações cinéticas e termodinâmicas (Kleerebezem; Loosdrecht,

2010), e da variação da estequiometria das reações (Rodriguez et al. 2006). O modelo será implementado na plataforma de simulação AQUASIM (Reichert, 1994).

Resultados esperados

Espera-se com os ensaios em reatores batelada:

- Adquirir informações suficientes para a determinação de variáveis operacionais para o dimensionamento de sistemas contínuos de produção de CH_4 a partir de vinhaça.
- Determinar quais as potencialidades e condições ideais para explorar o mecanismo sintrófico avançado DIET ou DIET acoplado a um sistema bioeletroquímicos no tratamento da vinhaça.
- Determinar a cinética dos diferentes processos sintróficos (DIET/ou com H_2), por meio da modelagem matemática.
- Definir a configuração dos reatores contínuos eletrometanogênicos.
- Determinar a eficiência de remoção de matéria orgânica em BES adaptados com DIET comparado a sistema metanogênico tradicional.

Referências Bibliográficas

Baek, G.; Kim, J.; Kim, J.; Lee, C., 2018. Role and potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. Energies, v. 11, n. 1.

Batstone, D. J; Keller J.; Angelidaki, I.; Kalyuzhyni, S. V; Pavlovstathis, S. G; Rozzi, A.; Sanders, W. T .M; Siegrist, H.; Vavilin, V.A., 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1. IWA Scientific and Tehnical Report, London: IWA Publishing, n. 13, 55p.

Cheng, S.; Xing, D.; Call, D. F.; Logan, B. E., 2009. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. Environ. Sci. Technol, v. 43, n. 10, p. 3953–3958.

Cruz-Viggi, C.; Rossetti, S.; Fazi, S.; Paiano, P.; Majone, M.; Aulenta, F., 2014. Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. Environ. Sci. Technol, v. 48, n. 13, p. 7536–7543.

Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., Greenberg, A. E., & Franson, M. A. H., 2005. PHA: standard methods for the examination of water and wastewater. In: Centennial Edition., APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Centennial ed.

España-Gamboa, E.; Mijangos-Cortes, J.; Barahona-Perez, L.; Dominguez-Maldonado, J.; Hernández-Zarate, G.; Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and treatments. Waste Manag. Res: the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA, v. 29, n. 12, p. 1235–50.

Feng, Q.; Song, Y. C.; Yoo, K.; Kuppanan, N.; Subudhi, S.; LAL, B., 2017. Bioelectrochemical enhancement of direct interspecies electron transfer in upflow anaerobic reactor with effluent recirculation for acidic distillery wastewater. Bioresour. Technol, v. 241, p. 171–180.

Ferraz Júnior, A. D.; Koyama, M. H.; De Araújo Júnior, M. M.; Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. Renew. Energy, v. 89, p. 245–252.

Fuess, L. T.; Garcia, M. L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. J. Environ. Manage, v. 145C, p. 210–229.

Fuess, L. T.; Kiyuna, L. S. M.; Ferraz, A. D. N.; Persinoti, G. F.; Squina, F. M.; Garcia, M. L.; Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-

bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. Appl. Energy, v. 189, p. 480–491.

Kleerebezem, R.; van Loosdrecht, M. C. M., 2006. Critical analysis of some concepts proposed in ADM1. Water Sci. Technol, v.54, p.51-57.

Lovley, D. R., 2017. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer. Annu. Rev. Microbiol, v. 71, n. 1, p. annurev-micro-030117-020420.

Park, J. H.; Kang, H. J.; Park, K. H.; Park, H. D., 2018. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications. Bioresour. Technol, v. 254, p. 300–311.

Reichert, P., 1994. Aquasim – A tool for simulation and data analysis of aquatic systems. Water Sci. Technol, v. 30, p. 21-30.

Rodriguez J.; Lema, J.; van Loosdrecht, M. C. M.; Kleerebezem, R., 2006. Variable stoichiometry with thermodynamic control in ADM1. Water Sci. Technol, v. 54, p. 101-110.

Rotaru, A.-E.; Shrestha, P. M.; LIU, F.; Shrestha, M.; Shrestha, D.; Embree, M.; Zengler, K.; Wardman, C.; Nevin, K. P.; Lovley, D. R., 2014. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. Energy. Environ. Sci, v. 7, n. 1, p. 408.

Shen, L.; Zhao, Q.; Wu, X.; Li, X.; iI, Q.; Wang, Y., 2016. Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors. Renew. Sustain. Energy Rev, v. 54, n. 2016, p. 1358–1367.

Shrestha, P. M.; Malvankar, N. S.; Werner, J. J.; Franks, A. E.; Elena-Rotaru, A.; Shrestha, M.; Liu, F.; Nevin, K. P.; Angenent, L. T.; Lovley, D. R., 2014. Correlation between microbial community and granule conductivity in anaerobic bioreactors for brewery wastewater treatment. Bioresour. Technol, v. 174, p. 306–310.

van Haandel, A. C., 2005. Integrated energy production and reduction of the environmental impact at alcohol distillery plants. Water Sci. Technol, v. 52, n. 1–2, p. 49–58.

Wilkie, A. C.; Riedesel, K. J.; Owens, J. M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass and Bioenergy, v. 19, n. 2, p. 63–102.

Zhao, Z.; Zhang, Y.; Wang, L.; Quan, X., 2015. Potential for direct interspecies electron transfer in an electric-anaerobic system to increase methane production from sludge digestion. Sci. rep, v. 5, n. p. 11094.

Zhao, Z.; Zhang, Y.; Quan, X.; Zhao, H., 2016. Evaluation on direct interspecies electron transfer in anaerobic sludge digestion of microbial electrolysis cell. Bioresour. Technol, v. 200, n. 2016, p. 235–244.

DESENVOLVIMENTO E CALIBRAÇÃO DE MODELO BASEADO NO ADM1 APLICADO AO PROCESSAMENTO DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REATOR BATELADA ACIDOGÊNICO

Pâmela T. Couto [1]; Felipe E. Sanchez [2]; Ingmar Nopens [3]; Marcelo Zaiat [4]; Wouter Naessens [5]; Rogers Ribeiro [6]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental da EESC/USP.
[2] Pós doutorando do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.
[3] Professor do Departamento de Modelagem Matemática, Estatística e Bioinformática, da Universidade de Ghent, Bélgica.
[4,6] Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental da EESC/USP.
[5] Pesquisador do Departamento de Modelagem Matemática, Estatística e Bioinformática, da Universidade de Ghent, Bélgica.

Resumo. *O Bio-hidrogênio pode ser produzido pela fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar em biorreatores acidogênicos anaeróbios. E, além de conhecer o processamento experimental da vinhaça, é importante propor modelos para entender o processo com profundidade, para possibilitar otimizações e simulações em outros cenários. O modelo mais usado em simulações de processos anaeróbios é o ADM1 (Anaerobic Digestion Model Number 1). Entretanto, para modelar reatores acidogênicos - produção de hidrogênio - o ADM1 não é apropriado. Portanto, neste trabalho um modelo baseado no ADM1 foi concebido para descrever o processamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar em um reator batelada acidogênico. Baseado nos dados experimentais, hipóteses foram propostas e duas novas rotas metabólicas foram assumidas, a produção de butirato e hidrogênio a partir de acetato e lactato e de glicerol. Uma análise de sensibilidade local foi realizada para reduzir o número de parâmetros livres do modelo e, posteriormente, este foi calibrado com dados experimentais, sendo os parâmetros livres estimados com o método de minimização Box-Draper. O modelo proposto foi capaz de descrever adequadamente a variação de açúcar, glicerol, acetato, lactato, hidrogênio e butirato ao longo do período de operação do reator. Contudo, novas rotas metabólicas podem ser inseridas no modelo para torná-lo mais realista.*

Introdução

Diante da escassez de combustíveis fósseis, a busca por fontes naturais de energia é cada vez mais crescente. O bio-hidrogênio, uma forma de energia limpa, pode ser produzido pela fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar em biorreatores acidogênicos anaeróbios. No Brasil, uma excessiva quantidade de vinhaça, subproduto da indústria sucro-alcooleira, é produzida anualmente (uma produção de 15 L de vinhaça é estimada para cada litro de etanol produzido) (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

A vinhaça atualmente é destinada as lavouras de cana-de-açúcar como fertilizante natural devido as suas altas concentrações de nutrientes. Entretanto, se este processo não for realizado com cautela pode levar a acidificação do solo, tornando-o improdutivo (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015). Uma forma de mitigar este problema ambiental é pelo processamento de vinhaça em biorreatores, assim reduzindo os níveis de matéria orgânica e recuperando a energia na forma de biogás (hidrogênio ou metano) e a vinhaça acidificada pode ser destinada posteriormente as lavouras, sem perder seu poder fertilizante. O processamento da vinhaça em dois estágios, reator acidogênico (recuperação de ácidos graxos voláteis -AGV- e hidrogênio) seguido por reator metanogênico (redução de matéria orgânica e produção de metano) apresentou uma eficiência energética superior ao processamento realizado em uma única etapa,

somente reator metanogênico (Ferraz Júnior et al., 2016). Entretanto, além de conhecer como o processamento da vinhaça ocorre na prática, é importante modelar o sistema para entendê-lo com profundidade, a fim de fazer otimizações e simulações em outros cenários.

O ADM1 (*Anaerobic Digestion Model Number 1*) foi proposto por Batstone et al. (2002) para simular a digestão anaeróbia desde a desintegração da matéria orgânica complexa até a produção de metano. Entretanto, quando é destinado a modelagem de reatores acidogênicos, modificações são necessárias, uma vez que as rotas metatabólicas se diferem, resultando em diferentes produtos, tais como AGV e hidrogênio. Além disso, em águas residuárias específicas como a vinhaça, que contêm alta presença de lactato e glicerol, outras rotas metabólicas são desempenhadas por certos tipos de micro-organismos, sendo necessário incluí-las no modelo, para torná-lo mais realista. Guellout et al. (2018) e Antonopoulou et al. (2012) fizeram algumas modificações no ADM1 para modelar a produção fermentativa de hidrogênio. Guellout et al. (2018) estudou a produção de hidrogênio a partir de glicose e eles adotaram um fator de correção para o ADM1 original, tornando-o passível de uso em reatores acidogênicos. Enquanto Antonopoulou et al. (2012) modificou o ADM1 original proposto por Batstone et al. (2002) para incluir etanol e lactato no modelo de produção de hidrogênio a partir de extrato de sorgo.

Entretanto, o ADM1 ainda não foi modificado para simular o processamento da vinhaça de cana-de-açúcar, com altos níveis de glicerol, em um reator batelada acidogênico para recuperar hidrogênio como energia. Portanto, o objetivo deste trabalho será realizar o tratamento anaeróbio da vinhaça em reator batelada com o intuito de determinar quais rotas metabólicas estão ocorrendo no sistema. Posteriormente, baseado nas observações experimentais, propor hipóteses para construir um modelo baseado no ADM1 que seja capaz de simular as rotas metabólicas observadas. Uma análise de sensibilidade será realizada para selecionar os parâmetros que mais afetam no resultado final e definir quais parâmetros podem ser fixados com valores da literatura, devido ao seus efeitos limitados. Este modelo será calibrado com os dados experimentais e os parâmetros livres serão determinados pelo método de minimização Box-Draper.

Material e Métodos

Etapa Experimental

Na fase experimental deste trabalho, um reator batelada anaeróbio foi operado por 20 dias. O inóculo de bactérias acidogênicas foi obtido pela fermentação natural de vinhaça em condições termofílicas (55°C) e pH 6,5, seguindo o protocolo descrito por Ferraz Júnior et al. (2014).

A vinhaça da indústria São Martinho (Pradópolis, São Paulo, Brasil) foi usada como substrato. Esta foi estocada a -20°C antes de ser usada para manter sua composição original.

A fermentação da vinhaça foi realizada em pequenos reatores bateladas de 500 ml, com volume de vinhaça de 250 ml. O meio de cultura foi preparado com uma concentração de vinhaça de aproximadamente 20 $g.L^{-1}$ de DQO total e 15 ml de inóculo preparado sem adicionar nenhum outro nutriente ou sal. O reator batelada foi submetido a uma atmosfera de nitrogênio 100% por 10 minutos para completa remoção do oxigênio do *headspace* e, posteriormente, foi completamente selado. O reator foi incubado sob agitação 130 rpm.

Com o objetivo de monitorar a performance do reator batelada, as seguintes variáveis foram analisadas duas vezes por dia: pH, condutividade elétrica, DQO total e solúvel (DQOt e DQOs, respectivamente), demanda química de oxigênio (DBO), carbono orgânico total (COT), nitrogênio, fósforo e sulfato foram analisados baseados no *Standard Methods of the American Public Health Association* (2005); Ácido lático (HLa), carboidratos e glicerol foram analisados de acordo com Taylor (1996), Dubois et al. (1956) e Fossati e Prencipe (1982), respectivamente; Etanol (EtOH), ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPro), ácido isobutírico (HIsoBu), ácido butírico (HBu), ácido isovalérico (HIsoVa), ácido valérico (HVa) e ácido caproico (HC) foram analisados em um equipamento de cromatográfica gasosa (Shimadzu GC 2010) equipado

com detector de ionização em chama, como descrito por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014); A composição analítica do biogás que consiste em hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) foi determinado usando cromatografia gasosa Shimadzu equipado com uma coluna capilar de Carboxen 1010 PLOT (30m x 0.32 mm) e um detector de condutividade térmica (Perna et al., 2013).

Alguns dos dados experimentais analisados, com seus respectivos erros padrão, podem ser vistos na Figura 1, os quais serão usados na próxima seção para a construção das hipóteses a cerca do modelo.

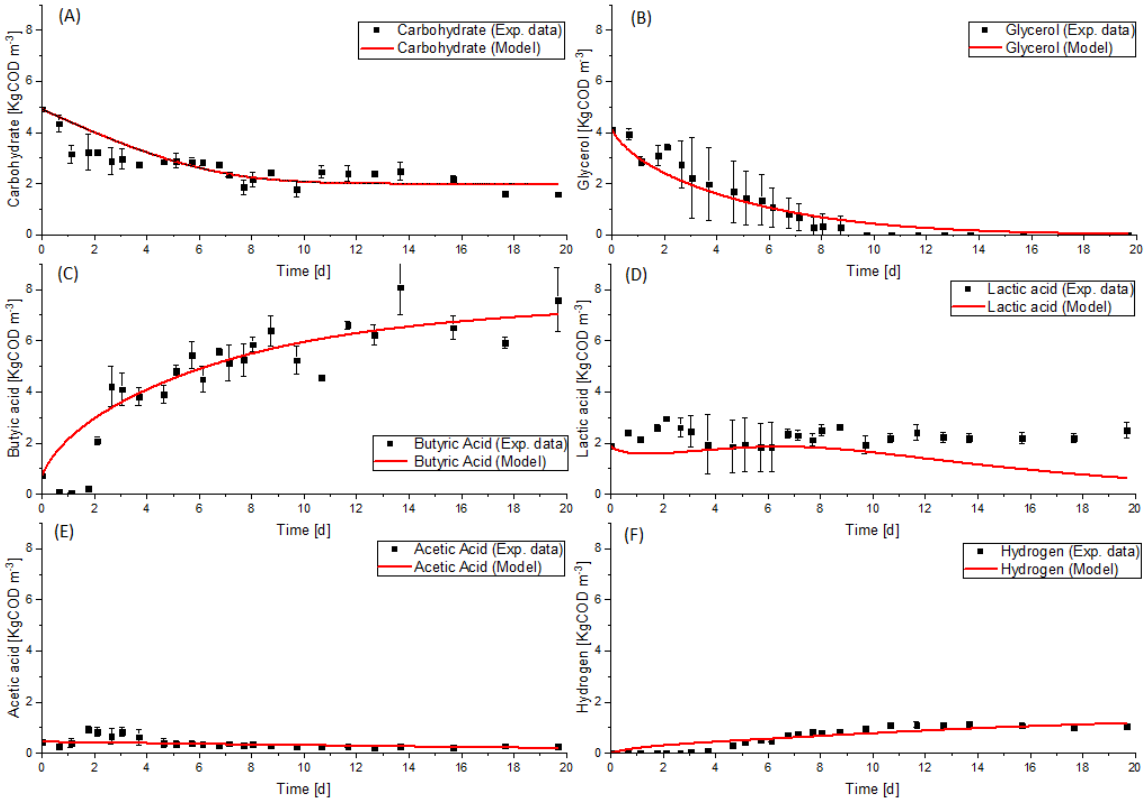


Figura 1: Comparação entre os resultados do modelo e os dados experimentais na calibração do modelo usado no processamento de vinhaça de cana-de-açúcar em reator batelada acidogênico

<u>Etapa de modelagem</u>

Na construção do modelo, uma análise cuidadosa do processo dinâmico dos dados foi realizado, tornando possível assumir as seguintes hipóteses: por se tratar de um reator acidogênico, nenhuma produção de metano foi encontrada na fase experimental como já era esperado. Sendo assim, todas as equações relacionadas com a metanogênese, presentes no ADM1 original (Batstone et al., 2002) foram desconsideradas aqui, as quais são metanogênese acetoclástica e hidrogenotrófica (Reações 7 e 8, respectivamente, da Tabela 1).

Nos dois primeiros dias de operação do reator, um consumo de carboidratos foi verificado. Inversamente, foi observado um pequeno aumento na produção de ácido acético e lático. Assim, as Reações 1 e 4 da Tabela 1, referentes a produção de acetato e lactato a partir de glicose, respectivamente, foram incluídas no modelo. A primeira foi incorporado ao ADM1 original proposto por Batstone et al. (2002), mas a última somente foi citada pelos pesquisadores, mas não incorporada no ADM1 original.

As Reações 2 e 3, Tabela 1, referentes a produção de ácido propiônico e ácido butírico e hidrogênio a partir de glicose também estão presentes no ADM1 original, mas foram omitidas aqui devida a não produção destes produtos durante a fase experimental, Figura 1.

Tabela 1: Status das reações presentes no atual modelo usado para modelagem do reator batelada acidogênico usado no tratamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar em condições termofílicas: (*) Reações mantidas do ADM1 original; (**) Reações removidas do ADM1 original; e (***) Reações adicionadas ao novo modelo.

Número	Reação	Status	Referência
1	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	*	Batstone et al. (2002)
2	$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$	**	Batstone et al. (2002)
3	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	**	Batstone et al. (2002)
4	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOCOOH$	*	Batstone et al. (2002)
5	$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$	**	Batstone et al. (2002)
6	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	**	Batstone et al. (2002)
7	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	**	Batstone et al. (2002)
8	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	**	Batstone et al. (2002)
9	$CH_3COOH + 2CH_3CH(OH)COOH \rightarrow H_2 + 3/2CH_3(CH_2)_2COOH$	***	Fuess et al. (2018)
10	$2C_3H_8O_3 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 4H_2 + 2CO_2$	***	Biebl et al. (1999)

O ADM1 original inclui as rotas metabólicas da acetogênese. A acetogênese de ácidos graxos voláteis é desfavorável em condições padrão de energia livre de Gibbs ($\Delta G > 0$) ($pH = 7$, pressão de 1 atm) (Harper e Pohland, 1986). Assim, para tornar este processo possível um sintrofismo obrigatório entre os micro-organismos produtores de hidrogênio (como bactérias acetogênicas) e consumidores (como arqueias metanogênicas) é requerido, para manter baixos os níveis de hidrogênio. A oxidação de ácido propiônico e butírico a acetato (Reações 5 e 6, Tabela 1) tem um $\Delta G = +76{,}1$ e $\Delta G = +48{,}1$, respectivamente (Harper e Pohland, 1986; Stams, 1994). Ainda de acordo com Harper e Pohland (1986), as Reações 5 e 6, Tabela 1 somente acontecem quando a pressão parcial de hidrogênio está abaixo de 10^{-4} e 10^{-3} atm, respectivamente. Por esta razão, as rotas acetogênicas somente ocorrem em reatores metanogênicos, mas em reatores acidogênicos, nos quais a presença de hidrogênio é alta, a acetogênese é completamente inibida. Assim, as Reações 5 e 6 (Tabela 1) também foram omitidas no modelo proposto.

Além do mais, é possível verificar analisando a Figura 1 que os níveis de ácido acético e lático deixaram de crescer a partir do segundo dia, como esperado devido a conversão deles a partir glicose (Reações 1 e 4 da Tabela 1), em contrapartida os níveis de ácido butírico começaram a aumentar. Fuess et al. (2018) verificaram que alguns micro-organismos pertencentes ao gênero *Clostridium* produzem ácido butírico e hidrogênio a partir ácido lático e ácido acético (Reação 9, Tabela 1) em reator acidogênico usado no processamento de vinhaça de cana-de-açúcar. Sendo assim, esta nova rota metabólica foi adicionada no presente modelo. Todavia, níveis significativos de ácido butírico foram observados, muito acima dos possíveis valores obtidos a partir da Reação 9, Tabela 1. Biebl et al. (1999) propôs algumas rotas metabólicas possíveis para o glycerol. De acordo com eles o glicerol pode ser convertido em 1,3 propanediol e depois convertido a piruvato, que posteriormente será convertido em lactato, n-butanol, butirato, acetato, etanol ou 2,3 butanediol dependendo das condições operacionais e dos tipos de micro-organismos atuantes dentro do reator. Além disso, neste processo é verificado altos níveis de dióxido de carbono e Bio-H_2 (Biebl et al., 1999). Como neste trabalho foi verificado altos níveis de butirato, somente ele foi considerado na modelagem, ou seja, a produção de ácido butírico e hidrogênio a partir de glicerol (Reação 10, Tabela 1).

O primeiro passo para implementar as equações de acordo com o ADM1 foi fazer o balanço de massa para cada componente solúvel que varia dentro do reator ao longo do tempo, seguindo a Equação 1. Neste trabalho toda nomenclatura segue o ADM1 original proposto por Bastone et. al. (2002), exceto os novos parâmetros adicionados neste projeto.

$$\frac{dS_{i,liq}}{dt} = \frac{q_{in}}{V_{liq}}\left(S_{i,in} - S_i\right) + \sum_{j=1}^{26} \rho_j \nu_{i,j} \quad (1)$$

Em que: V_{liq} é o volume de líquido no reator; q_{in} e q_{out} são as vazões de entrada e de saída, respectivamente; S_{in} e S são as concentrações de substrato na entrada e no momento, respectivamente; $\sum_{j=1}^{26} \rho_j \nu_{i,j}$ corresponde a soma de taxas cinéticas específicas dos processos *j* multiplicados por $\nu_{i,j}$ que é a velocidade do componente *i* no processo *j*. Aqui, como se tem um reator batelada, $q_{in} = 0$. Assim, o balanço de massa para açúcar é descrito por:

$$\frac{dS_{su}}{dt} = -\rho_5 = -k_{m,su}\frac{S_{su}}{K_{s,su}+S_{su}} X_{su} I_5 \quad (2)$$

Sendo ρ_5 o consumo de açúcar; $k_{m,su}$ a máxima velocidade de consumo de açúcar; S_{su} a concentração de açúcar; $K_{s,su}$ a concentração correspondente a metade da velocidade máxima; X_{su} a concentração de biomassa e; I_5 o fator de inibição. Cabe ressaltar que o açúcar é um substrato inicial presente na vinhaça, não sendo produzido por outras rotas metabólicas.

Bem como descrito para o açúcar, o glicerol também é considerado um substrato. Então, o balanço de massa segue a equação:

$$\frac{dS_{gl}}{dt} = -\rho_{26} = -k_{m,gl}\frac{S_{gl}}{K_{s,gl}+S_{gl}} X_{gl} I_{26} \quad (3)$$

O subscrito *26* foi adicionado para se referir ao glicerol, se tratando de uma nova rota metabólica não presente no ADM1 original.

O balanço de massa para butirato é um pouco diferente, visto que se trata de um produto final, sendo produzido a partir de acetato, lactato e glicerol. Além disso, devido ao fato dele ter sido assumido como produto final, o termo relacionado ao seu consumo foi removido:

$$\frac{dS_{bu}}{dt} = (1 - Y_{ac}) f_{bu,ac} \rho_{11} + (1 - Y_{lac}) f_{bu,lac} \rho_{24} + \left(1 - Y_{gl}\right) f_{bu,gl} \rho_{25} \quad (4)$$

Sendo Y_{ac}, Y_{lac} e Y_{gl} os yields de anabolismo da biomassa degradadora de acetato, lactato e glicerol, respectivamente; $f_{bu,ac}$, $f_{bu,lac}$ e $f_{bu,gl}$ os yields de catabolismo de butirato a partir acetato, lactato e glicerol, respectivamente; e ρ_{11}, ρ_{24} e ρ_{26} o consumo de açúcar, lactato e glicerol, respectivamente. O termo ρ_{24} também foi adicionado neste trabalho para se referir ao consumo de lactato, seguindo a equação de Monod.

$$\rho_{11} = k_{m,ac}\frac{S_{ac}}{K_{s,ac}+S_{ac}} X_{ac} I_{11} \quad (5)$$

$$\rho_{24} = k_{m,lac}\frac{S_{lac}}{K_{s,lac}+S_{lac}} X_{lac} I_{24} \quad (6)$$

O acetato somente vem do açúcar, por causa das suposições de que não há acetogênese em reator acidogênico, mas o acetato é um produto intermediário que será consumido pelas bactérias acidogênicas para produção de butirato (Reação 9, Tabela 1). Portanto:

$$\frac{dS_{ac}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{ac,su} \rho_5 - \rho_{11} \quad (7)$$

Neste trabalho foi adicionado o balanço de massa para o lactato. O lactato, assim como o acetato é um componente intermediário, sendo produzido a partir de açúcar e consumido para a produção de hidrogênio e butirato (Reação 9, Tabela 1).

$$\frac{dS_{lac}}{dt} = (1 - Y_{su})f_{lac,su}\rho_5 - \rho_{24} \quad (8)$$

O hidrogênio é um produto final, produzido a partir de açúcar, acetato, lactato e glicerol.

$$\frac{dS_{h2}}{dt} = (1 - Y_{su})f_{h2,su}\rho_5 + (1 - Y_{ac})f_{h2,ac}\rho_{11} + (1 - Y_{lac})f_{h2,lac}\rho_{24} + \left(1 - Y_{gl}\right)f_{h2,gl}\rho_{26} - \rho_{T,8} \quad (9)$$

Em que $\rho_{T,8}$ é a taxa de transferência de gás para hidrogênio (Batstone et al., 2002).

Finalmente, a variação de DQO ao longo do tempo está associada com a variação de açúcar, butirato, glicerol, acetato, lactato e hidrogênio:

$$\frac{dS_{COD}}{dt} = \frac{dS_{su}}{dt} + \frac{dS_{gl}}{dt} + \frac{dS_{bu}}{dt} + \frac{dS_{ac}}{dt} + \frac{dS_{lac}}{dt} + \frac{dS_{h2}}{dt} \quad (10)$$

As equações relacionadas aos equilíbrios ácido-base no ADM1 original foram mantidas (para butirato - ácido butírico, acetato - ácido acético, CO_2 e carbono inorgânico (Batstone et al., 2002)), somente foi adicionada a equação para o equilíbrio (lactato - ácido lático):

$$\rho_{A,12} = k_{A,Blac}(S_{lac}^{-}\left(K_{a,lac} + S_H^{+}\right) - K_{a,lac}S_{lac}) \quad (11)$$

Sendo o pKa da dissociação de lactato e ácido lático igual a 3,86. Assim, $k_{A,Blac} = 10^{-3,86}$.

O ADM1 original assume diferentes grupos de micro-organismos, tais como degradadoras de açúcar (X_{su}) e acetato (X_{ac}) (Batstone et al., 2002). Aqui, mais dois grupos de micro-organismos serão determinados, degradadoras de lactato e glicerol (X_{lac} e X_{gl}, respectivamente). Eles serão assumidos como parâmetros livres no modelo, devido à dificuldade de determiná-los na prática, sendo necessário técnicas de biologia molecular.

O ADM1 também tem um fator de inibição para cada componente, tais como I_5 (açúcar) e I_{11} (acetato). Assim, mais dois serão adicionados, o I_{24} (lactato) e o I_{25} (glicerol). Eles serão parâmetros fixos, devido ao fato da constante de equilíbrio não mudar ao longo do tempo. A função empírica para inibição será usada para calculá-los na prática.

$$I_{pH} = \begin{cases} exp\left(-3\left(\frac{pH - pH_{UL}}{pH_{UL} - pH_{LL}}\right)^2\right) : pH < pH_{UL} \\ 1 \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad : pH \geq pH_{UL} \end{cases} \quad (12)$$

Em que pH é o pH médio do sistema; pH_{LL} e pH_{UL} são os limites inferior e superior, respectivamente, referindo-se a inibição de 50% dos micro-organismos.

Os yields da biomassa anaeróbia para cada componente também foram assumidos como parâmetros fixos porque eles são intrínsecos dos micro-organismos, isto significa que não será alterado ao longo do tempo. Portanto, $Y_{su}=0,1$, $Y_{ac}=0,05$, $Y_{lac}=0,055$ e $Y_{gl}=0.1$ (Batstone et al., 2002; Danielsson, 2014).

Para simplificar o número de parâmetros livres, algumas relações pode ser feitas em relação aos yields de catabolismo presentes na equação abaixo.

$$f_{lac,su} + f_{ac,su} + f_{h2,su} = 1 \quad (13)$$

$$f_{bu,lac} + f_{h2,lac} = 1 \quad (14)$$

$$f_{bu,ac} + f_{h2,ac} = 1 \quad (15)$$

$$f_{bu,gl} + f_{h2,gl} = 1 \quad (16)$$

O atual modelo tem 17 parâmetros livres para serem calibrados: yield de catabolismo $f_{lac,su}$, $f_{ac,su}$, $f_{bu,lac}$, $f_{bu,ac}$ e $f_{bu,gl}$, máxima velocidade de consumo de açúcar, acetato, lactato e glicerol ($k_{m,su}$, $k_{m,ac}$, $k_{m,lac}$ e $k_{m,gl}$, respectivamente), os coeficientes de meia saturação para açúcar, acetato, lactato e glicerol ($K_{S,su}$, $K_{S,ac}$, $K_{S,lac}$ e $K_{S,gl}$) e a concentração de micro-organismos consumidores de açúcar, acetato, lactato e glicerol (X_{su}, X_{ac}, X_{lac} e X_{gl}, respectivamente). Entretanto, a análise de sensibilidade foi realizada para reduzir o número de parâmetros livres e evitar problemas de identificação dos parâmetros durante a estimação, porque o algoritmo poderia não encontrar um valor ótimo bem como encontrar infinitas soluções para o problema. Assim, foi possível selecionar quais parâmetros livres poderiam ser assumidos como fixos (dados da literatura) e quais deles deveriam ser. A análise de sensibilidade relativa leva em consideração a influência das variáveis e dos parâmetros, tornando os resultados comparáveis uns com os outros (Hamby, 1994).

$$\frac{\partial y_i}{\partial \theta_j}\frac{\theta_j}{y_i} = \frac{\theta_j}{y_i}\left[\frac{f(\theta_j+\epsilon\theta_j)-y(\theta_j)}{\epsilon\theta_j}\right] \quad (17)$$

Em que y_i são todas as variáveis i; θ são todos os parâmetros j; e $\varepsilon = 1.10^{-5}$.

A análise de sensibilidade foi implementada no Matlab. Para cada variável foi construído um gráfico com a variação de todos os parâmetros. Posteriormente, para se ter valores comparáveis, foi feita a integração de cada curva presente nos gráficos, para determinar os valores das áreas. Todos os resultados de integração foram sumarizados em uma tabela, onde a sensibilidade dos parâmetros foi destacada com cores, sendo o mais sensível enfatizado com uma cor mais escura e o menos sensível com uma cor mais clara.

A estimação dos parâmetros livres, na calibração do modelo, foi feita usando o software Matlab com o solver @fmincon que é adequado para modelos não lineares e permite a inserção de restrições nos parâmetros yields (Equações 13-16). Neste solver os parâmetros livres foram minimizados usando o método Box Draper de acordo com Couto et al. (2019). A integração de equações diferenciais para a variação de cada componente ao longo do tempo foi feita utilizando o integrador ODE15s do Matlab.

Resultados e Discussão

Análise de sensibilidade

Depois de realizar a análise de sensibilidade para o presente modelo foi possível construir gráficos, dos quais a área das curvas foram determinadas para simplificar a interpretação dos resultados. As áreas foram determinadas pela integração, assim estas curvas foram convertidas em números para serem analisadas diretamente. Todos estes resultados estão presentes na Tabela 2, a qual compara a sensibilidade de cada parâmetros com cada variável. Além disso, os dados foram agregados de acordo com a sensibilidade, sendo as cores mais escuras referentes a maior sensibilidade e as cores mais claras menor sensibilidade.

Analisando a Tabela 2 nota-se que os parâmetros ($K_{S,su}$, $K_{S,ac}$, $K_{S,lac}$ e $K_{S,gl}$) exercem uma pequena ou nenhuma sensibilidade. Portanto, os valores presentes na literatura (Batstone et al., 2002) para estes parâmetros serão adotados como fixos no presente modelo.

Também é possível verificar, analisando a Tabela 2, que a concentração de biomassa consumidora de um determinado substrato (X_{su}, X_{ac}, X_{lac} e X_{gl}) tem a mesma sensibilidade que a taxa máxima de consumo específico de Monod para o respectivo substrato ($k_{m,su}$, $k_{m,ac}$, $k_{m,lac}$ e $k_{m,gl}$). Isto ocorre porque eles estão multiplicados nas Equações de Monod, ρ's. Assim, somente um conjunto destes parâmetros livres precisam ser determinados, o outro conjunto pode ser fixado, com valores da literatura. Neste trabalho, a biomassa consumidora de cada componente será parâmetro livre, porque são parâmetros difíceis de serem determinados na prática, sendo necessário técnicas de biologia molecular, em contrapartida os valores de k_m's para cada componente são encontrados na literatura (Batstone et al., 2002; Danielsson, 2014).

Tabela 2: Integral da análise de sensibilidade relativa para variáveis e parâmetros presentes no atual modelo usado para descrever o processamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar em um reator batelada acidogênico termofílico (55°C)

		Parameters																
		X_{su}	X_{ac}	X_{lac}	X_{gl}	$f_{lac,su}$	$f_{ac,su}$	$f_{bu,lac}$	$f_{bu,ac}$	$f_{bu,gl}$	$k_{m,su}$	$K_{S,su}$	$k_{m,ac}$	$K_{S,ac}$	$k_{m,lac}$	$K_{S,lac}$	$k_{m,gl}$	$K_{S,gl}$
Variables	S_{su}	4.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.48	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S_{bu}	0.28	0.20	2.21	4.92	13.15	0.52	16.17	0.71	31.63	0.28	0.00	0.20	0.05	2.21	0.03	4.92	0.10
	S_{gl}	0.96	1.35	14.75	33.04	40.54	1.58	33.21	1.16	67.05	0.96	0.01	1.35	0.33	14.75	0.18	33.04	0.64
	S_{ac}	1.57	10.00	1.03	1.33	2.65	4.27	1.69	0.08	3.33	1.57	0.03	10.00	2.62	1.02	0.01	1.37	0.03
	S_{h2}	0.43	1.39	8.81	1.21	27.61	1.01	19.86	1.29	34.93	0.43	0.01	1.39	0.37	8.81	0.10	1.22	0.03
	S_{IC}	0.64	0.19	1.48	0.50	0.86	0.05	0.94	0.03	1.91	0.64	0.01	0.19	0.05	1.38	0.02	0.61	0.01
	S_{IN}	0.06	0.00	0.06	0.20	0.25	0.01	0.19	0.01	0.39	0.06	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.09	0.00
	S_I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	X_I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S_{cat}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S_{an}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S_{bum}	0.26	0.20	2.19	4.85	12.97	0.51	16.06	0.70	31.42	0.26	0.00	0.20	0.05	2.19	0.03	4.85	0.09
	S_{acm}	1.54	9.97	0.99	1.29	2.54	4.26	1.63	0.08	3.23	1.54	0.03	9.97	2.61	0.98	0.01	1.33	0.03
	S_{hco3m}	1.24	0.39	2.59	1.75	2.95	0.18	1.63	0.06	3.46	1.24	0.02	0.39	0.10	2.47	0.03	1.93	0.04
	S_{nh3}	2.93	0.72	4.42	5.40	9.81	0.50	7.42	0.31	14.42	2.93	0.04	0.71	0.18	4.27	0.05	5.61	0.10
	$S_{gas,h2}$	0.43	1.38	8.80	1.21	27.79	1.02	19.84	1.29	35.09	0.43	0.01	1.38	0.37	8.80	0.10	1.22	0.03
	$S_{gas,co2}$	1.32	0.45	2.08	3.68	7.72	0.37	6.70	0.31	12.96	1.32	0.02	0.45	0.12	2.10	0.03	3.61	0.07
	S_{lac}	6.70	1.26	16.66	1.93	9.56	1.34	26.71	1.10	53.17	6.70	0.10	1.26	0.31	16.66	0.20	1.93	0.03
	S_{lacm}	6.70	1.26	16.66	1.92	9.58	1.34	26.73	1.10	53.21	6.70	0.10	1.26	0.31	16.66	0.20	1.92	0.03
	S_{COD}	0.07	0.06	0.41	0.15	0.90	0.03	0.62	0.05	1.05	0.07	0.00	0.06	0.02	0.41	0.00	0.15	0.00

High

Low

Finalmente é possível notar que os parâmetros mais importantes para o modelo, isto é, aqueles que exercem maior influência nas variáveis de saída são os yields de catabolismo ($f_{lac,su}$, $f_{bu,lac}$ e $f_{bu,gl}$). Sendo assim, estes parâmetros devem ser estimados.

Portanto, a análise de sensibilidade foi capaz de reduzir o número de parâmetros livres de 17 para 9, aumentando consequentemente os graus de liberdade do modelo.

Calibração do modelo

O presente modelo foi calibrado com dados do processamento de cana-de-açúcar em reator batelada acidogênico para um concentração inicial de 20.900 mg.L^{-1}. Este foi implementado em Matlab e a determinação dos parâmetros mais sensíveis (X_{su}, X_{ac}, X_{lac}, X_{gl}, $f_{lac,su}$, $f_{ac,su}$, $f_{bu,lac}$, $f_{bu,ac}$ e $f_{bu,gl}$) foi feita usando o Método Box-Draper (Couto et al., 2019). Os valores iniciais para as variáveis são provenientes dos dados experimentais e todos os parâmetros fixos necessários vêm de Batstone et al. (2002) e Danielsson, 2014. Os parâmetros estimados estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros livres estimados usando o modelo Box-Draper

Parâmetro	X_{su}	X_{ac}	X_{lac}	X_{gl}	$f_{lac,su}$	$f_{ac,su}$	$f_{bu,lac}$	$f_{bu,ac}$	$f_{bu,gl}$
Valor	0,0088	0,0012	1,4565	3,7677	0,9984	0,0016	0,6789	0,9978	0,9800
Desvio	0,0005	0,0001	0,0962	0,2059	0,0975	0,0002	0,0393	0,1105	0,0581

Analisando os resultados da Tabela 3 é possível notar a predominância dos micro-organismos degradadores de glicerol, seguido pelos de lactato. Quase todo o açúcar foi convertido a lactato ($f_{lac,su}$) e uma pequena quantidade à acetato ($f_{ac,su}$). O hidrogênio produzido basicamente é resultante do consumo de lactato. Além disso, a alta produção de butirato vêm do consumo de lactato, acetato e glicerol, conforme as hipóteses propostas.

Também foi verificado que uma pequena quantidade de glicerol foi convertida a hidrogênio ($f_{h2,gl}$ = 0.02). Portanto a maior produção de hidrogênio é advinda da rota de lactato e acetato sendo convertido a butirato e hidrogênio. Os resultados modelados foram comparados com os dados experimentais na Figura 1.

Analisando o conjunto de dados é possível verificar que nem todos os carboidratos foram convertidos em produtos (Figura 1A), já todo o glicerol foi convertido em produtos (Figura 1B). O atual modelo foi capaz de descrever estes comportamentos, indicando que as hipóteses sobre a produção de acetato, lactato e hidrogênio a partir do açúcar e a produção de butirato a partir de glicerol foram importantes para aumentar a qualidade do modelo. Além disso, a suposição de que nem todo carboidrato é convertido em componentes intermediários também é válido.

Outros metabólitos não foram adicionados ao modelo, tais como etanol, metanol e ácido propiônico, porque pequenas quantidades foram determinadas nos testes experimentais. Entretanto, eles podem ser os responsáveis pelas divergências entre os dados experimentais e os resultados do modelo para os componentes intermediários, lactato e acetato (Figura 1D e E, respectivamente). O modelo subestimou a produção de lactato durante quase toda a operação do reator, mas somente subestimou a produção de acetato por volta do segundo dia.

Analisando a Figura 1C, pode-se observar que o modelo descreveu bem a produção de butirato a partir do segundo dia, justificando que a hipótese de butirato a partir de acetato e lactato foram pertinentes. Entretanto, o modelo não foi realista no início, até o segundo dia. Uma possível explicação para este desvio é que a acetogênese foi desconsiderada por causa dos níveis de hidrogênio que podem inibir as bactérias acetogênicas (que convertem butirato em acetato). Entretanto, no início da operação até o segundo dia os níveis de hidrogênio foram zero (Figura 1F). Assim, pode ter acontecido a acetogênese a partir do início da operação até o segundo dia, e quanto o hidrogênio começou a ser produzido, esta rota metabólica foi completamente inibida, consequentemente os níveis de butirato começaram a aumentar. Os dados experimentais e a simulação sugerem que o Bio-H_2 é resultante da fermentação de lactato e acetato (Reação 9, Tabela 1), porque os níveis de hidrogênio para os primeiros dois dias foram zero (sem hidrogênio a partir de carboidratos ou glicerol) e começou a aumentar com o consumo do lactato e acetato, para produção de hidrogênio e butirato. Em contrapartida, a rota metabólica de consumo de glicerol indica que este substrato foi predominantemente para butirato, e que somente pequenas quantidades de hidrogênio vêm desta rota.

Finalmente, em estudos futuros, será importante validar o presente modelo para outros cenários com diferentes características para o processamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar em reator batelada, com o intuito de concluir se o modelo é adequado em representar este processo.

Conclusões

Nesta pesquisa, um modelo baseado no ADM1 foi proposto para descrever o processamento da cana-de-açúcar em um reator batelada acidogênico. Baseado nos resultados foi possível concluir que o modelo deve ser construído baseado na composição físico-química da água residuária e no tipo de reator, porque as interações microbiológicas serão diferentes dependendo da disponibilidade de substratos, neste caso, de carboidratos, lactato e glicerol presente na vinhaça.

As hipóteses sobre a produção de butirato a partir de acetato e lactato e a partir de glicerol melhoraram a qualidade do modelo ao descrever reatores acidogênicos. Entretanto, também foi possível notar que outros intermediários metabólicos podem ser adicionados para tornar o modelo mais realista, devido ao fato do lactato e do acetato não terem tido um bom ajuste quando comparado com os substratos, carboidratos e glicerol, e produtos finais, butirato e hidrogênio.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 5, 406-414.

Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Lyberatus, G., 2012. Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. Int. J. Hydrogen Energy, 37, 191-208.

Standard Methods Examination of Water and Wastewater, 2005, twenty-first ed. Washington.

Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Povlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1). Scientific and Technical Report no. 13. IWA Publishing.

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., Deckwer, W.D., 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 289-297.

Couto, P.T., Brustello, M., Albanez, R., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M., Ribeiro, R., 2019. Calibration of ADM1 using the Monte Carlo MarkovChain for modeling of anaerobic biodigestion of sugarcane vinasse in an AnSBBR. Chem. Eng. Res. Des., 141, 425-435.

Danielsson, O., 2014. Modeling and simulation of anaerobic manure digestion into biogas. Chalmers University of Technology.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.

Ferraz Jr, A.D.N., Koyama, M. H., Araújo Jr, M.M., Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. Renewable Energy, 89, 245-252.

Ferraz Jr, A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy, 39, 16852-16862.

Fossati, P., Prencipe, L., 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, 28, 2077-2080.

Fuess, L.T., Ferraz Jr, A.D.N., Machado,C.B., Zaiat, M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. Bioresour. Technol., 247, 426-433.

Guellout, Z., Clion, V., Benguerba, Y., Dumas, C., Ernst, B., 2018. Study of the dark fermentative hydrogen production using modified ADM1 models. Biochem. Eng. J., 132, 9-19.

Hamby, D.M., 1994. A review of techniques for parameter sensitivity analysis of environmental models. Environ. Monit. Assess., 32, 135-154.

Harper, S.R., Pohland, F.G., 1986. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. Biotechnol. Bioeng., 28, 585-602.

Moraes, B. S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renewable Sustainable Energy Rev., 44, 888-903.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D.M.F., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy, 38, 54-62.

Stams, A.J.M., 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek, 66, 271-294.

Taylor, K., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochem. Biotechnol., 56, 49-58.

TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA EM PLATAFORMAS DE PETRÓLEO E GÁS, UTILIZANDO DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA COM SULFETO, ASSOCIADA À LAVAGEM DE BIOGÁS PRODUZIDO EM REATOR ANAERÓBIO

Cristiane A. de Oliveira [1]; Márcia H. R. Z. Damianovic [2]

[1]Doutoranda do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A água produzida em plataformas de extração de petróleo e gás é um dos principais passivos ambientais dessa indústria. Essa água residuária é caracterizada por possuir baixo teor de matéria orgânica, elevada salinidade, compostos orgânicos aromáticos, nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_4^+$) e sulfato (SO_4^{2-}). O processo de digestão anaeróbia apresenta potencial de remover a matéria orgânica, compostos orgânicos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - BTEX) e reduzir $SO_{4^{-2}}$ a sulfeto de hidrogênio (H_2S). Porém, para remoção dos compostos nitrogenados, encontrados em concentrações relevantes nessas águas, uma etapa adicional de tratamento é requerida. Assim, propõe-se o estudo da viabilidade do tratamento em sistema combinado sequencial de reatores de leito estruturado anaeróbio, aeróbio, com baixa aeração (0,30 -1,00 $mgO_2.L^{-1}$), visando, na última unidade, o processo simultâneo de nitrificação e desnitrificação (NDS) e um reator anóxico, para complementar a desnitrificação, pela via autotrófica, concomitantemente à lavagem do biogás produzido no reator anaeróbio, oxidando o sulfeto gasoso.*

Introdução

As atividades de produção de petróleo e gás natural geram resíduos e efluentes líquidos, dentre os quais se destaca a água de formação, ou água produzida como também é conhecida, que é retirada junto com os principais produtos extraídos. Essa água é produzida em grandes volumes que dependem da tecnologia de exploração, formação geológica, e principalmente da idade do poço, pois quanto mais antigo, mais água de produção será gerada (Campos et al., 2002). Dessa maneira, a cada ano há geração de mais água residuária para o mesmo montante de petróleo e/ou o gás explorado. A geração para o início da exploração é, em média, 0,6 L de água por litro de petróleo (Sauer Jr., 1981), enquanto em poços mais antigos, esse volume pode exceder 10 vezes o de petróleo produzido (Ribeiro, 1995).

A água produzida possui elevada salinidade, podendo chegar a quatro vezes a concentração da água do mar. Contém compostos aromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos, conhecidos como BTEX, fenóis, nitrogênio amoniacal, sulfato, matéria orgânica e metais. De acordo com Gabardo et al. (2005), os compostos BTEX dominam 97,5% dos aromáticos presentes nessas águas, sendo o restante dividido entre hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), naftalenos, feantrenos e debenzotiofenos (NPD).

As características da água produzida possibilitam que alguns compostos constituintes sejam convertidos por processos anaeróbios e/ou aeróbio. O processo anaeróbio possibilita a conversão de compostos aromáticos em cadeias mais simples (Carmona et al., 2009), passíveis de degradação em etapas subsequentes. A redução do impacto do BTEX em processos aeróbios subsequentes estão associada aos aspectos de toxicidade e de redução de carga orgânica, a última, relacionada à redução do aporte de O_2 e à geração de lodo. Ainda em ambiente anaeróbio, a sulfetogênese merece destaque, uma vez que produz alcalinidade, importante nos processos biológicos, concomitantemente à geração de sulfeto de hidrogênio (H_2S).

Cattony et al. (2005) demonstraram a eficiência da degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias redutoras de sulfato (BRS) avaliando que a presença de tais compostos não interferiu no metabolismos de microrganismos como BRS e arqueias metanogênicas. Trabalhos mais recentes avaliaram a eficiência da digestão anaeróbia na presença de compostos aromáticos como fenol, BTEX, pentaclorofenol (PCP), bifenilas policloradas (PCB) sendo verificada a toxicidade do PCB sobre a comunidade anóxica (Cattony et al., 2007; Damianovic et al., 2009; de Nardi et al., 2005; Gusmão et al., 2006; Lima e Silva, 2015; Omena, 2008; Ribeiro et al., 2013). Dadas as características complexas da água de produção, a influência dos BTEX nos processos de tratamento propostos requer avaliação.

O nitrogênio amoniacal, importante constituinte das águas produzidas na exploração de óleo e gás, apresenta potencial de remoção, utilizando os próprios componentes da água residuárias como doadores de elétrons, após a etapa de nitrificação em processo aeróbio autotrófico. Tendo em vista a baixa concentração de matéria orgânica prontamente biodegradável no afluente em questão, os produtos da conversão anaeróbia dos BTEX podem ser utilizados como doadores de elétrons na etapa de desnitrificação heterotrófica e o H_2S é um doador de elétrons potencial para a desnitrificação pela via autotrófica (Lu et al., 2012).

A utilização dos subprodutos, como o H_2S como doador de elétrons produzido a partir digestão anaeróbia da água de produção apresenta potencial como doador de elétrons na etapa de desnitrificação. Moraes et al. (2013) investigaram o processo NDS, com desnitrificação pela via autotrófica com sulfeto, em reatores em batelada alimentada com aeração intermitente. Os autores verificaram o acúmulo de enxofre elementar, indicando a oxidação parcial de sulfeto, associada às eficiências de 86% e 53% para a nitrificação e desnitrificação, respectivamente, associada ao consumo de alcalinidade, com em condições com excesso de sulfeto. Nesse sentido, outra vantagem da utilização do biogás contento H_2S como doador de elétrons é a possibilidade de recuperação de enxofre elementar que é formado pela oxidação incompleta do sulfeto, e pode ser utilizado como matéria prima em indústrias de produção de ácido sulfúrico e fertilizantes (Celis-García et al., 2008). Exaurido o potencial dos doadores de elétrons disponíveis na água residuária, a adição de fontes externas de carbono, como metanol, etanol, ácido acético (Foresti et al., 2006), dentre outros pode ser considerada.

Sendo assim, o projeto proposto pretende avaliar a eficiência de um novo sistema de tratamento de águas produzidas em plataformas de óleo e gás. O sistema será composto de reatores de leito estruturado anaeróbio, seguido de reator aeróbio/anóxico com baixa aeração, e um terceiro reator anóxico complementar, que será utilizado para a desnitrificação autotrófica com H_2S como doador de elétrons.

Material e Métodos

Água residuária

A água residuária aplicada a esse trabalho será sintética, sendo suas características semelhantes a água produzida em plataformas de óleo e gás com algumas adaptações, porém, sem alterar a faixa de concentração encontrada na literatura (Tabela).

Tabela 1: Meio sintético

Parâmetro	Concentração
pH	7,00
SO_4^{2-} ($mg.L^{-1}$)	480
HCO_3^- ($mg.L^{-1}$)	450
Nitrogênio amoniacal ($mg.L^{-1}$)	100
Salinidade ($mg\ Cl^-.L^{-1}$)	2800
DQO ($mg\ O_2.L^{-1}$)	790

Fases operacionais

O projeto consiste em quatro fases:

Fase I - Ensaios em batelada com caráter exploratório com objetivo de avaliar a influência do composto BTEX nos processos anaeróbios via metanogênese e sulfetogênese (ensaio A) e aeróbios para a nitrificação (ensaio B). As concentrações de BTEX adotadas baseiam-se na caracterização da água gerada em plataformas de óleo e gás (I. T. Gabardo et al., 2005). A soma da concentração mínima de BTEX será de 1 $mg.L^{-1}$ (-1), e a máxima de 20 $mg.L^{-1}$ (+1). O planejamento fatorial foi realizado de acordo com *Plackett-Burman design*, resultando em 16 frascos para cada ensaio (A e B).

Fase II – Ensaios em reatores biológicos contínuos, que consistirão em três reatores operados independentemente. O primeiro reator (R1) será operado em ambiente anaeróbio, em condições metanogênica e sulfetogênica, conforme descrito por Godoi et al. (2017). O principal objetivo da unidade será a remoção de matéria orgânica existente nas águas produzidas e conversão de compostos BTEX, fornecer alcalinidade necessária para o processo de nitrificação em unidade subsequente. O residual de matéria orgânica, proveniente da quebra do composto BTEX além de outros compostos orgânicos, serão potencialmente utilizados pelos microrganismos desnitrificantes heterotróficos no reator NDS (R2), submetido à baixa aeração. Como subproduto das reações em R1 será gerado gás H_2S. O meio suporte consistirá em espumas de poliuretano e tempo de detenção hidráulica (TDH) de R1 será de 12 horas, conforme observado por Ribeiro et al. (2013) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo para remoção de BTEX, e Camiloti et al. (2014) em reator de leito estruturado para redução simultânea de sulfato e matéria orgânica. O segundo reator (R2) será mantido em ambiente óxico e terá o mesmo tipo de suporte para imobilização da biomassa em leito estruturado, sendo seu afluente sintético simulado a partir das características do efluente de R1. Destaca-se que nesse reator serão testadas diferentes concentrações de OD avaliadas na literatura, entre 0,3 até 1,0 mg $O_2.L^{-1}$, por meio de compressor de ar com ajuste para microaeração. O tempo de detenção hidráulica para R2 será de 12 horas de acordo com Santos et al. (2016), operando reator de leito estruturado com recirculação e aeração intermitente (SBRRIA) visando a nitrificação e desnitrificação. O terceiro reator (R3), será um sistema anóxico, no qual pretende-se a complementação da desnitrificação pela via autotrófica e lavagem do biogás produzido em R1. Destaca-se que a quantidade de matéria orgânica presente na água residuária é insuficiente para suprir a demanda por doadores de elétrons exigida para desnitrificação heterotrófica em R2. A alimentação será feita em fluxo descendente e o gás introduzido na base do reator, em fluxo ascendente. A variação do TDH, entre 1 e 3 horas, baseou-se no trabalho realizado por Pantoja Filho et al. (2014) que variaram o TDH entre 3 e 1,5 horas para a câmara anóxica utilizando H_2S gasoso como doador de elétrons para desnitrificação.

Fase III - Reatores contínuos operados sequencialmente. A partir do estabelecimento das condições operacionais em cada uma das unidades será feita a junção dos reatores, ou seja, o efluente de R1 alimentará R2 e do efluente deste R3. O fornecimento de biogás para a desnitrificação autotrófica será realizado por meio de gás sintético, dados os pequenos volumes produzidos e às perdas associadas à manipulação.

Fase IV – Reator aeróbio continuo. A principal característica da Fase IV será avaliar o comportamento da NDS via desnitrificação heterotrófica sem o tratamento prévio em reator anaeróbio. O afluente será semelhante ao aplicado em R1 na Fase II, contendo NH_4^+, SO_4^{2-}, salinidade, matéria orgânica e concentrações BTEX, sendo essas estabelecidas no planejamento fatorial.

Inóculo

O R1 será inoculado a partir da maceração dos grânulos do lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) instalado no sistema de tratamento de águas residuárias do Abatedouro Rosaves Ltda, localizado na cidade de Pereiras-SP.

O R2 será inoculado com lodo proveniente de sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP).

O R3 será inoculado a partir de uma mistura na proporção de 50% de concentração (Guerrero and Zaiat, 2017) do lodo proveniente do Abatedouro Rosaves Ltda (Pereiras-SP), com capacidade desnitrificante e do lodo ativado da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP).

Análises físico-químicas

O monitoramento dos reatores será baseado em amostragens das fases líquida e gasosa. Na fase líquida, os valores de pH, demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal, nitrogênio total kjeldahl, nitrito, nitrato, e concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) serão determinados de acordo com protocolos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA/WEF, 2012), alcalinidade (DiLallo, R. e Albertson, 1961 modificada por Ripley et al., 1986) e oxigênio dissolvido (OD) será monitorado com sonda de medidor por luminescência Hach, modelo LDO HQ10. E O potencial de óxido-redução (pOR) será medido em sensor Intellical ORP-Redox MTC 101 (Hach). Também será avaliado o sulfeto total dissolvido (STD) de acordo com o pKa (6,89) para o primeiro estágio de ionização do sulfeto ($H_2S_{(aq)} \rightarrow HS^-$) sob a temperatura de operação (30 °C), de acordo com a Equação 1 enquanto a distribuição da especiação do sulfeto [$H_2S_{(aq)}$] e [HS^-] determinada conforme a Equação 2 (Callado et al., 2015).

$$pKa = 7{,}257 \cdot exp^{(-0{,}00172.T)} \quad \text{Equação 1}$$

$$pH = pKa + \log \frac{[HS^-_{(aq)}]}{[H_2S_{(aq)}]} \quad \text{Equação 2}$$

Com relação à fase gasosa, a vazão de biogás em R1 será monitorada continuamente, acoplando-se medidor diretamente no headspace do reator descrito por Veiga et al. (1990). A composição do biogás – Sulfeto de hidrogênio (H_2S), nitrogênio (N_2), e gás carbônico (CO_2) serão analisadas em cromatógrafo gasoso GC 2010 (Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica, com coluna HP-PLOT/Q 30m x 0,54mm, sendo o gás de arraste o hidrogênio (Lebrero et al., 2015). O biogás produzido no reator anaeróbio, contendo metano (CH_4), será analisado em cromatógrafo gasoso GC 2010 (Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna *Carboxen*® 1010 Plot (30 mm de comprimento, 0,53 mm de diâmetro externo e 0,30 μm de espessura), sendo o gás de arraste o argônio. As temperaturas do injetor e detector foram de 220° C e 230° C, respectivamente. Sendo o tempo de corrida de aproximadamente 6 minutos (Perna et al., 2013).

Resultados esperados

Pretende-se com o sistema proposto, interpretar o desempenho do sistema frente aos interferentes (sais, BTEX, etc.) presentes na água residuária complexa, e à possível remoção dos mesmos. Também como contribuição da pesquisa, espera-se que o processos NDS, precedido de reator anaeróbio, submetido à baixa aeração resulte em redução de gastos tanto no sistema de aeração quanto na dispensa de recirculação do efluente, utilizada para manter a homogeneidade da qualidade do efluente avaliada em trabalhos anteriores (Moura et al., 2012 e Santos et al., 2016). Sendo assim, essa pesquisa pretende contribuir para os avanços já realizados no grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC-USP) em relação ao tratamento de águas residuárias complexas, visando a desnitrificação autotrófica com a utilização de concentrações de gás sulfídrico, associada à lavagem do biogás produzido no processo anaeróbio.

Referências Bibliográficas

APHA,AWWA, W., 2012. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environmental Federation, Washington, DC, USA.

Callado, N., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2015. Resilience of methanogenesis in an anaerobic reactor subjected to increasing sulfate and sodium concentrations. J. Water Process Eng. 7, 203–209. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.06.011

Camiloti, P.R., Mockaitis, G., Domingues, A., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., Zaiat, M., 2014. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. j chem technol Biotechnol 1044–1050. https://doi.org/10.1002/jctb.4199

Campos, J.C., Borges, R.M.H., Filho, A.M.O., Nobrega, R., Anna, G.L.S., 2002. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. Water Res. 36, 95–104. https://doi.org/S 0043 -1354(01)0 0203-2

Carmona, M., Zamarro, M.T., Blazquez, B., Durante-Rodriguez, G., Juarez, J.F., Valderrama, J.A., Barragan, M.J.L., Garcia, J.L., Diaz, E., 2009. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 71–133. https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-08

Cattony, E.B.M., Chinalia, F.A., Ribeiro, R., Zaiat, M., Foresti, E., Varesche, M.B.A., 2005. Ethanol and Toluene Removal in a Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass Reactor in the Presence of Sulfate. Biotechnol. Bioeng. https://doi.org/10.1002/bit.20509

Cattony, E.B.M., Ribeiro, R., Zaiat, M., Foresti, E., Varesche, M.B.A., 2007. Ethanol and benzene removal in a horizontal - flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulfate. Eng. Sanit. E Ambient. 12, 181–191.

Celis-García, L.B., González-Blanco, G., Meraz, M., 2008. Removal of sulfur inorganic compounds by a biofilm of sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a down-flow fluidized bed reactor. J. Chem. Technol. Biotechnol. 83, 260–268. https://doi.org/10.1002/jctb.1802

Damianovic, M.H.R.Z., Moraes, E.M., Zaiat, M., Foresti, E., 2009. Bioresource Technology Pentachlorophenol (PCP) dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors. Bioresour. Technol. 100, 4361–4367. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.076

de Nardi, I.R., Ribeiro, R., Zaiat, M., Foresti, E., 2005. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. Process Biochem 40, 587–592.

DiLallo, R. & Albertson, O.R., 1961. Volatile acids by Direct Titration. J. Water Pollut. Control Fed. 23, 353–365.

Foresti, E., Zaiat, M., Vallero, M., 2006. Anaerobic processses as the core technology for suitanable domestic wastewater treatment: consolidated applications, new trends, perspectives and challeges. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 5, 3–16.

Gabardo, I.T., Platte, E.B., Lima, E.F.., Andrade, F.B., 2005. Caracterização do efluente da plataforma Curimã (PCR-1). RT AMA 024/2005 - relatório técnico parcial. Centro de pesquisas e desenvolvimento leopoldo a. miguez de mello p&d de energia e desenvolvimento sustentável.

Gabardo, I.T., Platte, E.B., Lima, E.F.D.A., Andrade, F.B. De, 2005. Caracterização do efluente da plataforma curimã (PCR-1) 50.

Godoi, L.A.G. de, Foresti, E., Damianovic, M.H.R.Z., 2017. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. J. Environ. Manage. 197, 597–604. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.027

Guerrero, R.B.S., Zaiat, M., 2017. Wastewater post-treatment for ammonium removal using H2S as electron donor for denitrification with simultaneous elemental sulphur recovery, in: The 14th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies.

Gusmão, V.R., Martins, T.H., Chinalia, F.A., Sakamoto, I.K., Thiemann, O.H., Varesche,

M.B.A., 2006. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor , under denitrifying condition. Process Biochem 41, 1391–1400. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.001

Lebrero, R., Toledo-cervantes, A., Muñoz, R., Foresti, E., 2015. Biogas upgrading from vinasse digesters : a comparison between an anoxic biotrickling filter and an algal-bacterial photobioreactor. https://doi.org/10.1002/jctb.4843

Lima e Silva, M.R., 2015. Análise dos parâmetros que interferem no metabolismo da microbiota anaeróbia e anóxica na remoção de bifenilas policloradas. Tese de Doutorado. Departamento de Hdráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.

Lu, H., Wu, D., Jiang, F., Ekama, G.A., Loosdrecht, M.C.M. Van, Chen, G., 2012. The Demonstration of a Novel Sulfur Cycle-Based Wastewater Treatment Process : Sulfate Reduction , Autotrophic Denitrification , and Nitrification Integrated (SANI 1) Biological Nitrogen Removal Process 109, 2778–2789. https://doi.org/10.1002/bit.24540

Moraes, B.S., Orrú, J.G.T., Foresti, E., 2013. Nitrogen and sulfide removal from effluent of UASB reactor in a sequencing fed-batch biofilm reactor under intermittent aeration. J. Biotechnol. 164, 378–385. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.032

Moura, R.B., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2012. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. J. Environ. Manage. 98, 163–167. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.009

Omena, S.P.F., 2008. Remoção de fenol em reator anaeróbio de leito fluidificado sob condições desnitrificantes. Tesede mestrado. Departamento de Hidraúlica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Univerisdade de São Paulo.

Pantoja Filho, J.L.R., Damianovic, M.H.R.Z., Fonseca, D.F., Foresti, E., 2014. Nitrogen and residual organic matter removal from anaerobic reactor effluent in a fixed-bed reactor with biogas for denitrification. J. Chem. Technol. Biotechnol. https://doi.org/10.1002/jctb.4537

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy 38, 54–62. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022

Ribeiro, C.M.S., 1995. Ozonização de Efluentes da Indústria de Petróleo. Tese de mestrado. PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Ribeiro, R., Nardi, I.R., Fernandes, B.S., Foresti, E., Zaiat, M., 2013. BTEX removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor under denitrifying conditions 269–278. https://doi.org/10.1007/s10532-012-9585-2

Ripley, A.L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strenght wastes 58, 406–411.

Santos, C.E.D., Moura, R.B., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2016. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). J. Environ. Manage. 166, 519–524. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.054

Sauer Jr., T.C., 1981. Volatile Liquid Hidrocarbon Characterization of Underwater Vents and Formation Waters from Offshore Production Operations. Environ. Sci. Technol. 15, 917–923. https://doi.org/10.1021/es00090a005

Veiga, M.C., Soto, M., Mendez, R., Lema, J.M., 1990. A new device for measurement and control of gas production by bench scale anarobic digesters. Water Res. 24, 1551–1554. https://doi.org/0043-1354/9

INFLUÊNCIA DOS METAIS (FERRO, COBRE, ZINCO, MANGANÊS, MAGNÉSIO E NÍQUEL) NO ESTABELECIMENTO DO PROCESSO SULFETOGÊNICO

Mirabelle Perossi Cunha[1]; Adriana Ferreira Maluf Braga[2]; Rachel Biancalana Costa[3]; Renata Piacentini Rodriguez[4]; Marcelo Zaiat[5]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Pós Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[4] Pós Doutoranda no Instituto de Química da UNESP;
[4]Professora do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFAL- MG;
[5] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Sete metais bivalentes (Ferro, Cobre, Zinco, Cobalto, Manganês, Magnésio e Níquel) foram avaliados para verificar se existe efeito significativo específico no estabelecimento do processo sulfetogênico. Um delineamento experimental Plackett-Burman foi empregado neste estudo e o resultado mostrou que o elemento cobalto influenciou positivamente e o ferro negativamente, ou seja, o elemento cobalto favoreceu a remoção de sulfato no estabelecimento do processo sulfetogênico, utilizando intervalo de confiança (IC) de 90%, e o ferro, com o mesmo IC, resultou em remoções menores. Além disso, foi verificado que a melhor concentração de cobalto para uma efetiva sulfetogênese é a de 10 mg.L^{-1}.*

Introdução

Alguns efluentes industriais como a drenagem ácida de minas (DAM) e a vinhaça, que são ricos em metais, nutrientes e sulfato, são submetidos a tratamentos biológicos a fim de uma posterior recuperação de compostos, elementos químicos, ou mesmo obter produção de energia na forma de metano ou hidrogênio (Fuess, et al. 2018, Guerrero e Zaiat 2018, Yildiz et al. 2019).

No caso da DAM, os metais, principalmente bivalentes, dependem muito da geologia da região e do tipo de exploração mineralógica. No entanto, não há consenso na literatura sobre como esses metais podem influenciar o processo sulfetogênico sob condições anaeróbias em sistemas de tratamento biológico. O que se reporta sobre sulfetogênese e metais na literatura são apenas afirmações sobre os metais se tornarem indisponíveis para a digestão anaeróbia quando este é precipitado na forma de sulfeto metálico. Gustavsson et al. (2013) verificaram que níquel estimulou o processo de geração biogás em reatores alimentados com vinhaça e que tal fato pode estar relacionado com a absorção microbiana do elemento químico e o sulfeto (sulfeto ácido volátil).

Choong et al. (2016) enfatizam a importância de alguns elementos como o ferro, níquel e cobalto para uma efetiva digestão anaeróbia, pois estes são responsáveis pela ativação e funcionamento de muitas enzimas. Para a metanogênese, a ordem de importância dos metais que pode ser considerada é: Fe > Ni > Co = Mo.

O ferro é o elemento mais requerido na etapa acetogênica e metanogênica da digestão anaeróbia e Cunha et al. (2018) relatam sua influência no processo sulfetogênico de um reator UASB, que demonstrou um incremento na redução de sulfato após a adição de 100 mg.L^{-1} de ferro na alimentação. A adição de 20 mg.L^{-1} de zinco e 5 mg.L^{-1} de cobre, promoveu queda na eficiência, segundo os autores.

Neste contexto, por meio de um planejamento experimental, sete metais (Ferro, Cobre, Zinco, Cobalto, Manganês, Magnésio e Níquel) foram avaliados a fim de verificar sua influência no estabelecimento do processo sulfetogênico, tendo como parâmetro avaliativo a redução da concentração de sulfato.

Material e Métodos

Delineamento experimental, procedimentos experimentais e métodos avaliativos

O delineamento experimental Plackett-Burman (Plackett e Burman, 1946) foi utilizado para avaliar o efeito significativo dos metais bivalentes ferro, cobre, zinco, cobalto, manganês, magnésio e níquel no estabelecimento da sulfetogênese.

A biomassa utilizada nos ensaios em batelada foi inoculada dentro de um reator anaeróbio de leito estruturado (AnSTBR), o qual já havia sido operado por mais de um ano com aumento sequencial de metais e nutrientes, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 16h e relação DQO/SO_4 de 1 (concentração de 1500 mg.L^{-1} de sulfato e de matéria orgânica). Originalmente o reator AnSTBR continha 8 hastes revestidas com espumas de poliuretano, sendo deixadas apenas 2 hastes para a inoculação de novas 6 hastes por 30 dias que seriam então cortadas em cubos de 1cm de aresta e utilizadas nos ensaios em batelada. Durante o período de inoculação das novas espumas, o reator AnSTBR foi alimentado com a quantidade mínima de metais e nutrientes, que foi a primeira fase de operação do reator, a composição (mg L^{-1}) do meio sintético foi: Na_2SO_4 (2185,5); $MgSO_4$. $7H_2O$ (0,035); $FeSO_4$. $7H_2O$ (49,75); $ZnCl_2$(4,17); $CuSO_4$. $5H_2O$ (1,96); $MnSO_4$. H_2O (0,88); $CoCl_2$.$2H_2O$ (2,81); $NiCl_2$. $6H_2O$ (4,05); $Al_2(SO_4)_3$. 16 H_2O (23,5); NaH_2PO_4. H_2O (3,41); NH_4Cl (5,77) e KH_2PO_4 (5,6).

Para a avaliação dos dados obtidos experimentalmente, considerou-se a média de sulfato residual dos últimos três valores, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA). Após tal avaliação, apenas os parâmetros com valor "p" próximo ao nível significância de 10% foram mantidos no modelo para aproximar o R ajustado para o R^2, que são os coeficientes de correlação da regressão linear.

Já na segunda parte da pesquisa, diante do resultado do Plackett-Burman, o elemento cobalto foi submetido a um ensaio de adição simples sob diferentes concentrações para avaliar o efeito destas sobre a remoção de sulfato.

Os dados de sulfato residual (SR) foram submetidos ao ajuste cinético de primeira ordem considerando um valor residual de sulfato nas últimas amostragens. A equação que descreveu tal comportamento foi:

$$SR(x) = Sf + (S0 - Sf) * e^{-kx} \quad (1)$$

Em que:
Sf: Sulfato final (mg.L^{-1}); S0: Sulfato inicial (mg.L^{-1}); k: constante cinética; x: tempo (h); SR(x): Sulfato residual em função do tempo.

Montagem dos experimentos em batelada e análises químicas

Para o primeiro ensaio (Plackett-Burman), foram utilizados 20 frascos de vidro com volume nominal de 500 mL e para a segunda parte experimental, foram apenas 10 frascos, incluindo 2 frascos de controle. Os ensaios em batelada foram realizados em duplicatas, a 30°C e 120 rpm com um volume líquido reacional de 200 mL. Cada frasco continha dez cubos de espuma de poliuretano e a fonte de carbono utilizada foi etanol, igualmente adicionada em todos os frascos, incluindo os controles, correspondendo a uma demanda química de oxigênio (DQO) de 1500 mg O_2.L^{-1}. Gás nitrogênio foi fluxonado por 5 min para garantir anaerobiose na montagem de cada frasco.

A concentração dos metais utilizada na primeira parte experimental está descrita na Tabela 1, considerando os diferentes níveis (alto nível, baixo nível e ponto central- estabelecido pela metade do intervalo entre os fatores de alto e baixo nível) gerados a partir do software Statistica 13.4 (TIBCO Software Inc., EUA).

Tabela 1: Matriz com as concentrações dos metais adicionados no planejamento experimental Plackett–Burman.

Concentrações ($mg.L^{-1}$) dos metais adicionados em cada frasco							
Frascos	Fe	Ni	Co	Cu	Mn	Mg	Zn
1	10,0	1,00	0,998	0,499	3,00	0,035	20,0
3	10,0	1,00	0,998	4,99	3,00	0,003	20,0
4	100,0	10,0	9,98	4,99	3,00	0,035	2,00
5	10,0	1,00	0,998	0,499	30,0	0,035	2,00
6	100,0	10,0	9,98	0,499	30,0	0,003	20,0
7	10,0	1,00	0,998	4,99	30,0	0,003	2,00
8	100,0	10,0	9,98	4,99	30,0	0,035	20,0
9 *	45,0	4,50	4,49	2,25	13,5	0,016	9,00
10*	45,0	4,50	4,49	2,25	13,5	0,016	9,00

*Ponto central

As concentrações utilizadas de cobalto para o segundo experimento foram: 10, 30, 50 e 90 $mg.L^{-1}$. A fonte de nutrientes, de sulfato e o elemento alumínio foram igualmente adicionados em todos os frascos de ambos os experimentos, sendo sua composição, em $mg.L^{-1}$, igual a: Na_2SO_4 (1892,7); $Al_2(SO_4)_3$. 16 H_2O (235,0); NaH_2PO_4 H_2O (34,1); NH_4Cl (57,7) e KH_2PO_4 (56,0). Nos dois frascos controle do teste estatístico de triagem do cobalto, o meio reacional era composta apenas pelos nutrientes, sulfato e alumínio, mais a fonte de carbono.

O decaimento da concentração de sulfato, redução de sulfato, foi o parâmetro utilizado para avaliar o estabelecimento do processo sulfetogênico e no segundo experimento, utilizando apenas o elemento cobalto, também foi verificado o perfil de degradação do etanol pelo monitoramento da DQO. As análises de sulfato e DQO foram determinadas conforme descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastwater* (APHA et. al, 2012), método turbidimétrico 4500 E e método colorimétrico de refluxo fechado 5220 D, respectivamente.

Resultados e Discussão

O reator AnSTBR começou sua operação com a composição dos metais, nutrientes e sulfato de acordo com as especificações do meio sintético descritas para a inoculação das novas espumas e essas concentrações foram aumentando gradativamente com o decorrer do tempo. Após 44 dias, tal concentração dos sais aumentou em 10% da original, depois de 99 dias de operação do reator essa porcentagem mudou para 40%, depois 60% no dia 163 e no dia 277 a alimentação tinha sua concentração aumentada em 100 vezes.

Diante dessas informações e a fim de inferir qual metal foi determinante para a melhora de eficiência no estabelecimento da sulfetogênese, realizou-se os ensaios em batelada com as espumas inoculadas com a concentração mais baixa de operação do AnSTBR, para evitar que o acúmulo de metais na biomassa original do reator mascarasse o resultado.

A Figura 1 resume os resultados obtidos na primeira etapa experimental que foi o delineamento estatístico Plackett–Burman. Neste estudo, a função objetivo foi minimizar a

concentração de sulfato, ou seja, ter uma maior remoção de sulfato, com concentração menor de sulfato residual (SR).

O gráfico de Pareto, representado pela Figura 1a, mostra que dentre os sete metais, os mais relevantes no estudo foram o cobalto, ferro, manganês, níquel e magnésio - ordem decrescente de importância. Ademais, também se pode inferir que apenas o cobalto e o ferro foram considerados significativos, ou seja, tiveram algum efeito sobre o sulfato residual ao nível de significância de 10%. No caso, o cobalto influenciou de forma positiva e o ferro influenciou negativamente, pois se a função SR tem que ser a mínima possível, o elemento que apresenta essa função mais negativa tem efeito positivo sobre a função objetivo (SR).

A função que descreve a função objetivo ajustada usando os dados experimentais (R^2 = 0,99231 e R-adj = 0,9827) é dada pela Equação 2:

$$\mathbf{SR = 1006.93 + 319.29C_{Fe} - 203.48C_{Ni} - 395.05C_{Co} + 224.05C_{Mn} + 192.95C_{Mg}} \quad (2)$$

Em que:
C_{Fe}: é a concentração de ferro; C_{Ni}: é a concentração de níquel; C_{Co}: é a concentração de cobalto; C_{Mn}: é a concentração de manganês e C_{Mg}: é a concentração de magnésio.

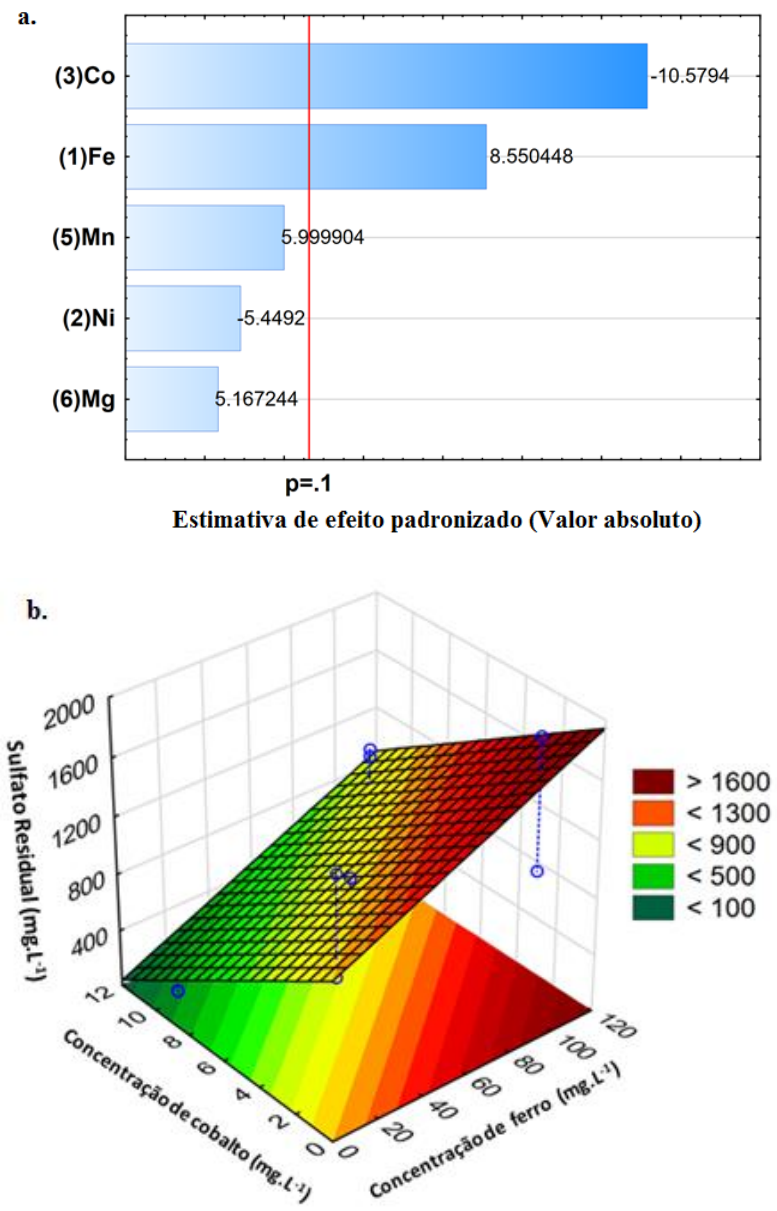


Figura 1: Resultado obtido do delineamento experimental Plackett- Burman.
a. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos metais sobre o sulfato residual, ao nível de significância de 10%. b. Superfície resposta para o sulfato residual ($mg.L^{-1}$) em função dos metais ferro e cobalto.

Pela Figura 1b é possível observar melhor o resultado encontrado pelo gráfico de Pareto (Figura1a), pois de acordo com a Equação 3, concentrações de cobalto superiores a 10 $mg.L^{-1}$ resultariam em SR menor que 100 mg $SO_4^{2-}.L^{-1}$. Por outro lado, a concentração de ferro maior que 100 $mg.L^{-1}$ não proporcionaria redução de sulfato.

O resultado encontrado nesta pesquisa contradiz o artigo de Cunha et al. (2018) que identificaram uma melhora da remoção de sulfato na presença de ferro, utilizando as mesmas condições operacionais no reator anaeróbio - TDH de 16h e razão DQO/SO_4 de 1,0. A hipótese para tal divergência de resultados é o tipo de reator utilizado, pois no caso de Cunha et al. (2018) o reator utilizado era do tipo UASB com lodo granular e nesta pesquisa o reator AnSTBR possuía hastes de PVC revestidas com espumas de poliuretano que são consideradas favoráveis ao crescimento de BRS segundo Silva et al. (2006). Outra hipótese, é que a água residuária sintética utilizada por Cunha et al. (2018) continha menor variedade de metais e não apresentava cobalto.

O delineamento experimental Plackett-Burman não avalia as interações dos metais e conforme já mencionado por Kiran et al. (2017) estas deveriam ser melhor estudadas, pois podem afetar diretamente as etapas da digestão anaeróbia. Há alguns relatos na literatura sobre as possíveis interações entre os metais, a destacar: Ranquet et al. (2007) e Paulo et al. (2017) sugerem a interação do ferro com o cobalto competindo pelo mesmo sítio ativo ocorrendo a inativação das enzimas biogênicas Fe-S pela ação do cobalto intracelular, mas nada pode ser afirmado sobre os resultados obtidos no presente experimento.

Moestedt et al. (2016) também se referem a interação dos metais ao estudar a adição de elementos traço como o ferro (400 $mg.L^{-1}$), o cobalto (0,5 $mg.L^{-1}$) e o níquel (0,5 $mg.L^{-1}$), para produção de biogás pela degradação de resíduos sólidos urbanos e resíduos de matadouros, e observou que a adição combinada dos três metais foi melhor que a adição deles separadamente. Ademais, os autores notaram uma estabilidade no processo quando se adicionou apenas o ferro, com maior produção de biogás e menor acúmulo de ácidos.

Apesar da literatura destacar o ferro como o elemento traço mais requerido para a digestão anaeróbia e aumentar a eficiência na geração de metano devido ao estímulo na produção de ácidos (Choong et al., 2016, Wei et al.,2018), o resultado desta pesquisa apresentou o cobalto como tendo efeito positivo sobre a função SR. Sendo assim, diferentes concentrações do elemento (10, 30, 50 e 90 $mg.L^{-1}$) foram avaliadas em um segundo experimento. Os resultados estão mostrados na Figura 2.

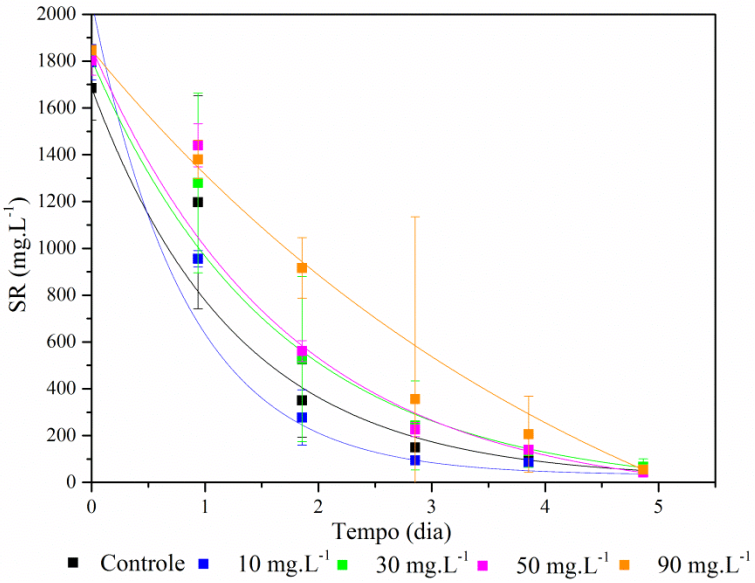


Figura 2: Ajuste cinético de primeira ordem dos dados experimentais com as diferentes concentrações de cobalto (10, 30, 50 e 90 $mg.L^{-1}$) além do controle- concentração de sulfato residual ($mg.L^{-1}$) em função do tempo de experimento (dia).

A Tabela 2 traz em termos numéricos a qualidade do ajuste cinético de primeira ordem feito para o controle e as diferentes concentrações de cobalto avaliadas.

Tabela 2: Valores de concentração inicial (S0), constante cinética(k) e valores de chi quadrado (χ^2) obtidos pelo ajuste cinético de primeira ordem.

	Concentrações ($mg.L^{-1}$)				
	Controle	10	30	50	90
k	0,78±0,06	1,21±0,16	0,61±0,09	0,58±0,09	0,21±0,03
S0	1685±109	2057±386	1805±5	1856±169	1847±3
χ^2 reduzido	0,65	30,97	0,20	8,24	0,19
χ^2 ajustado	0,98	0,88	0,99	0,97	0,99

Analisando os valores das constantes cinéticas da Tabela 2, e sabendo que se trata de um processo biológico, a concentração que apresenta maior valor é a de 10 $mg.L^{-1}$ que, consequentemente, apresentará maior velocidade de degradação do sulfato, já que esta é diretamente proporcional ao valor de k vezes a diferença das concentrações do sulfato (inicial e final). Em contrapartida, a concentração de 90 $mg.L^{-1}$ pode ser considerada crítica, indicando começo da inibição do processo sulfetogênico por presentar o menor valor de k.

Comparando o resultado desta pesquisa com os valores encontrados na literatura para o elemento cobalto na eficiência da metanogênese, 10 $mg.L^{-1}$ é considerado um valor alto para a degradação de substratos orgânicos (Choong et al., 2016), mas nada é relatado sobre a influência do cobalto sobre a sulfetogênese.

Considerando que a relação estequiométrica DQO/SO_4 é de 0,67, ou seja, cada 1 g de SO_4 requer 0,67 g de DQO para assegurar a completa redução do sulfato (Lens et al., 1998), a DQO foi monitorada para avaliar se toda fonte de carbono estava sendo utilizada na degradação do sulfato e o resultado é a apresentado na Figura 3.

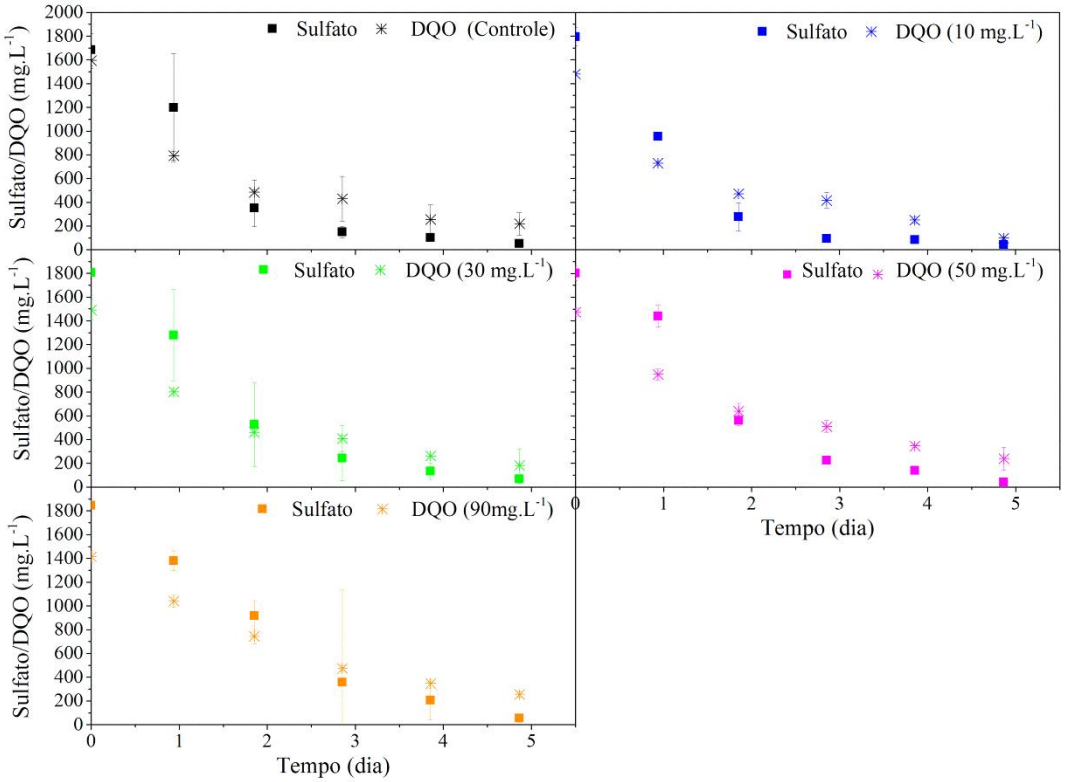


Figura 3: Perfil de degração de sulfato e de matéria orgânica, representada pela DQO, em função do tempo para as diferentes concentrações de cobalto (10, 30, 50 e 90 $mg.L^{-1}$) e controle.

Pela Figura 3 nota-se que nos dois primeiros dias nem toda fonte de carbono estava sendo utilizada para a conversão de sulfato, sendo esta uma pequena parte no valor de (23±11)%. Entretanto, próximo ao quinto dia de experimento, praticamente toda a DQO estava sendo utilizada via sulfetogênese, tendo concentrações de sulfato residual próximas a zero em todas as condições estudadas. Tais resultados evidenciam o estabelecimento da condição sulfetogênica dos frascos em batelada e o aumento da eficiência na degradação de sulfato e matéria orgânica no decorrer dos dias.

Conclusões

Dentre os sete elementos químicos avaliados (Ferro, Cobre, Zinco, Cobalto, Manganês, Magnésio e Níquel) para a minimização da função objetivo de sulfato residual, o cobalto foi considerado significativo e a concentração considerada ótima para um eficiente estabelecimento do processo sulfetogênico é de 10 $mg.L^{-1}$, ou seja, nesta concentração foi possível se ter a maior remoção de sulfato utilizando uma água residuária sintética rica em metais e nutrientes, simulando DAM, com relação DQO/SO_4 de 1,0, equivalente a uma concentração de 1500 $mg.L^{-1}$ para ambos.

Referências Bibliográficas

APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environ. Fed., Washington, DC, USA.

Choong, Y. Y., Norli, I., Abdullah, A. Z.,Yhaya, M. F., 2016. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. Bioresource Technol. 209, 369–379.

Cunha, M. P., Ferraz, R. M., Sancinetti, G. P., Rodriguez, R. P., 2018. Long-term performance of a UASB reactor treating acid mine drainage: effects of sulfate loading rate, hydraulic retention time, and COD/SO_4^{2-} ratio. Biodegradation, 29, 1-12.

Fuess, L. T, Ferraz Júnior, A. D. N., Machado, C. B., Zaiat, M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. Bioresource Technol. 247, 426–433

Kiran, M. G., Pakshirajan, K., Das, G., 2017. Heavy metal removal from multicomponent system by sulfate reducing bacteria: Mechanism and cell surface characterization. J. Hazard. Mater. 324, 62–70.

Lens, P.N.L.; Visser, A.; Janssen, A. J. H.; Hulshoff Pol, L. W.; Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. Critical review in Envir. Sc. Tech. 28, 1, 41- 88.

[dataset] Moestedt, J., Nordell, E., Shakeri Yekta, S., Lundgren, J., Martí, M., Sundberg, C., Ejlertsson, J., Svensson, B.H., Björn, A., 2016. Effects of trace element addition on process stability during anaerobic co-digestion of OFMSW and slaughterhouse waste. Waste Manag 47:11–20. https://doi- rg.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.wasman.2015.03.007

[dataset] Paulo, L. M., Ramiro-Garcia,J., van Mourik, S., Stams, A. J. M., Sousa, D. Z., 2017. Effect of Nickel and Cobalt on Methanogenic Enrichment Cultures and Role of Biogenic Sulfide in Metal Toxicity Attenuation Front. Microbiol. 8:1341. doi: 10.3389/fmicb.2017.01341

Plackett RL, Burman JP., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33, 305–325.

Ranquet, C., Ollagnier-de-Choudens, S., Loiseau, L., Barras, F., Fontecave, M., 2007. Cobalt Stress in *Escherichia coli*. The Effect on the iron-sulfur proteins. Journal. Biol. Chem. 282, n.42, 30442–30451.

Silva, A.J., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B., Foresti, E., Zaiat, M., 2006. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea**.** Anaerobe 12, 93-98.

Yildiz, M, Yilmaz, T., Arzum, C. S., Yurtsever,A., Kaksonen, A. H., Ucar, D., 2019. Sulfate reduction in acetate- and ethanol-fed bioreactors: Acidic mine drainage treatment and selective metal recovery. Miner. Eng. 133, 52–59.

Wei, J., Hao, X., van Loosdrecht, M. C. M., Li, J., 2018. Feasibility analysis of anaerobic digestion of excess sludge enhanced by iron: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 89, 16–26.

METATRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF ANAEROBIC DIGESTERS TREATING ANIONIC SURFACTANT CONTAMINATED WASTEWATER

Tiago Delforno[1]; Thais Macedo[2]; Cédric Midoux[3]; Gileno Lacerda[4]; Olivier Rué[5]; Mahendra Mariadassou[6]; Valentin Loux[7]; Maria Bernadete Varesche[8]; Théodore Bouchez[9]; Ariane Bize[10]; Valéria Oliveira[11]

[1,4,11]Pesquisador no Microbial Resources Division, Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture (CPQBA) da UNICAMP;
[2,8] Aluno de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[8] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.
[3,5,6,7,9,10] Pesquisador no L'Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA), Antony/França

Abstract. *Three distinct biological reactors fed with synthetic medium (UASB_Control), synthetic medium and linear alkylbenzene sulfonate (LAS; UASB_SL), and real laundry wastewater (UASB_LW) were compared using a metatranscriptomic approach to determine putative bioindicator genes and taxonomies associated to all steps of anaerobic LAS biodegradation pathway. A homemade bioinformatics pipeline combined with an R workflow was developed to perform the RNAseq data analysis. UASB_SL and UASB_LW showed similar values of LAS biological degradation (~ 47 %) and removal (53 – 55 %). In the first step of LAS biodegradation pathway, fumarate reductase subunit C was detected and taxonomically assigned to the genus Syntrophobacter (0.002 % - UASB_SL; 0.0015 % - UASB_LW; not detected - UASB_Control). In the second step, many enzymes related to beta-oxidation were observed and most of them with low relative abundance in UASB Control and taxonomically related with Smithella, Acinetobacter and Syntrophorhabdus. For the ring cleavage step, the abundance of 6 OCH CoA hydrolase putative gene was ten times higher in UASB_SL and UASB_LW when compared to UASB_Control, and assigned to Desulfomonile and Syntrophorhabdus. Finally, the adenylylsulfate reductase, taxonomically related with Desulfovibrio and Desulfomonile, was observed in the desulfonation step with the highest relative abundance in UASB_LW.*

Introduction

The versatility of surfactant molecules has awakened the interest of different industrial segments for years, resulting, in 2012, in a global market of US$ 26.8 billions and an annual production of 1630 thousand tons.

According to Bain & Company and GasEnergy (2014), the Brazilian market generated US$ 0.75 billion and 293 thousand tons of anionic surfactant in 2012 of the total world production. Although surfactants have important applications in different kinds of industries, the domestic field is the major sector, representing 54% of the total weight against only 32% for the industrial field (Banat et al., 2000). Consequently, the great consumption of surfactants represents a significant problem for the environmental and public health since it has been detected in rivers, sea, soil, domestic sludge and laundry wastewater, among others (Braga & Varesche, 2014). Among all anionic surfactants, the linear alkylbenzene sulfonate (LAS) has been studied by many research groups due to its high worldwide production, low production cost and recalcitrance in the environment and wastewater treatment plants. The main issues include dispersed pollution, foaming in rivers, limitation of oxygen diffusion and inhibition of catalytic microorganisms during natural depuration (García et al., 2005).

A brief review of studies applied to LAS removal shows that different types of biological reactors have already been evaluated under different parameters and operational conditions, such as hydraulic retention times (HRT), concentrations of LAS influent,

temperature, biomass adaptation, influent supplementation, material support and types of wastewater as source of LAS. Molecular biology tools revealed that microorganisms of the domain Archaea are more susceptible to the presence of LAS, especially in reactors without granular biomass, which is known to confer an extra protection to microbial communities. 16S. Recently, a shotgun metagenomics approach was applied to investigate the functional potential of three different anaerobic reactors applied to commercial laundry wastewater treatment (Delforno et al., 2017). However, there is an information gap between the microbial members that are present and the ones that are functionally active in biological reactors applied to LAS removal, which could be clarified by using a shotgun metatranscriptomics approach.

Metatranscriptomics approaches applied to complex ecosystems are challenging due to the low proportion of mRNAs and the presence of inhibitors (humic and fulvic acids and phenolic compounds). Nevertheless, despite these challenges, many works have provided significant contributions in different fields; especially, it has proven to be valuable in the field of anaerobic digestion to elucidate the microbial activity (Kouzuma et al., 2017).

In this framework, the primary goal of the present study was to compare the metatranscriptomic data from three UASB reactors under different feeding types (synthetic medium, synthetic medium + LAS, and commercial laundry wastewater) in order to determine the taxonomies and functions actives involved in the steps of biodegradation pathway of LAS.

Material and Methods

Three UASB laboratory-scale reactors constructed with borosilicate glass and steel parts with a total volume of 350 mL were investigated for approximately 100 days. The reactors were operated in mesophilic conditions (30 ± 1 °C) and inoculated with a granular sludge (60 mgTVS.L^{-1}) from a full-scale UASB plant treating effluents from a poultry slaughterhouse (Dacar Poultry, Tietê-SP, Brazil). The goal was to compare a snapshot view of the active microbial community using shotgun metatranscriptomics on three UASB reactors under different feeding types: synthetic medium (UASB_Control), synthetic medium + LAS (UASB_SL), and commercial laundry wastewater (UASB_LW).

The first reactor was fed with a modified mineral medium (MgCl2 concentration adjusted to 25 mg.L^{-1} ; Angelidaki et al., 1990), vitamins (Touzel & Albagnac, 1983), sodium bicarbonate (400 mg.L^{-1}) and a mixture of co-substrates. These co-substrates consisted of ethanol (150 mgCOD.L^{-1} ; chemical oxygen demand - COD), methanol (150 mgCOD.L^{-1}) and yeast extract (150 mgCOD.L^{-1}). This reactor was considered as the control (UASB_Control) since it was not fed with synthetic LAS or real laundry wastewater. The second reactor (UASB_SL) had the same feeding as UASB_Control, except that synthetic LAS (Aldrich, CAS No. 25155-30-0, technical grade) at a concentration of around 15 mg.L^{-1} was also added. The third reactor (UABS_LW) was not fed with a modified mineral medium but with commercial laundry wastewater diluted with a public water supply to obtain an influent LAS concentration of approximately 30 mg.L^{-1} . Sodium bicarbonate was also added to UASB_LW at a concentration of 400 mg.L^{-1} to maintain a neutral pH. In all reactors, the average hydraulic retention times ranged from 35 to 37 h.

For the metatranscriptomic approach, two technical replicates were sequenced for each UASB reactor, yielding a total of six sequencing datasets. For this, homogeneous samples were collected from the UASB reactors at the end of each operating period, using 15 mL Falcon tubes. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen (~3 min) and stored for less than a week at −80 °C until RNA extraction. Total RNA isolation was carried out from 1.0 g of biomass using RNA PowerSoil Total RNA Isolation™ kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA), following the instruction of the manufacturer and resulting in 100 µL of total RNA extract. To increase the proportion of mRNA in the obtained RNA extracts, Ribo-Zero®

rRNA Removal Kit (Bacteria; Epicentre) was used to remove rRNAs, according to the manufacturer's instructions. The library preparation (Illumina® TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Kit) and metatranscriptomic sequencing (Illumina HiSeq Platform; 2 × 100 bp) were performed at Animal Biotechnology Laboratory, Department of Animal Science (ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brazil) according to specifications of the manufacturer.

Raw data were preprocessed by cutting the adaptors and merging the reads. Then, low-quality sequences (Phred score b 20) were trimmed and reads shorter than 50 bp were discarded using Sickle version 1.33 (Joshi and Fass, 2011). The SortMeRNA program (Kopylova et al., 2012) identified the rRNA sequences that remained after the rRNA depletion step. For this, the SILVA database of rRNA genes for all three domains of life (Bacteria, Archaea and Eukarya) was used as reference. After a normalization step based on kmer counts (khmer), the mRNA reads from the 6 datasets were de novo co-assembled by using Trinity software (Grabherr et al., 2011). A minimal threshold of 150 bp was applied to contig length. For each dataset individually, reads were mapped back to the coassembled contigs using the Bowtie alignment tool (Langmead and Salzberg, 2012). Coding regions of the metatranscriptomic assembly were predicted using FragGeneScan against an NCBI nonredundant (NR) protein database (Rho et al., 2010). For functional annotation, sequences with matches to the eggNOG and KEGG GENES databases were retrieved to establish the categories and reconstruct the metabolic pathways (Huerta-Cepas et al., 2016). For taxonomic classification, Kaiju program with the best hit option assigned the sequences by comparing them to a NCBI-nr database containing microbial and viral protein sequences and by using protein-level classification (Menzel et al., 2016).

Results and Discussion

The specific LAS loading rate (SLLR) in UASB_SL reached 3.3 ± 1.1 $mg.gVS^{-1}.d^{-1}$ (15.4 ± 5.3 $mgLAS.L^{-1}$ influent) and the removal average was of 52.5 ± 17.5 % with a SLRR of 1.9 ± 1.2 $mgLAS.L^{-1}$ (Table 1). By contrast, the values measured for UASB_LW reached more than the double of UASB_SL values for SLLR and LAS influent concentrations, of 7.4 ± 2.8 $mg.gVS^{-1}.d^{-1}$ and 32.5 ± 12.4 $mgLAS.L^{-1}$, respectively. The percentage of LAS removal in the UASB_LW reached 53.9 ± 21.9 %, the SLRR being of 3.9 ± 1.8 $mg.gVS^{-1}.d^{-1}$. In summary, the percentages of LAS removal were similar between both reactors; however, the SLRR was significantly different.

According to the mass balance of LAS, the total amounts of LAS added were of 198 mg and 453 mg for UASB_SL and UASB_LW, respectively. Approximately 7–8 % of the total LAS amount was adsorbed in the granular biomass and 45–47 % were recovered in the effluent. Therefore, the percentages related to biological degradation were similar between the reactors (~ 47 %) and the proportion of removed LAS (biological degradation + adsorption) reached 53–55 %. Okada et al. (2013) also observed limited LAS removal efficiency in UASB reactors, ranging from 39 to 53 %, with values of SOLR (70–110 $mgCOD.gVS^{-1}.d^{-1}$) and SLLR (2–14 $mg.gVS^{-1}.d^{-1}$) similar to the ones obtained in this study. The high recalcitrance of LAS molecule in biological treatment is probably due to the its complex chemical structure, associated with the absence of final electron acceptors in anaerobic conditions (Reddy et al., 2002) and other parameters, such as hydraulic retention time (HRT), co-substrates concentration, bioavailability of LAS and stability of the bioprocess (production of volatile acids; Okada et al., 2013).

Table 1: Operating conditions of the UASB reactors.

Parameters	UASB_Control	UASB_SL	UASB_LW
Mineral medium	+	+	-
Ethanol (mgCOD.L^{-1})	150	150	-
Methanol (mgCOD.L^{-1})	150	150	-
Yeast extract (mgCOD.L^{-1})	150	150	-
Sodium bicarbonate (mg.L^{-1})	400	400	400
Specific organic loading rate (mgCOD.gVS^{-1}.d^{-1})	80 ± 27	73 ± 22	62 ± 26
Standard LAS ▲	-	+	-
Laundry wastewater ●	-	-	+
LAS influent (mg.L^{-1})	-	15.4 ± 5.3	32.2 ± 12.4
HRT (h)	34 ± 2	37 ± 1	35 ± 3
Initial biomass (g.L^{-1})			
Total solids - TS		70.5 ± 2.0	
Total volatile solids - TVS		10.1 ± 0.1	
Total fixed solids - TFS		60.4 ± 2.1	
Duration (days)	99	101	103

▲ Aldrich, CAS No. 25155-30-0. ● Diluted laundry wastewater

Three samples with two technical replicates for each of them were sequenced, yielding six datasets. 38.0 millions reads were obtained per sample, with an average length of 101 bp and GC percentage ranging from 51 to 54 %. After the preprocess step (removal of rRNA, low-quality reads and adaptor sequences), the number of reads ranged from 3 to 18 millions according to the dataset. The lowest values corresponded to the sample UASB_LW that presented the highest proportion of rRNA sequences despite the use of an rRNA depletion step before library preparation and sequencing. After preprocessing and merging of the overlapping paired-end reads, the average read length ranged from 119 bp to 124 bp. A total of 10,725–31,925 contigs were subsequently obtained by co-assembly.

The raw and filtered data showed similar arrangement patterns using Bray-Curtis and Jaccard distance. The points corresponding to pairs of technical replicates were very close, indicating high correlation between them. Among the samples, the points from UASB_Control and UASB_SL were closer from each other than from UASB_LW. A similar pattern was observed after combining the technical replicates. Except for the presence of surfactant in reactor UASB_SL, UASB_Control and UASB_SL reactors presented the same characteristics of feeding which must have led to a higher similarity of metabolic activities.

To gain insights into the transcriptionally active members of the biological reactors applied to surfactant treatment, the taxonomic profile was inferred from mRNA sequences of the metatranscriptome datasets. Taxonomic classification revealed that only 27–53 % of the reads could be assigned at the domain level. The percentage of reads assigned to archaea ranged from 7 to 10 %, whereas reads assigned to Bacteria domain represented 17 to 44 % of total reads. Low percentages of reads were assigned to Eukarya domain (0.55–1.6 %) and to Viruses (0.03–0.22 %). Euryarchaeota phylum and Methanoregulaceaea and Methanosaetaceae families were the most represented within the Archaea domain. For the Bacteria domain, the most represented phyla were Proteobacteria, Synergistetes, Bacteroidetes and Actinobacteria; and the most abundant families were Streptomycetaceae, Synergistaceae and Bacteroidaceae At the genus level, Archaea were dominated by the genera *Methanosaeta* and *Methanoregula*, which moreover showed significantly different levels among samples.

Based on previous studies, the core microbial consortium associated with the different stages of LAS degradation can be predicted to be composed of the following genera: *Clostridium*, *Desulfovibro*, *Geobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Syntrophorhabdus*, *Syntrophus* and *Synergistes* (Centurion et al., 2018). All these genera were identified in the

metatranscriptomic dataset. Interestingly, the presence of *Syntrophorhabdus* and *Syntrophus* genera with a genetic potential for aromatic ring cleavage under anaerobic conditions has been recently reported by phylogenetic analysis of bamA gene sequences (Centurion et al., 2018). In the metatranscriptomic dataset, the relative abundance of these genera was lower in the UASB_Control (0.008–0.0067 %) compared to UASB_SL (0.069–0.348 %) and UASB_LW (0.072–0.306 %), which were fed with the surfactant.

To reveal the active microbial functional profile, total mRNA reads were annotated according to the KEGG database categories (Figure 1). ccording to Lara-Martin et al. (2010), anaerobic degradation of LAS involves (i) fumarate addition to the alkyl chain, (ii) subsequent β-oxidation reactions, (iii) ring cleavage and (iv) desulfonation process. Therefore, comparing the relative abundance in the metatranscriptomics datasets and using the biodegradation pathway proposed by LaraMartin et al. (2010), active genes were detected in each step of LAS degradation.

For the fumarate addition to the alkyl chain, the fumarate reductase subunit C (frdC; K00246) was detected and taxonomically assigned to the genus *Syntrophobacter*. This enzyme was observed with relative abundances of 0.0002 % and 0.0015 % in the UASB_SL and UASB_LW, respectively, but it was not observed in UASB_Control. A greater relative abundance was observed in UASB_LW, the reactor that showed the highest specific LAS removal (3.9 ± 1.8 mg.gVS^{-1}.d^{-1}).

Many enzymes related to the beta-oxidation step were observed and the majority with low relative abundance in UASB Control when compared to UASB_SL and UASB_LW. Taxonomic assignment indicated that the genera *Smithella*, *Acinetobacter*, *Syntrophorhabdus*, *Amniphilus* and *Azovibrio* were the most abundantly related to the beta-oxidation step. In the ring cleavage step, only the enzyme K07539 (6-oxocyclohex-1-ene carbonyl-CoA hydrolase; 6-OCH-CoA) was observed. This enzyme was ten times more abundant in UASB_SL and UASB_LW than in UASB_Control. Two genera were assigned to this enzyme: *Desulfomonile* and *Syntrophorhabdus*. According to Kuntze et al. (2008), this enzyme cleaves the aromatic ring into an aliphatic thiol ester and the name of the gene related to this enzyme is bamA. The bamA gene has already been detected in EGSB pilot-scale reactor applied to co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage (Centurion et al., 2018). According to the authors, bamA genes were closely related to the ones from *Syntrophorhabdus* and *Syntrophus*. Lastly, six different KO numbers were observed in the desulfonation step that consists in the removal of sulfur compounds from aliphatic and aromatic compounds (Cook et al., 1998). Interestingly, no enzymes related to desulfonation were observed in UASB_Control. On the other hand, UASB_LW presented higher relative abundances of such enzymes compared to UASB_SL. Physicochemical characterization of laundry wastewater showed high concentration of sulfate (590 ± 30 mg.L^{-1}), that could be explain the high activity of this enzyme family in UASB_LW, specially K00394 and K00395 (adenylylsulfate reductase), responsible for dissimilatory sulfate reduction (sulfate $\geq$ H_2S; Michaels et al., 1970). The main genera assigned to desulfonation step were *Desulfovibrio*, *Desulfomonile*, *Desulfobacterium* and *Desulfomicrobium*.

Therefore, active biological functions and their assigned taxonomies enabled to define an active microbial consortium involved in the biodegradation of LAS in anaerobic conditions.

Steps of LAS degradation and Enzymes	UASB_Control	UASB_SL	UASB_LW
(A) Fumarate Addition			
K00246 (fumarate reductase)	0	0.0002	0.0015
(B) Beta-oxidation			
K00059 (3-oxoacyl-acyl- reductase)	0.0019	0.0240	0.0054
K00208 (enoyl-acyl- reductase)	0.0001	0.0086	0.0011
K00249 (acyl-CoA dehydrogenase)	0.0001	0.0004	0
K00507 (stearoyl-CoA desaturase)	0	0.0002	0
K00626 (acetyl-CoA C-acetyltransferase)	0.0051	0.0174	0.0186
K00632 (acetyl-CoA acyltransferase)	0.0012	0.0024	0.0100
K00645 (acyl- S-malonyltransferase)	0	0.0061	0.0082
K00647 (3-oxoacyl-acyl-carrier synthase)	0.0002	0.0008	0.0008
K00648 (3-oxoacyl-acyl-carrier synthase)	0.0006	0.0172	0.0118
K01692 (enoyl-CoA hydratase)	0.0003	0.0002	0
K01716 (3-hydroxyacyl-acyl dehydratase)	0	0.0008	0
K01825 (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)	0	0.0005	0
K01897 (acyl-CoA synthetase)	0.0047	0.0192	0.0307
K01961 (acetyl-CoA carboxylase)	0	0.0019	0.0048
K01962 (acetyl-CoA carboxylase)	0.0001	0.0027	0.0003
K01963 (acetyl-CoA carboxylase)	0.0003	0.0011	0
K02160 (acetyl-CoA carboxylase)	0.0001	0.0006	0
K02371 (enoyl-acyl-carrier reductase)	0.0001	0.0008	0.0003
K02372 (3-hydroxyacyl-acyl-dehydratase)	0	0.0011	0.0009
K07516 (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)	0.0002	0.0039	0.0155
K09458 (3-oxoacyl-acyl-synthase)	0.0020	0.0402	0.0432
(C) Ring Cleavage			
K07539 (6-oxocyclohex-1-ene-carbonyl-CoA hydrolase)	0.0011	0.0111	0.0106
(D) Desulfonation			
K00956 (sulfate adenylyltransferase)	0	0.0008	0
K00957 (sulfate adenylyltransferase)	0	0.0007	0
K00958 (sulfate adenylyltransferase)	0	0.0003	0.0337
K00394 (adenylylsulfate reductase)	0	0.0002	0.1421
K00395 (adenylylsulfate reductase)	0	0.0001	0.0334
K00390 (phosphoadenosine phosphosulfate)	0	0.0024	0.00289

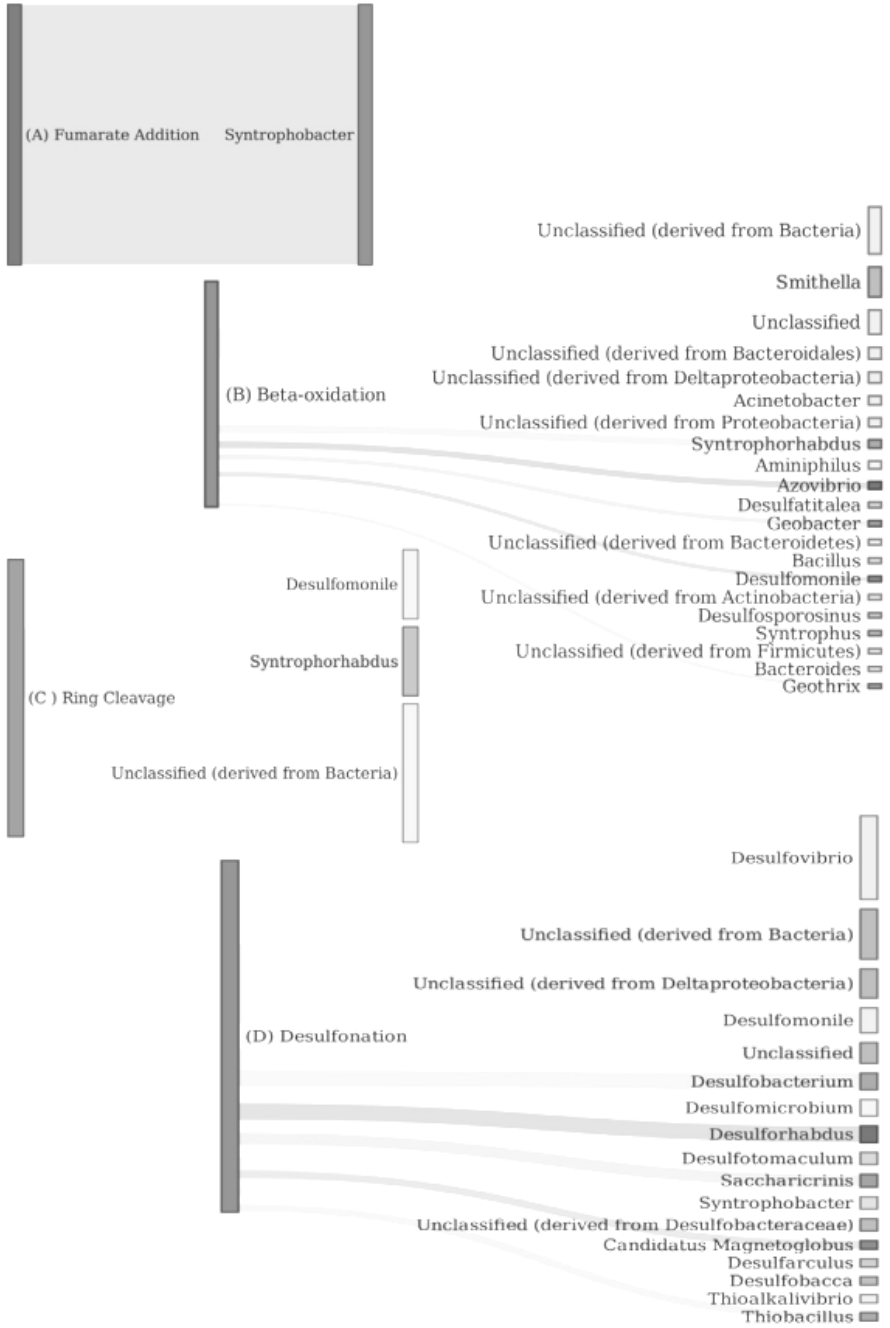


Figure 1: Relative abundance of active genes found in each steps of LAS degradation (left hand side). Taxonomy assigned from the active genes found in each step of LAS degradation (right hand side).

Conclusions

This study determined putative bioindicator genes and taxonomies associated to all steps of anaerobic LAS biodegradation pathway. Our data support the implication of fumarate reductase genes attributed to the genus *Syntrophobacter* in the initial stages of degradation. In the beta-oxidation step, the most representative genera were *Smithella*, Acinetobacter and *Syntrophorhabdus*, whereas in the ring cleavage step, transcripts for 6-OCH-CoA hydrolases were observed and assigned to *Desulfomonile* and *Syntrophorhabdus* genera. Finally, active genes coding for enzymes of the desulfonation step were observed and assigned to the genera *Desulfovibrio*, *Desulfomonile* and *Desulfobacterium.*

References

GasEnergy, B.C.a, 2014. Potencial de diversificação da indústria química. Tensoativos. 399–419.

Angelidaki, I., Petersen, S.P., Ahring, B.K., 1990. Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 469–472.

Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 495–508.

Braga, J.K., Varesche, M.B.A., 2014. Commercial laundry water characterisation. Am. J. Anal. Chem. 5, 8–16.

Centurion, V.B., Moura, A.G.L., Delforno, T.P., Okada, D.Y., Dos Santos, V.P., Varesche, M.B.A., Oliveira, V.M., 2018. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: the influence of surfactant concentration on microbial diversity. Int. Biodeterior. Biodegrad. 127, 77–86.

Cook, A.M., Laue, H., Junker, F., 1998. Microbial desulfonation. FEMS Microbiol. Rev. 22 (5),

Delforno, T.P., Lacerda, G.V., Sierra-Garcia, I.N., Okada, D.Y., Macedo, T.Z., Varesche, M.B.A., Oliveira, V.M., 2017. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. Sci. Total Environ. 587–588.

García, M.T., Campos, E., Ribosa, I., Latorre, A., Sánchez-Leal, J., 2005. Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: biodegradation kinetics and metabolite analysis. Chemosphere 60, 1636–1643.

Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat. Biotechnol. 29, 644.

Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M.C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. Nucleic Acids Res. 44, D286–D293.

Joshi, N.A., Fass, J.N., 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at. https://github.com/najoshi/sickle.

Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H., 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. Bioinformatics 28 (24), 3211–3217

Kouzuma, A., Tsutsumi, M., Ishii, S.i., Ueno, Y., Abe, T., Watanabe, K., 2017. Non-autotrophic methanogens dominate in anaerobic digesters. Sci. Rep. 7 (1), 1510.

Kuntze, K., Shinoda, Y., Moutakki, H., McInerney, M.J., Vogt, C., Richnow, H.H., Boll, M., 2008. 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. Environ. Microbiol. 10, 1547–1556.

Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. Nat. Methods 9, 357.

Lara-Martin, P.A., Gomez-Parra, A., Sanz, J.L., Gonzalez-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., Gómez-Parra, A., Sanz, J.L., González-Mazo, E., 2010. Anaerobic degradation pathway of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sulfate-reducing marine sediments. Environ. Sci. Technol. 44, 1670–1676.

Menzel, P., Ng, K.L., Krogh, A., 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat. Commun. 7, 11257.

Okada, D.Y., Delforno, T.P., Esteves, A.S., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2013. Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. Bioresour. Technol. 128

Reddy, C.M., Eglinton, T.I., Hounshell, A., White, H.K., Xu, L., Gaines, R.B., Frysinger, G.S., 2002. The West Falmouth oil spill after thirty years: the persistence of petroleum hydrocarbons in marsh sediments. Environ. Sci. Technol. 36, 4754–4760.

Rho, M., Tang, H., Ye, Y., 2010. FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. Nucleic Acids Res. 38 (20), e191.

Touzel, J.P., Albagnac, G., 1983. Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC3. FEMS Microbiol. Lett. 16, 241–245.

AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE METANO, DE ÁCIDOS VOLÁTEIS E DA ATIVIDADE METANOGÊNICA NO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE REATORES.

Valéria Del Nery[1]; Marcia H. R. Z. Damianovic[2]; Moacir, M. Araujo Jr.[3], Eduardo C. Pires [2]

[1] Pesquisadora Colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Bioproj-Tecnologia Ambiental

Resumo. *Reatores anaeróbios em diversas escalas já foram utilizados em estudos científicos e tecnologicamente para degradação da vinhaça e geração de biogás. Entretanto, devido às lacunas de projeto e às dificuldades de manutenção do processo anaeróbio de alta taxa para degradação da vinhaça existem muitas etapas a serem cientificamente investigadas para possibilitar projetos de reatores anaeróbios de alta taxa compactos e eficientes que atinjam o potencial máximo de remoção de matéria orgânica e de produção de biogás. Este projeto tem como objetivo a avaliação da geração de metano e de ácidos voláteis no processo de digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores de diversas escalas e obtenção da atividade metanogênica específica do lodo anaeróbio presente nos reatores sob incrementos de cargas orgânicas e taxas hidráulicas. Esta avaliação é importante para verificar as similaridades e incrementar o conhecimento do processo de digestão anaeróbia em diferentes configurações de reatores sob diferentes condições operacionais.*

Introdução

A degradação anaeróbia da vinhaça em escala industrial é um desafio e está vinculada à utilização de bases científicas e tecnológicas para a otimização do processo bioquímico e do projeto de reator. Resultados recentes obtidos com Reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) em escala piloto (LPB-EESC-USP), operados com vinhaça concentrada (20 g DQO L-1) sob diferentes parâmetros operacionais, mostraram elevada produtividade de metano e evidenciaram a potencialidade de produção de energia a partir deste substrato com o protocolo de partida adotado (Projeto de pós-doutorado Senior-CNPq-158721/2012-8 e Projeto de auxílio FAPESP- 2013/17591-1). Entretanto, a complexidade do tratamento anaeróbio da vinhaça requer que estudos complementares abordem o desenvolvimento de mecanismos que assegurem a permanência da biomassa na área de reação e o aprofundamento do conhecimento da degradação anaeróbia da vinhaça com características variáveis ao longo da safra. O reator anaeróbio híbrido (HAnR), desenvolvido pela Bio Proj Tecnologia Ambiental Ltda., é uma alternativa tecnológica para suprir as deficiências detectadas nos reatores UASB para a degradação da vinhaça. Caracterizado por ter uma camada de material suporte para adesão da biomassa (Biobob®) acima da manta de lodo, o reator HAnR possui alta capacidade de retenção de sólidos e maior concentração de biomassa na área de reação devido ao Biobob®, melhorando o desempenho e permitindo velocidades ascensionais elevadas em reatores mais compactos. Estudos com este reator está sendo desenvolvido no projeto PIPE FAPESP (Processo n. 2015/22729-8), com o objetivo principal da adequação da configuração, do protocolo de partida e da operação continua do reator HAnR em escala piloto implantado em uma usina de açúcar e álcool, visando o estabelecimento do processo anaeróbio para a contínua degradação da vinhaça e a maximização da produção de metano.

O Monitoramento do processo anaeróbio é uma das estratégias para o sucesso de reatores do laboratório e reatores em escala plena de operação. A avaliação da eficiência

reatores é realizada principalmente por meio de análises físico-químicas que seguem procedimentos bem definidos. O teste de atividade metanogênica específica (AME) pode ser usado para a avaliação de lodo anaeróbio em reatores. Esta técnica mede o potencial de lodo anaeróbio para converter matéria orgânica em metano e é uma ferramenta importante para avaliar a eficiência de microrganismos anaeróbios na operação do reator. Os métodos manométricos para medir a geração de metano são vantajosos devido ao processo de monitoramento e automação de linha.

Neste projeto serão avaliadas a geração de metano e a variação de ácidos voláteis ao longo do perfil de diferentes configurações de reatores anaeróbios na degradação da vinhaça de cana-de-açúcar sob incrementos de cargas orgânicas e taxas hidráulicas. Será obtido o protocolo de atividade metanogênica do lodo proveniente de reatores de alta taxa. Esta avaliação é importante para verificar as similaridades e incrementar o conhecimento do processo de digestão anaeróbia em diferentes configurações de reatores sob diferentes condições operacionais.

Material e Métodos

Este trabalho será dividido em 4 módulos (Figura 1). Análise estatística e interpretação matemática dos resultados obtidos no projeto de pós-doutorado Sênior-CNPq-158721/2012-8 e Projeto de auxílio FAPESP- 2013/17591-1. Análise dos resultados obtidos ao longo da operação do reator anaeróbio híbrido projeto PIPE FAPESP (Processo n. 2015/22729-8). Serão analisadas a produção de biogás e as concentrações de ácidos orgânicos ao longo do perfil de reatores. Será obtido do protocolo de atividade metanogênica para reatores tratando vinhaça. Para finalização serão apresentadas as diretrizes de projeto em escala plena.

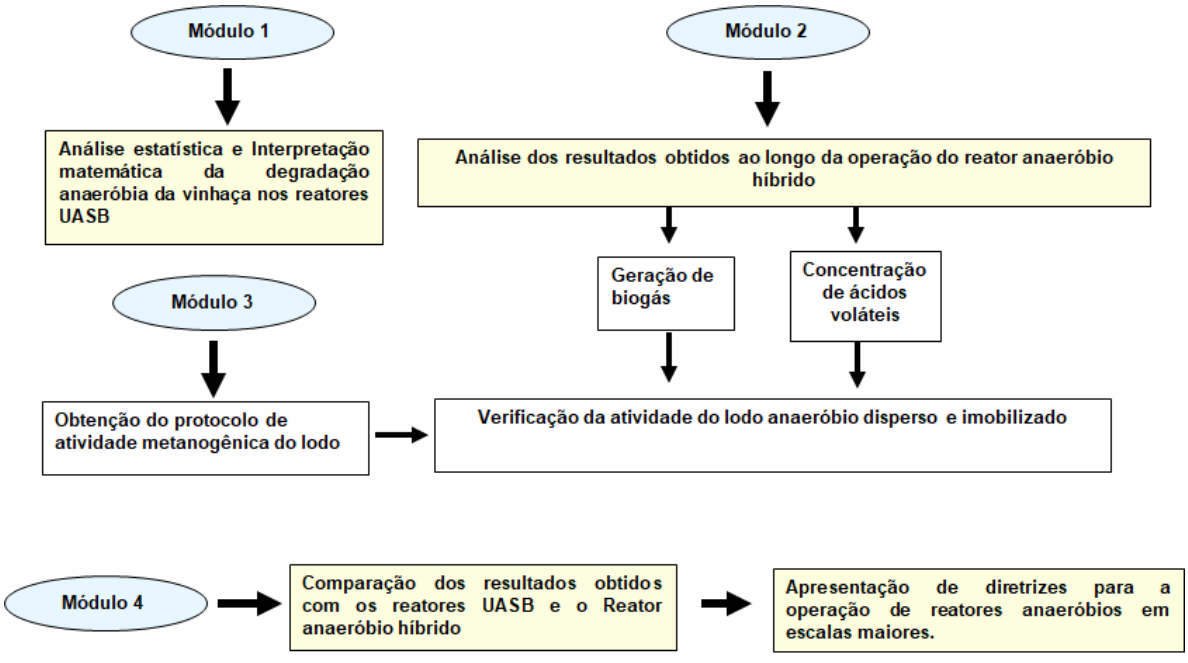


Figura 1: Fluxograma das etapas do trabalho de pesquisa

Módulo 1: Análise dos resultados obtidos com os reatores UASB operados sob diferentes cargas orgânicas volumétricas e taxas hidráulicas (Projeto de pós-doutorado Senior-CNPq-158721/2012-8 e Projeto de auxílio FAPESP- 2013/17591-1)

Será realizada a análise estatística dos resultados obtidos da operação dos reatores sob

diferentes cargas orgânicas e taxas hidráulicas. Serão analisados os resultados de remoção de matéria orgânica, produção de metano e de ácidos voláteis totais e orgânicos.

Serão utilizados testes paramétricos para comparação dos efeitos operacionais em cada fase operacional. O principal teste a ser aplicado será a analise de variância.

Módulo 2: Obtenção e análise dos resultados de geração de biogás e ácidos voláteis do Reator Anaeróbio Híbrido PIPE FAPESP (Processo n. 2015/22729-8).

O reator está em operação e em fase de obtenção dos resultados. Será realizada a análise estatística dos resultados obtidos da operação do reator ao longo do período operacional. Serão analisados os resultados de produção de metano e de ácidos voláteis totais e orgânicos.

Serão utilizados testes paramétricos para comparação dos efeitos operacionais em cada fase operacional. O principal teste a ser aplicado será a analise de variância.

Módulo 3: Obtenção do protocolo de atividade metanogênica específica do lodo

Será obtido o protocolo de atividade metanogênica específica para lodo anaeróbio proveniente de reatores tratamento vinhaça. Este protocolo especial tem como objetivo obter a atividade metanogênica para lodo em reatores de alta taxa.

Módulo 4: Comparação dos resultados e apresentação de diretrizes para a operação de reatores em maiores escalas

A análise dos resultados da digestão anaeróbia em diferentes tipos de reatores gerará conhecimento para a obtenção de diretrizes para o aumento de escala de reatores anaeróbios no tratamento de vinhaça.

Sistemas operacionais

Reatores UASB: Os reatores com capacidade de 63L na área de reação (2 m de altura) e volume total de 126 L (4 m de altura total) foram construídos em coluna de PVC com 20 cm de diâmetro, equipados com separadores gás-sólido e providos de dispositivos de recirculação (baseados nas instalações experimentais de Leitão, 2004). Os reatores UASB modificados, em escala piloto, foram submetidos a taxas de recirculação de 50% a 400%, foram alimentados com vinhaça de cana-de açúcar com DQO de 19400±5675 g/L. Os reatores foram submetidos a cargas orgânicas volumétricas (COV) crescentes de 0,6 a 33 kgDQO/m3.dia. A Figura 2 apresenta o desenho esquemático do sistema operacional. Foi utilizada vinhaça proveniente de usina de açúcar e álcool na concentração de aproximadamente 20 g/L.

Reator anaeróbio híbrido: O reator anaeróbio híbrido foi em fibra de vidro com geometria cilíndrica, com dimensões de 1,20 m de diâmetro e 6,00 m de altura, com volume total de 6,4 m³. O leito reacional é dividido em uma camada de manta de lodo com volume de 2 m³ e uma camada de material suporte (Biobob ®) com volume de 3 m³ (Figura 3).

Teste de atividade metanogênica

O teste de atividade metanogênica será realizado no sistema Oxitop©. O sistema Oxitop© é um equipamento manométrico que consiste de um frasco de vidro com duas aberturas laterais (Figura 4a) provido de um transdutor de pressão localizado em uma cabeça de medição, selados por um septo de borracha e por uma válvula de teflon hermético, são utilizados para injeções de substrato e para a descarga de biogás. Durante os testes anaeróbios, frascos são mantidos em estufa a temperatura desejada e agitados; a sobrepressão devida a acumulação de biogás no headspace é automaticamente registrado pelas cabeças de medição (Figura 4b). Levando-se em conta o volume do headspace, a temperatura de incubação, a equação de gás ideal de estado permite o cálculo de volumes de biogás a partir de dados acumulados de sobre pressão.

Existe uma cesta de borracha no headspace dos frascos onde são adicionadas lentilhas

de NaOH para adsorção do CO2 produzido pelos processos biológicos. Essa premissa é fundamental para os cálculos de produção de gases, sejam ensaios metanogênicos ou desnitrificantes. Em ensaios de atividade anammox específica não é necessária a adição de NaOH, pois não é produzido CO2. O teste para adsorção de CO2 nas lentilhas já foi realizado e comprovada sua eficiência.

.

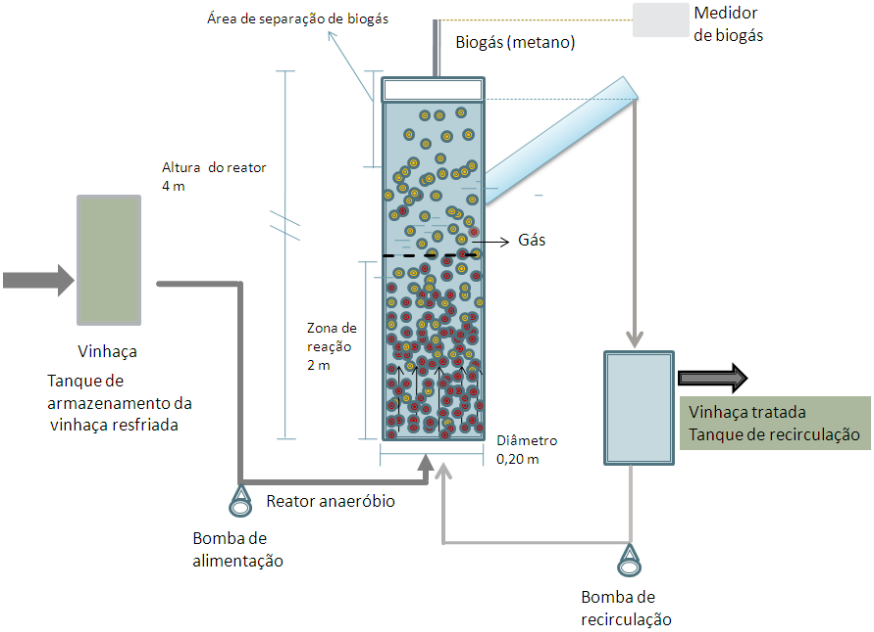


Figura 2: Desenho esquemático das instalações experimentais com reator UASB

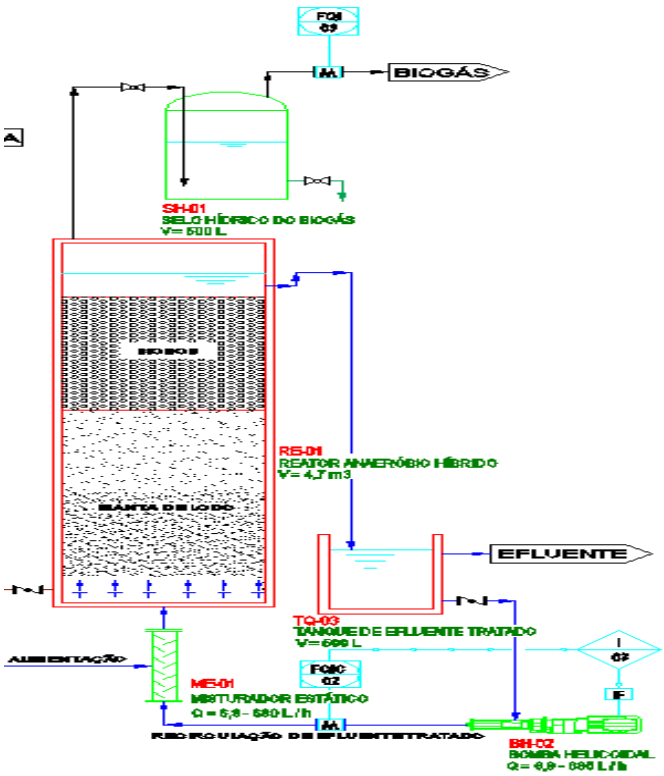


Figura 3: Desenho esquemático do Reator anaeróbio híbrido

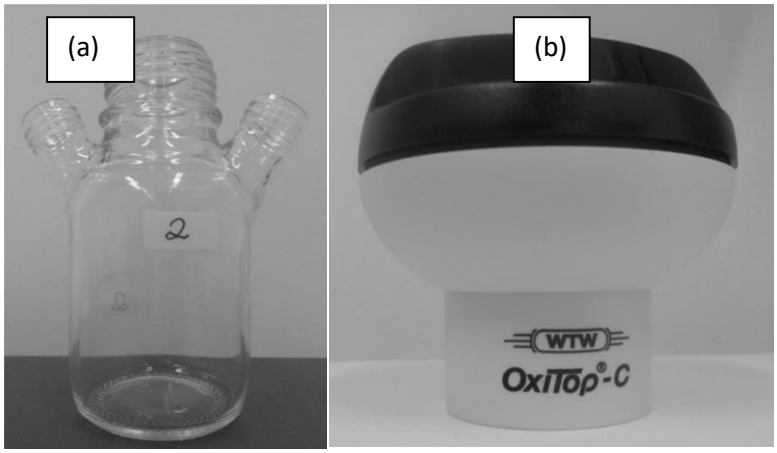


Figura 4. (a) Frasco utilizado nos ensaios; (b) Cabeça que determina e armazena os dados de pressão

Os testes serão realizados variando-se o tipo de substrato orgânico, a concentração de matéria orgânica e a concentração da biomassa, totalizando 18 ensaios, conforme Figura 5. Todos os testes devem ser realizados em triplicata, com temperatura da câmara mantida em 30±1˚C.

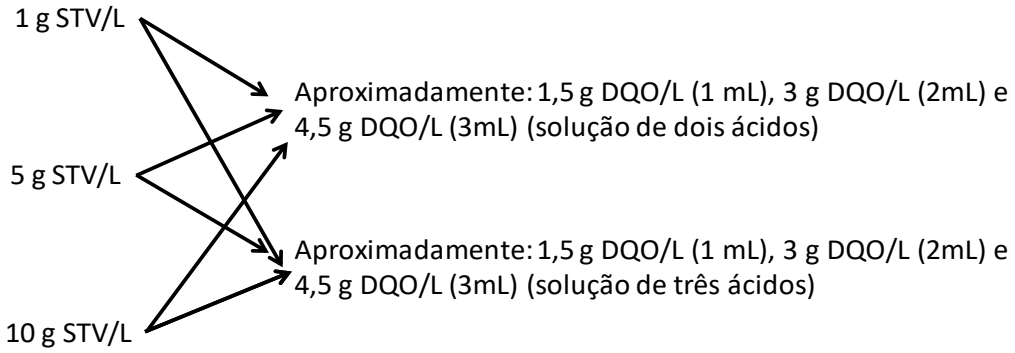


Figura 5. Parâmetros variados nos teste de AME

Determinações analíticas durante a operação dos reatores

As análises de monitoramento dos reatores são realizadas de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). Ácidos voláteis totais serão analisados de acordo com DiLallo e Albertson (1961), alcalinidade a bicarbonato de acordo com Ripley et al. (1986). A composição de ácidos voláteis será analisada pelo cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 (Shimadzu Corp., Japão). A composição de gás será realizada no cromatógrafo a gás Shimadzu (GC 2014 model), com detector de condutividade térmica e coluna HP-PLOT (30m x 0,53mm). A medida da vazão de biogas foi realizada pelo medidor de gas Ritter modelo TG 0.5 e por medidor termal modelo RTII (Contech).

Referências Bibliográficas

DiLallo, R. and Albertson, O.E., 1961. Volatile acids by direct titration. J. Water Pollut. Control Fed., 33(4), 356-365.

Ripley, L. E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. J. Water Pollut. Control Fed, 58(5), 406-411.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2005. 21th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC. ISBN 0-87553-161-X.

CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE EFLUENTE TÊXTIL SALINO COM LEVEDURA RESIDUAL ORIUNDA DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, VISANDO REMOÇÃO DE COR E PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Heitor Róger Alves e Dias [1]; Márcia H. R. Z. Damianovic [2]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A indústria têxtil e de confecções apresenta grande relevância para o estado de São Paulo. Associado ao processo de produção está a geração de efluente caracterizado pela elevada concentração de sais, corantes não totalmente fixados no processo de tingimento entre outros compostos utilizados no processo produtivo. Tais características conferem à essa água residuária elevado potencial poluidor, requerendo complexidade no processo de tratamento. O tratamento anaeróbio é o mais indicado na remoção de cor em efluentes têxteis, em condição de anaerobiose os corantes apresentam-se como aceptores preferenciais de elétrons. Neste estudo, será investigada a co-digestão de efluente têxtil sintético salino contendo o corante Direct Blue 71 com levedura residual oriunda do processo de fermentação cervejeira, que apresenta-se como fonte de doadores de elétrons e nutrientes, importantes para as reações de biodegradação pretendidas. Os ensaios de degradação anaeróbia serão realizados em reatores com alimentação em batelada, visando avaliar a proporção da mistura dos resíduos, os efeitos da salinidade e das diferentes cargas orgânicas, oriundas da levedura residual, na remoção de cor, e geração de metano. O estudo da dinâmica dos processos bioquímicos e as interações das populações microbiana no processo de degradação serão acompanhadas por biologia molecular e análises físico-químicas.*

Introdução

A indústria têxtil apresenta grande relevância para a indústria nacional e, em especial, para o estado de São Paulo, que é responsável por 31,2% do valor bruto de produção nacional, valor na ordem de 25,9 bilhões de reais no ano de 2016 (SIDRA/IBGE, 2017).

Associados aos processos de produção da indústria têxtil e de confecção, tem-se a geração de efluentes caracterizados pela presença de corantes, sais, sólidos e elevada DQO, gerados em diferentes pH (Bisschops e Spanjers, 2003).Este efluente apresenta potencial poluidor, visto que apresentam capacidade de alteração da qualidade da água em corpos hídricos pelo consumo de oxigênio, conferindo cor, afetando os processos fotossintéticos, contaminação por compostos tóxicos à fauna e flora, entre outros efeitos adversos.

A legislação brasileira impõe limites para alguns parâmetros (pH, temperatura, concentração de óleos e graxas, demanda bioquímica (DBO), contaminantes orgânicos e inorgânicos, entre outros) de lançamentos de efluentes e suas condições e padrões de lançamento de acordo com o enquadramento do corpo hídrico (Brasil, 2005, 2011). Dessa forma, segundo a resolução, o efluente não deve alterar as características de enquadramento do corpo hídrico receptor e deve cumprir as metas obrigatórias da qualidade do efluente. Um outro ponto a ser considerado está relacionado à presença de corantes nos efluentes das indústrias têxteis. A legislação não estabelece limites para o lançamento de efluentes com coloração, apenas determina que o efluente não deve alterar a classificação do corpo hídrico. A maioria das empresas apenas cumpre a legislação, uma vez que condicionantes do licenciamento ambiental visam a manutenção da qualidade dos corpos d'agua e o equilíbrio dos compartimentos ambientais.

Os azo corantes são os mais utilizados pela indústria têxtil, sendo produzidas cerca de 7×10^5 toneladas anualmente (Puvaneswari, Muthukrishnan e Gunasekaran, 2006). Diferentes

tecnologias são utilizadas com o objetivo de remoção de cor de efluentes têxteis, sendo a tecnologia anaeróbia considerada uma das mais adequadas. Em condições de anaerobiose, os azo corantes são os aceptores finais de elétrons, dessa forma obtendo-se uma melhor remoção de cor (Santos, 2004). Por outro lado, deve-se atentar ao fato de que processo de remoção de cor em condições anaeróbias está associado ao rompimento da ligação azo, que ao fim leva à geração de aminas aromáticas (Jayapal et al., 2018; Popli e Patel, 2014). Tais compostos conferem potencial tóxico e recalcitrante ao efluente, necessitando de um pós tratamento, sendo normalmente empregado sistemas aeróbios (Van Der Zee e Villaverde, 2005).

Limitações da utilização da tecnologia anaeróbia na remoção de cor estão associadas à velocidade do processo e à ausência de doadores de elétrons no meio. Estudos mostraram que os mediadores redox podem ser utilizados como forma de acelerar a transferência de elétrons no processo de descoloração redutiva dos corantes azo (Encinas-Yocupicio et al., 2006; Van der Zee e Cervantes, 2009). Segundo Costa et al.(2010), a presença de um co-subtrato, que será fonte de nutrientes e funcionará como doador de elétrons na reação de descoloração, é condição importante para boa capacidade de remoção de cor em biorreatores operados sob condições anaeróbias. A co-digestão possibilita a inserção de nutrientes aos microrganismos no processo de tratamento não presentes em determinados efluentes, como é o caso dos efluentes têxteis.

A levedura residual é um resíduo gerado durante o processo de fermentação alcoólica. Este resíduo apresenta elevada concentração de sólidos, alto teor proteico, presença de lipídeos, RNA, vitaminas (em especial as do complexo B), minerais (Ca, P, K, Mg, Fe, entre outros), presença de açúcares não fermentados na fase líquida, ácidos orgânicos, álcool, entre outros compostos orgânicos gerados no processo de fermentação (Caballero-Córdoba, Pacheco, e Sgarbieri, 1997).

A levedura residual apresenta DQO variando de 160-277g.L^{-1}, fato justificado pela grande quantidade de sólidos, etanol , açúcares entre outros compostos presente na suspensão (di Biase et al., 2018; Neira e Jeison, 2010; Zupančič, Panjičko, e Zelić, 2017). Tal característica, associada à presença de nutrientes e da riboflavina, faz desse efluente agroindustrial uma boa fonte de doadores de elétrons, mediador redox e nutrientes para a digestão com efluentes têxteis.

A partir das características dos efluentes têxteis combinada com a das leveduras residuais de cervejarias, pretende-se avaliar a potencialidade da codigestão de ambos os resíduos em processo anaeróbio visando a remoção de cor e geração de metano.

Material e Métodos

Levedura residual

A levedura residual será obtida em uma cervejaria artesanal, localizada em Araraquara (SP). A levedura será coletada diretamente das dornas de fermentação onde o processo já se encontra na fase final de produção e nas quais a levedura seria destinada ao descarte. A levedura residual será centrifugada para armazenamento. A parte sólida será armazenada em baixas temperaturas (aproximadamente 3ºC) e a fase líquida congelada (-10 a -5ºC), visando diminuir a degradação do efluente.

A suspensão de levedura residual será avaliada em relação aos parâmetros de DQO total e dissolvida(APHA, AWWA, e WEF 2012), pH (Potenciômetro), série de sólidos (APHA, AWWA, e WEF 2012), nitrogênio Kjeldahl (NTK) (APHA, AWWA, e WEF 2012), carboidratos (Dubois et al., 1956), determinação dos principais açúcares e etanol (Sluiter et al., 2008).

Efluente Sintético

O Direct Blue 71 (DB71) foi escolhido como corante azo modelo. Para a preparação de solução stock do corante serão dissolvidos 7,5g de DB71 em 1L de água destilada.

A definição das concentrações dos componentes da água residuária sintética e solução nutriente utilizadas nos testes foi baseada em estudos tratando efluentes têxteis sintéticos e reais (Costa et al., 2010; Santos, 2012), conforme apresentado na Tabela 1. A solução de micronutrientes será a utilizada por Amorin et al. (2013).

Tabela 1: Composição do efluente têxtil sintético, $mg.L^{-1}$

Parâmetro	Ensaios em batelalda
DB22	65
NaCl	1500-15000
pH	6,8-7,2
DQO Doador de elétrons (Levedura residual)	500-2500
K_2HPO_4	250
$MgSO_4.7H_2O$	50
$CaCl_2$	5
$NaHCO_3$	600
Micronutrientes	1 $mL.L^{-1}$

Origem dos microrganismos

O inóculo anaeróbio utilizado nos ensaios em batelada e contínuo será proveniente de dois reatores UASB (upflow anaerobic sludge blanket), da Avícola Dacar (Indústria de criação e produção de aves) e da Avícola Ideal, em Pereiras SP, visando obter uma biomassa com uma maior diversidade microbiana. O inoculo será caracterizado pela série de sólidos por análise gravimétrica (APHA, AWWA, e WEF, 2012).

Ensaios em Batelada

Ensaios em batelada serão realizados com o objetivo de avaliar o efeito da matéria orgânica e da salinidade na água residuária sintética para remoção de cor e matéria orgânica, pela geração de metano, no processo de co-digestão. As variáveis a serem estudas foram escolhidas devido ao impacto na atividade microbiana, remoção de cor e produção de biogás. Os níveis de estudos para a salinidade foram definidos a partir das características de efluentes têxteis reais e de estudos dos efeitos da salinidade em microrganismos tratando efluentes em ambiente anaeróbio. Os níveis da DQO fornecida pela levedura residual foram definidos a partir de processos tratando levedura residual como co-substrato.

Nos testes em batelada será utilizado o planejamento fatorial 3^2 com duas repetições, totalizando 18 ensaios. Os fatores estudados serão a DQO pela adição de levedura residual e a salinidade .Os resultados dos experimentos (Tabela 2) serão analisados com o uso do software Statistica 9.0 e o ajuste do modelo será avaliado por análise de variância (ANOVA).

Os ensaios serão realizados em reatores com capacidade de 1L, preenchidos em 60% do volume com efluente a ser co-digerido e inóculo. Será mantida relação alimento microrganismo de 0,4 $gDQOgSSV^{-1}$. Serão realizadas as análises de cor , DQO, produção de biogás e concentração de metano, pH, condutividade e avaliação qualitativa de geração de aminas (Tabela 3).

Tabela 2: Condições experimentais do planejamento

Experimentos	DQO ($mg.L^{-1}$)	($mgNaCl.L^{-1}$)	Experimentos	DQO ($mg.L^{-1}$)	($mgNaCl.L^{-1}$)
1	500	1500	6	1500	15000
2	500	8250	7	2500	1500
3	500	15000	8	2500	8250
4	1500	1500	9	2500	15000
5	1500	8250			

Tabela 3: Parâmetros de monitoramento e frequência de análise para ensaios em batelada

Parâmetro	Método	Frequência
DQO	(APHA, AWWA, e WEF 2012)	Início e fim
Condutividade	Condutivímetro	Início e fim
pH	Potenciômetro	Início e fim
Cor	Espectrofotométrico	Variável no decorrer do ensaio
Biogás	Cromatografia Gasosa (Adorno, Mirandola, e Pimenta, 2014)	Variável no decorrer do ensaio

Análises microbiológicas

A análise microbiológica terá como principal objetivo identificar e entender a dinâmica e interações da comunidade microbiana durante os ensaios em batelada. Para tal, serão realizadas análises DGGE e sequenciamento de microrganismos de interesse. Serão feitas extrações de DNA seguindo uma metodologia adaptada de Griffiths et al. (2000) . A integridade será verificada em gel de agarose por eletroforese. A amplificação do DNA será feita por Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) com o uso de primers específicos para os organismos de interesse.

Resultados esperados

A partir dos ensaios em batelada espera-se determinar a aplicabilidade da levedura residual como fonte de doadores de elétrons e mediador redox no processo de descoloração de efluente têxtil salino sintético. Associado ao processo de descoloração será também determinada a produção de biogás a partir da codigestão dos dois efluentes.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Mirandola, C.A.S., e Pimenta, D.F.N., 2014. Development and Validation of a Method (GC/TCD) to Determine N_2, CH_4, CO_2 and H_2S in Biogas. XI Simposio Latinoamericano de Digestão Anaeróbia.

APHA, American Public Health Association, American Water Works Association AWWA, and Water Environment Federation WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

di Biase, A., Devlin, T. R., Kowalski, M. S. e Oleszkiewicz, J. A., 2018. Performance and Design Considerations for an Anaerobic Moving Bed Biofilm Reactor Treating Brewery Wastewater: Impact of Surface Area Loading Rate and Temperature. Journal of Environmental Management 216: 392–98.

Bisschops, I., e Spanjers, H.. 2003, Literature Review on Textile Wastewater Characterisation. Environmental Technology 24(February): 1399–1411.

Brasil, 2005. Resolução No 357, de 17 de março de 2005.

———, 2011. Resolução No 430, de 13 de maio de 2011.

Caballero-Córdoba, G. M., Pacheco, M.T.B., e Sgarbieri,V.C., 1997. Composicao Química Da Biomasa de Levedura Integral (Saccharomyces Sp.) e Determinacao Do Valor Nutritivo Da Proteína Em Células Integras Ou Rompidas Mecanicamente. Ciência e Tecnologia de Alimentos 17(2): 102–6.

Costa, M.C., Bezerra, A., Mota, S.B., Mendonça, G.L.F., Nascimento, R.F., 2010. Descoloração redutiva de corantes azo e o efeito de mediadores redox na presença de aceptor de elétrons sulfato. Química Nova 33(7): 1514–19.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K.. Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28(3): 350–56.

Encinas-Yocupicio, A. A., Razo-Flores, E., Sánchez-Diaz, F., Santos, A. B., Field, J. A.,

Cervantes, F.J., 2006. Catalytic Effects of Different Redox Mediators on the Reductive Decolorization of Azo Dyes. Water Science and Technology 54(2): 165–70.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., Anthony, G., Donnell, O.,Bailey, M.J.,Whiteley, A.S.,Donnell, A.G.O., 2000. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and RRNA-Based Microbial Community Composition Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- And . 66(12): 1–5.

Jayapal, M., Jagadeesan, H., Shanmugam, M., Danisha, J.P., Murugesan, S., 2018. Sequential Anaerobic-Aerobic Treatment Using Plant Microbe Integrated System for Degradation of Azo Dyes and Their Aromatic Amines by-Products. Journal of Hazardous Materials 354(May): 231–43.

Neira, K., e Jeison, D., 2010. Anaerobic Co-Digestion of Surplus Yeast and Wastewater to Increase Energy Recovery in Breweries. Water Science and Technology 61(5): 1129–35.

Pinheiro, H. M.,Touraud, E., 2004. Aromatic Amines from Azo Dye Reduction: Status Review with Emphasis on Direct UV Spectrophotometric Detection in Textile Industry Wastewaters. Dyes and Pigments 61(2): 121–39.

Popli, S., e Upendra, D. P., 2014. Destruction of Azo Dyes by Anaerobic – Aerobic Sequential Biological Treatment : A Review.

Puvaneswari, N., Muthukrishnan,J., e Gunasekaran, P., 2006. Toxicity Assessment and Microbial Degradation of Azo Dyes. Indian Journal of Experimental Biology 44(August): 618–26.

Santos, A.B., 2004..Reductive Decolourisation of Dyes by Thermophilic Anaerobic Granular Sludge. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Santos, B.R.T., 2012. Efeito de diferentes doadores de elétrons e da variação da concentração de sulfato na descoloração redutiva do corante direct black 22. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco.

SIDRA/IBGE, 2017. Pesquisa Industrial Anual – Empresa, Dados Gerais Das Unidades Locais Industriais de Empresas Industriais Com 5 Ou Mais Pessoas Ocupadas Por Unidade Da Federação - Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) .

Van Der Zee, F.P., e Villaverde, S., 2005. Combined Anaerobic-Aerobic Treatment of Azo Dyes - A Short Review of Bioreactor Studies. Water Research 39(8): 1425–40.

Van der Zee, F.P., e Cervantes, F.J., 2009. Impact and Application of Electron Shuttles on the Redox (Bio)Transformation of Contaminants: A Review. Biotechnology advances 27(3): 256–77.

Zupančič, G.D., Panjičko, M., e Zelić, B., 2017. Biogas Production from Brewer ’ s Yeast Using an Anaerobic Sequencing Batch Reactor. 55(2): 187–96.

CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA DA DEGRADÇÃO DE 4-NONILFENOL EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFCADO EM ESCALA AUMENTADA

Henrique S. Dornelles [1]; Fabrício Motteran [2]; Edson Luiz Silva [3];
Maria Bernadete A. Varesche [4]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Pesquisador de pós-doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química da DEQ/UFSCar;
[4] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Objetivou-se neste estudo avaliar a remoção e degradação de 4-Nonilfenol (4-NF) em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF) em escala aumentada (20L), bem como caracterizar a comunidade microbiana estabelecida no material suporte por meio das técnicas de PCR/DGGE do gene RNAr 16S e sequenciamento massivo via plataforma Illumina-Miseq®. O RALF foi preenchido com areia como material suporte, operado com Tempo de Detenção Hidráulico (TDH) de 18,2±1,1 horas e alimentado com meio de cultura acrescido de 4-NF PESTANAL® (Sigma-Aldrich®). A operação do reator foi dividida em distintas etapas, contando com inoculação do RALF em circuito fechado, adaptação ao meio de cultura e subsequentes fases com adição de 4-NF. As diferentes concentrações de 4-NF aplicadas ao RALF não afetaram a eficiência de remoção de DQO e promoveram a seleção dos microrganismos que compuseram a biomassa do leito. Os gêneros com maior abundância relativa identificados após adição de 4-NF foram os seguintes: Geothrix, Holophaga, Elusimicrobium, Paludibacter, Lactobacillus, Aeromonas, Pelobacter, Aquaspirillum, Pseudomonas, Delftia, Acinetobacter, Arcobacter, Ignavibacterium, Treponema, Lysinibacillus e Enterococcus.*

Introdução

4-Nonilfenol (4-NF) é um xenobiótico formado a partir da degradação do surfactante não iônico Nonilfenol etoxilado (NFe). O NFe um produto economicamente importante, uma vez que é amplamente utilizado na formulação de detergentes para limpeza doméstica, produtos de cuidados pessoais, têxteis, tintas, polímeros, formulações de pesticidas, farmacêuticas, mineração, recuperação de petróleo e indústrias de celulose e papel (EPA, 2005). A sua presença no ambiente é diretamente relacionada as atividades antrópicas, tendo como principal fonte o despejo de efluentes de estações de tratamento de efluentes (ETE) em corpos receptores (Ahel et al., 1994; Corsi et al., 2003; Fries and Püttmann, 2004; Langford and Lester, 2002; Petrovic et al., 2002).

Os seres humanos são expostos ao 4-NF por meio do consumo de alimentos cultivados com irrigação proveniente de manancial contaminado, pela ingestão direta de água contaminada, contato com produtos de limpeza, higiene pessoal, bem como o uso de espermicidas em contraceptivos (Priac et al., 2017). O NFe também é empregado na síntese de polímeros para a fabricação de recipientes plásticos e embalagens, os quais, dependendo das condições de uso, liberam NFe para os alimentos e água (Loyo-Rosales et al., 2004).

Os produtos de degradação do NFe podem ser mais tóxicos que seus precursores (Giger et al., 1984), sendo que o 4-NF pode mimetizar mimetizar o hormônio feminino 17β-estradiol e competir pelos mesmos sítios de ligação nas células animais (Bechi et al., 2010), provocando a desregulação do sistema endócrino. O 17β-estradiol é um hormônio natural que influencia o desenvolvimento e a manutenção das características do sexo feminino (Arevalo et al., 2015), devido a isso, o contato de organismos com o 4-NP pode desencadear as mais

diversas reações como proliferação de células aberrantes (Forte et al., 2016), lesões no sistema reprodutivo (El-Hefnawy et al., 2017), redução da secreção de ocitocina (Bechi et al., 2010), inibição da liberação de testosterona (Wu et al., 2010), atividade antiandrogênica (Lee et al., 2003) e dano ao DNA (Sharma and Chadha, 2017). Frente ao risco ambiental deste contaminantes emergente e seus danos irreparáveis a curto e longo prazo, é evidente a necessidade de investigar a efetividade da remoção e degradação do 4-Nonilfenol em sistemas biológicos, que mesmo em baixas concentrações podem afetar de forma irreversível o meio ambiente e ecossistema.

O objetivo deste estudo foi avaliar a remoção e degradação de 4-Nonilfenol (4-NF) em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF) em escala aumentada (20L), bem como caracterizar a comunidade microbiana estabelecida no material suporte.

Material e Métodos

O RALF foi construído em PVC (Policloreto de vinila) com 10 cm de diâmetro, 254 cm de altura, área de 78,54 cm^2 com volume de 20 L. Na base do reator foi instalado um distribuidor para garantir a uniformidade do fluxo e no topo, um separador de fases para impedir que partículas sólidas fossem levadas para o efluente. O reator foi instalado em sala anexa ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e mantido em temperatura ambiente. A vazão da bomba de recirculação foi de 180 $L.h^{-1}$ e a vazão de alimentação de 1 $L.h^{-1}$, resultando em um TDH de 18,2±1,1 h. Para a imobilização da biomassa no RALF utilizou-se areia como material suporte, devido aos bons resultados obtidos por Oliveira et al. (2010).

O lodo anaeróbio usado para inoculação do RALF e dos reatores em batelada foi proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Pereira, São Paulo). Antes de ser usado, o lodo foi armazenado em câmara fria a 4°C. Para a inoculação do RALF, o lodo granular com uma concentração de STV de 40,2±0,1 $g.L^{-1}$ foi desestruturado afim de garantir que não houvesse colmatação do leito de areia devido aos grânulos.

A operação do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado foi dividida em seis fases; iniciando-se com a inoculação do reator em circuito fechado (sem afluente e efluente de fluxo contínuo), adaptação da biomassa as condições nutricionais e reacionais e posteriores fases com adição de 4-NF. Após atingir remoção estável de DQO foram adicionadas diferentes concentrações de 4-Nonilfenol, seguindo as fases pré-estabelecidas. Estas fases foram denominadas II, III e IV e referem-se às concentrações de 4-NF de 127,4±29,2; 270,1±24,7 e 376,1±35,8 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente. Na Fase IV, além do aumento da concentração afluente de 4-NF, foi realizada redução da concentração de cossubstrato (etanol) a composição nutricional do meio de cultura. Na alimentação do RALF usado 4-NF padrão (Sigma-Aldrich®, CAS nº 104-40-5). A composição do meio de cultura foi similar a usada por Oliveira et al. (2010): extrato de levedura (500 $mg.L^{-1}$), bicarbonato de sódio (400 $mg.L^{-1}$) e 5 $mL.L^{-1}$ de solução salina (50,0 $g.L^{-1}$de NaCl, 1,4 $mg.L^{-1}$ de $MgCl_2 6H_2O$ e 0,9 $g.L^{-1}$ de $CaCl_2$-$2H_2O$).

Para a caracterização microbiana, o DNA das amostras foi extraído usando o kit PowerSoil® DNA *Isolation* (MoBio *Laboratories*, Inc., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA e as concentrações foram avaliadas por eletroforese em gel (agarose a 1%) e espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE), usando uma razão de 260/280 nm > 1,8. Na PCR foram usados iniciadores set primer 968FGC – 1401R, para o Domínio Bacteria (NUBEL et al., 1996).

Para análise filogenética das amostras referentes ao RALF (Inóculo, Fase I, Fase III e Grânulos), as amostras de DNA foram enviadas para GenOne Soluções em Biotecnologia (www.genone.com.br, RJ, Brasil). Na PCR foi usado o set de primers 515F/907R (Domínio Bacteria) do gene RNAr 16S, região variável V4-V5. O sequenciamento foi realizado via

plataforma Illumina - MiSeq seguindo as diretrizes do fabricante. Os dados foram avaliados na GenOne, com bioinformática primária para metabarcoding.

Os dados experimentais dos reatores em batelada e RALF foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada usando o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro (*p*-valor: 0,05).

Resultados e Discussão

Após etapa inicial de inoculação em circuito fechado iniciou-se a operação do reator em circuito aberto, no qual a duração das fases operacionais foi determinada de acordo com a estabilidade de remoção de matéria orgânica (DQO) e 4-Nonilfenol (4-NF). O tempo de operação de cada fase foi de 40, 14, 35, 140 e 58 dias, para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III e IV, respectivamente.

A etapa de inoculação (circuito fechado) teve duração de 20 dias e foram verificados valores médios de DQO efluente de 350,7±227,9 $mg.L^{-1}$ para uma DQO afluente de 907,0±7,7 $mg.L^{-1}$. Após esse período tiveram início as etapas em sistema contínuo sem adição de 4-NF (Adaptação e Fase I) e com adição de 4-NF (Fase II, III e IV).

Foram verificados valores médios de DQO afluente para as fases sem adição de 4-NF de 905,8±19,7 $mg.L^{-1}$ (Adaptação) e 894,4±14,1 $mg.L^{-1}$ (Fase I). Para as fases com adição de 4-NF os valores médios de DQO afluente foram de 877,6±13,5 $mg.L^{-1}$ (Fase II); 939,7±23,1 $mg.L^{-1}$ (Fase III) e 568,0±18,0 $mg.L^{-1}$ (Fase IV). A redução da DQO afluente verificada na Fase IV (568,0±18,0 $mg.L^{-1}$) foi devido a retirada do cossubstrato da composição do meio de cultura, o qual foi adicionado em todas as fases anteriores (Inoculação, Adaptação, Fase I, II e III) de operação do RALF.

O maior valor médio para a DQO efluente (337,36±106,0 $mg.L^{-1}$) ocorreu na fase inicial de operação em modo contínuo (Adaptação). Isto pode ter ocorrido devido a adaptação da comunidade do leito de areia a configuração reacional e composição nutricional do meio de cultura, o que resultou também na menor eficiência de remoção de DQO (63±11,9%), em comparação as demais fases operadas em modo contínuo (Fase I, II, III e IV).

As menores concentrações médias de DQO efluente foram verificadas para as Fases III (32,8±11,8 $mg.L^{-1}$) e IV (29,11±8,7 $mg.L^{-1}$), seguidas da Fase II (50,2±11,2 $mg.L^{-1}$) e Fase I (72,2±53,2 $mg.L^{-1}$). Observou-se tendência de redução da concentração de média de DQO efluente com o aumento do período operacional, apesar de os valores não apresentarem diferença significativa. A fase sem adição de 4-NF (Fase I) diferiu significativamente das fases com a as maiores doses de 4-NF (Fase III e IV).

As maiores eficiências médias de remoção de DQO foram verificadas para as Fases III (97,0±1,3%) e IV (95±1,5%), seguidas da Fase II (94,0±1,2%) e Fase I (90,34±6,1%). A eficiência de remoção de DQO para a fase operacional sem adição de 4-NF (Fase I) diferiu significativamente das fases com maiores concentrações de 4-NF (Fase III e IV). A fase inicial de adição de 4-NF (Fase II) não diferiu significativamente da fase controle (Fase I) nem das fases com maiores concentrações de 4-NF (Fase III e IV).

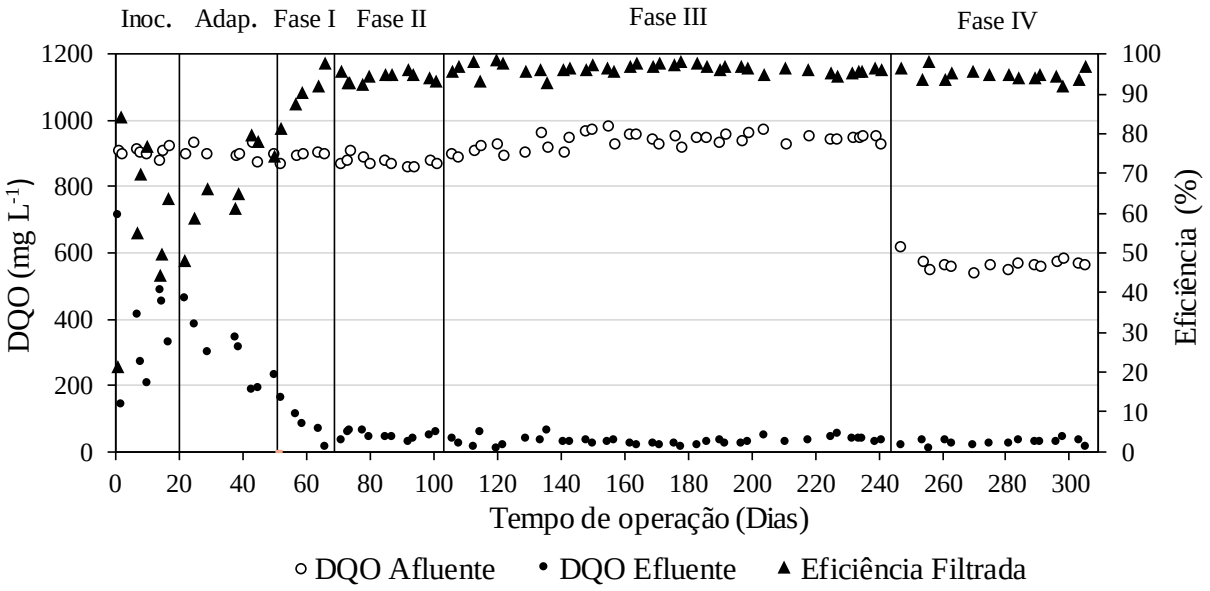
A adição de 4-NF não provocou alteração significativa na eficiência de remoção de DQO filtrada. A eficiência média de remoção de DQO (94,0±1,2%) da fase inicial de adição e 4-NF (Fase II) não diferiu significativamente da eficiência da fase controle (90,34±6,1%), sem adição de 4-NF (Fase I).

Por meio da análise temporal (Figura 1), verificou-se estabilidade de remoção de DQO após a fase de adaptação da biomassa a configuração reacional (RALF) e ao meio de cultura. A adição de 4-NF a partir da Fase II não provocou alteração na eficiência de remoção de matéria orgânica. A variação temporal de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção pode ser verificada na Figura 1.

Os altos valores de eficiência de remoção de DQO verificados no presente trabalho, foram atingidos devido às características do reator de leito fluidificado. Provavelmente, o

sistema de mistura completa com alta recirculação, associado a imobilização da biomassa no material suporte e diluição inicial do afluente, tenham favorecido o contato e disponibilidade do substrato para os microrganismos, em relação às outras configurações reacionais (Bello et al., 2017; Deng et al., 2016; Iza, 1991; Metcalf and Eddy, 2003; Shieh and Keenan, 1986).

Figura 1 – Variação temporal de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção.



Fonte: O autor.

A estabilidade desta configuração reacional (RALF) proporcionou um efluente clarificado, evidenciado pelas baixas concentrações de DQO bruta no efluente (155,60±77 $mg.L^{-1}$ para Fase I; 105,25±27 $mg.L^{-1}$ para Fase II; 62,82±13 $mg.L^{-1}$ para Fase III e 50,96±10,04 $mg.L^{-1}$ para Fase IV).

Na Fase IV (58 dias de duração), não foi realizada adição de cossubstrato (etanol) a composição do meio de cultura, como estratégia para aumentar a eficiência de degradação de 4-NF. A adição de cossubstrato a alimentação pode subsidiar o desenvolvimento de comunidade degradadora do composto de interesse (Okada et al., 2014) e, uma vez adaptada, a comunidade microbiana pode consumir o composto tóxico mesmo na ausência do cossubstrato (Duarte et al., 2010; Macedo et al., 2015; Sanz et al., 2003).

Verificou-se pH médio afluente de 7,48±0,12 para a fase de Adaptação, com adição de alcalinizante ao meio de cultura e 6,76±0,07 para as demais fases operacionais, as quais não foi observado diferença significativa. Para os valores médios afluente de pH, Alcalinidade Parcial, Intermediária, Total e relação AI/AP não foi verificado diferença significativa para as Fases I, II, III e IV.

No monitoramento do efluente foram observados valores de pH de 7,69±0,25; 7,69±0,25; 7,45±0,20; 7,43±0,16 e 7,45±0,15 para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III e IV, respectivamente. Durante todo o período operacional verificou-se pH efluente médio de 7,69±0,25 para a fase com adição de alcalinizante ao meio de cultura (Adaptação) e 7,44±0,18 para as demais fases operacionais (Fase I, II, III e IV), as quais não diferiram significativamente.

Para os valores de relação AI/AP verificou-se decréscimo ao longo do período operacional; ou seja, de 0,62±0,33; 0,58±0,08; 0,35±0,05; 0,30±0,05 e 0,29±0,02 para a Fase de Adaptação, Fase I, II, III e IV, respectivamente.

O fenômeno de aumento da alcalinidade efluente em relação ao afluente no reator de leito fluidificado também foi verificado por por Motteran (2013) e (Braga, 2014). Esta configuração reacional (RALF) promove alta eficiência de degradação de compostos orgânicos formando CO_2, o que associado a alta recirculação do efluente, permite a

reintrodução deste CO_2 na forma de $NaHCO_3$, gerado pelo contato com o oxigênio atmosférico no separador de fases do RALF (Iza, 1991; Shieh and Keenan, 1986).

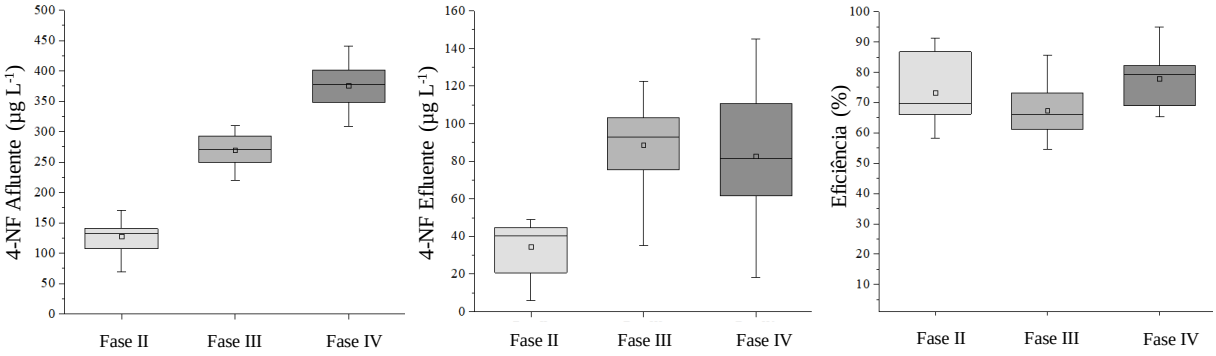
Verificou-se remoção de 4-NF de 73,2±11,1; 67,3±7,3 e 77,88±8,98%, para as fases II, III e IV respectivamente. As concentrações médias de 4-NF afluente variaram de 127,4±29,2 a 376,1±35,8 $\mu g.L^{-1}$ para Fase II e IV, respectivamente.

A maior eficiência de remoção (77,88±8,9%) de 4-NF ocorreu na Fase IV, para concentração afluente de 376,1±35,8 $\mu g.L^{-1}$ de 4-NF. Nesta fase operacional (Fase IV) foi reduzida a concentração do cossubstrato (etanol) da composição do meio de cultura, o que pode ter favorecido na degradação do 4-NF. De acordo com Okada et al. (2014), a suplementação com cossubstrato facilmente biodegradável a composição nutricional pode favorecer a colonização de consórcio degradador do composto de interesse e, uma vez adaptado, este consórcio pode consumir o contaminante mesmo na ausência do cossubstrato (Duarte et al., 2010; Macedo et al., 2015; Sanz et al., 2003).

O aumento da concentração de 4-NF afluente da Fase III (270,1±24,7 $\mu g.L^{-1}$) para a Fase IV (376,1±35,8 $\mu g.L^{-1}$) não provocou aumento da concentração de 4-NF efluente de 88,5±21,5 $\mu g.L^{-1}$ (Fase III) para 82,72±33,8 $\mu g.L^{-1}$ (Fase IV), fazendo com que a maior concentração de 4-NF afluente (376,1±35,8 $\mu g.L^{-1}$) aplicada na Fase IV atingisse a maior eficiência de remoção (77,88±8,9%). Este comportamento indica que o aumento da dose de 4-NF proporcionou aumento da remoção deste composto.

O aumento da concentração de 4-NF afluente da Fase II (127,4±29,2 $\mu g.L^{-1}$) para a Fase III (270,1±24,7 $\mu g.L^{-1}$) ocasionou aumento da concentração de 4-NF efluente de 34,5±14,8 $\mu g.L^{-1}$ (Fase II) para 88,5±21,5 $\mu g.L^{-1}$ (Fase III). Todavia, não verificou-se diferença significativa entre as eficiências de remoção de 4-NF para estas fases (73,2±11,1% para Fase II e 67,3±7,3% para Fase III). O comportamento do 4-NF afluente, efluente e eficiência de remoção pode ser verificado na Figura 2.

Figura 2 – Representação em box-plot para 4-NF afluente, efluente e eficiência de remoção para as fases operacionais do RALF.



Fonte: O autor.

O 4-Nonilfenol adsorvido ao material suporte (areia) foi quantificado ao final de cada fase operacional e foram verificadas concentrações de 4,51±0,43, 4,44±0,61 e 3,96±0,71 µg 4-NF g^{-1} de areia, para as Fases II, III e IV, respectivamente. Por meio do teste de Tukey (a 5% de probabilidade de erro) não foi verificada diferença significativa entre os valores.

Em relação ao balanço de massa global de 4-Nonilfenol no RALF, foram adicionados 1,6 g de 4-NF em 233 dias de operação; sendo recuperados 0,468 g de 4-NF efluente e 0,019 g de 4-NF adsorvidos no material suporte (areia) ao final da última fase de operação (Fase IV), o que representou cerca de 1% do 4-NF total adicionado.

A concentração de 4-NF adsorvido a massa total de material suporte (4.500 g de areia) ao final de cada fase operacional foi de 20.295, 19.995 e 17.800 µg, para a Fase II, III e IV, respectivamente. Por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro não foi verificada diferença significativa. Avaliando a distribuição percentual de 4-NF (adsorvido, biodegradado

e recuperado no efluente) em cada fase operacional, a fração correspondente ao 4-NF adsorvido (em 4.500 g de areia) representou cerca de 22% na Fase II, 2% na Fase III e 3% na Fase IV.

Na primeira fase com adição de 4-NF (Fase II) verificou-se o maior percentual de 4-NF adsorvido (22%) em comparação com as Fases III (2%) e IV (3%). Isso aconteceu devido a menor carga de 4-NF aplicada na fase II (0,1 mg), indicando que a concentração de 4-NF adsorvido ao material suporte (areia) não aumentou de forma proporcional ao aumento de carga. Uma vez que os sítios de adsorção do material suporte foram saturados, o aumento da carga de 4-NF aplicada na Fase III (6870±628 $\mu g.d^{-1}$) e IV (9568±910 $\mu g.d^{-1}$) proporcionou aumento da concentração de 4-NF efluente e degradado

Com relação a caracterização microbiana, ao todo foram identificados 146 gêneros, divididos em 280 Unidades a Taxonômicas Operacionais (UTOs). O maior número de gêneros (137) foi identificado na Fase I, referente a fase inicial de operação do RALF, sem 4-NF. O menor número de gêneros (128) foi identificado na biomassa de aspecto granular formada sobre o leito de areia na Fase III, com adição de 270,1±24,7 $\mu g.L^{-1}$.

Ocorreu redução percentual de representantes do domínio Archaea na biomassa do RALF após adição de 4-NF (Fase III), em comparação com a amostra sem adição de 4-NF (Fase I). A redução de gêneros de arqueias no leito de areia após adição de 4-NF (Fase III) pode estar relacionada a estratificação do leito (areia e granular) e não a toxicidade do 4-NF, uma vez que no leito com aspecto granular verificou-se 15,98% de gêneros pertencentes a Archaea. Organismos que compõem o domínio Archaea podem desempenhar importante papel em processos de biorremediação, uma vez que podem sobreviver em condições extremas (temperatura, salinidade, toxicidade) e consumir subprodutos gerados por bactérias, promovendo a completa degradação de contaminantes (Krzmarzick et al., 2018).

Os dez gêneros mais abundantes identificados no inóculo foram *Methanosaeta* (43,04%), *Methanoregula* (5,36%) e *Methanosphaerula* (3,22%) para o Domínio Archaea. Em relação ao Domínio Bacteria foram identificados *Mariniphaga* (5,54%), *Geobacter* (3,86%), *Paraclostridium* (3,55%), *Anaerolinea* (3,53%), *Syntrophus* (3,02%), *Owenweeksia* (2,52%) e *Cloacibacillus* (2,37%). Os demais gêneros identificados na amostra de inóculo (com exceção dos supracitados) compuseram 24,01% da abundância relativa.

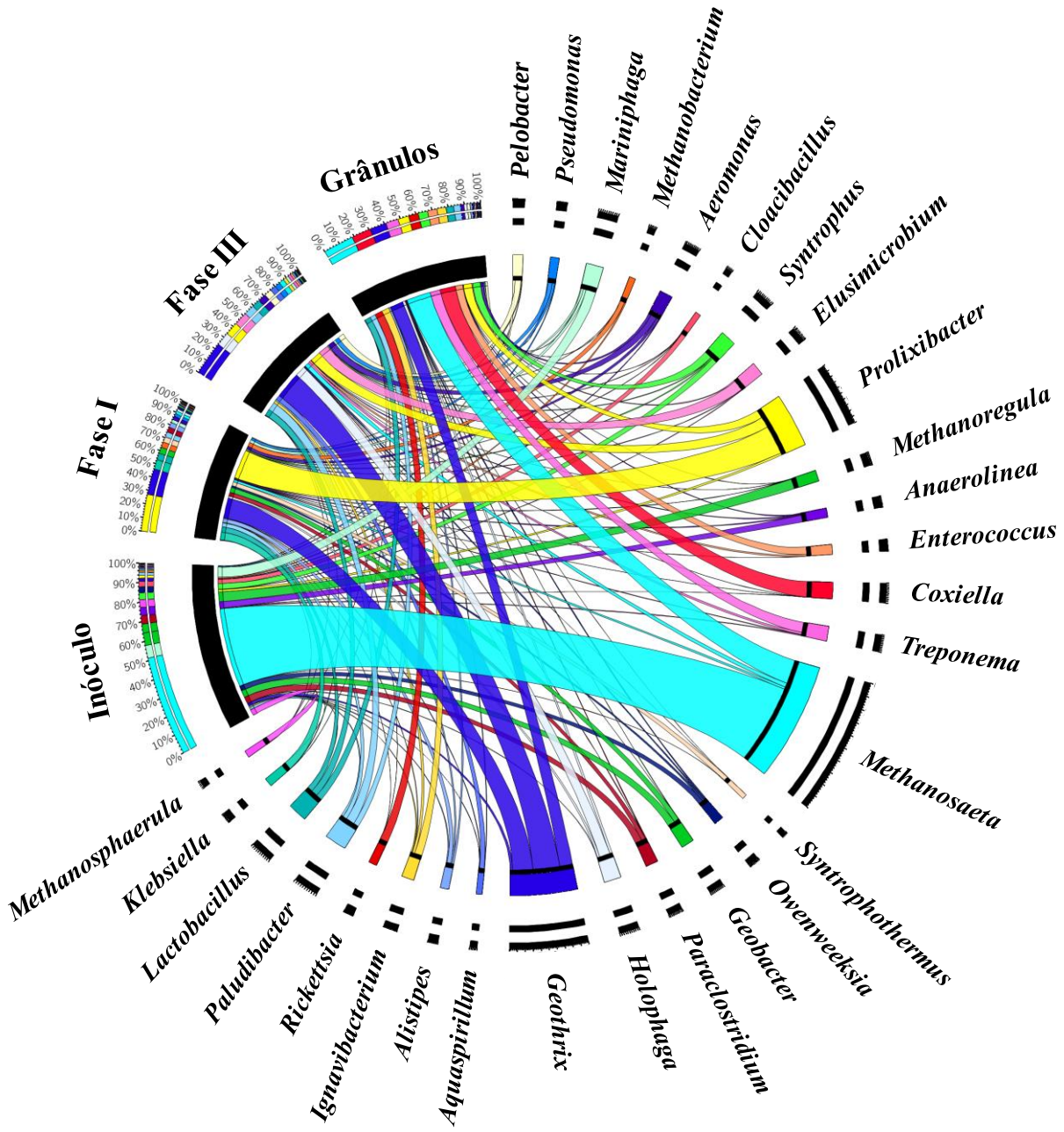
Para a amostra de biofilme da areia da Fase I, os dez gêneros identificados mais abundantes foram *Prolixibacter* (20,38%), *Geothrix* (14,12%), *Klebsiella* (5,35%), *Lactobacillus* (3,75%), *Geobacter* (3,44%), *Syntrophothermus* (3,03%), *Paludibacter* (2,90%), *Paraclostridium* (2,78%) e *Alistipes* (2,84%) para o Domínio Bacteria e somente *Methanobacterium* (3,06%) para o Domínio Archaea. A soma dos demais gêneros identificados representou 38,96%.

Para a amostra de biofilme da areia da Fase III (após adição de 270,1±24,7 $\mu g.L^{-1}$), os dez gêneros mais abundantes identificados foram *Geothrix* (17,82%), *Holophaga* (7,11%), *Prolixibacter* (7,03%), *Elusimicrobium* (6,98%), *Paludibacter* (5,60%), *Lactobacillus* (4,27%), *Aeromonas* (4,20%), *Pelobacter* (3,92%), *Aquaspirillum* (2,98%) e *Pseudomonas* (2,86%), todos pertencentes ao domínio Bacteria. A soma dos demais gêneros representou 37,23%.

Para a amostra da biomassa com aspecto granular (Grânulos) (após adição de 270,1±24,7 $\mu g.L^{-1}$), os dez gêneros mais abundantes identificados foram *Coxiella* (9,96%), *Geothrix* (8,34%), *Treponema* (6,60%), *Prolixibacter* (5,44%), *Rickettsia* (5,00%), *Syntrophus* (4,92%), *Enterococcus* (4,78%), *Ignavibacterium* (4,71%) e *Lactobacillus* (3,92%) para o Domínio Bacteria e somente *Methanosaeta* (15,65%) para o domínio Archaea. A soma dos demais gêneros representou 31,40%.

A comparação entre os dez gêneros com maior abundância relativa identificados no Inóculo, Leito de Areia sem adição de 4-Nonilfenol (Fase I), Leito de Areia após adição de 4-Nonilfenol (Fase III) e Leito com aspecto Granular com adição de 4-Nonilfenol (Grânulos) pode ser verificada na representação circular ilustrada na Figura 3.

Figura 3 – Representação circular dos dez gêneros com maior abundância relativas para Inóculo, Leito de Areia sem adição de 4-Nonilfenol (Fase I), Leito de Areia após adição de 4-NF (Fase III) e Leito com aspecto Granular com adição de 4-Nonilfenol (Grânulos).



Fonte: O autor.

A representação circular da Figura 3 apresenta total de 29 gêneros, sendo que cada gênero apresentado foi o mais abundante em pelo menos uma das amostras.

Na fase III (4-NF a 270,1±24,7 μg.L^{-1}) verificou-se aumento da abundância relativa para organismos semelhantes a *Geothrix*, *Holophaga*, *Elusimicrobium*, *Paludibacter*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Pelobacter*, *Aquaspirillum*, *Pseudomonas*, *Delftia*, *Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Ignavibacterium*, *Treponema*, *Lysinibacillus e Enterococcus*, em comparação a fase sem adição de 4-NF (Fase I).

A maior abundância relativa após adição de 4-NF ao RALF (Fase III), em relação a fase controle (Fase I), ocorreu para o gênero *Geothrix* (17,82%), correspondendo a 25% de

aumento em comparação a fase sem adição de 4-Nonilfenol. *Geothrix* é gram-negativa, realiza fermentação e respiração anóxica. Cresce na presença de ácidos orgânicos e seus produtos finais da fermentação são ácidos acético e succínico. *Geothrix* está diretamente relacionado a degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Coates et al., 1999), além de já ter sido identificado em reatores biológicos usados na degradação de surfactante aniônico LAS (Delforno et al., 2015; Okada, 2012).

De modo geral pode-se constatar ampla alteração da comunidade microbiana estabelecida no leito de areia do RALF após adição de 4-NF (Fase III) ao meio reacional, levando a seleção de organismos amplamente relacionados à degradação de compostos aromáticos (*Geothrix*, *Holophaga*, *Aeromonas*, *Pelobacter*, *Aquaspirillum, Pseudomonas* e *Delftia*).

Em relação ao leito com aspecto granular (Grânulos) formado sobre o leito de areia da Fase III, verificou-se distinta composição na comunidade microbiana. Verificou-se que o gênero dominante identificado no leito com aspecto granular foi *Methanosaet*a (15,65%), com abundância relativa 84% maior do que a verificada no leito de areia (2,56%). Organismos representantes do gênero *Methanosaeta* são anaeróbios estritos e exclusivamente acetoclástica (Patell and Sprott, 1990). Sua ocorrência no leito com aspecto granular pode estar relacionada às características hidrodinâmicas deste, uma vez que a gradual perda de carga do fluxo ascendente permite a formação de zona com menor cisalhamento e, consequentemente o espessamento do biofilme. Aliado a isto, a abundância de gêneros relacionados à produção de ácido acético no leito de areia (*Geothrix*, *Holophaga*, *Elusimicrobium*, *Paludibacter*, *Pelobacter*, *Syntrophus*, *Ignavibacterium*, *Treponema*) pode ter subsidiado a ocorrência de *Methanosaeta*.

A comparação entre a composição da comunidade microbiana do leito de areia e do leito com aspecto granular possibilitou inferir que a configuração reacional promoveu estratificação da biomassa. No leito de areia foram verificados desde organismos aeróbios a anaeróbios estritos, com predominância de gêneros relacionados a hidrólise, acidogênese e acetogênese, etapas iniciais da degradação anaeróbia. No leito com aspecto granular predominaram organismos estritamente anaeróbios relacionados com a acetogênese e metanogênese.

Conclusões

A adição de 4-NF ao RALF não afetou a eficiência de remoção de DQO nem o tamponamento do sistema. As diferentes concentrações de 4-NF aplicadas ao RALF ocasionaram a seleção dos microrganismos que compõem sua biomassa, tanto para domínio Archaea quanto para Bacteria. O acréscimo de cossubstrato (etanol) ao meio de cultura aliado a adição de concentrações crescentes de 4-NF foi estratégia eficaz para estabelecer consórcio microbiano em RALF com capacidade de degradação deste contaminante. A comunidade microbiana estabelecida em RALF pode degradar 4-Nonilfenol em meio de cultura sem adição de cossubstrato, após prévia adaptação. Os principais gêneros relacionados a degradação de 4-NF foram *Geothrix, Holophaga, Elusimicrobium, Paludibacter, Lactobacillus, Aeromonas, Pelobacter, Aquaspirillum, Pseudomonas, Delftia, Acinetobacter, Arcobacter, Ignavibacterium, Treponema, Lysinibacillus* e *Enterococcus.*

Referências Bibliográficas

Ahel, M., Giger, W., Schaffner, C., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-II. Occurrence and transformation in rivers. Water Res. 28, 1143–1152. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90201-1

Arevalo, M., Azcoitia, I., Garcia-segura, L.M., 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. Nat. Publ. Gr. 16, 17–29.

https://doi.org/10.1038/nrn3856
Bechi, N., Ietta, F., Romagnoli, R., Jantra, S., Cencini, M., Galassi, G., Serchi, T., Corsi, I., Focardi, S., Paulesu, L., 2010. Environmental levels of para-nonylphenol are able to affect cytokine secretion in human placenta. Environ. Health Perspect. 118, 427–431. https://doi.org/10.1289/ehp.0900882
Bello, M.M., Raman, A.A.A., Purushothaman, M., 2017. Applications of fluidized bed reactors in wastewater treatment – A review of the major design and operational parameters. J. Clean. Prod. 141, 1492–1514. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.148
Braga, J.K., 2014. Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária de lavanderia. Esc. Eng. São Carlos. Universidade de São Paulo.
Coates, J.D., Ellis, D.J., Gaw, C. V, Lovley, D.R., 1999. Geothrix ferrnentans gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1615–1622.
Corsi, S.R., Zitomer, D.H., Field, J.A., Cancilla, D.A., 2003. Nonylphenol ethoxylates and other additives in aircraft deicers, antiicers, and waters receiving airport runoff. Environ. Sci. Technol. 37, 4031–4037. https://doi.org/10.1021/es034005i
Delforno, T.P., Moura, A.G.L., Okada, D.Y., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2015. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. Bioresour. Technol. 192, 37–45. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.050
Deng, Z., Fung, K.Y., Ng, K.M., Wei, C., 2016. Design of anaerobic fluidized bed bioreactor - Dyeing effluents. Chem. Eng. Sci. 139, 273–284. https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.09.029
Duarte, I.C.S., Oliveira, L.L., Mayor, M.S., Okada, D.Y., Varesche, M.B.A., 2010. Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing-batch reactor containing granular biomass. Int. Biodeterior. Biodegrad. 64, 129–134. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.12.003
El-Hefnawy, T., Hernandez, C., Stabile, L.P., 2017. The endocrine disrupting alkylphenols and 4,4′-DDT interfere with estrogen conversion and clearance by mouse liver cytosol. Reprod. Biol. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.04.003
EPA, 2005. Aquatic life ambient water quality criteria nonylphenol.
Forte, M., Di Lorenzo, M., Carrizzo, A., Valiante, S., Vecchione, C., Laforgia, V., De Falco, M., 2016. Nonylphenol effects on human prostate non tumorigenic cells. Toxicology 357–358, 21–32. https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.024
Fries, E., Püttmann, W., 2004. Occurrence of 4-Nonylphenol in rain and snow. Atmos. Environ. 38, 2013–2016. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.01.013
Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C., 1984. 4-nonylphenol in Sewage Sludge : Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/1694043 225, 623–625.
Iza, J., 1991. Fluidized Bed Reactors for Anaerobic Wastewater Treatment. Water Sci. Technol. 24, 109–132.
Krzmarzick, M.J., Taylor, D.K., Fu, X., McCutchan, A.L., 2018. Diversity and Niche of Archaea in Bioremediation. Archaea 2018, 1–17. https://doi.org/10.1155/2018/3194108
Langford, K.H., Lester, J.N., 2002. Fate and behaviour of endocrine disrupters in wastewater treatment processes, in: Birkett, J.W., Lester, John N. (Eds.), Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. London.
Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.Y., Ahn, R.S., Lee, K., 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. Toxicol. Sci. 75, 40–46. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg150

Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A., 2004. Migration of Nonylphenol from Plastic Containers to Water and a Milk Surrogate. J. Agric. Food Chem. 52, 2016–2020. https://doi.org/10.1021/jf0345696

Macedo, T.Z., Okada, D.Y., Delforno, T.P., Braga, J.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2015. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. Bioprocess Biosyst. Eng. 38, 1835–1844. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1424-5

Metcalf, Eddy, 2003. Wastewater engineering : treatment and reuse. New York.

Motteran, F., 2013. Caracterização da comunidade microbiana de reator anaeróbio de leito fluidificado envolvida na degradação de surfactante não iônico álcool etoxilado de cadeia não ramificada (GENAPOL) 187.

Okada, D.Y., 2012. Degradação de surfactante aniônico em reator UASB com água residuária de lavanderia. Esc. Eng. São Carlos Doutorado, 226.

Okada, D.Y., Delforno, T.P., Etchebehere, C., Varesche, M.B.A., 2014. Evaluation of the microbial community of upflow anaerobic sludge blanket reactors used for the removal and degradation of linear alkylbenzene sulfonate by pyrosequencing. Int. Biodeterior. Biodegrad. 96, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.017

Patell, G., Sprott, G., 1990. Methanosaeta concilii. Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 79–82. https://doi.org/10.1099/00207713-40-1-79

Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. Environ. Toxicol. Chem. 21, 2146–2156. https://doi.org/PDF 132

Priac, A., Morin-crini, N., Druart, C., Gavoille, S., Torri, G., Winterton, P., Bradu, C., 2017. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater : A review of options for their elimination.

Sanz, J.L., Culubret, E., De Ferrer, J., Moreno, A., Berna, J.L., 2003. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Biodegradation 14, 57–64. https://doi.org/10.1023/A:1023557915653

Sharma, M., Chadha, P., 2017. Widely used non-ionic surfactant 4-nonylphenol: showing genotoxic effects in various tissues of Channa punctatus. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 11331–11339. https://doi.org/10.1007/s11356-017-8759-1

Shieh, W.K., Keenan, J.D., 1986. Fluidized bed biofilm reactor for wastewater treatment. Biotechnology 33, 131–169. https://doi.org/10.1007/BFb0002455

Wu, J.-J., Wang, K.-L., Wang, S.-W., Hwang, G.-S., Mao, I.-F., Chen, M.-L., Wang, P.S., 2010. Differential effects of nonylphenol on testosterone secretion in rat Leydig cells. Toxicology 268, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.10.030

CARBOXYLIC ACIDS PRODUCTION BY DARK FERMENTATION FROM SUGARCANE VINASSE AND ACIDOGENIC MIXED CULTURE: EFFECT OF THE ETHANOL AND LACTATE ADDITION AS SUBSTRATES

Felipe Eng Sánchez [1]; Lucas T. Fuess [1]; Guilherme Soares Calvacante [2]; Maria A.T. Adorno [3]; Marcelo Zaiat [4]

[1] Pós-doutorado do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[3] Técnico no Laboratório de Processos biológicos da EESC/USP;
[4] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Abstract. *Today, wastewaters and solid residues treatment through anaerobic digestion can generate not only biofuels as biohydrogen and methane, but other intermediaries as the carboxylic acids with high value-added products called Carboxylate Platform. This study presents the effect of the ethanol (EtOH) and lactate (Lac), and a real wastewater fermented containing lactic acid (HLa) as cassava flour wastewater fermented (CFWF) addition in the production of organic acids. Fermentations were made with a mixed culture under anaerobic conditions from sugarcane vinasse as substrate. The studies were performed in a batch system (in bottles) with an acidogenic inoculum without the addition of other nutrients and salts, with diluted vinasse and a stirring speed (130 r.min^{-1}). EtOH addition to mixed culture had not a positive effect to organic acid production. However, LAc and CFWF added increased the organic acids productivity of propionic acid (HPrO), butyric acid (HButO), valeric acid (HValO), isovaleric acid (iHValO) and caproic acid (CA), but HButO was the main product obtained. CFWF added (at pH 7) increased the HButO productivity (409 mg.L^{-1}.d^{-1}) and yield (0,55g/gVSfed) by three and four times with respect to the negative control, respectively.*

Introduction

Brazil is one of the two biggest producers of sugarcane, responsible for around 40% of the world's production. For example, the harvest production of 2017/2018 achieved to 633,26 million m^3 (which corresponds to 3,6% less than the previous harvest) being a part used for the production of sugar and EtOH in that order (CONAB, 2018).

The EtOH production from sugarcane is generated vinasses as wastewaters which are resulted of the distillation of fermentation broth of substrate as molasses, sugarcane broth or both substrates. In the sugarcane harvest 2017/2018, 27.76 billons L of EtOH were produced generating about 340 billons L of sugarcane vinasses (CONAB, 2018).

Sugarcane vinasses are composed mainly the salts and suspended solids with a high organic materials then its discharge to environment can lead several impacts as well as to contamination of rivers and groundwater sources (Acharya, 2008).

At present, 97% of sugarcane vinasses emitted by approximately 400 sugarcane mills are used as fertilizer in fertirrigation of sugarcane itself due to high potassium content. Sugarcane vinasse also presents calcium, magnesium, phosphorus, nitrogen and other micronutrients (Fuess e Garcia, 2014). The benefits of this practice are unquestionable since the point of view agronomic, economic and social aspects. The increase in the productivity of some sugarcane plantations can occur in practice especially with more intensive use in poor soils and more dry regions, as well as in economic terms due to the decrease in the consumption of chemical fertilizers. However, if applications those vinasses to sugarcane plantations are not appropriate can occur soils salinization, groundwater contamination, lixiviation of metals and sulphates, release of unpleasant odors, attraction of insects and increase of emission of gases of greenhouse (Fuess e Garcia, 2014, Moraes et al., 2015).

An alternative for the disposal of sugarcane vinasses is the treatment by anaerobic digestion process of their organic materials using an mixed culture under anaerobic conditions. This process generated the biogas production being methane the main component. Besides, if the last stage of anaerobic digestion and methane production could be inhibited, will occur only an acidogenic and acetogenic phases which the principal products will be hydrogen and carbon dioxide and solvents as methanol, EtOH and butanol and volatile fatty acids (VFAs) mainly acetic acid (HAcO), HPrO and HButO (Khan et al., 2016).

These alternatives are in agreement with the development of news sources of sustainable energy from wastewaters treatment as an alternative to fossil fuel and the generation of the low-cost feedstocks for the production of value-added products as alcohols and carboxylic acids production (especially VFAs) called Carboxylate Platform (Agler et al., 2011). VFAs are a valuable platform chemical for various industrial applications, including as chemical precursor for producing flavor compounds, aviation fuels (Angenent et al., 2016; Spirito et al., 2014), natural antimicrobials with medical uses and additives for animal food and cosmetics (Debois, 2012), microbial lipids (Liu et al., 2016) and bioplastics as polyhydroxyalkanoates (Valentino et al., 2017).

At this time, for the production of these products, it is preferred the use of mixed culture (open microbiomes) over pure culture because open microbiomes can tolerate the complexity and variability of substrate due to the metabolic flexibility and besides the sterilization and aeration can be eliminated since undefined mixed cultures can grow under non-sterile and anaerobic conditions. The metabolic pathways of open microbiomes can be regulated by factor as pH, substrates and hydrogen donor (Hoelzle et al., 2014).

In addition, longer chain carboxylic acid as CA and caprylic acid have attracted the attention of researcher because it's are superior in terms of energy content and hydrophobic nature that facilities the downstream processing having similar application than VFAs and as renewable precursors for aviation fuels (Harvey and Meylemans, 2014; Kucek et al., 2016).

Chain elongation of carboxylic acid typically takes place in biological reactor when carbon source and reducing agent are available. For example, mixed culture can use EtOH or LAc as substrates via reversed β-oxidation and acetate and butyrate are elongated with two unit of carbon, acetyl-CoA derived from a reduced substrate (Seedorf et al., 2008; Agler et al., 2012; Grootscholten et al., 2013; Calvacante et al., 2017). However, there are little studies that show that EtOH and LAc can act as reducing agent in the elongation of VFAs chain by mixed culture in a fed-batch systems using sugarcane vinasses.

In this study, with a selected mixed culture from the sugarcane vinasse treatment in an acidogenic packed bed reactors capable of producing high concentration of organic acids from sugarcane vinasse, we investigated the effect of the EtOH and LAc addition in the elongation of VFAs chain and the use of a real wastewaters fermented containing LAc under non-sterilizing conditions.

Materials and Methods

Inoculation

Bacteria acidogenic from the VFAs production by treatment of sugarcane vinasses in an acidogenic packed bed reactors with a capacity of the 0,54 L, low-density polyethylene as support and the mesophilic (37 ^{o}C) and thermophilic (55 ^{o}C) temperature range was used as inoculum.

Substrates

Sugarcane vinasse from the São Martinho biorefinery (São Martinho, Pradópolis, SP) and cassava flour wastewater (CFW) was collected from a cassava flour factory Plaza SA (Santa Maria da Serra, SP) were used as substrates. Both substrates were stored at -20 ^{o}C prior to use.

Fermentation

Batch fermentation of sugarcane vinasse was carried out in 500 mL bottles with 250 mL of volume of culture media. Culture media was prepared an initial chemical oxygen demand (COD) of 10 g.L^{-1} and 15 mL inoculum prepared was added. The bottles were submitted an atmosphere of nitrogen (100%) by ten minutes for oxygen removal from the headspace and were sealed with rubber stoppers and plastic caps. The bottles were incubated in an orbital shaker at 130 rpm from 7 to 12 days. Batch natural fermentation of CFW in order to obtain a source of LAc was carried in bottles 500 mL with 400 mL of volume of culture media. Culture media was prepared at initial pH 4,5 and without inoculation. The bottles were submitted an atmosphere of nitrogen (100%) by ten minutes for oxygen removal from the headspace and were sealed with rubber stoppers and plastic caps. The bottles were incubated at 30 ^{o}C for 10 days.

Fed-batch fermentation

At pH 8.8 and 40 ^{o}C were further used to study of the effect of EtOH and LAc addition on the chain elongation of carboxylic acids (adequate conditions to VFA production with the mixed culture determined). EtOH was added at 2 g.L^{-1} (with ratio of concentration molar of EtOH added: HAcO (2:1) according to reported by others authors (Cavalcante et al., (2017)) on day 5 and 9 of course of fermentation. LAc or CFWF (without pH adjustment and at pH 7) was added in two or three times with a concentration of HLa of 1,35 g.L^{-1}. 2 mL of fermentation broth was collected at each sampling time up to 14 sampling times, centrifuged at 9000 rpm for 10 minutes, and filtered through 0.45 um nylon membrane filter for further analysis.

Analytical methods

The pH, COD total (CODt), COD soluble and volatile solids (VS) were determined based on the Standard Methods of the American Public Health Association (APHA, 2005). HLa was analyzed according to Taylor (1996). EtOH, HAcO, HPrO, isobutyric acid (iHButO), HButO, iHValO, HValO, and CA, were analyzed in a Shimadzu GC 2010 gas chromatograph equipped with aflame ionization detector (FID) column and an HPInnowax column with an internal diameter of 30 x 0.25 mm and a film thickness of 0.25 mm, as described previously (Adorno et al., 2014).

Data and statistical analysis

All fermentations test and measurements were conducted in triplicate and duplicate, respectively, and the average values and standard deviation were reported. Analysis of variance (ANOVA) and t-test were performed with Stagraphics Centurion version 15 with a threshold p-value of 0.05.

Results and Discussion

Effect of ethanol addition

EtOH and LAc are known to be a carbon sources and reducing equivalent that promotes the chain elongation of carboxylic acids using isolated strains and mixed culture (Steinbusch et

al., 2010; Tao, et al., 2016; Zhu et al., 2017). The effect of EtOH addition on the organic acid production is depicted in Figure 1a-c. After the first addition of EtOH was consumed slowly and reduced about half the initial concentration. The second addition of EtOH was presented a behavior similar to the first addition and was not completed after 12 days of course of fermentation. The HAcO was not consumed due its concentration remained unchanged during all the fermentation process (Figure 1b). HPrO, HButO, HValO and iHValO were also unchanged with EtOH addition (data not shown). Although, a ratio of concentration molar of EtOH: HAcO (2:1) was used in this study for biochemical formation of CA (Cavalcante et al., 2017), the reaction between EtOH and HAcO for longer chain VFAs production was not occurred possibly due to EtOH added was only used as carbon source. In fact, other authors have point out that the use of EtOH and acetate as only substrates with ratios between 3:1 to 10:1 could be increased the CA yield (Liu et al., 2016; Gildemyn et al., 2017). The phenomenon that EtOH only was consumed as carbon source could relate with the pH of broth the fermentation that was generated between 5,4-5,7 being inhibitory for the mixed culture on the elongation chain reaction. For example, it is known that maximal CA production yield occurs at a pH around 7 or can also occur a pH < 5 (Calvacante et al., 2017). At pH reduction from, e.g. 7-5,0, results in about 40 % lower growth rates with *Clostridium kluyveri* strain 3231B (Weimer and Stevenson, 2012). In contrast, Zhu et al., (2017) reported that a *Ruminococcaceae* bacteria strain CPB6 the CA production rate at initial pH 5.0-6.5 was almost the same, but it decreased to much lower levels when the initial pH was increased to 7.0-8.0. Further study is needed to address in order to promote the elongation chain from VFAs with EtOH addition using the acidogenic mixed culture with sugarcane vinasse as substrate.

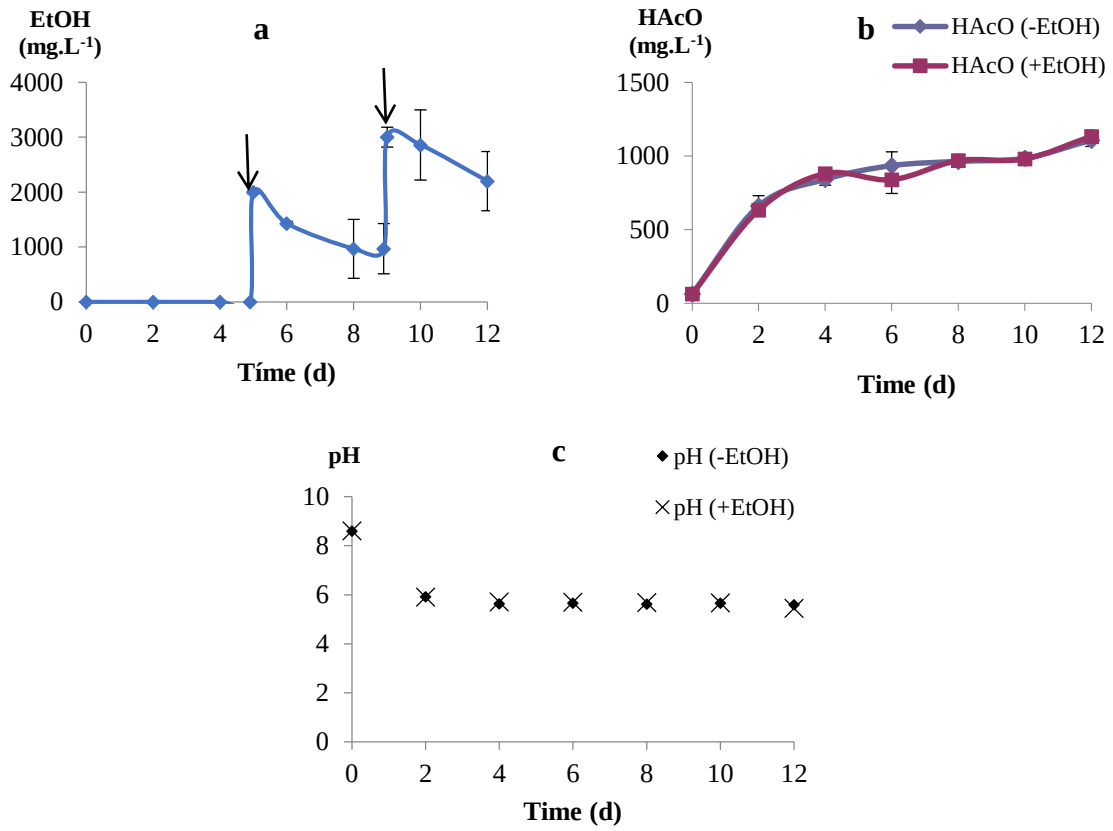
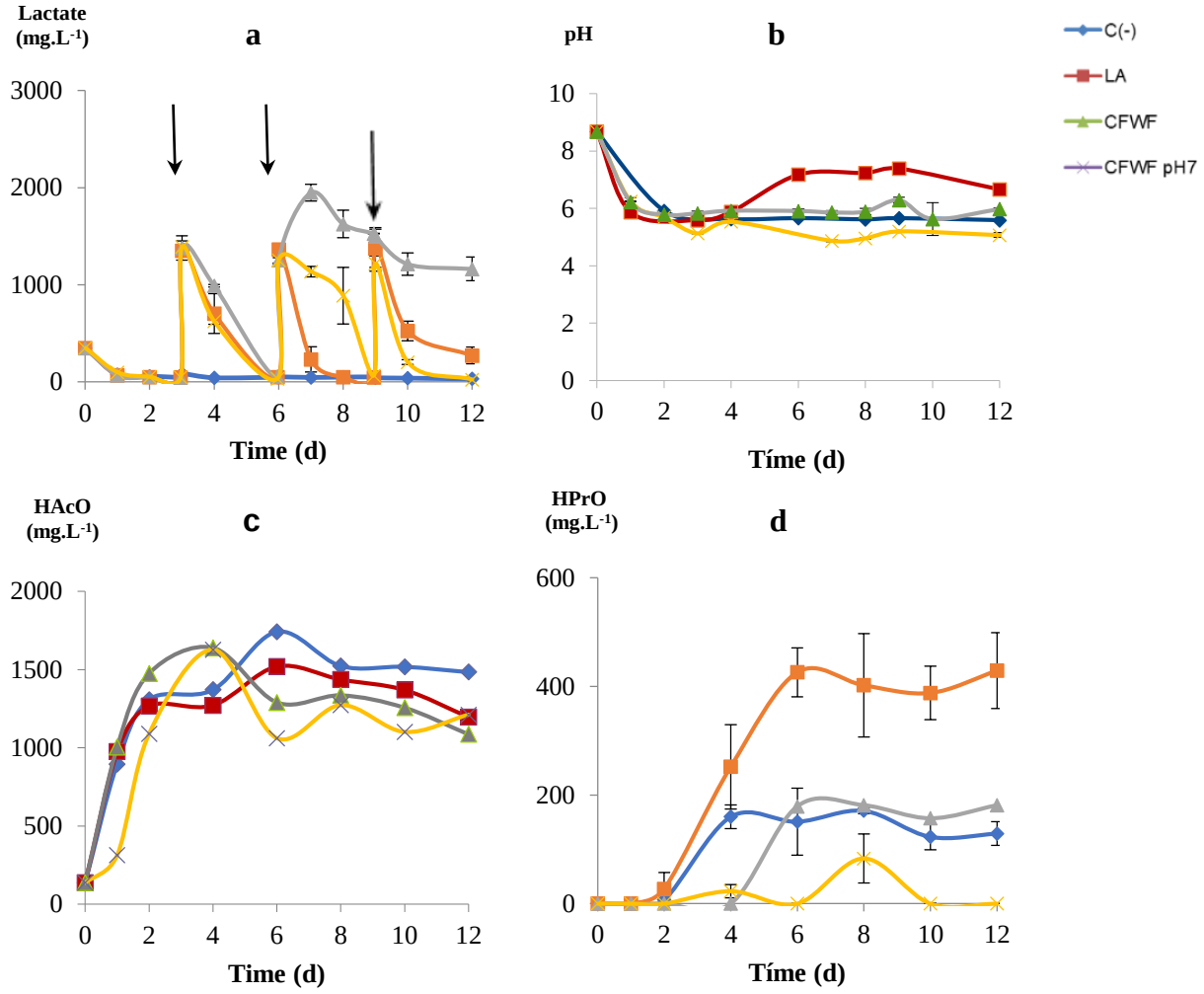


Figure 1. Ethanol addition and its effect on acetic acid production and pH profile during the fermentation of sugarcane vinasse with an acidogenic mixed culture: (a): ethanol addition; (b): acetic acid and (c): pH. The arrows denote ethanol addition on days 5 and 9 of the course of the fermentation.

Effect of lactate addition

It was study the effect the addition of LAc on VFA production and chain elongation at initial pH 8.8 of the culture media and 40 ºC where by adding LAc exogenous and a source of this substrate as CFWF at pH uncontrolled and adjustment pH at 7 to the fermentation broth. Figure 2 shows the carboxylic acid production with the addition of these substrates including a control without adding of LAc. As shown in Figure 2a, LAc from the substrates was added at 1350 mg.L^{-1} approximately on day 3, 6 and 9 when its concentration dropped markedly during the mixed culture fermentation. HLa was consumed quickly in the negative control until day 2 and during the course of fermentation remained at low levels. LAc added in all variant was also consumed quickly, except in the variant with CFWF at pH 4 and it was produced until day 7 and then was not consumed completely after 12 days. This phenomena could be related with the generation of pH between 4,9-5,2 that was inhibitory for the activity of mixed culture (Figure 2b) probably attributed to the increase of undissociated HLa, which can penetrate into the cell membrane and dissociate in the cell at the higher internal pH releasing a proton, resulting in acidification of the cytoplasm (Presser et al., 1997; Thylin et al., 1995; Tao et al., 2016). High proton concentration could be disrupts proton-motive force owing to the collapse of pH gradient and causes the loss of viability and cell destruction (Van Ginkel and Logan, 2005).



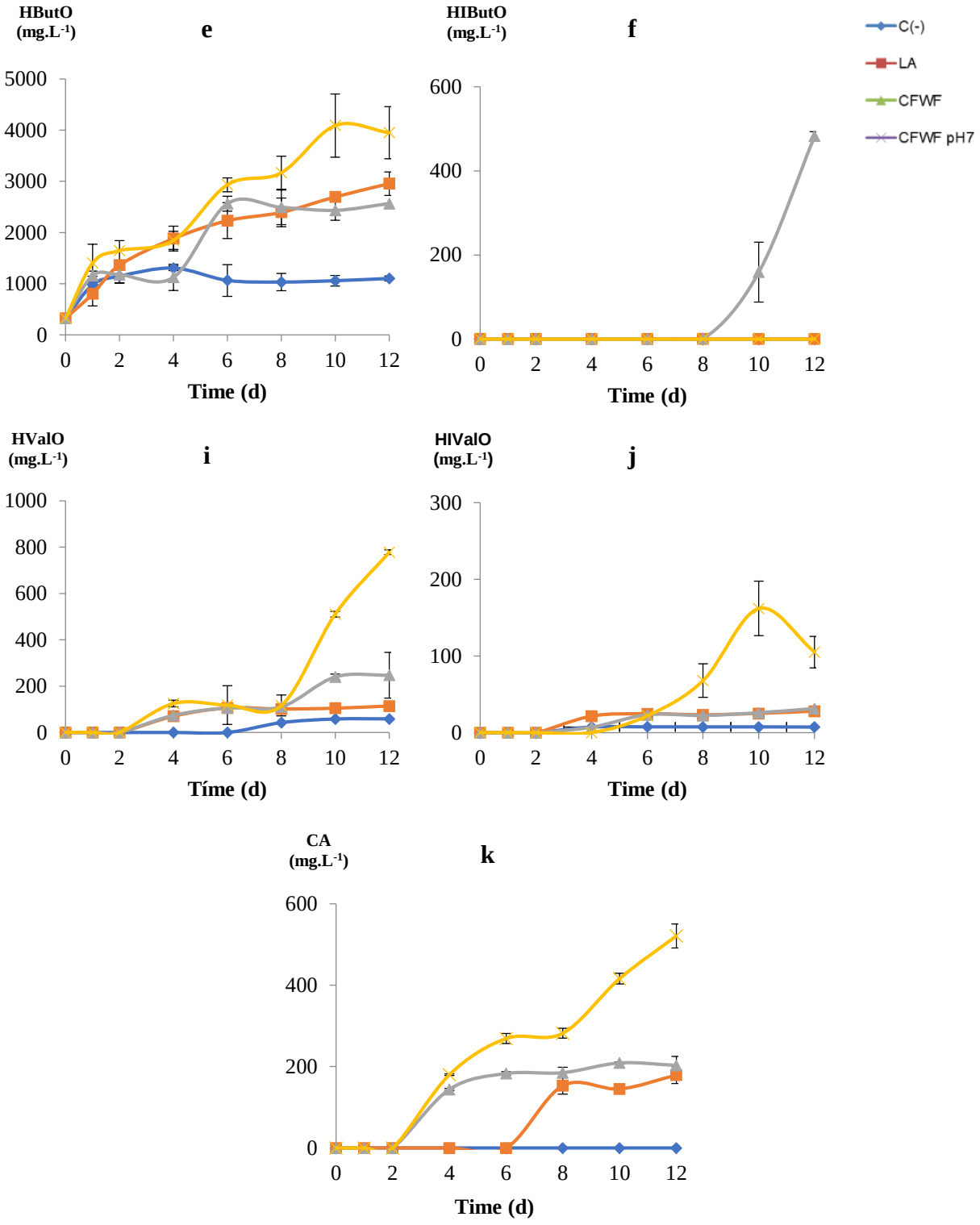


Figure 2. Effect the addition of lactate and cassava flour wastewaters fermented (CFWF) (with and without adjustment of the pH to 7: CFWF pH 7 and CFWF, respectively) in the production of organic acids using sugarcane as substrate: (a): Lactate addition; (b): pH; (c): acetic acid; (d): propionic acid; (e): butyric acid; (f): isobutyric acid, (i): valeric acid; (j): isovaleric acid and (k): caproic acid. The arrows denote lactate or CFWF addition on days 3, 6 and 9 of the course of the fermentation.

With LAc addition, HAcO concentration almost remained unchanged until day 2 but in the variants with CFWF added, it concentration was increased at 1620-1640 mg.L^{-1} at day 4 by HAcO endogenous of these materials (Figure 2c). At day 6 to the end the fermentation, HAcO

concentration was lower below the negative control in all variants. However, significant increases- in HPrO, HButO and CA ($p < 0,05$, Figure 2c-d and j) and lightly more HValO and iHValO (Figure 2f and i) were observed with LAc addition. HPrO, HButO, HValO and iHValO concentration increased to 3.3; 2.7; 2 and 3.8 times respectively with respect to the negative control to the end of fermentation. The maximum HPrO, HButO, HValO, iHValO and CA productivity was 71; 246; 10; and 14 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, respectively.

There could be a balance between the production and consumption of HAcO. For example, the hydrolysis and acidification of organic materials from sugarcane vinasse to produce HAcO until day 6; HAcO, LAc and carbohydrates endogenous from the CFWF added at days 3, 6 and 9, HButO could be produce via the reaction of HAcO with LAc, which in turn can be possibly converted to CA via the reaction of HButO with HAcO. As result, the produced HAcO could be offset by the consumed HAcO.

It is noteworthy that the reaction of LAc reduction to HPrO was favored with the generation of pH neutral with respect to the others variants (Figure 2b), possibly by the inhibition of the propionate-producing bacteria by the undissociated carboxylates at pH generated (4,8-6,2) in the others variants. It is known that HPrO production by pure cultures is favored at pH 4-4.5 but the yield is low, which is attributed to the fact that the propionate-producing bacteria are strongly inhibited by undissociated propionate, especially when the pH is below 6.0 (Zhou et al., 2018).

With CFWF added as LAc source without initial pH adjustment, similarly significant increases of HButO, HValO and CA was occurred and only in this variant, iHButO was produced, possibly due to at pH generated (4,9-5,2) favored the HButO degradation to this isoform according the reported by Lin and Hun (1993). However, with CFWF added at initial pH 7 was produced the best concentrations of HButO (4090 $mg.L^{-1}$), HValO (778 $mg.L^{-1}$), iHValO (162 $mg.L^{-1}$) and CA (521 $mg.L^{-1}$). HButO, HValO and iHValO concentrations were increased by 3.6, 13 and 14 times with respect to the negative control, respectively, at the end of fermentation (day 12). The maximum HButO, HValO, iHValO and CA productivity was 409; 65; 16 and 45 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, respectively. Then, slightly increase of pH until 5,8-6,0 favored the production of these metabolites (Figure 2b). Besides, HButO was the VFA predominant product and its maximum productivity and yield expressed as COD_{HButO}/CODfed was three and four times higher than the productivity and yield of the negative control, respectively. A maximum HButO yield expressed also as gHButO/gVSfed was 0,55. However, it maximum concentration and productivity was less than to report by other authors (Ai et al., 2016; Stein et al., 2017; Varrone et al., (2017)). Then, it is need to continue the studies with improving the fermentation method, immobilizing microbial cells to increase the biomass in a continuous reactor, the use of extraction method connecting the reactor to removing formed products; the use of isolated bacteria or mixed culture according the desired product in order to enhanced both the productivity and selectivity instead of batch mode led to a higher final product concentration.

Then, the reactor microbiomes acting on VFAs production in this study were capable of converting HPrO and HButO into longer chain fatty acids as HValO, iHValO and CA. The consumption of LAc from the substrates added possibly involves two reaction pathways: 1) the reduction the LAc to HPrO favored in the variant with LAc added, 2) chain elongation of LAc and HAcO (from the fermentation process and CFWF addition) to n-butyrate and caproate via reverse ß-oxidation (Spirito et al., 2014). In fact, Zhu et al., (2017) studied the production of n-CA from LAc as substrate using isolated *Ruminococcaceae* bacterium strain CPB6. They proposed that the pathway for CA production from LAc with this strain might be similar to the reverse β-oxidation pathway used in the conversion of EtOH to CA. LAc is converted to acetyl-CoA and this process provides energy to promote the chain elongation where CA was the predominant product.

Although mixed culture with LAc as substrate have been studied for elongation of VFAs, the knowledge of mechanism of LAc conversion and its effects on the chain elongation

of carboxylic acids is still limited, then it is need to continue these studies as systematic transcriptomic analysis, isotope-labeled flux analysis or genetic engineering manipulation in order to regulate the targeted the organic acid production via mixed culture fermentation.

Conclusions

The mixed culture selected for carboxylic acid production from sugarcane vinasse as substrate was evaluated in this study in system batch and fed-batch under unsterile conditions and without the addition of other nutrients. The mixed culture produced in the liquid phase VFAs mainly HAcO, HButO and HPrO and less quantities HValO, iHValO, iHButO and CA.

EtOH addition to mixed culture had not a positive effect in the organic acids production. LAc and CFWF added stimulated the HPrO and HButO production and elongation of chain of VFAs until HValO, iHValO and CA. HButO was the dominant product. LAc addition favored the generation of pH neutral that had also a positive effect in these metabolites production fundamentally in the reduction reaction to produce HPrO (with a maximum productivity of 71 $mg.L^{-1}.d^{-1}$).

CFWF added at pH 7 also increased the HButO, HValO, iHValO and CA productivity until 409; 65; 16 and 45 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, respectively, with respect to CFWF added without pH adjustment. Then, fed-batch system of mixed culture with addition of CFWF was adequate in order to increase a yield and productivity especially the HButO production with respect to the batch system.

These findings provide evidence for regulating carboxylic acid production during mixed culture fermentation with sugarcane vinasse by LAc addition and pH neutral. Further research is needed for a better understanding of longer chain VFAs production regulated by mixed culture and addition of EtOH and LAc, such as the role of these electron donors and the microbial consortia succession involved.

References

Acharya, B.K., Mohana, S., Madmwar, D., 2008. Anaerobic treatment of distillery spent wash – A study on up flow anaerobic fixed film bioreactor. Bioresource Technology. 99, 4621–4626.

Adorno M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and validation of two methods to quantify acids (C2-C6) by GC/FID headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). AJAC. 5, 406-414.

Agler, M.T., Spirito, C.M., Usack, J.G., Werner, J.J., Angenent, L.T., 2012. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. Energy Environ Sci. 5, 8189-8192.

Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H.**,** Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. Trends Biotechnol. 29,70-78. http://doi: 10.1016/j.tibtech.2010.11.006.

Ai, B., Chi, X., Meng, KJ., Sheng, Z., Zheng, L., Zheng, C., Li, J., 2016. Consolidated bioprocessing for butyric acid production from rice straw with undefined mixed culture. Front Microbiol. 7, 1648. eCollection 2016.

Angenent, L.T., Richter, H., Buckell, W., Spirito, C.M., Steinbusch, K.J.J., Plugge, C.M., Strik, D.P.B.T.B., Grootscholten, T.I.M., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M., 2016. Chain elongation with reactor microbiome: open culture biotechnology to produce biochemicals. Environ Sci Technol. 50, 2796-2810.

APHA, APWA, WEF. 2005 Standard methods for examination of water and wastewater, 21st Edition, Washington DC.

Calvacante, W.A., Leitão, R.C., Gehring, T.A., Angenet, L.T., Santaella, S.T., 2017. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. Process Biochemistry. 54, 106-119.

CONAB, Cana-de-açúcar tem queda de 3,6% e fecha safra 2017/18 em 633,26 milhões de t, 2018. Companhia de abastecimento. https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2327-cana-de-acucar-tem-queda-de-3-6-e-fecha-safra-2017-18-em-633-26-milhoes-de-t.

Dahiya, S., Sarkar, O., Swany, Y.V., Mohan, V., 2015. Acidogenic fermentation food waste for volatile fatty acid production with co-generation of hydrogen. Bioresour Technol. 182, 103-113.

Desbois, A.P., 2012. Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other Industries. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. 7, 111-122.

Fuess, L.T., Garcia, M., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertirrigation. J. Environ. Manage. 145, 210-229.

Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., Gonzalez-Mtnez, J.G., 2017. Selective VFA production potential from organic waste streaming: Assessing temperature and pH influence. Bioresource Technology. 244, 1081-1088.

Grootscholten, T.I.M, Kinsky dal Borgo, F., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013 Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. Biomass and Energy. 48, 10-16.

Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. Bioresource Technology. 136 735–738.

Harvey, B.G., Meylemans, H.A., 2014. 1-Hexene: a renewable C6 platform for full-performance jet and diesel fuels. Green Chem. 16, 770–776.

Hoelzle, R.D., Virdis, B., Batstone, D.J., 2014. Regulation mechanisms in mixed and pure culture microbial fermentation. Biotechnol Bioeng. 111, 2139-2154.

Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., Li, M., 2013. Volatile fatty acids production from food wastes: effect of pH, temperature and organic loading rate. Bioresour. Technol. 143, 525-530.

Jie, W., Peng, Y., Ren, N., Li, B., 2014 Volatile fatty acids (VFAs) accumulation and microbial community structure of excess sludge (ES) at different pHs. Bioresource Technology. 152, 124-129.

Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, W.S., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L.J., Wang, J., Wu, Y., 2016. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. Bioresour Technol. 219, 738-748.

Kim, D.H., Kim, S.H., Jung, K.W., Kim, M.S., Shin, H.S., 2011. Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. Bioresource Technology. 102, 8646-8652.

Kucek, L.A., Xu, J., Nguyen, M., Angenent, L.T., 2016. Waste Conversion into *n*-Caprylate and *n*-Caproate: Resource Recovery from Wine Lees Using Anaerobic Reactor Microbiomes and In-line Extraction. Front Microbiol. 7, 1892. http://doi: 10.3389/fmicb.2016.01892.

Liu, J., Liu, J-N., Yuan, M., Shen, Z-H., Peng, K-M., Lu, L-J., Huang, X-F., 2016. Bioconversion of volatile fatty acids derived from waste activated sludge into lipids by *Cryptococcus curvatus*. Bioresource Technology. 211, 548–555.

Ma, H., Chen, X., Liu, H., Liu, H., Fu, B., 2016. Improved volatile fatty acids anaerobic production from waste activated sludge: effect of pH. Water Res. 46, 799-807.

Moraes B.S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 44, 888-903.

Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as function of pH and lactic concentration. Applied and Environmental Microbiology. 63, 2355-2360.

Seedorf, H., Fricke, W.F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeier, C., Thauer R.K., Gottschalk, G., 2008.

The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. Proc Natl Acad Sci USA. 105, 2128-2133.

Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. Current Opinion in Biotechnology. 27, 115–122.

Stein, U.H., Wimmer, B., Ortner, M., Fuchs, W., Bochmann, G., 2017. Maximizing the production of butyric acid from food waste as precursor for ABE-fermentation. Sci Total Environmental. 598, 993-1000.

Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Plugge, C.M., Buisman, C.J.N., 2010. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. Energy Environ Sci. 4, 216-224.

Tao, Y., Hu, X., Zhu, X., Jin, H., Xu, Z., Tang, Q., Li, X., 2016. Production of butyrate from lactate by a newly isolated *Clostridium* sp BPY5. Appl Biochem Biotechnol. 179, 361-374.

Taylor, K.A., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Applied Biochemistry and Biotechnology. 56, 49–58.

Thylin, I., Schuisky, P., Lindgren, S., Gottschal, J.C., 1995. Influence of pH and lactic acid concentration of *Clostridium tyrobutyricum* during continuos growth in a pH-auxostat. The Journal of Applied Bacteriology. 79, 663-670.

Valentino, F., Morgan-Sagastumeb, F., Campanaria, S., Villanoa, M., Alan Werker, A., Majone, M., 2017. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. New Biotechnology. 37, 9–23.

Van Ginkel, S., Logan, B.E., 2005. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. Environmental Sci and Technology. 39, 9351-9356.

Varrone, C., Floriotis, G., Heggeset, T.M.B., Le, S.B., Markussen, S., Ioannis V., Skiadas, I.V., Gaval, H.N., 2017. Continuous fermentation and kinetic experiments for the conversion of crude glycerol derived from second-generation biodiesel into 1,3 propanediol and butyric acid. Biochemical Engineering Journal. 128, 149-161.

Weimer, P.J., Stevenson, D.M., 2012. Isolation, characterization, and qualification of *Clostridium kluvery* from the bovine rumen. Appl Microbiol. Biotechnol. 94, 461-466.

Yu, G.H., He, P.J., Shao, L.M., He, P.P., 2008. Toward understanding the mechanism of improving the production of volatile fatty acids from activated sludge at pH 10. Water Res. 42, 4367-4644.

Yuan, H., Chen, Y., Zhang, H., Jiang, S., Zhou, Q., Gu, G. 2006. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. Environ. Sci. Technol. 40, 2025-2029.

Zhang, D., Li, X., Jia, S., Dai, L., Zhao, J., Chen, Y., Dai, X., 2015 A review: factors affecting excess sludge anaerobic digestion for volatile fatty acids production. Water Science and Technology. 72, 678-688.

Zhou, M., Yan, B., Wong, J.W.C., Zhang Y., 2018. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food wastes: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathway. Bioresour. Technol. 248, 68-78.

Zhu, X., Zhou, Y., Wang, Y., Wu, T., Li, X., Li, D., Tao, Y., 2017. Production of high-concentration of caproic acid from lactate throgh fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6. Biotecnology Biofuels. 10, 102. http://doi 10.1186/s13068-017-0788-y.

DEVELOPMENT OF A LOW-COST SENSOR APPLIED IN ANAEROBIC PROCESS WASTEWATER COMPONENTS QUANTIFICATION

Rafael Frederico Fonseca[1]; Marcelo Zaiat[2]

[1] Post Doctor Fellow, Laboratory of Biological Processes, Center for Research, Development and Innovation in Environmental Engineering
[2] Professor, Laboratory of Biological Processes, Center for Research, Development and Innovation in Environmental Engineering

Abstract. *To anaerobic digestion processes achieve their optimal performance, the understanding on how the metabolic pathways affect them is a key step. However, an accurate process comprehension is usually impaired by the large amount of chemical analysis and by the elevated cost of the necessary equipment. To surpass this issue, the aim of this project is to develop an electrochemical sensor that can identify most of the influent wastewater, as well the reactor bulk liquid, components as possible. Due to the complexity of such waters, the identification will be limited to certain concentration levels for the classifiable components. To achieve the objective, several experimental procedures, allied with comprehensive study of metal and non-metal electrodes, associated with electrochemical voltametric analysis, will be carried out. The classification will be evaluated using the Matlab Classification Learner app. The results will be analyzed in terms of identification accuracy and precision, which means, respectively, the percentage of correct identification and the range of the levels for each component.*

Introduction

The achievement of anaerobic digestion processes optimum performance is commonly impaired by process instability, which can be caused by changes in operational conditions, variations of pH, inhibitors, and others (Jin et al., 2016). Despite few process inputs can be fully controlled, monitoring the process is a key step to improve process understanding, as well to take the necessary actions to prevent those problems. Parameters like pH, alkalinity, biogas production composition are typical online indicators of anaerobic reactors state. However, these are not the preferred indicators for the biological current status, because the composition and concentration of the wastewater, mainly the volatile acids (VFA), provide better information about the overall process condition (Falk et al., 2015). Anaerobic digestion chemical analysis monitoring is mainly based on off-line techniques. The analytical methods often involve the use of equipment as HPLC, GC, oxidation methods to determine the chemical oxygen demand (COD) using sulfuric acid and/or dichromate (Kondo et al., 2014; Xu et al., 2014). The dichromate must be strictly managed, because it contains hexavalent chromium, which is poisonous and is known to cause cancer. For these methods, their effectiveness on real processes are impaired by the cost of the necessary equipment and the required time for each measurement to be carried out.

As alternative to the classical analytical methods, bio-electrolytic sensor has been explored. These sensors rely on measurements of electrical charges over known biomasses and correlating it with VFA concentration in the reactor. However, if for any reason, the biomass is affected, the measurements may become biased (Kretzschmar et al., 2017). On the other hand, electrochemical techniques have been applied to evaluate VFA and chemical oxygen demand (COD) concentrations with great precision and with long-term reliable performance (Chailapakul et al., 2000; Kondo et al., 2014). Despite these advantages, there is a lack of researches concerning complex wastewaters as those found in anaerobic digestion treatment processes, as well those observed during the treatment (Oliveira et al., 2016; Oliveira et al.,

2017). In fact, the wastewater complexity is the major problem faced by electrochemistry to correctly identify its components.

This proposed study is based on an anaerobic process treating piggery wastewater contaminated with the antibiotic sulfamethazine (SMZ). It was previously found that the metabolic pathways have major role in SMZ degradation, and that operational conditions, organic load rate, hydraulic retention time and SMZ concentration deeply affect the process performance (Fonseca et al., 2018). Therefore, to improve the understanding on how the metabolic pathways responsible for the antibiotic degradation, the main objective is to develop a low-cost sensor for online monitoring and quantification of piggery wastewater components concentration. The objective is to identify the detectable components with an accuracy of 200 $mg_{O2}.L^{-1}$ in COD in a 2000 $mg_{O2}.L^{-1}$ wastewater. Note that, it is expected that carbohydrates will not be easily measured with this method due to their electrochemical characteristics. Therefore, the secondary objective, depending on the progress of the main objective, is an offline measurement of the proposed wastewater COD. Due to some components electrochemical recalcitrance, alkaline or saline solutions can be added to the medium to improve anodic decomposition (Chailapakul et al., 2000; Huang & Kim, 2017; Kondo et al., 2014; Lopes et al., 2018).

The proposed accuracy for this sensor is based on the complexity of the wastewater and in the available classification algorithms, which separate the samples in distinct groups (Tiwari et al., 2013). In addition, the understanding of a biological process can be greatly improved by using mathematical models as support (Bai et al., 2017; Lara-Cisneros & Dochain, 2018). Considering the proposed low-cost monitoring system, CO_2, CH_4, H_2, in gaseous phase, pH and redox potential in liquid phase are common measurements acquired in anaerobic reactor monitoring systems. The first four generally can be estimated using ADM1 based models, and their related parameters and metabolic pathways adjusted and estimated from real processes data. Online monitoring of a process can be carried out by feeding back the model with those data (Wang et al., 2018). In fact, the better the identification of bulk liquid data, the better the estimation of other metabolic pathways that can be estimated by ADM1, e.g., valeric, propionic, butyric and acetic acid. Thus, even with a limited accuracy, online electrochemical sensor can help to improve several understandings in such complex processes as the anaerobic digestion.

Methodology and Technological Challenges

Due to the earlier stage of development of this project, a laboratory produced wastewater will be used (Oliveira et al., 2016). The main components of this wastewater are beef extract, cellulose, sucrose, starch, soy oil, a salty solution, sodium bicarbonate and ammonium chloride, as shown in Table 1. In a real wastewater obtained from a pig farm, also were found some organic acids, such as the acetic, propionic, butyric, isobutyric, isovaleric, and caproic. When considering the reactor operations, also were observed the citric, malic, succinic, lactic and formic acids. Therefore, the major challenge of this study is to develop a low-cost sensor, associated with a classification algorithm that is capable of identify most of the components within the specified accuracy range. The observed concentrations of these components, for both real wastewater and reactor bulk liquid are shown in Table 2. The studies will be divided in some steps:

1- Theoretical determination and use of different types electrodes for distinct types of substrates and their electrochemical interactions considering the wastewater to be characterized, under the low-cost ness limitation.
2- Determination of the most appropriated electrochemical methodology, among impedance spectroscopy, cyclic voltammetry and chrono amperometry for the specified wastewater and electrodes.

It is expected the use of the host institution potentiostat in these first two steps, in order to choose the most adequate method to identify the wastewater components. To achieve this

aim, a correlation analysis is suggested as a suited approach for the complex wastewater (Gabor et al., 2017).

3- Determination and implementation of experimental procedures to assess the selectiveness between the proposed electrodes/electrochemical methods and some wastewater component groups. To minimize the number of experiments, the groups will be selected according to their electrochemical characteristics. Thus, the groups will be divided into carbohydrates and lipids, proteins, volatile fatty acids, salts and carbonate buffer. The beef extract will be split in some proteins, which will be evaluated together. The experimental setup may be an association of central composite designs, Box-Behnken design and randomly generated experiments designs, in order to explore several combinations of the desired identifiable levels of each component in their respective groups. Other experimental setups may also be considered.
4- Determination and implementation of experimental procedures to assess the selectiveness between the most relevant components evaluated in the previous step, and evaluation of their identification using *Matlab Classification Learner*. The experimental setup will be conducted as in the step 3.
5- Evaluation of the previous steps and determination of the feasibility of the secondary objective, considering the time frame of the internship. If it is considered feasible, the same procedure of the previous steps will be applied, taking into account the selectiveness of the previously developed electrode.

Table 1: Organic and inorganic composition of the laboratory produced wastewater.

Inorganic constituent	**Concentration ($mg.L^{-1}$)**	**Organic constituent**	**Concentration ($mg.L^{-1}$)**
KH_2PO_4	430.6	Beef extract	876.0
$CaCl_2$	337.8	Sucrose	306.0
KCl	623.9	Starch	920.0
$MgCl_2.6H_2O$	334.6	Cellulose	306.0
K_2SO_4	152.0	Soy oil	650.0
$FeSO_4.7H_2O$	39.2		
$NaHCO_3$	1512		
NH_4Cl	1500		

Table 2: Volatile fatty acids measured in the real wastewater and during reactor operation.

Organic Acid	**Real wastewater concentration ($mg.L^{-1}$)**	**Reactor operation concentration ($mg.L^{-1}$)**
Malic	-	81
Succinic	-	47
Formic	-	60
Acetic	372	411
Propionic	266	492
Isobutyric	27	100
Butyric	60	99
Isovaleric	35	250
Valeric	-	94
Caproic	10	66

Analysis of the Results

In Figure 1 is shown how Matlab classification learner uses the voltammetry information to classify the component concentration. Figure 1 is the result of a combination of

a two factors central composite design, beef extract versus salts concentration. The levels for the classified component are shown in both y and x-axis, and a randomly generated design. The randomly generated design was used to test the classifier accuracy. The best result would be all green squares. Thus, changes in voltammetry methodology, as well in the type of electrodes, will be assumed once the classifier cannot correctly classify more than 90% of experimental samples.

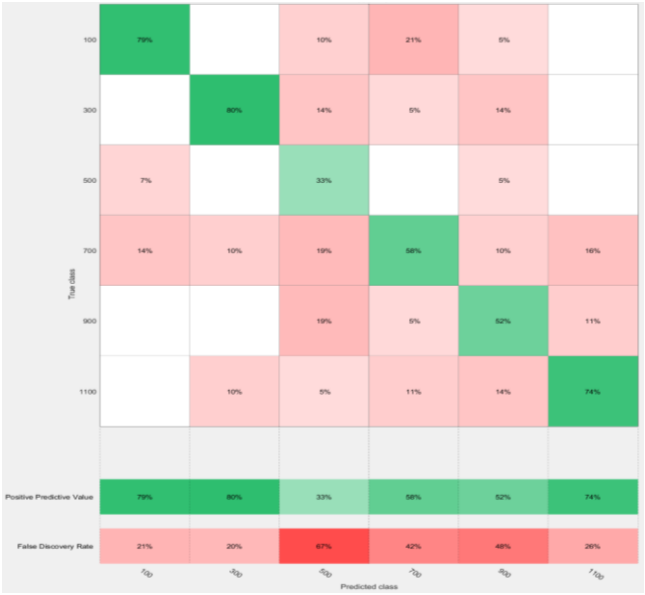


Figure 1: *Matlab Classification Learner* confusion matrix. The y-axis represents the true class of an experimental result, the x-axis represents the identification result. The green squares represent the percentage of correct predictions, while the red square the wrong predictions.

Project execution schedule

The forecast of the project schedule is presented in Table 3. As previously state, the secondary objective will be carried out once concluded the primary objective. Depending on the necessary time to fulfill the proposed tasks, it is assumed that part of the documentation can be concluded after the internship.

Table 3: Project execution schedule

	Activity/Month	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Primary Objective	Bibliographic Revision	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Determination and use of different types electrodes		x	x	x								
	Determination of the most appropriated electrochemical methodology			x	x	x							
	Experimental procedures to assess the component selectiveness				x	x	x						
	Documentation of the results					x	x	x	x				
Secondary Objective	Determination and use of different types electrodes						x	x	x	x			
	Determination of the most appropriated electrochemical methodology							x	x	x	x		
	Experimental procedures to assess the component selectiveness								x	x	x	x	
	Documentation of the results									x	x	x	x

References

Bai, X., Li, Z.F., Wang, X.M., He, X., Cheng, S.K., Bai, X.F., Gao, R.L., 2017. Online measurement of alkalinity in anaerobic co-digestion using linear regression method. Int J Agr Biol Eng, 10(1), 176-183.

Chailapakul, O., Popa, E., Tai, H., Sarada, B.V., Tryk, D.A., Fujishima, A., 2000. The electrooxidation of organic acids at boron-doped diamond electrodes. Electrochem Commun, 2(6), 422-426.

Falk, H.M., Reichling, P., Andersen, C., Benz, R., 2015. Online monitoring of concentration and dynamics of volatile fatty acids in anaerobic digestion processes with mid-infrared spectroscopy. Bioproc Biosyst Eng, 38(2), 237-249.

Fonseca, R.F., Oliveira, G.H.D., Zaiat, M. 2018. Development of a Mathematical Model for the Anaerobic Digestion of Antibiotic-Contaminated Wastewater. Chem Eng Res Des, 134, 18.

Gabor, A., Villaverde, A.F., Banga, J.R., 2017. Parameter identifiability analysis and visualization in large-scale kinetic models of biosystems. Bmc Syst Biol, 11.

Huang, W., Kim, Y., 2017. Electrochemical techniques for evaluating short-chain fatty acid utilization by bioanodes. Environ Sci Pollut R, 24(3), 2620-2626.

Jin, X., Angelidaki, I., Zhang, Y., 2016. Microbial Electrochemical Monitoring of Volatile Fatty Acids during Anaerobic Digestion. Environ Sci Technol, 50(8), 4422-4429.

Kondo, T., Tamura, Y., Hoshino, M., Watanabe, T., Aikawa, T., Yuasa, M., Einaga, Y., 2014. Direct Determination of Chemical Oxygen Demand by Anodic Decomposition of Organic Compounds at a Diamond Electrode. Anal Chem, 86(16), 8066-8072.

Kretzschmar, J., Koch, C., Liebetrau, J., Mertig, M., Harnisch, F., 2017. Electroactive biofilms as sensor for volatile fatty acids: Cross sensitivity, response dynamics, latency and stability. Sensors Actuators B-Chem, 241, 466-472.

Lara-Cisneros, G., Dochain, D., 2018. Software Sensor for Online Estimation of the VFA's Concentration in Anaerobic Digestion Processes via a High-Order Sliding Mode Observer. Ind Eng Chem Res, 57(42), 14173-14181.

Lopes, A.M., Tenreiro Machado, J.A., Ramalho, E., Silva, V., 2018. Milk Characterization Using Electrical Impedance Spectroscopy and Fractional Models. Food Anal Method, 11(3), 901-912.

Oliveira, G.H.D., Santos-Neto, A.J., Zaiat, M., 2016. Evaluation of sulfamethazine sorption and biodegradation by anaerobic granular sludge using batch experiments. Bioproc Biosyst Eng, 39(1), 115-124.

Oliveira, G.H.D., Santos-Neto, A.J., Zaiat, M., 2017. Removal of the veterinary antimicrobial sulfamethazine in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor subjected to step changes in the applied organic loading rate. J Environ Manage, 204, 674-683.

Tiwari, K., Tudu, B., Bandyopadhyay, R., Chatterjee, A., 2013. Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue. J Food Eng, 117(2), 205-210.

Wang, X.M., Bai, X., Li, Z.F., Zhou, X.Q., Cheng, S.K., Sun, J.C., Liu, T., 2018. Evaluation of artificial neural network models for online monitoring of alkalinity in anaerobic co-digestion system. Biochemical Eng J, 140, 85-92.

Xu, Z.Y., Zhao, M.X., Miao, H.F., Huang, Z.X., Gao, S.M., Ruan, W.Q., 2014. In situ volatile fatty acids influence biogas generation from kitchen wastes by anaerobic digestion. Bioresource Technol, 163, 186-192.

MELAÇO *vs.* CALDO: MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM BIORREFINARIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO À DIVERSIFICAÇÃO DA GERAÇÃO DE ENERGIA RENOVÁVEL

Lucas Tadeu Fuess [1]; Marcelo Zaiat [2]; Claudio Augusto Oller do Nascimento [3]

[1] Pós-doutorando do Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP (DEQ/EP/USP)
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, USP (SHS/EESC/USP)
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, USP (DEQ/EP/USP)

Resumo. *A diversificação do portfólio de bioprodutos/bioenergia nas biorrefinarias de cana-de-açúcar é requerida para incrementar tanto a eficiência de conversão da matéria-prima base quanto o alcance de mercado dos produtos. Nesse contexto, avaliou-se o potencial de produção de biohidrogênio (bioH_2) por meio da fermentação termofílica de caldo e melaço como alternativa ao processamento convencional da cana-de-açúcar, utilizando-se reatores contínuos (leito fixo estruturado) e em batelada. O controle do pH efluente (> 4) mostrou-se fator chave para estimular a fermentação dos substratos, sendo o melaço caracterizado como substrato mais adequado para produção contínua de bioH_2, considerando uma composição nutricional mais balanceada. A carência de nitrogênio limitou diretamente a fermentação do caldo. Uma relação DQO/N ótima de aproximadamente 100 maximizou a produção de bioH_2 de ambos caldo e melaço. Finalmente, os perfis de concentração de intermediários sugeriram o estabelecimento da fermentação lática caponofílica acoplada a produção de butirato e bioH_2 via fermentação do lactato e acetato com principais vias metabólicas nos reatores.*

Introdução

O processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol, açúcar e eletricidade representa um modelo consolidado de biorrefinaria, no qual o balanço de energia (BE) ou energia retornada sobre energia investida (EROI, do inglês *energy return on energy invested*) para a produção de etanol atinge valores da ordem de 6,5–7,7 (Turdera, 2013). Entretanto, o presente cálculo assume apenas o consumo de energia fóssil na fração correspondente ao investimento energético, fato que mascara a energia efetivamente recuperada como etanol nas destilarias. Estudos detalhados indicam valores de EROI na faixa de 1,0–2,0 ao se considerar o consumo total de energia na produção de etanol (Pimentel e Patzek, 2008), no qual a energia renovável (eletricidade e vapor) gerada a partir da queima do bagaço e consumida na cadeia produtiva também é incluída no cálculo. Esse valor é menor do que a mínima EROI recomendada para sistemas modernos de produção de energia (> 3,0; Atlason e Unnthorsson, 2014), o que confronta a eficiência energética real da indústria sucroalcooleira.

Diversificar o aproveitamento da cana-de-açúcar é, portanto, necessário para melhorar a eficiência energética dos processos de conversão e prover uma maior gama de produtos, buscando-se aplicar, de maneira mais ampla, o conceito de biorrefinaria no processamento dessa matéria-prima. Particularmente, o emprego da biodigestão anaeróbia como etapa central de processamento tem potencial para suprir as limitações inerentes ao "aproveitamento convencional" da cana-de-açúcar, uma vez que a versatilidade do processo permite recuperar um portfólio diversificado de bioprodutos, incluindo: correntes de biogás ricas em metano e/ou hidrogênio para geração direta de eletricidade/energia térmica ou produção de biometano visando à substituição de gás natural e diesel (Fuess et al., 2018), metabólitos solúveis de valor agregado (Sydney et al., 2014) e bioplásticos a partir de efluentes fermentados (Amulya et al., 2014). Além disso, custos operacionais e energéticos em plantas de biodigestão tendem a ser

muito menores comparativamente à produção convencional de etanol, fato que pode impactar positivamente o BE do processo ao eliminar etapas amplamente dispendiosas em termos energéticos, tais como a destilação.

Atualmente, a aplicação da biodigestão anaeróbia nas biorrefinarias de cana-de-açúcar está pautada principalmente no processamento da vinhaça, caracterizada como a principal água residuária da cadeia produtiva do etanol. Apesar dos comprovados ganhos ambientais e energéticos associados a essa prática (Del Nery et al., 2018; Fuess et al., 2018), apenas uma fração residual do conteúdo orgânico da cana-de-açúcar é usada para a produção complementar de bioenergia, indicando que o potencial de recuperação de energia a partir dos processos anaeróbios é explorado marginalmente nas biorrefinarias de cana-de-açúcar. O emprego de substratos brutos diretamente derivados da cana-de-açúcar, tais como o caldo e o melaço, em sistemas anaeróbios apresenta grande potencial para a produção direta de energia, uma vez que a conversão da fração orgânica pode ser quase que completamente direcionada à recuperação de produtos-alvo devido aos requerimentos nutricionais mínimos intrínsecos às populações anaeróbias.

O aproveitamento efetivo de sistemas anaeróbios no contexto das biorrefinarias depende diretamente da aplicação da separação de fases, na qual o processo é dividido em duas etapas principais buscando-se favorecer a atividade de grupos microbianos distintos, i.e., populações acidogênicas e metanogênicas, em reatores sequenciais. A versatilidade de sistemas fermentativos permite recuperar uma ampla gama de produtos, a partir dos quais a produção de biohidrogênio (bioH_2) é destacada no presente trabalho. A implementação de abordagens alternativas para produção de hidrogênio em escala industrial procura minimizar a dependência de combustíveis fósseis comumente observada em processos termoquímicos tradicionais, fato que impacta negativamente a relevância ambiental do uso do hidrogênio como um carreador de energia (Ghimire et al., 2015).

Estudos anteriores no contexto da biorrefinaria de cana-de-açúcar indicaram o potencial da utilização da vinhaça como substrato na produção fermentativa de bioH_2 (Ferraz Jr. et al., 2014; Fuess et al., 2016, 2019; Sydney et al., 2014) independentemente da complexidade composicional da água residuária em questão. Considerando o papel primário dos carboidratos na produção de bioH_2 em sistemas fermentativos (Ghimire et al., 2015), o caldo (diretamente obtido a partir da cana-de-açúcar nas moendas) e o melaço (principal subproduto da produção de açúcar a partir da remoção contínua de água do caldo) compreendem, teoricamente, substratos prontamente disponíveis para a produção de bioH_2 em grande escala, provendo um produto de alto valor agregado para incrementar/diversificar as receitas do aproveitamento da cana-de-açúcar em complemento à produção convencional de açúcar, etanol e eletricidade (Fuess et al., 2018). Por sua vez, os substratos fermentados podem ser explorados no contexto dos processos anaeróbios, conforme previamente indicado.

O presente estudo aborda diversos aspectos do emprego de caldo e melaço na produção fermentativa de bioH_2. O objetivo primário incluiu a comparação de ambos os substratos na fermentação termofílica contínua utilizando-se reatores de leito fixo estruturado (AnSTBR, do inglês *anaerobic structured-bed reactor*). Um detalhado programa de monitoramento forneceu subsídios para entender limitações e potenciais do processo fermentativo. Testes adicionais em batelada foram empregados para avaliar especificidades da fermentação do caldo, fornecendo um panorama holístico da produção de bioH_2 a partir dos substratos de interesse.

Material e Métodos

Caracterização dos substratos: caldo e melaço

Os substratos utilizados foram coletados em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar padrão, i.e., produzindo açúcar, etanol e eletricidade, localizada no município de Pradópolis, SP. Duas amostragens foram realizadas, i.e., uma durante a safra 2017/2018 (caldo e melaço) e outra durante a safra 2018/2019 (apenas caldo). Baseando-se em critérios de identificação,

quando pertinente, as amostras de caldo foram denominadas SugJce-17/18 e SugJce-18/19 respectivamente para as safras 2017/2018 e 2018/2019, enquanto as amostras de melaço foram identificadas como SugMol. Características composicionais básicas das amostras de caldo e melaço são apresentadas na Tabela 1. Ambos os substratos foram diluídos até valores requeridos de demanda química de oxigênio total (DQOt) previamente à alimentação dos reatores.

Tabela 1: Caracterização composicional das amostras de caldo e melaço.

Parâmetro	SugJce-17/18	Sug-Jce-18/19	SugMol
DQOt	122000[a]	149500[a]	945[b]
DQOs	118450[a]	147375[a]	940[b]
DQOs/DQOt	0,97	0,99	0,99
CH[c]	117375[a]	131500[a]	691[b]
SO_4^{2-}	403[a]	417[a]	7,41[b]
CODs/ SO_4^{2-}	294	353	129
pH	4,54	6,14	-

Parâmetros: DQOt – demanda química de oxigênio total (amostras não-filtradas), DQOs – demanda química de oxigênio solúvel (amostras filtradas em 0,45 μm), CH – carboidratos totais, SO_4^{2-} - sulfato.

Notas: [a]Valores em $mg.L^{-1}$, [b]Valores em $mg.g^{-1}$melaço, [c]Medido como mg-glicose.L^{-1}.

Reatores contínuos: aparato experimental, inoculação e condições operacionais

Dois reatores anaeróbios de leito fixo estruturado em escala de bancada, denominados R1 (1,9 L) e R2 (2,0 L), foram continuamente operados (179 dias) em paralelo em condições termofílicas de temperatura (55ºC). Caldo e melaço foram utilizados, respectivamente, na alimentação de R1 e R2. Ambos os reatores foram construídos em acrílico tubular e preenchidos com anéis de polietileno de baixa densidade (PEBD) na região do leito fixo, semelhante ao previamente reportado em Fuess et al. (2019).

A inoculação dos reatores foi baseada na fermentação natural da vinhaça em condições termofílicas (55ºC). Nesse procedimento, um volume definido de vinhaça foi mantido exposto à atmosfera na ausência de luz e temperatura controlada (55ºC) por um período de três dias, a partir do qual o efluente naturalmente fermentado foi recirculado no reator em circuito fechado, buscando-se garantir a adesão da biomassa no material suporte. Após o período de recirculação, iniciou-se a alimentação dos sistemas com substrato fresco. A mesma fonte de vinhaça fermentada foi usada para inocular ambos os reatores, i.e., as correntes efluentes dos sistemas foram direcionadas para o mesmo container durante a fase de recirculação. O sucesso na obtenção de populações produtoras de hidrogênio previamente reportado (Ferraz Jr. et al., 2014, Fuess et al., 2016, 2019) motivou o uso da vinhaça também na inoculação dos reatores alimentados com caldo e melaço.

Os reatores foram submetidos a uma carga orgânica volumétrica aplicada de 20 kg-DQOt.m^{-3}.d^{-1} sob diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH; 24–6 h), fazendo-se o controle da DQOt afluente (20,0–5,0 g.L^{-1}) para a manutenção de uma COVa aproximadamente constante. Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) foi dosado nos sistemas em condições operacionais específicas. Detalhes das fases de operação dos reatores são descritos na Tabela 2.

Reatores em batelada: montagem e condições de incubação

Nessa etapa, os efeitos da disponibilidade de nitrogênio sobre a produção de bioH_2 a partir do caldo de cana foram avaliados. Para tanto, três diferentes razões DQOt/N foram consideradas, incluindo a razão DQOt/N efetivamente medida no caldo da safra 2018/2019 (1647), 137 e 40. Os valores 137 e 40 foram definidos segundo Anzola-Rojas et al. (2015). A suplementação de nitrogênio foi baseada na dosagem de ureia até a obtenção das razões

DQOt/N desejadas, usando-se a porcentagem de nitrogênio na ureia (46,64%) como referência. Triplicatas foram monitoradas para cada condição, também se avaliando reatores alimentados com melaço (sem suplementação de nitrogênio) para fins de comparação.

Tabela 2: Condições operacionais aplicadas nos reatores.

Fase operacional	Período (d)	Substrato	COVa[c]; TDH[c] (kg-DQOt.m^{-3}.d^{-1}; h)	Dosagem de NaOH	Dosagem de $NaHCO_3$ (g-$NaHCO_3$ g^{-1}COD)
I	1-32[a,b]	SugJce-17/18[a]; SugMol[b]	20,0; 24,0	Sim[d]	0,0
II	33-63[a,b]	SugJce-17/18[a]; SugMol[b]	20,0; 12,0	Sim[d]	0,0
IIIa	93-99[a,b]	SugJce-17/18[a]; SugMol[b]	20,0; 6,0	Sim[d]	0,0
IIIb	100-146[a]; 100-179[b]	SugJce-17/18[a]; SugMol[b]	20,0; 6,0	Não	0,25
IIIb'	147-179[a]	SugJce-18/19[a]	20,0; 6,0	Não	0,25

Condições operacionais: COVa – carga orgânica volumétrica aplicada, TDH – tempo de detenção hidráulica. Notas: [a]R1, [b]R2, [c]Valores teóricos, [d]Dosagem de solução concentrada de NaOH (50% m/V) para obtenção de pH afluente de 6,5 (Ferraz Jr. et al., 2014; Fuess et al., 2016, 2019).

Os testes foram conduzidos em frascos de Duran® de 500 mL, os quais foram preenchidos com caldo de cana (SugJce-18/19) ou melaço diluídos para obtenção de uma DQOt equivalente a 5000 mg.L^{-1}. O protocolo de incubação dos reatores incluiu a manutenção de condições termofílicas de temperatura (55ºC), velocidade de agitação na faixa de 130–140 rpm e uma razão $NaHCO_3$/DQOt de 0,40. Biomassa acidogênica coletada em R1, após sua desmontagem, foi utilizada na inoculação dos reatores, procurando-se fixar uma relação A/M inicial de 3,70 g-DQOt.g^{-1}SSV (SSV = sólidos suspensos voláteis), baseando-se no valor estimado para a disponibilidade de substrato na câmara de alimentação de R1. Os reatores foram colocados em um *shaker* (Modelo 430, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), a partir de quando a pressão interna e a composição do biogás foram monitoradas por 48 h. Previamente à incubação no *shaker*, nitrogênio foi fluxionado nos frascos por 5 min para garantir o estabelecimento de condições anaeróbias. A determinação da pressão interna foi realizada por meio de um medidor de bancada (Modelo MDD50, T&S Equipamentos Eletrônicos, São Carlos, SP, Brasil). A composição da fase líquida foi determinada apenas ao final do período de incubação, baseando-se em procedimentos descritos na sequência do texto.

O modelo modificado de Gompertz (Zwietering et al., 1990) foi ajustado ao perfis temporais da produção molar de bioH_2 buscando-se a obtenção dos seguintes parâmetros cinéticos: produção potencial de bioH_2 (P_{H2}; mmol-H_2), velocidade máxima de produção de bioH_2 (R_{H2}; mmol-H_2.h^{-1}) e duração da fase lag (λ_{H2}; h). Os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando-se o *software* OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) por meio do algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Métodos analíticos e análise de desempenho

Métodos analíticos comuns ao monitoramento da fase líquida dos reatores contínuos e em batelada incluíram as determinações do pH, da demanda química de oxigênio total (DQOt) e solúvel (DQOs), das concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV), carboidratos totais (CH), ácido lático (HLa), ácidos orgânicos voláteis (AOV) e solventes. Os procedimentos referentes às análises de pH, DQOt, DQOs e SSV são descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA e WEF, 2012). Por sua vez, as determinações de CH, HLa e AOV/solventes são detalhadas, respectivamente, em Dubois et al.

(1956), Taylor (1996) e Adorno et al. (2014). Previamente às análises de DQOs, CH, HLa e AOV/solventes as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μm.

Com relação ao monitoramento da fase gasosa, nos sistemas contínuos a vazão de biogás foi determinada por meio do acoplamento de gasômetros (Modelo MGC-1 V30; Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GMBH & CO. KG, Bochum, Alemanha) diretamente ao *headspace* dos reatores. Finalmente, a composição do biogás (H_2, N_2, CH_4 e CO_2; reatores contínuos e em batelada) foi analisada por meio de cromatografia gasosa (Modelo GC-2010, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA) utilizando-se detector de condutividade térmica (GC/TCD) e argônio como gás de arraste.

O desempenho dos reatores contínuos incluiu o cálculo das seguintes variáveis-resposta: eficiência de conversão de CH (EC_{CH}; %) e eficiências de remoção de DQOt (ER_{DQOt}; %) e DQOs (ER_{DQOs}; %) para a fase líquida; vazão de biogás (BFR, do inglês *biogas flow rate*; $NmL.d^{-1}$), fração de hidrogênio no biogás (f-H_2; %), produção volumétrica de hidrogênio (VHPR, do inglês *volumetric hydrogen production rate*; $NmL\text{-}H_2.L^{-1}.d^{-1}$) e rendimento de hidrogênio (HY, do inglês *hydrogen yield*; $mmol\text{-}H_2.g^{-1}CH$ e $mmol\text{-}H_2.g^{-1}DQOt_{aplicada}$). Com relação aos reatores em bateladas, também se obteve a EC_{CH} e o HY ($mmol\text{-}H_2.g^{-1}CH$).

Resultados e Discussão

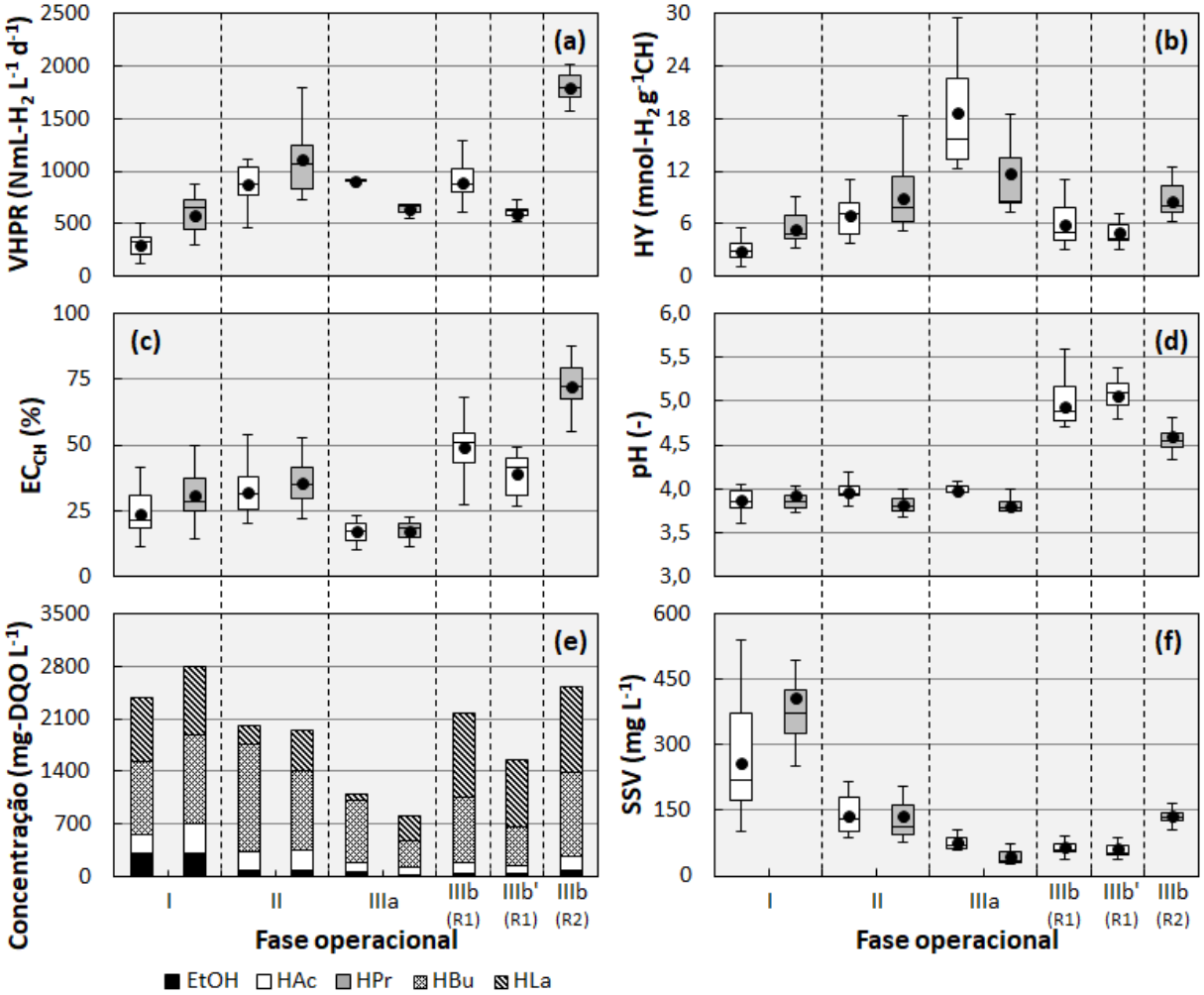
Produção contínua de bioH_2: caldo *vs.* melaço

A comparação entre o emprego de caldo e melaço como substratos para produção de bioH_2 em condições termofílicas refere-se a dados de monitoramento dos sistemas contínuos obtidos nas fases operacionais I–IIIb' (R1 e R2), sendo detalhes reunidos na Figura 1. Em termos gerais, os valores obtidos para a VHPR, HY e EC_{CH} nas fases I–IIIa (Figuras 2a-c) indicaram um desempenho similar para os dois reatores, com valores ligeiramente superiores usualmente associados à fermentação do melaço (R2). A redução do TDH para 6 h (fases I a IIIa) objetivou desfavorecer a produção de HLa com o concomitante estímulo à produção de bioH_2 nos dois sistemas, utilizando-se os resultados reportados em Palomo-Briones et al. (2017) como referência. A estratégia operacional selecionada limitou a produção de HLa em R1 e R2. Entretanto, a VHPR foi negativamente afetada nos dois reatores (Figura 1a), bem como os valores de EC_{CH} decresceram até níveis inferiores a 25% (Figura 2c). Os patamares atingidos pela EC_{CH} nas fases operacionais iniciais sempre estiveram inferiores a 50% (valores médios; Figura 1c), mesmo durante a aplicação de elevados valores de TDH, fato que sugere o estabelecimento de condições desfavoráveis para a fermentação dos substratos em aspectos gerais, independentemente da produção de bioH_2. O padrão observado em R1 e R2 provavelmente resultou da manutenção de condições desfavoráveis de pH nos reatores, observando-se valores médios menores do que 4,0 (3,86–3,96 em R1 e 3,79–3,92 em R2, fases I–IIIa; Figura 1d). Conforme previamente reportado (Fuess et al., 2016, 2019), a produção de bioH_2 em sistemas inoculados com vinhaça fermentada normalmente é favorecida em maiores valores de pH, usualmente na faixa de 5,0–5,5.

O aumento no pH de ambos os reatores (4,94 em R1 e 4,60 em R2, fase IIIb; Figura 1d) por meio da dosagem de $NaHCO_3$ resultou em dois padrões distintos, i.e., a produção de bioH_2 (VHPR: 636–1793 $NmL\text{-}H_2.L^{-1}.d^{-1}$; Figura 1a) e a EC_{CH} (17.3–72.1%; Figura 1c) foram positivamente afetados em R2, enquanto uma melhora consistente não foi observada em R1. Particularmente, o emprego de um tipo diferente de caldo (SugJce-18/19, fase IIIb') levou a uma nova perda de desempenho em R1, considerando tanto a produção de bioH_2 (VHPR = 894–600 $NmL\text{-}H_2.L^{-1}.d^{-1}$; Figura 1a) quanto a EC_{CH} (49.4–39.2%; Figura 1c), independentemente do aumento de pH verificado (> 5,0; Figura 1d). A concentração de SSV medida nas correntes efluentes aos dois sistemas, principalmente nas fases IIIb (64 e 138 $mg.L^{-1}$ em R1 e R2, respectivamente) e IIIb' (63 mg L^{-1} em R1) (Figura 1f), sugeriram uma maior lavagem de células em R2, provavelmente como um consequência direta do estabelecimento de maiores velocidades de crescimento de biomassa nesse reator. Análises

composicionais complementares posteriormente revelaram uma razão C/N (DQOt/N) desbalanceada nas amostras de caldo dos dois períodos amostrados (955 em SugJce-17/18 e 1647 em SugJce-18/19), explicando o limitado desempenho de R1 em comparação a R2, bem como a perda de desempenho quando SugJce-18/19 foi usado como substrato. A aplicação de condições termofílicas pode ter potencializado os efeitos negativos da deficiência de nitrogênio no caldo, uma vez que maiores velocidades metabólicas, o que inclui um maior consumo de nutrientes, são observados em populações termofílicas (comparativamente a populações microbianas mesofílicas) (Lettinga et al., 2001). Em contrapartida, uma razão DQOt/N equivalente a 152 foi medida no melaço, a qual apresenta magnitude similar ao valor ótimo (137) previamente definido para a fermentação de água residuária rica em sacarose em reatores de leito fixo (Anzola-Rojas et al., 2015). O papel da relação DQOt/N na fermentação do caldo é abordado com mais detalhes na sequência do texto.

Figura 1: Comparação de desempenho entre R1 (caixas vazadas) e R2 (caixas sombreadas): (a) VHPR, (b) HY, (c) EC_{CH}, (d) pH efluente, (e) concentração de metabólitos solúveis (EtOH



= etanol, HAc = ácido acético, HPr = ácido propiônico, HBu = ácido butírico, HLa = ácido lático) e (f) concentração de SSV nos efluentes. Legenda: Valores médios (●).

A dosagem de $NaHCO_3$ favoreceu o aumento das concentrações de HBu nos dois reatores (comparando-se a fase IIIa com as fases IIIb–IIIb'; Figura 1e). No caso de R2, a concentrações de HBu atingiram níveis similares (1111 mg-DQO.L^{-1}) aos observados nas fases I e II (1060–1183 mg-DQO.L^{-1}), independentemente da aplicação de uma DQOt aproximadamente 2–4 vezes inferior. Concomitantemente, também foi observado um aumento nas concentrações de HLa (90 para 1121–897 mg-DQO.L^{-1} em R1 e 330 para 1131 mg-DQO.L^{-}

[1] em R2, fases IIIb–IIIb'; Figura 1e) nos dois reatores, independentemente do TDH relativamente baixo (6 h) e do aumento no pH da fermentação (> 4,5; Figura 1d). Uma explicação plausível para o padrão observado pode estar associada ao estabelecimento de condições favoráveis para a fermentação lática capnofílica, na qual a produção de bioH_2 via fermentação acética é substituída pela fermentação lática (Reação 1; Dipasquale et al., 2014) devido ao aumento da disponibilidade de CO_2 no meio reacional. Nesse caso, a redução do piruvato é favorecida em detrimento da descarboxilação oxidativa, sendo a dosagem de $NaHCO_3$ um dos fatores que pode acionar esse mecanismo (Dipasquale, d'Ippolito e Fontana, 2014). Curiosamente, o aumento na produção de HLa não impactou a produção de bioH_2 em R2 (VHPR; Figura 1a), sugerindo o estabelecimento de fontes paralelas de atividade hidrogenogênica no reator. A co-produção de bioH_2 e HBu a partir da fermentação de HLa e HAc (Reação 2; Matsumoto e Nishimura, 2007) pode explicar esse padrão, de maneira similar ao observado em outros sistemas termofílicos inoculados com vinhaça de cana-de-açúcar fermentada (Fuess et al., 2019).

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH(OH)COOH$ (Reação 1)

$CH_3COOH + 2CH_3CH(OH)COOH \rightarrow H_2 + 3/2CH_3(CH_2)_2COOH + 2CO_2 + H_2O$ (Reação 2)

Em termos gerais, os resultados obtidos indicam que o melaço supera o caldo como substrato para produção fermentativa de bioH_2 nas condições avaliadas, tendo em vista uma composição nutricional mais balanceada. Esse aspecto provavelmente resulta da contínua remoção de água do caldo durante a produção de açúcar, a qual favorece a concentração de componentes específicos no melaço, tais como nitrogênio e outros macro- e micronutrientes. Em termos práticos, a aplicação direta do melaço em sistemas fermentativos elimina a necessidade da suplementação externa de nitrogênio, impactando positivamente o desempenho econômico do processo.

Potencial de produção de bioH_2: o papel-chave do nitrogênio

Os ensaios de potencial hidrogenogênico almejaram avaliar os impactos da suplementação de nitrogênio sobre a produção de bioH_2 a partir do caldo de cana, tendo em vista discrepâncias observadas na operação dos sistemas contínuos. Os parâmetros cinéticos e dados de monitoramento adicionais são reunidos na Tabela 3. A variação da dosagem de nitrogênio no caldo impactou diretamente a produção de bioH_2, observando-se os maiores valores experimentais (HY e EC_{CH}) e parâmetros ajustados (P_{H2} e R_{H2}) (Tabela 3) para uma razão DQOt/N de 137. Os resultados referentes ao melaço apresentaram magnitude similar aos verificados para o caldo na supracitada razão DQOt/N (Tabela 3), fato plausível devido ao conteúdo similar de nitrogênio nessas condições particulares.

A carência de nitrogênio (DQOt/N = 1647) afetou a produção de bioH_2 em uma extensão muito menor em comparação à dosagem de concentrações excessivas (DQOt/N = 40) (Tabela3). Embora o nitrogênio desempenhe papel fundamental no crescimento celular (Anzola-Rojas et al., 2015), a mesma quantidade inicial de biomassa foi fornecida em todas as condições avaliadas nos testes de atividade hidrogenogênica, i.e., em teoria, não seria necessário um crescimento de biomassa elevado para consumir a quantidade de substrato fornecida em um tempo de incubação relativamente curto (48 h). Os valores similares observados para a fase lag nos reatores alimentados com caldo (λ = 17.91–19.35 h; Tabela 3) corrobora essa tendência, sugerindo mínimas diferenças na "partida" da atividade hidrogenogênica. Essa característica mostra-se distinta da formação da densidade celular requerida na partida de sistemas contínuos, sendo os efeitos da falta de nitrogênio mais evidentes nesses reatores. De fato, comparando-se o desempenho de R1 (SugJce-18/19, fase IIIb') e R2 (SugMol, fase IIIb) para a VHPR (600 *vs.* 1793 $NmL\text{-}H_2.L^{-1}.d^{-1}$) verifica-se uma produção de bioH_2 66,5% menor a partir do caldo. Essa diferença é reduzida a aproximadamente 20% ao se considerar os valores de P_{H2} obtidos para o melaço e o caldo a

uma razão DQOt/N de 1647 (Tabela 3), indicando um valor inesperado para produção de bioH_2 a partir do caldo nessa condição.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos e desempenho geral da fermentação nos testes de potencial de produção de bioH_2.

Substrato		SugJce-18/19			SugMol
DQOt/N		1647	137	40	152
Parâmetros cinéticos	P_{H2} (mmol-H_2)	5,03 ± 0,04	7,42 ± 0,05	0,87 ± 0,03	6,31 ± 0,10
	R_{H2} (mmol-H_2.h^{-1})	0,50 ± 0,01	1,41 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,83 ± 0,07
	λ_{H2} (h)	19,35 ± 0,12	17,91 ± 0,12	19,01 ± 0,49	13,96 ± 0,39
	R^2	0,999	0,998	0,974	0,987
EC_{CH} (%)		96,9 ± 0,1	97,6 ± 0,1	88,4 ± 4,2	94,8 ± 0,1
HY (mmol-H_2.g^{-1}CH)		3,6 ± 0,0	5,3 ± 0,1	0,5 ± 0,0	5,4 ± 0,1
pH (-)		4,86 ± 0,01	5,62 ± 0,03	4,37 ± 0,06	5,86 ± 0,04

Abreviaturas/símbolos: P_{H2} – produção potencial de bioH_2, R_{H2} – velocidade máxima de produção de bioH_2, λ_{H2} – fase lag, EC_{CH} – eficiência de conversão de carboidratos totais, HY – rendimento de hidrogênio.

O fornecimento de concentrações excessivas de nitrogênio levaram a um decréscimo acentuado da atividade hidrogenogênica a partir do caldo (Tabela 3). Tendo em vista a não observação de um crescimento celular notadamente discrepante nos reatores com razão DQOt/N de 40 (1345 mg-SSV.L^{-1} *vs.* 1335 e 1247 mg-SSV.L^{-1} para as razões DQOt/N de 137 e 1647, respectivamente), a perda de desempenho observada pode estar associada ao pH da fermentação, caracterizado como inferior (4,37) em comparação às demais condições para o caldo (5,62 e 4,86 para as razões DQOt/N de 137 e 1647, respectivamente) e ao melaço (5,86) (Tabela 3). Embora o padrão observado corrobore a dependência de pH identificada nos sistemas contínuos, particularmente em R1, não foi identificado um mecanismo associando claramente os impactos da suplementação de nitrogênio sobre a fermentação, uma vez que os resultados obtidos não permitem definir uma relação causa-efeito: a dosagem de nitrogênio impacta diretamente o pH do meio, o qual posteriormente direciona as vias fermentativas predominantes; ou o tipo de fermentação (e o subsequente favorecimento ou não-favorecimento da produção de bioH_2) é diretamente impactado pela suplementação de nitrogênio, o que determina o pH do meio? De qualquer forma, os resultados indicam que a disponibilidade de nitrogênio pode estar associada ao pH da fermentação, caracterizando outro aspecto positivo da razão DQOt/N relativamente balanceada no melaço.

Elevadas concentrações de nitrogênio favorecem a geração de amônia, a qual tende a inibir, na sua forma não ionizada (NH_3), o metabolismo celular ao interferir principalmente no pH intracelular (Elbeshbishy et al., 2017). Entretanto, espera-se que processos consumidores de hidrogênio, i.e., homoacetogênese, metanogênese e sulfetogênese, sejam inibidos de maneira mais severa pela amônia em comparação à acidogênese (Wang et al., 2018). Além disso, a forma ionizada da amônia (íon amônio, NH_4^+) predomina em condições ácidas, fato que dificulta sua permeação nas células e potencialmente minimiza a ocorrência de efeitos inibitórios. Estudos indicam que o íon amônio pode impactar diretamente a atividade enzimática em sistemas metanogênicos (Kayhanian, 1999), entretanto, a permeação celular ainda é necessária.

Independentemente das limitações para se definir um mecanismo claro de inibição sobre a produção de bioH_2, algumas considerações sobre os valores ótimos da razão DQOt/N podem ser direcionados. Considerando as variáveis-resposta relacionadas à produção de bioH_2 (P_{H2} e R_{H2}; Tabela 3) para o caldo e o melaço (exceto aquelas obtidas para a relação DQOt/N de 1647, devido ao padrão inesperado observado, conforme previamente discutido), uma razão DQOt/N ótima na faixa de 96–112 foi definida (correlação não apresentada). Tais valores são similares

à razão C/N ótima (137) definida por Anzola-Rojas et al. (2015) na fermentação da sacarose em condições mesofílicas de temperatura.

Com relação aos produtos solúveis da fermentação, três padrões distintos foram observados. Condições favoráveis à produção de bioH_2 (SugJce-18/19 a uma razão DQOt/N de 137 e SugMol) foram associados ao predomínio da fermentação butírica, com HAc e EtOH caracterizados como metabólitos secundários. Nesse caso, o padrão observado é similar aos perfis reportados para R2, exceto pelas concentrações desprezíveis de HLa nos reatores em batelada, sugerindo o consumo deste como substrato na produção de bioH_2. Por sua vez, HLa foi identificado como principal metabólito na fermentação do caldo em condições de excesso de nitrogênio (DQOt/N = 40). Apesar das limitações na definição de uma relação causa-efeito no mecanismo de inibição por nitrogênio, o estabelecimento de condições desfavoráveis de pH pode ter inibido a produção de bioH_2 a partir do HLa, explicando o predomínio deste. Finalmente, o perfil de metabólitos observado para o caldo sem suplementação de nitrogênio (DQOt/N = 1647) indica uma distribuição similar em relação a R1 (fases IIIb e IIIb'; Figura 1e), com a distribuição similar de ambos HBu e HLa. A conversão parcial do HLa em HBu e bioH_2 pode ter resultado do valor intermediário de pH no meio líquido, i.e., 4,86 (Tabela 3).

Conclusões

A produção de bioH_2 pode ser estabelecida com sucesso a partir de ambos caldo e melaço. Entretanto, a carência de nitrogênio limitou diretamente a fermentação do caldo, sendo necessária suplementação com ureia para obtenção de uma razão DQOt/N ótima de aproximadamente 100. A disponibilidade de nitrogênio mostrou-se determinante para o pH da fermentação, verificando-se o predomínio de valores inferiores a 5,0 em condições de carência ou excesso de nitrogênio. A dependência do pH em sistemas acidogênicos alimentados com substratos menos complexos e ricos em açúcares também foi comprovada, tendo em vista o direcionamento dos processos de conversão para produção de lactato ou butirato. O fornecimento de alcalinidade via dosagem de bicarbonato parece ser um fator determinante para o favorecimento dos dois tipos de fermentação supracitados, fornecendo condições para a fermentação lática capnofílica e o subsequente abastecimento da produção de butirato e bioH_2 via conversão de lactato e acetato. Particularmente, a fermentação butírica a partir do lactato caracteriza-se como rota metabólica chave na produção de bioH_2 a partir de substratos derivados da cana-de-açúcar.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 5, 406–414.

Amulya, K., Reddy, M.V., Mohan, S.V., 2014. Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. Bioresour. Technol. 158, 336–342.

Anzola-Rojas, M.P., Fonseca, S.G., Silva, C.C., Oliveira, V.M., Zaiat, M., 2015. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. Biotechnol. Rep. 5, 46–54.

APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. APHA, Washington, DC.

Atlason, R., Unnthorsson, R., 2014. Ideal EROI (energy return on investment) deepens the understanding of energy systems. Energy 67, 241–245.

Del Nery, V., Alves, I., Damianovic, M.H.R.Z., Pires, E.C., 2018. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. Biomass Bioenergy 119, 411–417.

Dipasquale, L., d'Ippolito, G., Fontana, A., 2014. Capnophilic lactic fermentation and hydrogen synthesis by *Thermotoga neopolitana*: An unexpected deviation from the dark fermentation model. Int. J. Hydrogen Energy 39, 4857–4862.

Dubois, S.M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugar and related substance. Anal. Chem. 228, 13–21.

Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H.S., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. Renew. Sustain. Energy Rev. 79, 656–668.

Ferraz Jr., A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy 39, 16852–16862.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in continuous acidogenic packed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 41, 8132–8145.

Fuess, L.T., Klein, B.C., Chagas, M.F., Rezende, M.C.A.F., Garcia, M.L., Bonomi, A., Zaiat, M., 2018. Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and environmental approach. Renew. Energy 122, 674–687.

Fuess, L.T., Zaiat, M., Nascimento, C.A.O., 2019. 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. Bioresour. Technol. 286: 121379.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. Appl. Energy 144, 73–95.

Kayhanian, M., 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions. Environ. Technol. 20(4), 355–365.

Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G., 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. Trends Biotechnol. 19(9), 363–370.

Matsumoto, M., Nishimura, Y., 2007. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. J. Biosci. Bioeng. 103, 236–241.

Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., Trably, E., 2017. Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. Appl. Energy 198, 77–87.

Pimentel, D., Patzek, T.W., 2008. Ethanol production: Energy and economic issues related to U.S. and Brazilian sugarcane, in: Pimentel, D. (Ed.), Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems: Benefits and Risks. Springer, Dordrecht, pp. 357–371.

Sydney, E.B., Larroche, C., Novak, A.C., Nouaille, R., Sarma, S.J., Brar, S.K., Letti, L.A.J., Soccol, V.T., 2014. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. Bioresour. Technol. 159, 380–386.

Taylor, K.A.C.C., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochem. Biotechnol. 56(1), 49–58.

Turdera, M.V., 2013. Energy balance, forecasting of bioelectricity generation and greenhouse gas emission balance in the ethanol production at sugarcane mills in the state of Mato Grosso do Sul. Renew. Sustain. Energy Rev. 19, 582–588.

Wang, D., Duan, Y.Y., Yang, Q., Liu, Y., Ni, B.J., Wang, Q., Zeng, G., Li, X., Yuan, Z., 2018, Free ammonia enhances dark fermentative hydrogen production from waste activated sludge. Water Res. 133, 272–281.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56(6), 1875–1881.

FERTILIDADE E MINERALOGIA DO SOLO SUJEITO À DISPOSIÇÃO DE VINHAÇA DE UMA FAZENDA EM SANTA CRUZ DAS PALMEIRAS

Larissa R. Galdeano [1]; Cibele Montibeller[2];Guillermo R. B. Navarro[3]; Marcelo L. Garcia[3]

[1] Mestranda do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[2] Doutoranda do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[3] Professor do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP).

Resumo. *Com a crescente produção de etanol no Brasil, houve o aumento da geração da vinhaça, efluente da indústria sucroalcooleira, que sob certas condições pode ser utilizada para a fertirrigação de lavouras de cana-de-açúcar. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da vinhaça aplicada no período de 2012 a 2017, considerando as propriedades químicas e mineralógicas do solo de uma fazenda situada em Santa Cruz das Palmeiras. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que no ano de 2014 de maior cálculo de dosagem de vinhaça ocorreram baixas condições de fertilidade com altas concentrações de H+Al e de CTC total. A análise temporal de uma das glebas da fazenda demonstrou que, em doses controladas, a aplicação de vinhaça pode melhorar a fertilidade do solo e promover a redução da acidez e da toxicidade por alumínio. Os ensaios granulométricos e mineralógicos caracterizaram o solo estudado como um solo arenoso com altas concentrações de silicatos e óxidos de ferro e alumínio. O estudo avaliou a possibilidade de lixiviação dos cátions de base e concentração de H+Al em períodos chuvosos, ao passo que haveria reposição de umidade e macronutrientes com a fertirrigação em períodos secos.*

Introdução

Desde a implantação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), o Brasil apresentou uma grande expansão do cultivo de cana-de-açúcar para a indústria sucroalcooleira, que consequentemente resultou no aumento da produção da vinhaça como o principal resíduo do processo de confecção do etanol (Mortatti, 2010; Casarini e Branco, 1989).

A vinhaça (ou restilo, vinhoto) é usada principalmente na fertirrigação de lavouras de cana-de-açúcar, uma vez que este efluente possui elevadas concentrações de matéria orgânica e de macro e micronutrientes, através de expressivas concentrações de Potássio (K^{+}), Cálcio (Ca^{2+}) e Magnésio (Mg^{2+}) com menores quantidades de Nitrogênio (N) e Fósforo (P), que podem elevar a fertilidade do solo ao longo do tempo. Em contrapartida, a depender da forma como a vinhaça é despejada ou dosada, esta pode representar um risco de contaminação de solos e águas subterrâneas e superficiais, com possível risco de eutrofização de corpos hídricos, salinização e aumento da acidez (Fuess, 2013; Oliveira, 2015).

Em vista do possível risco ambiental proveniente da aplicação de vinhaça no solo, foram estabelecidas normas e legislações que visam o manejo apropriado deste resíduo, a exemplo da Norma Técnica P4.231 - *Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola* (CETESB, 2015), que define critérios e procedimentos quanto ao armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça, além da elaboração anual de "Planos de Aplicação de Vinhaça" (PAV) para fins de acompanhamento e fiscalização através da amostragem de solos e de vinhaça.

Em relação aos efeitos da aplicação de resíduos como a vinhaça ou de lodo de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) na fertilidade de solos de culturas de cana-de-açúcar, trabalhos como os de Pereira (2015), Lopes (1984), Nascimento et al (2004) e Barros et al (2010) observaram o aumento da concentração de matéria orgânica (MO), diminuição do pH no momento da aplicação do efluente com posterior regresso aos valores originais após determinado tempo, aumento da Capacidade de Troca Catiônica (CTC), acréscimo

expressivo de cátions como K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} e o consequente aumento da soma (SB) e saturação por bases (V%), além da redução do alumínio (Al^{3+}) trocável.

Uma vez que alguns minerais do solo fazem parte da fração coloidal e possuem a capacidade de adsorver cátions, a exemplo dos argilominerais e os óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, alguns efeitos causados pela aplicação da vinhaça como mudanças de pH, aumento do carbono orgânico, da CTC e da atividade microbiológica em conjunto com a alta disposição de cátions de base podem influenciar em mudanças no comportamento mineralógico do solo (Ribeiro et al., 2011), e consequentemente pode acarretar impactos na produtividade das lavouras.

O presente trabalho tem como objetivo analisar as variações das propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo em uma fazenda devido à aplicação de volumes de vinhaça durante o período de 2012 a 2017.

Caracterização da Área de Estudo

A fazenda estudada se localiza no município de Santa Cruz das Palmeiras, o qual se situa no estado de São Paulo nas coordenadas 21º49'36" S e 47º15'03"W e está inserido na Mesorregião de Campinas e na Microrregião de Pirassununga (IBGE, 2008; Santa Cruz das Palmeiras, 2018).

De acordo com relatórios técnicos feitos na área de estudo (Arcadis Tetraplan, 2011; Plano de Aplicação de Vinhaça, 2017; CBH-MOGI et al, 1999), o município está inserido no contexto da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu e na Unidade Geomorfológica da Depressão Periférica Paulista, onde ocorrem unidades geológicas caracterizadas localmente por rochas básicas intrusivas e afloramentos da Formação Corumbataí. O clima da região da área de estudo é caracterizado por ser do tipo tropical subsequente úmido, com temperaturas médias entre 15ºC e 18ºC no intervalo de um mês e situado à aproximadamente 600 metros acima do nível do mar (Arcadis Tetraplan, 2011).

O balanço hídrico normal mensal da região do município de Pirassununga (Figura 1) demonstra que grande parte das chuvas (ou época de Excedente Hídrico) ocorreu no período entre os meses de Outubro até o final de Março e no mês de Maio (Plano de Aplicação de Vinhaça, 2017). Em contrapartida, os meses de junho a setembro expõem um período com baixos índices de precipitação inferiores aos valores de Evapotranspiração Potencial (ETP) e, portanto, é a época do ano mais seca (ou de Deficiência hídrica).

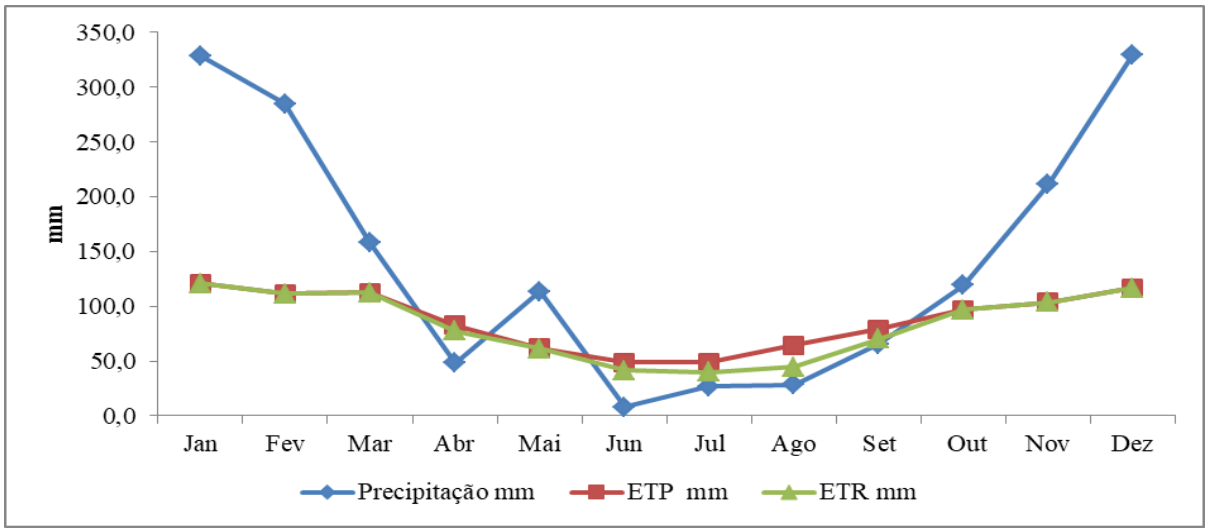


Figura 1: Gráfico do Balanço Hídrico Normal Mensal do município de Pirassununga e região (Plano de Aplicação de Vinhaça, 2017).

O tipo de solo predominante no município de Santa Cruz das Palmeiras é caracterizado por latossolos vermelhos, considerados como solos muito intemperizados e profundos com altas concentrações de argilominerais e de Fe_2O_3 que lhe dão uma coloração avermelhada muito intensa, podendo ocorrer em locais de relevo ondulado a suave ondulado e com baixa declividade.

Material e Métodos

Os resultados analíticos da vinhaça e das propriedades físico-químicas do solo foram obtidos por meio dos relatórios dos PAV correspondentes aos anos de 2012 a 2017, de acordo com a Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2015). A norma mencionada também define o cálculo do volume máximo de vinhaça a ser aplicado, determinada a partir do teor de K_2O do solo (Eq.1):

$$\mathbf{m^3 \text{ de Vinhaça/ha} = [(0{,}05 \times CTC - ks) \times 3744 + 185] / kvi} \qquad \mathbf{(1)}$$

Onde:
0,05: 5% da CTC
CTC: Capacidade de Troca Catiônica, expressa em $cmol_c.dm^{-3}$
ks: concentração de potássio no solo, expresso em $cmol_c.dm^{-3}$
3744: constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em $cmol_c.dm^{-3}$. ou $meq.100cm^{-3}$, para kg de potássio em um volume de 01 (um) hectare por 0,80 metros de profundidade.
185: massa, em kg, de K_2O extraído pela cultura por hectare, por corte.
kvi: concentração de potássio na vinhaça, expressa em kg de $K_2O.m^{-3}$.

Os dados dos cálculos da dosagem de vinhaça foram comparados com as propriedades físico-químicas do solo, além da análise das propriedades físico-químicas do efluente. Por sua vez, a caracterização da mineralogia foi realizada a partir da coleta de seis amostras de solo nas profundidades 30 cm e 100 cm nas glebas 27, 29 e 56 da fazenda, seguida da realização das análises granulométrica, química e mineralógica através do peneiramento e pesagem das amostras e por meio dos ensaios de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (FRX) e de Difração de Raios-X (DRX), respectivamente.

Resultados e Discussão

Propriedades físico-químicas da Vinhaça

Os principais parâmetros físico-químicos da vinhaça (Tabela 1) usados na interpretação da análise de fertilidade do solo da área de estudo foram os dados de pH, cátions de base (K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+}), Na^+ (salinidade) e DQO e DBO, os quais foram comparados com os valores de referência obtidos por Fuess (2013) no ano de 2010 para a mesma usina da área de estudo.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos médios da vinhaça do período de 2012 a 2017 em comparação com os resultados de Fuess (2013).

Parâmetro	Unidade	2012 a 2017	Fuess (2013)*
pH	---	3,8 a 6,07	4,59
SST	---	3288,10 ± 2836,68	2757,5 ± 150,64
CE	dS/m	5,70 ± 4,92	8,703

NO^{3-}	$mg.L^{-1}$	7,96 ± 7,36	55,00 ± 5,00
NO^{2-}	$mg.L^{-1}$	1,66 ± 2,48	2,25 ± 0,05
NH_3	$mg.L^{-1}$	8,50 ± 7,14	87,50 ± 7,50
$N_{Kjeldahl}$	$mg.L^{-1}$	141,06 ± 103,14	1.130,50
Na^+	$mg.L^{-1}$	27,24 ± 19,62	10,64
Ca^{2+}	$mg.L^{-1}$	451,84 ± 308,29	458,4
K^+	$mg.L^{-1}$	1857,6 ± 1718,83	1.330,40 ± 0,10
Mg^{2+}	$mg.L^{-1}$	219,26 ± 120,93	235,39
SO_4^{2-}	$mg.L^{-1}$	1250,49 ± 783,79	3.701 ± 1.154,70
P_{Total}	$mg.L^{-1}$	30,04 ± 49,06	5,58 ±0,07
DBO	$gDBO_{5.}L^{-1}$	5,47 ± 3,55	14,40 ± 0,53
DQO	$gO_{2.}L^{-1}$	16,05 ± 9,71	24,63 ± 0,55
Alcalinidade total	$mg_{.}L^{-1}$	2172,66 ± 1193,70	137

*Analisado em 2010.

A variação dos resultados de pH durante o período de 2012 a 2017 foi de 3,8 a 6,07, onde a maioria das amostras de vinhaça analisadas apresentaram pH ácido e semelhantes ao valor de referência de Fuess (2013) de 4,59.

Em relação da concentração dos cátions de base, as amostras apresentaram elevadas concentrações de K^+ com média de 1857,55 ± 1718,83 $mg.L^{-1}$ maiores que o valor apresentado por Fuess (2013) de 1.330,40 ± 0,10, sendo desta forma um indicador da alta potencialidade da vinhaça como fornecedor deste macronutriente ao solo.

A média dos valores de Ca^{2+} e de Mg^{2+} no período de 2012 a 2017 foi de respectivamente 451,84 e de 219,26 $mg.L^{-1}$, semelhantes às médias calculadas por Fuess (2013) de 458,40 $mg.L^{-1}$ para o Ca^{2+} e de 235,39 $mg.L^{-1}$ para o Mg^{2+}, e que provavelmente indicam a concentração mais comum destes cátions nas amostras de vinhaça.

No caso de Na^+, a média obtida foi de 27,24 ± 19,62 $mg.L^{-1}$. Apesar de a média obtida ter sido aproximadamente o triplo do valor de referência obtido por Fuess (2013) de 10,64 $mg.L^{-1}$, a concentração de Na^+ analisada foi expressivamente inferior às médias das concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+}, resultando em baixo risco de salinidade.

A média de DQO (16,05 ± 9,71 $gO_{2.}L^{-1}$) foi maior que a de DBO (5,47 ± 3,55 $gDBO_{5.}L^{-1}$) em uma relação de $R_{DQO/DBO}$ de 2,93, o que evidencia moderada quantidade de substâncias biodegradáveis (provenientes da MO da vinhaça) na maioria das amostras de analisadas. Por sua vez, os resultados de DQO e DBO obtidos por Fuess (2013) foram de respectivamente 24,63 ± 0,55 $gO_{2.}L^{-1}$ e de 14,40 ± 0,53 $gDBO_{5.}L^{-1}$ com razão de $R_{DQO/DBO}$ de 1,71, os quais apresentaram maior quantidade da fração biodegradável com consumo mais acentuado de oxigênio por processos biológicos.

Dosagens de vinhaça e propriedades físico-químicas do solo

As maiores dosagens de vinhaça ocorreram no ano de 2014 na gleba 75 com 1557,98 $m^3.ha^{-1}$ e na gleba 38 com 1019,63 $m^3.ha^{-1}$. Nos anos de 2013, 2015 e 2016, houve a aplicação de vinhaça na gleba 15, permitindo a análise temporal nesta gleba. Ademais, o menor cálculo de dosagem de vinhaça do período de 2012 a 2017 foi obtido nesta gleba em

2013, correspondente à 21,48 $m^3.ha^{-1}$.

Em comparação com os resultados dos parâmetros físico-químicos do solo de 2014 (Figura 2), os cálculos de dosagem de vinhaça apresentam correlação negativa com os percentuais de V%, o qual obteve valor mínimo de 23,42% na gleba 75, seguido de 35,55% na gleba 38, o que caracteriza esses solos como inférteis com valores de V% menores que 50% (Brito, 2013; Ronquim, 2010).

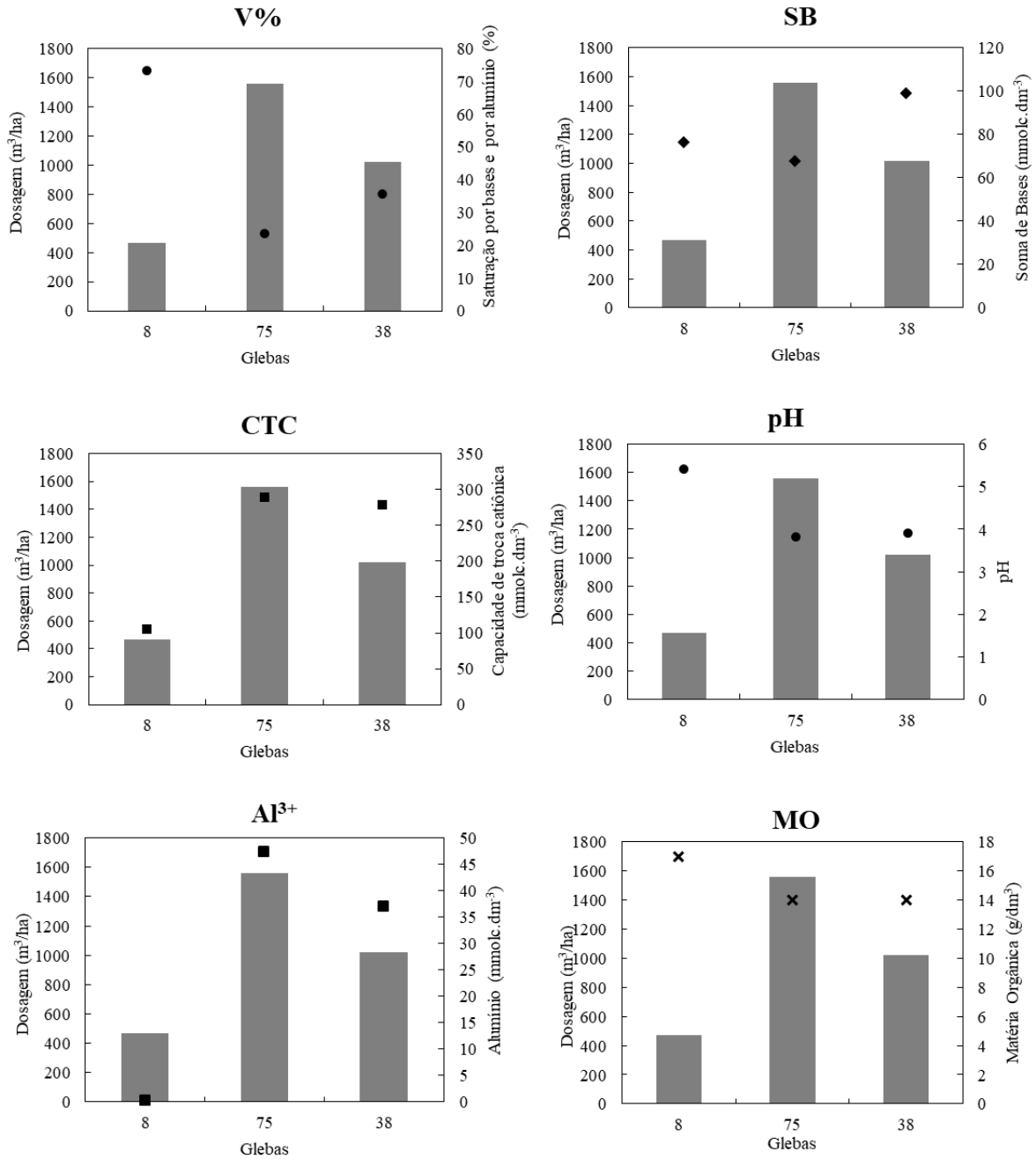


Figura 2: Comparação dos cálculos de dosagem da vinhaça de 2014 (em cinza) com os parâmetros de fertilidade do solo para o mesmo ano: V% (●); SB (♦); CTC (■); pH (●); Al^{3+} (■);MO do solo (**x**).

Em relação aos resultados da gleba 15 (Figura 3), no ano de 2013 de menor dosagem, a porcentagem de V% foi de 63,93%. De 2015 a 2016, não apresentaram uma variação significativa de um ano para o outro (de 76,29% para 76,26%), ainda que o cálculo de dosagem de 2015 (168,31 $m^3.ha^{-1}$) foi mais elevada em comparação com o volume de vinhaça calculado em 2016 (88,19 $m^3.ha^{-1}$).

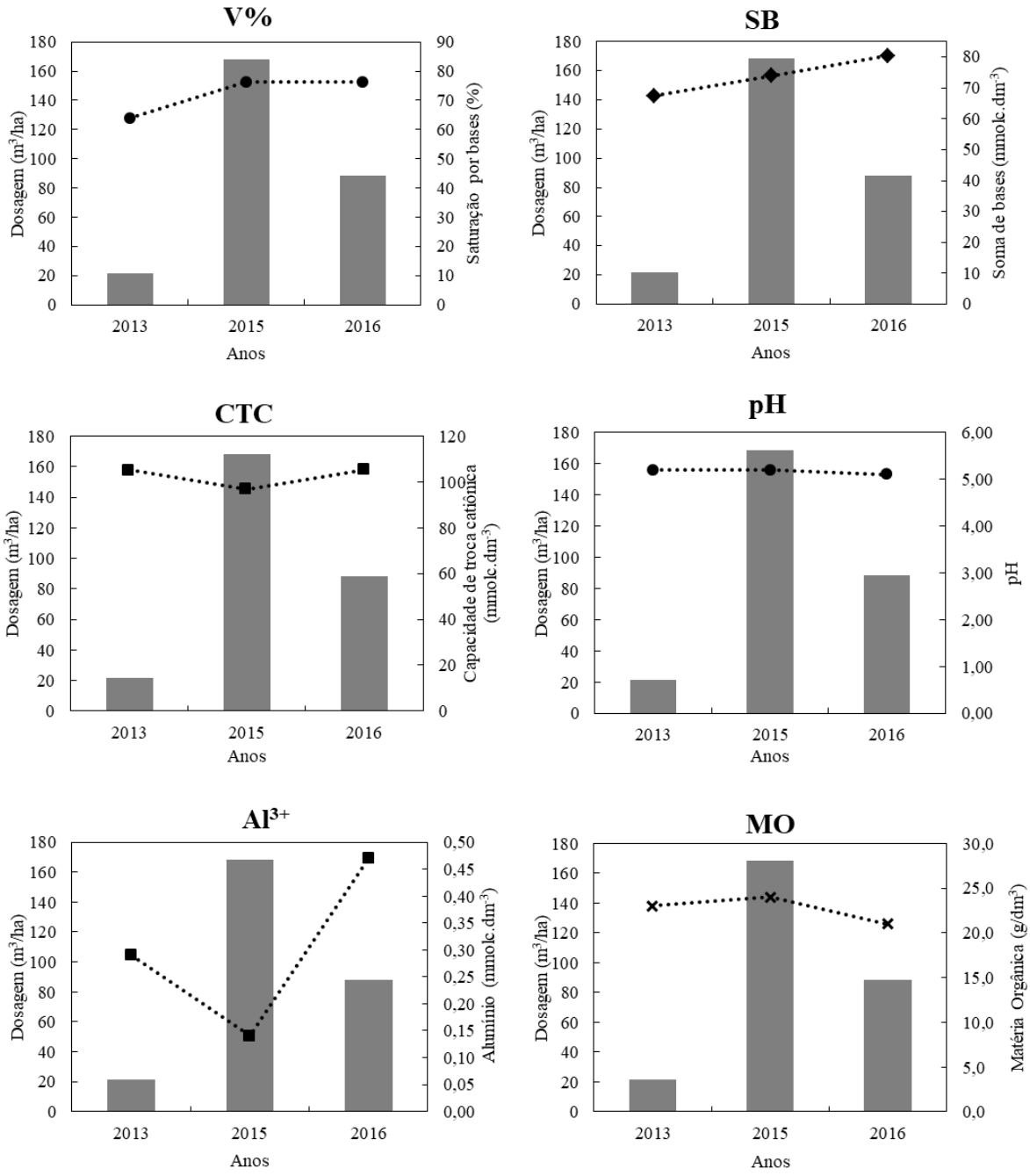


Figura 3: Comparação dos cálculos de dosagem da vinhaça na Gleba 15 (em cinza) com os parâmetros de fertilidade do solo para a mesma gleba: V% (●); SB (♦); CTC (■); pH (●); Al^{3+} (■); MO do solo (**x**).

Uma vez que V% é a razão em porcentagem entre SB e CTC_{total} (Ronquim, 2010), sua variação está interligada às alterações desses dois parâmetros e dos cátions que os compõem.

Em relação ao parâmetro SB, correspondente à soma dos cátions de Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^{+} (Lopes, 1984; Pereira, 2015; Ronquim, 2010), em 2014 o menor valor de SB foi equivalente a 67,59 $mmol_c.dm^{-3}$ na gleba 75 (Figura 2), sendo negativamente correlato com o alto cálculo de dosagem obtido nesta gleba. Desta forma, o solo desta gleba possuía baixas concentrações de cátions de base (que servem como macronutrientes para as lavouras de cana-de-açúcar) associados a baixos índices de fertilidade, independente dos altos volumes de vinhaça calculados.

No que se refere às variações de SB na gleba 15 (Figura 3), as concentrações dos cátions de base apresentaram leve acréscimo de 67,39 $mmol_c.dm^{-3}$ em 2013 para 80,45

$mmol_c.dm^{-3}$ em 2016 (aumento de 13,06 $mmol_c.dm^{-3}$ durante o período analisado), o que contrasta a redução dos cálculos de dosagem de 2015 para 2016.

Ao entender as variações dos cátions de base, é possível analisar as mudanças de CTC em conjunto com as modificações das concentrações de Al^{3+} e dos íons H^+, a fim de compreender as mudanças de fertilidade do solo na fazenda de estudo. Em comparação com os cálculos de dosagem de 2014 (Figura 2), os maiores valores de CTC obtidos foram de 288,59 $mmol_c.dm^{-3}$ na gleba 75 em 2014 e de 277,72 $mmol_c.dm^{-3}$ na gleba 38, o quais foram positivamente correlacionadas com os volumes de vinhaça calculados e com padrão oposto ao observado nos resultados de V%. Uma vez que a CTC_{total} corresponde à somatória dos cátions de Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Al^{3+} e de íons de H^+ (Ronquim, 2010), provavelmente houve maior colaboração de Al^{3+} e dos íons de H^+ no aumento da CTC na gleba 75 do que dos cátions de base, com consequente redução dos índices de fertilidade do solo.

Os índices de CTC da gleba 15 (Figura 3) tiveram valores similares nos anos de 2013 e em 2016 (de 105,36 $mmol_c.dm^{-3}$ e 105,45 $mmol_c.dm^{-3}$). Por outro lado, a concentração deste parâmetro foi de 96,89 $mmol_c.dm^{-3}$ em 2015 (ano com maior dosagem de vinhaça nesta gleba), tendo sido a menor registrada na gleba 15.

A fim de compreender as variações de CTC total na fazenda, foi necessária a avaliação da concentração de íons H^+ e de Al^{3+}, além dos resultados dos cátions de base. De 2012 a 2017, os menores valores de pH adquiridos foram de 3,8 na gleba 75 e de 3,9 na gleba 38, ambos em 2014 (Figura 2). Dado que solos com pH ácido possuem maior quantidade de íons H^+ e que a gleba 75 em 2014 foi a que apresentou o menor percentual de V%, provavelmente a alta quantidade de íons H^+ presentes no solo poderia estar relacionada com a redução de fertilidade naquele período. Por sua vez, a variação do pH na gleba 15 (Figura 3) foi de 5,2 a 5,1 de 2013 a 2016, com uma variação temporal mínima deste parâmetro de somente 0,1, independente das variações dos cálculos de dosagem de vinhaça neste mesmo período.

Em relação aos resultados de Al^{3+}, o valor mínimo obtido do período de 2012 a 2017 foi de 0,14 $mmol_c.dm^{-3}$ na gleba 15 em 2015, ao passo que as concentrações máximas observadas foram de 47,33 $mmol_c.dm^{-3}$ da gleba 75 e de 37,05 $mmol_c.dm^{-3}$ da gleba 38 em 2014. Comparativamente com as dosagens de vinhaça de 2014 (Figura 2), a concentração de alumínio na gleba 8 foi de 0,27 $mmol_c.dm^{-3}$, valor que se aproxima de zero no gráfico. Todavia, as elevadas quantidades de Al^{3+} nas glebas 75 e 38 apresentaram uma correlação positiva com os cálculos de dosagem de vinhaça, da mesma forma como os resultados de CTC e de forma inversa à V%. As variações desse cátion na gleba 15 (Figura 3) no ano de 2015 foi menor de todo o período analisado (de 0,14 $mmol_c.dm^{-3}$), o que provavelmente influenciou na redução da CTC_{total} em 2015 para a mesma gleba.

Na maior parte dos casos, os resultados indicaram a redução da fertilidade do solo com maiores concentrações de H^+ e Al^{3+} do que de SB. Neste caso, ocorre uma colaboração maior de Al^{3+} e H^+ na CTC_{total} do que dos demais cátions trocáveis, o que resultou na diminuição da fertilidade e no aumento da acidez e toxicidade do solo. Conforme a concentração de CTC_{total} é considerada como uma das variáveis da equação na fórmula da dosagem de vinhaça (Eq.1), mesmo solos com elevada acidez e toxicidade por Al^{3+} podem resultar em altos cálculos de volumes de vinhaça, sendo necessário o devido cuidado para que não haja risco de redução da fertilidade do solo nos anos seguintes à aplicação da vinhaça.

Além dos cátions de base e das concentrações de H+Al, o parâmetro da CTC também depende da quantidade de MO presente no solo, uma vez que esta age como partículas coloidais que tem a capacidade trocar cátions de Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Al^{3+} e íons H^+.

A comparação das quantidades de MO do solo com os cálculos de dosagem de vinhaça de 2014 (Figura 2) expôs a mesma quantidade de MO de $14g.dm^{-3}$ nas glebas 75 e 38 com cálculos de dosagem distintos. Como as concentrações de CTC destas glebas também foram semelhantes, este pode ser um indicativo da influência direta da quantidade de MO do solo com o aumento da adsorção de cátions. Por sua vez, as concentrações de MO da gleba 15 (Figura 3) apresentaram uma correlação positiva com os cálculos de dosagem, onde a

quantidade de MO de 2013 a 2015 teve variação de apenas 1 $g.dm^{-3}$ (de 23 $g.dm^{-3}$ para 24 $g.dm^{-3}$) independentemente da diferença dos volumes de vinhaça calculados, seguido de redução da quantidade de MO de 24 $g.dm^{-3}$ para 21 $g.dm^{-3}$ no período de 2015 a 2016. Todavia, o ano de 2015 teve o decréscimo da CTC em comparação com os outros anos de aplicação de vinhaça na gleba 15, o que pode ser um indício de que o aumento da MO não é o único fator que influencia no aumento da CTC do solo, tendo também a influência da presença de argilominerais e óxidos de ferro e alumínio que compõem a fração coloidal do solo e também possuem capacidade de adsorver cátions.

Análise mineralógica

A análise granulométrica das amostras de solo coletados apresentou maior fração de areia fina (0,25 a 0,125 mm) com porcentagens entre 42,303% a 61,155%, seguida da fração de areia média (0,5 a 0,25 mm) com 12,478% a 29,587% e de areia muito fina (0,125 a 0,064 mm) com 12,108% a 21,886%, o que caracteriza o solo da área de estudo como arenoso muito fino a médio. Os resultadas da FRX indicaram altas porcentagens de sílica (SiO_2) entre 33,81 a 83,10%, além de relevantes concentrações de Fe_2O_3 entre 4,66 a 25,21% e de alumínio (Al_2O_3) com percentuais de 6,27 a 21,45%, além de significativas quantidades em ppm de V, Zr, Ba e Cr.

Por sua vez, a composição mineralógica obtida através da DRX (Tabela 2) apresentou argilominerais do grupo da Caulinita (Caulinita, Halloysita, Dickita e Nacrita), Gibbsita, Hematita e Quartzo, além da ocorrência de minerais de Birnessita, Anatásio, Siderita e Magnesita.

Tabela 2: Composição mineralógica das amostras de solos da fazenda da área de estudo obtidas por meio da DRX, com suas respectivas fórmulas químicas (Dana e Hurlbut, 1960; Figueira et al., 2016).

Amostras	**Glebas**	**Mineralogia do solo**
P1- 30 cm	Gleba 27	Caulinita - $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_3$, Gibbsita - $Al(OH)_3$, Quartzo – SiO_3, Siderita - $FeCO_3$, Magnesita – $MgCO_3$, Hematita - Fe_2O_3
P1-100 cm	Gleba 27	Caulinita - $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_3$, Halloysita $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_8$, Birnessita (rica em Na) - $(Na_{0,7}Ca_{0,3})Mn_7O_{14}.2,8H_2O$, Gibbsita - $Al(OH)_3$, Quartzo – SiO_3, Hematita - Fe_2O_3.
P2-30 cm	Gleba 29	Caulinita - $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_3$, Gibbsita - $Al(OH)_3$, Quartzo – SiO_3, Hematita - Fe_2O_3.
P2-100 cm	Gleba 29	Dickita - $Al_4(Si_4O_{10})_3(OH)_{12}.3H_2O$, Gibbsita - $Al(OH)_3$, Quartzo – SiO_3, Anatásio – TiO_3, Siderita - $FeCO_3$, Magnesita – $MgCO_3$, Hematita - Fe_2O_3.
P3-30 cm	Gleba 56	Dickita - $Al_4(Si_4O_{10})_3(OH)_{12}.3H_2O$, Gibbsita - $Al(OH)_3$, Hematita - Fe_2O_3.
P3-100 cm	Gleba 56	Nacrita - $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_8$, Gibbsita - $Al(OH)_3$.

Os resultados da análise das amostras de solo coletadas expuseram a predominância dos principais minerais constituintes de latossolos vermelhos escuros típicos de um clima tropical úmido, entre os quais os argilominerais do grupo da caulinita, quartzo e óxidos de ferro e alumínio (gibbsita e hematita). Como os argilominerais do grupo da caulinita e os óxidos de ferro e alumínio possuem CTC baixo (Vieira, 1988), a adição de MO na fração coloidal do solo por meio da aplicação de vinhaça propicia o aumento de CTC do solo. Por sua vez, outros minerais de menor ocorrência estão relacionados a alguns dos elementos menores observados, entre eles o Anatásio, cuja concentração de Ti pode causar interferência

nos resultados de V na FRX (Simabuco e Nascimento Filho, 1994), e a Birnessita, o qual pode estar associado a concentrações de Ba, Zn, Ni, Cu, Sr e Co (Figueira et al., 2016).

A predominância de minerais de alumínio e ferro em um solo arenoso pode ser um indicador de alta lixiviação dos cátions de Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^{+} (mais solúveis e facilmente transportados) no perfil de solo, com consequente acúmulo de SiO_2, Fe_2O_3 e Al_2O_3 através do intemperismo dos minerais primários das rochas intrusivas básicas e das rochas sedimentares da Fm. Corumbataí, entre eles a hidrólise total ou parcial de caulinitas e gibbsitas que liberam mais íons H^{+} e Al^{3+} no solo (Vieira, 1988). O processo descrito também tem forte influência dos relevos de baixa amplitude e declividade moderada com formação de horizontes de solos profundos e do balanço hídrico da região, uma vez que a lixiviação é mais acentuada em períodos de excedente hídrico.

Desta forma, o período de excedente hídrico correspondente à entressafra (Arcadis Tetraplan, 2011) propicia o aumento da lixiviação dos cátions de base e do aumento de H+Al no solo, ao passo em que no período de safra a aplicação de vinhaça aumenta a umidade ao solo na época de deficiência hídrica e repõe a quantidade de macronutrientes de Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^{+} perdida no período chuvoso. Contudo, os resultados de fertilidade nem sempre apresentaram o padrão de maior concentração H+Al em relação à SB, sendo um possível indicador da influência de tipos de manejo como a calagem na época chuvosa.

Conclusões

Em épocas de excedente hídrico, os processos de lixiviação de K^{+}, Ca^{2+} e Mg^{2+} e de hidrólise de caulinitas e gibbsitas com aumento de H+Al no solo podem ser intensificados, os quais são influenciados pela granulometria do solo e pelos aspectos físicos, como a geologia e o tipo de relevo. Em doses devidamente controladas, a aplicação de vinhaça na época de déficit hídrico no período de safra propicia o aumento da umidade do solo e o fornecimento de macronutrientes, resultando em bons índices de fertilidade. Todavia, as variações de fertilidade não dependem exclusivamente da dosagem de vinhaça e podem ser causadas pelas mudanças do balanço hídrico e do uso de alguns tipos de manejo, que também devem ser considerados no estudo.

Referências Bibliográficas

Arcadis Tetraplan, 2011. Estudo de Impacto Ambiental- EIA: Ampliação das Áreas de Plantio de cana-de-açúcar e da Produção de açúcar, álcool e energia elétrica. São Paulo, p. 483.

Barros, R.P., Viégas, P.R.A., Silva, T.L.; Souza, R.M.; Barbosa, L.; Viégas, R.A.; Barretto, M.C.V.; Melo, A.S., 2010. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v.40, n.30, 341-346 p.

Brito, A.P.F., 2013. Avaliação da disposição de biossólido oriundo da ETE Araraquara (SP) em argissolo vermelho. Dissertação de Mestrado em Geociências e Meio Ambiente. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), pp. 95.

Casarini, D.C.P.; Branco, S. M., 1989. Efeito da Fertirrigação com vinhaça nas propriedades químicas e microbiológicas do solo em um sistema de disposição de efluente industrial. Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos.

CBH-MOGI – Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu, Centro Regional Universitário do Espírito Santo do Pinhal-Creupi, SMA – Secretária do Meio Ambiente, CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1999. Diagnóstico da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu: "Relatório Zero". Disponível em:< http://www.sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/7106/relmogiseg.pdf>. [acesso em 19/05/2018].

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2015. Norma Técnica P4.231: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 3ª Edição, 2ª Versão – São Paulo.

Dana, E.S.; Hurlbut, C.S., 1960. Manual de Mineralogia. Editora Reverté, S.A. New York, USA, 2ª Edição, pp. 600.

Figueira, B.A.M.; Angélica, R.S.; Costa, M.L.; Mercury, J.M.R.; Santos, M.R.P.; Poellmann, H., 2016. Caracterização química e mineralógica de birnessita natural da Mina do Azul (Província Mineral de Carajás, Brasil) e seu análogo sintético obtido pelo método sol-gel. Cerâmica, v. 62, n.362, pp. 128-132.

Fuess, L.T., 2013. Potencial Contaminante e energético da vinhaça: Riscos de contaminação ao solo e recursos hídricos e recuperação de energia a partir da digestão anaeróbica. Dissertação de Mestrado em Geociências e Meio Ambiente. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, p. 161.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008. Divisão Territorial Brasileira. Disponível em:< https://ww2.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_dtb_int.shtm >. [acesso em 19/05/2018].

Lopes, A.S., 1984. Solos sob cerrado: Características, propriedades e manejo. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato (POTAFOS), 162 p.

Mortatti, B.C., 2010. Caracterização físico-química dos solos e comportamento dos contaminantes da vinhaça por processo de difusão. Trabalho de Conclusão de Curso em Geologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

Nascimento, C.W.A., Barros, D.A.S., Melo, E.E.C., Oliveira, A.B., 2004. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v. 28, n.2, p. 385-392.

Oliveira, B.G., 2015. Emissão de metano e microbiota funcional associadas a vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas de armazenamento e transporte. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.99.

Pereira, A.C.A., 2015. Efeitos da Disposição de Lodo de ETE de indústria alimentícia no solo: estudo de caso. Dissertação de Mestrado em Geociências e Meio Ambiente. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 75 p.

Plano de Aplicação de Vinhaça, 2017. Pirassununga: CETESB de Mogi Guaçu.

Plano de Aplicação de Vinhaça, 2016. Pirassununga: CETESB de Mogi Guaçu.

Plano de Aplicação de Vinhaça, 2015. Pirassununga: CETESB de Mogi Guaçu.

Plano de Aplicação de Vinhaça, 2014. Pirassununga: CETESB de Mogi Guaçu.

Plano de Aplicação de Vinhaça, 2013. Pirassununga: CETESB de Mogi Guaçu.

Plano de Aplicação de Vinhaça, 2012. Pirassununga: CETESB de Mogi Guaçu.

Ribeiro, B.T.; Lima, J.M.; Curi, N.; Oliveira, C.C.; Lima, P.L.T., 2011. Cargas superficiais da fração argila de solos influenciados pela Vinhaça e Fósforo. Quim. Nova, vol. 34, nº 1, pp. 5-10.

Ronquim, C.C., 2010. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Disponível em:< https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31004/1/BPD-8.pdf>. [acesso em 27/05/2018].

Santa Cruz das Palmeiras. Prefeitura Municipal, 2018. Informações: A Cidade. Disponível em:< http://www.santacruzdaspalmeiras.sp.gov.br/>. [acesso em 19/05/2018].

Simabuco, S.M.; Nascimento Filho, V.F., 1994. Study on vinasse dynamics in soil using energy dispersive X-ray fluorescence with radioisotopic excitation. Scientia Agricola, v. 51, n.2, pp. 207-215.

Vieira, L.S., 1988. Manual da Ciência do solo – Com ênfase aos solos tropicais. 2ª Edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA., pp. 464.

CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL COM ESGOTO SANITÁRIO EM REATOR HÍBRIDO VISANDO AO AUMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Caroline de Cassia Banci Garcia [1]; Marcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic [2]; Eugenio Foresti [2]

[1] Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *No Brasil, os reatores anaeróbios de manta de lodo (UASB) vêm sendo utilizados como primeira unidade de tratamento biológico de esgotos sanitário. Esses reatores, no entanto, apresentem baixa eficiência de remoção de matéria orgânica, expressa como demanda química de oxigênio (DQO) e de sólidos em suspensão. Ademais, a digestão anaeróbia do esgoto sanitário em reatores UASB apresenta baixa produção de biogás, em razão da baixa concentração de matéria orgânica no afluente. No entanto, a produção de biogás pode ser aumentada pela codigestão anaeróbia, com a adição de um cossubstrato para aumentar a concentração inicial de matéria orgânica. Nesse trabalho, foi avaliada a possibilidade de utilização do potencial de produção de metano de reatores anaeróbios já instalados no Brasil, por meio da adição de glicerol ao afluente. A pesquisa foi realizada em duas etapas, usando reatores UASB híbrido, com volumes de 24,75 L e 1,46 L. Os reatores foram alimentados com esgoto sanitário e efluente de reator UASB, respectivamente, mantendo-se o tempo de detenção hidráulica (TDH) em 8 horas e variando-se a dosagem de glicerol afluente. O melhor resultado foi obtido com a aplicação da carga orgânica volumétrica de COV de 2,09 ± 0,22 kgDQO.m^{-3}.d^{-1}, que apresentou rendimento na produção de metano de 75 ± 68 mLCH$_4$.gDQOremovida^{-1}.*

Introdução

Muitas estações de tratamento de esgoto em operação no nosso país utilizam o reator UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, do inglês upflow anaerobic sludge blanket reactor) como principal unidade de tratamento biológico. A digestão anaeróbia do esgoto sanitário produz biogás, o qual tem sido, na maioria dos casos, queimado em "flare" ou simplesmente liberado para a atmosfera, contribuindo para aumento dos gases de efeito estufa. Além da poluição atmosférica, a liberação desses gases se apresenta como um desperdício de energia, uma vez que o biogás tem elevado potencial energético devido ao metano presente na mistura gasosa.

Estações municipais com tratamento anaeróbio do esgoto sanitário têm potencial para serem consideradas como usinas geradoras de energia, pois a energia gerada pode ser utilizada de modo a tornar a estação de tratamento de esgoto (ETE) autossuficiente.

A produção de energia a partir de resíduos biodegradáveis tem ganhado destaque no desenvolvimento de pesquisas, devido ao potencial energético e disponibilidade dessas fontes de energia renovável. Tal opção pode ser uma estratégia eficiente de gestão e utilização de resíduos indesejáveis e de difícil disposição no meio ambiente. Nesse contexto, a produção de biogás na digestão anaeróbia é um processo biotecnológico importante que trata resíduos biodegradáveis, enquanto gera energia pela produção do gás. Além disso, o metano derivado de digestão anaeróbia pode ser competitivo em eficiência e custo com outras formas de energia de biomassa (Chynoweth, Owens, Legrand, 2001).

O Brasil se destaca no uso de reatores UASB para tratamento de esgoto sanitário (Chernicharo et al., 2015). O plano energético brasileiro visa utilizar o biogás gerado em estações de tratamento de esgotos para geração de energia como uma das práticas sustentáveis a ser implementada no país (Probiogás, 2015). No entanto, o aproveitamento da capacidade

instalada depende da superação de desafios como a elevada perda de sólidos no efluente e a baixa produção de biogás em reatores UASB tratando esgoto sanitário.

Dentre as dificuldades enfrentadas nas estações de tratamento de esgoto sanitário no Brasil, destacam-se a necessidade de ampliação dos sistemas de tratamento e o gerenciamento e a disposição do lodo biológico de forma adequada. Uma forma de reduzir a geração de lodo é a imobilização das células no interior do reator, que, além de reduzir a perda de sólidos no efluente, também aumenta a capacidade de tratamento devido ao aumento da concentração da biomassa (Araujo Junior et al., 2011). Nesse cenário, reatores híbridos representam uma alternativa importante no aumento da capacidade de tratamento de esgoto sanitário, sem necessidade de alterações físicas nas ETEs.

Outro aspecto limitante à ampliação dos processos anaeróbios para águas residuárias de baixa concentração é a baixa produção de metano e a perda do biogás no efluente. A fim de melhorar o desempenho de reatores anaeróbios no que se refere à produção de metano, a codigestão, ou seja, a digestão combinada de diferentes resíduos orgânicos tem sido uma prática buscada por pesquisadores da área. Além disso, a codigestão tem surgido como uma alternativa promissora não somente para otimização da produção de biogás, como também para destinação ambiental correta de rejeitos passíveis de serem utilizados como cossubstratos (Budych-Gorzna, Smoczynski, Oleskowick-Popiel, 2016).

O uso de glicerol como cossubstrato é uma estratégia interessante para destinação de tal resíduo. O glicerol bruto é um subproduto da produção de biodiesel, que apresenta elevada concentração de matéria orgânica e baixo valor comercial. Observando-se a tendência de aumento do uso de biocombustíveis, em um futuro próximo, a produção de glicerol tende a aumentar. Embora esse subproduto seja utilizado, especialmente em indústrias de cosméticos, o grau de pureza necessário para utilização é muito alto, fator esse que limita seu consumo para esse tipo de indústria (Baba et al., 2013).

Dessa forma, visando a aproveitar a capacidade de produção de biogás já instalada no país e viabilizar o uso energético de metano em estações de tratamento de esgoto sanitário, o qual tem sido queimado em “flare”, esse trabalho foi formulado para testar duas hipóteses. A primeira é referente ao aumento na produção de biogás de reatores anaeróbios por meio da adição de glicerol como cossubstrato ao esgoto sanitário afluente ao sistema biológico, desde que respeitadas as cargas orgânicas assimiláveis pelos reatores e sem adição externa de álcali. A segunda hipótese diz respeito à melhoria no desempenho de reator UASB no que se refere à qualidade do efluente final, por meio da imobilização de parte da biomassa em reator híbrido.

Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido em duas partes. Na primeira, foi utilizado um reator anaeróbio híbrido com volume de 24,75 L, diâmetro de 150 mm e altura total de 1,4 m. Esse reator foi dividido em quatro zonas, ou câmaras superpostas com uma parcela da biomassa suspensa e uma parcela aderida em material suporte, ambas com volume de 7,07 L. Tal sistema foi alimentado com esgoto sanitário e glicerol por meio de uma bomba de alimentação. No separador trifásico, havia um tubo principal e um braço lateral com um defletor, constituindo a separação das fases sólida, líquida e gasosa. O efluente tratado era coletado na lateral, enquanto o biogás saia pela parte superior, sendo encaminhado a um selo hídrico e um medidor de vazão de gás. Durante a operação, o reator foi operado com 8h de tempo de detenção hidráulica (TDH), o sistema foi mantido à temperatura ambiente e o glicerol foi adicionado em volume percentual em relação ao esgoto (v/v).

Na segunda etapa de operação, dois reatores metanogênicos foram operados. O esgoto sanitário bruto foi tratado em um reator UASB e, ao efluente desse reator, foi adicionado glicerol. Essa mistura foi encaminhada a um reator híbrido com volume de 1,46 L e 52 mm de diâmetro. Para essa etapa de operação, o tempo de detenção hidráulica foi de 8h e a temperatura do sistema foi mantida em 25^{o}C. Nessa operação, o glicerol foi adicionado de

acordo com a carga orgânica volumétrica (COV). Os volumes destinados à biomassa imobilizada e à manta de lodo eram de 0,38 L e 0,46 L. O aquecimento do sistema foi necessário devido às baixas temperaturas no período de inverno e às grandes variações térmicas entre dias e noites.

O material para imobilização da biomassa foi confeccionado utilizando espuma de poliuretano e uma estrutura de polipropileno (PP) - bob de cabelo. A espuma de poliuretano foi escolhida como material suporte, por ser de baixo custo, inerte à biodigestão anaeróbia e processos físico-químicos, sendo que a elevada porosidade permite a aderência e de biomassa em alta concentração. A estrutura externa com bob é necessária para evitar compressão da espuma e a colmatação dos poros.

Com objetivo de diminuir o tempo de partida do sistema, em ambas as etapas, os reatores foram previamente inoculados com lodo proveniente de reator UASB da Avícola Ideal na cidade de Pereiras-SP, o qual tem sido utilizado no Laboratório de Processos Biológicos. Nas duas etapas, o lodo granular foi introduzido, o reator foi preenchido com esgoto sanitário e deixado em recirculação alguns dias. Nesse período de recirculação, a biomassa se fixou na espuma e o excesso de sólidos foi lavado do sistema.

As representações esquemáticas das duas fases de operação estão apresentadas na Figura 1.

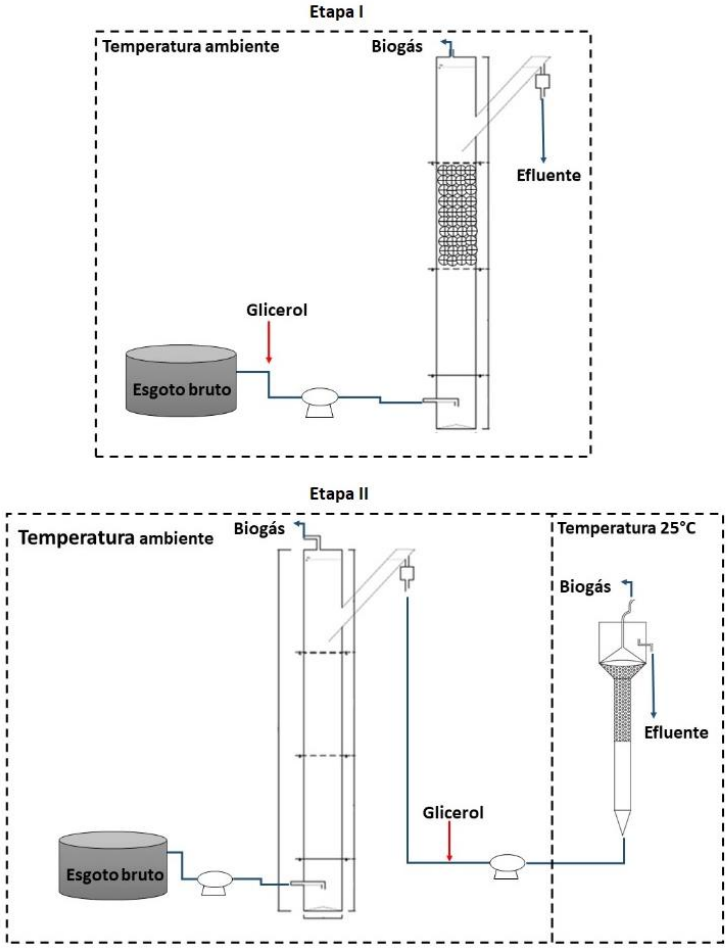


Figura 1: Representação esquemática das duas operações do experimento.

O esgoto sanitário utilizado na pesquisa foi proveniente de uma derivação do coletor de esgoto municipal que passa pela Área 2 da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo (USP). Essa derivação localiza-se próxima ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB), local de instalação do experimento.

O glicerol utilizado na pesquisa é produto residual da Biobrotas Oleoquímica, indústria localizada em Brotas (SP). Esse composto tem elevada DQO - cerca de 1.300.000 $mgO_2.L^{-1}$, densidade de 1,26 $g.cm^{-3}$, e é altamente viscoso.

Nas operações, a carga orgânica foi aumentada progressivamente de modo a permitir a adaptação da biomassa no sistema, evitando sobrecargas orgânicas. Na primeira fase das operações, a DQO afluente foi proveniente apenas do esgoto sanitário, com cerca de 400 $mgO_2.L^{-1}$ na primeira etapa de operação. Já para a segunda parte do experimento, a DQO afluente foi proveniente do esgoto sanitário tratado em reator UASB com cerca de 120 $mgO_2.L^{-1}$. Nas fases seguintes de cada etapa, o glicerol foi adicionado na corrente de alimentação, aumentando a DQO e COV afluente.

Para verificação do desempenho do sistema biológico, o monitoramento foi realizado por meio das análises descritas na Tabela 1. O desempenho do sistema biológico foi verificado efetuando-se análises de monitoramento nas correntes líquidas, afluente e efluente ao reator, e no biogás.

Tabela 1: Análises, métodos e frequências de monitoramento do reator.

Análise	Frequência		Método
Vazão	diariamente		-
Demanda química de oxigênio (DQO)	3 vezes por semana		APHA/AWWA/WEF (2005)
pH	3 vezes por semana		APHA/AWWA/WEF (2005)
Alcalinidade parcial, intermediária e total	3 vezes por semana		Ripley et al. (1986)
Ácidos voláteis	2 vezes por semana	Cromatografia gasosa/titulação	Penteado (2012)/Dilallo e Albertson (1961)
Série de sólidos	1 vez por semana		APHA/AWWA/WEF (2005)
Produção de biogás	diariamente	Vazão Volumétrica	-
Composição do biogás	2 vezes por semana	Cromatografia gasosa	Perna et al. (2013)

Resultados e Discussão

Parte I: Operação com reator único

Essa etapa experimental, compreendeu as fases operacionais I e II, correspondentes a 0% e 0,03% de glicerol, respectivamente. A carga orgânica volumétrica máxima adicionada ao sistema foi de 2,32 ± 0,36 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$. Após 20 dias com essa carga, o sistema apresentou baixo valor de pH e não havia produção de biogás.

Na fase 1, o reator foi alimentado apenas com esgoto sanitário. Durante 35 dias de operação, com TDH de 8h, a carga orgânica volumétrica média afluente ao sistema biológico foi de 1,13 ± 0,16 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$. Para essa fase, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 60 ± 11,6 % para DQOt (DQO total) e 55,7 ± 8,4% para DQOs (DQO solúvel).

Na Tabela 2, há o resumo dos valores relativos à remoção de matéria orgânica durante a operação do reator.

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão para a DQO afluente e efluente, porcentagem de remoção de DQO e carga orgânica volumétrica aplicada ao reator.

		Fase I	Fase II
DQO Afluente ($mgO_2.L^{-1}$)	Total	378 ± 45	781 ± 113
	Dissolvida	153 ± 30	542 ± 73
DQO Efluente ($mgO_2.L^{-1}$)	Total	145 ± 31	571 ± 62
	Dissolvida	64 ± 11	420 ± 37
Remoção (%)	Total	60 ± 11,6	23,4 ± 10,4
	Dissolvida	55,7 ± 8,4	19,6 ± 9,8
COV aplicada ($kgDQO.m^{-3}.dia^{-1}$)	Total	1,13 ± 0,16	2,30 ± 0,36
	Dissolvida	0,46 ± 0,1	1,60 ± 0,21

Em relação à estabilidade do sistema, o pH médio do efluente na fase I foi de 6,90 ± 0,84. Na operação, as médias de alcalinidade parcial e intermediária no efluente para a primeira fase (0% glicerol) foram de 104 ± 43 $mgCaCO_3.L^{-1}$ e 45 ± 19 $mgCaCO_3.L^{-1}$. Para a operação com 0,03% (v/v) de glicerol, o pH médio do efluente foi de 5,84 ± 0,60, as alcalinidades a bicarbonato (parcial) e a ácidos (intermediária) foram 20 ± 27 $mgCaCO_3.L^{-1}$ e 85 ± 20 $mgCaCO_3.L^{-1}$. Durante a fase em que o reator foi operado com adição de glicerol, foram observadas várias ocorrências de ausência de alcalinidade parcial, ou seja, a capacidade tampão do sistema estava comprometida.

Comparando-se as duas fases de operação do reator, conclui-se que o aumento da COV devido à introdução de glicerol reduziu a alcalinidade a bicarbonato no sistema e, consequente, contribuiu para a queda do pH. Esses parâmetros indicam a ocorrência de instabilidade do sistema biológico, devido ao aumento de carga orgânica e da atividade acidogênica, e possível deficiência na atividade metanogênica.

Durante a operação com esgoto sanitário, praticamente nenhuma concentração de ácidos orgânicos foi detectada. No entanto, com a adição de glicerol, foram detectados os ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico, tanto no efluente quanto no afluente ao reator. As concentrações presentes no afluente são justificadas pela pré-fermentação do glicerol no tanque de alimentação. Na Tabela 3, estão apresentados os resultados das análises de ácidos totais durante a primeira operação.

A adição de glicerol no afluente resultou no aumento da atividade acidogênica, no tanque de alimentação, contribuiu para introdução de ácidos orgânicos na corrente de alimentação. Os ácidos orgânicos produzidos pela fermentação do glicerol (no tanque de alimentação e no reator) não foram não completamente convertidos em metano e gás carbônico no reator.

Tabela 3: Concentrações médias e desvios padrão dos ácidos totais analisados para primeira etapa de operação

		Fase I	Fase II
Ácidos totais ($mg.L^{-1}$)	Afluente	75,1 ± 16	160,1 ± 54,3
	Efluente	1,6 ± 2,3	194,3 ± 21

Durante essa operação, observou-se elevado teor de metano no biogás (na ordem de 96%). A produção volumétrica de metano para a alimentação com esgoto sanitário foi de 71 ± 15 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$ e o rendimento de metano foi de 92 ± 23 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$, nas condições normais de temperatura e pressão (1 atm e 0^oC). Para a fase II, quando foi adicionado o glicerol, a produção volumétrica de metano foi de 38 ± 21 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$ e o rendimento de metano foi de 64 ± 45 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$, nas condições normais de

temperatura e pressão (1 atm e 0ºC), bem abaixo do rendimento teórico de 350 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$.

A baixa produção volumétrica de metano, bem como o baixo rendimento do gás, foram outros indícios da instabilidade do sistema biológico, uma vez que não houve atividade metanogênica estável.

Nas análises de composição do gás, na maioria das amostras, os gases presentes eram metano e gás carbônico, nas proporções de 98 e 2%. Poucas vezes foi observado o gás hidrogênio no conteúdo da amostra. Nas vezes que esse gás foi detectado, ele foi o único componente do biogás.

Devido a dificuldades na operação, o reator teve condições operacionais modificadas. Uma das alternativas foi a operação de um reator UASB tratando o esgoto sanitário e a outra foi o controle da temperatura operacional em 25ºC.

Parte II: Operação com dois reatores

Devido às variações de DQO no esgoto afluente, a estratégia de adição de glicerol por porcentagem em volume foi substituída pela adição segundo a COV. Dessa forma, a quantidade de glicerol afluente foi variada de acordo com o efluente do reator UASB piloto. Como o esgoto era pré-tratado, a variação no volume de glicerol era quase que insignificante, devido à constância nos valores de DQO do efluente.

Na fase I, o reator foi alimentado apenas com efluente de reator UASB tratando esgoto sanitário e, nas fases seguintes, o glicerol foi adicionado a esse efluente e introduzido no reator metanogênico.

Nessa etapa experimental, o reator foi operado por cinco fases. Para essa operação, o glicerol foi adicionado progressivamente, aumentando a COV afluente ao sistema. A carga máxima adicionada, correspondente à fase V, foi de 2,48 ± 0,19 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$. Com a aplicação dessa carga orgânica, o sistema biológico apresentou sobrecarga de ácidos, queda de remoção de matéria orgânica, aumento da relação AI/AP, e queda de pH. Na Tabela 4, há o resumo dos valores relativos à remoção de matéria orgânica durante a operação do reator.

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão para a DQO afluente e efluente, porcentagem de remoção de DQO e carga orgânica volumétrica aplicada ao reator.

		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
DQO Afluente ($mgO_2.L^{-1}$)	Total	239 ± 53	359 ± 73	550 ± 74	697 ± 74	826 ± 63
	Dissolvida	178 ± 63	305 ± 103	412 ± 151	584 ± 151	608 ± 236
DQO Efluente ($mgO_2.L^{-1}$)	Total	118 ± 32	114 ± 50	117 ± 82	159 ± 82	200 ± 31
	Dissolvida	74 ± 25	81 ± 26	99 ± 60	122 ± 60	132 ± 54
Remoção (%)	Total	47 ± 24	68 ± 16	78 ± 12	77 ± 12	76 ± 5
	Dissolvida	54 ± 19	71 ± 10	75 ± 12	78 ± 12	76 ± 9
COV aplicada ($kgDQO.m^{-3}.dia^{-1}$)	Total	0,72 ± 0,16	1,08 ± 0,22	1,65 ± 0,22	2,09 ± 0,22	2,48 ± 0,19
	Dissolvida	0,53 ± 0,19	0,92 ± 0,31	1,24 ± 0,45	1,75 ± 0,45	1,83 ± 0,71

Considerando a estabilidade do processo e as frações total e dissolvida, a fase IV apresentou melhor desempenho, com porcentagens de 77 ± 12% em relação à DQOt e 78 ± 12% em relação à DQOs. Embora as fases IV e V tenham tido desempenho semelhantes em termos de remoção de DQO, a diferença entre ambas foi evidenciada pelos valores de alcalinidade. As variações de DQO afluente e efluente foram principalmente devido à degradação do glicerol no tanque de alimentação, especialmente em períodos de elevada

temperatura. Embora o reator metanogênico tenha sido mantido à temperatura constante de 25ºC, o tanque de alimentação foi mantido à temperatura ambiente, propiciando a acidificação do glicerol, e reduzindo a DQO afluente.

O valor da COV para a melhor fase de operação 2,09 ± 0,22 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$ foi maior que os valores de carga orgânica volumétrica ótima obtidos nos trabalhos de Athanasoulia et al. (2014) e Baba et. al. (2013), respectivamente 1,7 e 1,48 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$. E a COV nesse trabalho foi menor que os valores obtidos de 4,5, 5,41 e 2,97 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$ obtidos respectivamente por Siles et al. (2010), Castrillón et al. (2013) e Nartker et al. (2014).

Na fase V, observa-se que houve queda na remoção de DQO, indicando possível início do colapso do sistema.

Em relação à estabilidade do sistema, houve uma queda significante de pH da fase IV para a fase V, indicando instabilidade no sistema biológico. Durante as quatro primeiras fases de operação, não foi observado nenhum episódio de ausência de alcalinidade parcial, diretamente associada à disponibilidade de alcalinidade a bicarbonato. Apenas na fase V da operação houve episódios em que o pH do efluente esteve abaixo de 5,75 e, portanto, a alcalinidade parcial foi inexistente. As fases II e IV apresentaram maiores valores de alcalinidade parcial no efluente, sendo, respectivamente, 109 ± 41 e 104 ± 32 $mgCaCO_3.L^{-1}$. Em relação à alcalinidade intermediária, ou a ácidos orgânicos, os valores foram aumentando durante as fases, de modo que na fase V, o efluente apresentou maior valor de alcalinidade intermediária (64 ± 48 $mgCaCO_3.L^{-1}$).

Analisando os dados de ácidos orgânicos afluentes, foi observado a presença dos ácidos lático, fórmico, acético, propiônico e isobutírico, o que indica a ocorrência de degradação do glicerol previamente à introdução no reator metanogênico híbrido. Em relação ao efluente do reator, o ácido fórmico foi detectado no início da operação e na última fase, indicando instabilidade no sistema biológico, inicialmente por ter ocorrido no período de adaptação da biomassa e, na última fase, devido ao comprometimento da metanogênese, que resultou na instabilidade do processo. O ácido acético foi detectado apenas no efluente da primeira fase, quando o reator híbrido era operado apenas com efluente de esgoto sanitário tratado. A adição de glicerol não influenciou no acúmulo de ácido acético no sistema, concluindo-se que este composto orgânico foi efetivamente consumido pela comunidade microbiana. Quanto ao ácido propiônico, este foi detectado em baixas concentrações, tanto no afluente, quanto no efluente. Na fase IV de operação, o reator produziu o ácido, com concentração na ordem de 0,9 ± 1,9 $mg.L^{-1}$. O ácido butírico foi observado em todas as fases de operação, com exceção da fase II (menor quantidade de glicerol adicionada ao sistema). Para as fases III, IV e V, o ácido esteve presente tanto no efluente quanto no afluente. Nas fases III e IV, o reator biológico foi capaz de consumir a carga de ácido afluente e a produzida no interior do reator, enquanto que na fase V, a concentração no efluente foi muito elevada.

Em relação aos ácidos totais, obtidos por titulação, houve um aumento na concentração efluente a partir da fase III. Nas fases I, II e IV, o reator consumiu os ácidos orgânicos presentes no afluente, bem como os produzidos pela fermentação do glicerol e outros constituintes orgânicos. Nas fases III e V, a produção de ácidos pelo sistema biológico não foi totalmente convertida em outros produtos finais, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Concentrações médias e desvio padrão dos ácidos orgânicos analisados para operação de reator em fase única

		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
Ácidos totais ($mg.L^{-1}$)	Afluente	36,1 ± 14,7	37,6 ± 26,6	30,3 ± 20,1	44,2 ± 36,1	58,2 ± 36,2
	Efluente	32,5 ± 18,5	21,6 ± 6,3	34,6 ± 24,9	37,0 ± 26,7	104,1 ± 113

Observa-se que o aumento do volume de glicerol adicionado à alimentação do reator resultou no aumento da concentração de ácidos orgânicos no afluente, resultando no aumento da carga orgânica aplicada no reator metanogênico. A fermentação do glicerol segue diferentes caminhos, dependendo dos microorganismos envolvidos e das condições ambientais impostas ao sistema (Biebl, 2001). Como o inóculo é de cultura mista e o cosubstrato é esgoto sanitário, era esperado que vários subprodutos das cadeias de fermentação do glicerol fossem encontrados nas análises.

Assim como na operação com reator único, a adição de glicerol ao esgoto sanitário favoreceu o aumento do teor de metano no biogás (média de 92%). Portanto, a adição de glicerol contribui para variação na composição do biogás. Em algumas amostras de análise de composição gasosa não foi detectado a presença de gás carbônico, sendo que o biogás era composto exclusivamente por metano. Isso pode ser um indício de que o CO_2 ficou dissolvido ou que houve consumo desse gás por bactérias autotróficas. A redução de dióxido de carbono em acetato é denominada homoacetogênese. Nessa reação, bactérias homoacetogênicas consomem hidrogênio e dióxido de carbono produzindo água e acetato.

No gráfico da Figura 2, estão apresentados os valores de produção volumétrica e rendimento de metano médio para cada uma das fases, e a evolução temporal desses dois parâmetros.

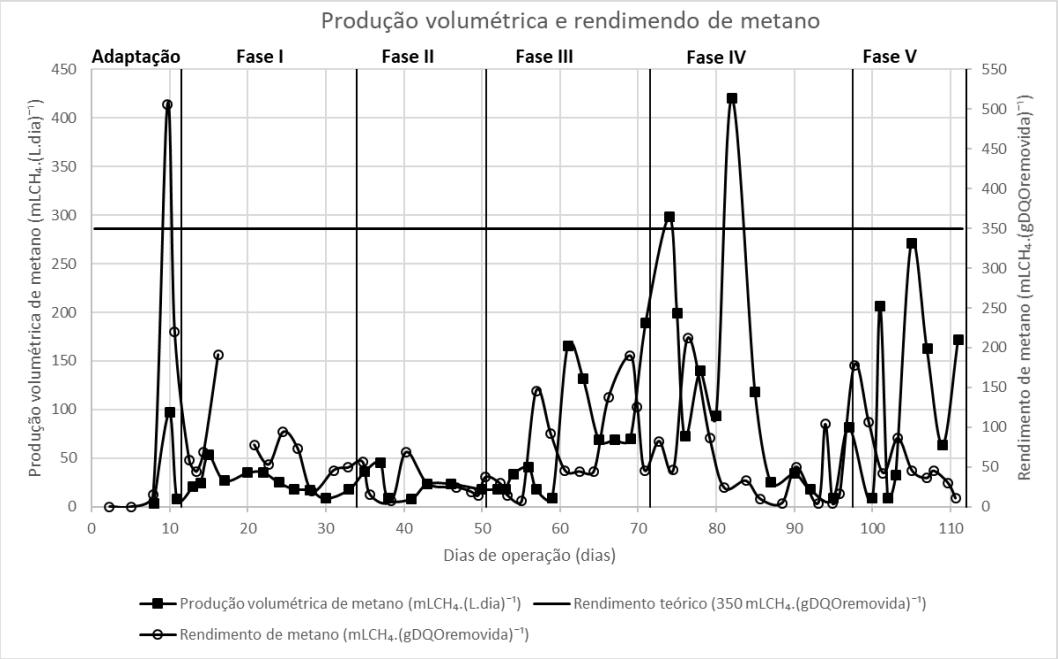


Figura 2: Produção volumétrica e rendimento de metano médios durante a operação com dois reatores. Fonte: Elaboração própria.

Em geral, quanto maior a carga orgânica do afluente, maior a quantidade de metano produzido por volume tratado. No entanto, a fase V, de maior carga orgânica, foi a etapa de declínio da atividade metanogênica e instabilidade do sistema biológico. Observa-se um aumento no rendimento de metano nas fases II, III e IV, conforme o glicerol foi sendo adicionado. É interessante observar que o rendimento de metano para a fase I foi muito próximo do rendimento de metano para a fase IV. É possível deduzir que a comunidade microbiana precisou de um tempo longo para se adaptar ao novo substrato adicionado. Por isso, as fases II e III tiveram rendimento menor que a fase I.

Na fase IV, a produção volumétrica de metano foi de 126 ± 125 $mLCH_4.L^{-1}.dia^{-1}$ e o rendimento de metano foi de 75 ± 68 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$, nas condições normais de temperatura e pressão (1 atm e 0^oC). Embora o rendimento de metano tenha sido bem abaixo

do rendimento teórico de 350 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$, essa fase apresentou os maiores valores de rendimento observados.

Análise de viabilidade no uso do biogás oriundo da codigestão de glicerol e esgoto sanitário

A análise de viabilidade no uso de biogás em estações de tratamento de esgoto através da adição de glicerol em reatores híbridos foi feita com a melhor fase de operação observada no experimento, relativa à fase IV com operação com dois reatores, em que a remoção de matéria orgânica, a produção volumétrica e rendimento de metanos apresentaram os maiores valores, e a estabilidade do sistema biológico foi mantida.

Considerando, hipoteticamente, uma cidade com 200.000 habitantes, com geração média de 160 L de esgoto por dia, DQO média de 400 $mgO_2.L^{-1}$, e com a estação municipal de tratamento de esgoto operando com reator UASB como unidade biológica de tratamento, com eficiência média de remoção de matéria orgânica na forma de DQO de 65%. Para esse cenário, a produção teórica de metano nas condições normais de temperatura e pressão é de 2.910 m^3CH_4 por dia.

Se essa estação adotar reator híbrido e suplementar o esgoto afluente com glicerol, a carga de DQO afluente à ETE passaria a ser de 975 $mgO_2.L^{-1}$ e a eficiência de remoção de DQO do reator passaria a ser de 77%. Com esse novo cenário, a produção teórica de metano nas condições normais de temperatura e pressão seria de 8.403 m^3CH_4 por dia. A modificação do reator UASB em híbrido e a suplementação de glicerol, resultariam em aumento na produção de metano de 2,8 vezes a produção teórica do cenário inicial.

Portanto, o aproveitamento da capacidade de produção de biogás já instalada no país e o uso energético de metano em estações de tratamento de esgoto sanitário, podem ser viabilizados por meio da adição de glicerol como cossubstrato ao esgoto sanitário afluente ao sistema biológico, e pela melhoria no desempenho de reator UASB devido à imobilização de parte da biomassa em reator híbrido.

Conclusões

O experimento foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira, a digestão anaeróbia foi realizada em reator único, e na segunda etapa, o sistema biológico foi separado com dois reatores. A mudança foi feita devido a dificuldades operacionais enfrentadas na primeira etapa, e com objetivo de melhorar a eficiência do sistema biológico.

Na primeira operação, o reator híbrido operado com 8h de tempo de detenção hidráulica, mantido à temperatura ambiente, não apresentou bom desempenho, com queda de pH e baixa produção de biogás com pouco tempo de operação. O reator foi operado com COV máxima de 2,2 ± 0,81 $kgDQO.m^{-3}.dia^{-1}$ e levado ao colapso.

Na segunda operação, o reator híbrido também foi operado com 8h de tempo de detenção hidráulica, com manutenção da temperatura operacional em 25ºC. O desempenho do reator foi melhor do que na primeira experiência, com COV ótima de 2,09 ± 0,22 $kgDQO.m^{-3}.dia^{-1}$ e máxima de 2,48 ± 0,19 $kgDQO.m^{-3}.dia^{-1}$.

Considerando a eficiência de remoção de matéria orgânica, produção de ácidos orgânicos, produção de biogás e estabilidade do sistema biológico devido a alcalinidade, a melhor fase de operação foi a fase IV relativa à operação com digestão anaeróbia em dois estágios. Para essa fase, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 77 ± 12% para a DQO total e 78 ± 12% para a DQO solúvel. Nessas condições o rendimento de metano nas condições normais de temperatura e pressão foi de 75 ± 68 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$. Embora essa produção tenha sido bem abaixo da produção teórica (350 $mLCH_4.gDQOremovida^{-1}$), o teor de metano no biogás foi na ordem de 92%, com ocorrência episódios de ausência de gás carbônico e hidrogênio.

Com os dados de remoção de matéria orgânica e rendimento de metano para a melhor fase de operação, foi possível fazer um breve estudo de viabilidade do uso de glicerol em estações de tratamento de esgoto sanitário visando aumento na produção de biogás. O estudo indicou que a modificação de um reator UASB em reator híbrido e a adição de glicerol ao esgoto sanitário afluente ao sistema biológico pode resultar em um aumento de 2,8 vezes na produção teórica de metano na estação.

Referências Bibliográficas

APHA/AWWA/WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods 541.

Araújo Junior, M. M. et al, 2011. Estudo Do Efeito Da Adição De Material Suporte Para Adesão Celuar Em Reator De Lodos Ativados Tipo Cass ® (Cyclic Activated Sludge System) Tratando Esgoto Sanitário Municipal. 26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1–10.

Athanasoulia, E., Melidis, P., Aivasidis, A., 2014. Co-Digestion of Sewage Sludge and Crude Glycerol from Biodiesel Production. Renew. Energy 62, 73–78.

Baba, Y., Tada, C., Watanabe, R., Fukuda, Y., Chida, N., & Nakai, Y., 2013. Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. Bioresour. Technol. 140, 342-348.

Budych-Gorzna, M., Smoczynski M., Oleskowicz-Popiel P., 2016. Enhancement of Biogas Production at the Municipal Wastewater Treatment Plant by Co-Digestion with Poultry Industry Waste. Appl. Energy 161, 387–94.

Castrillón, L., Fernández-Nava Y., Ormaechea P., Marañón E., 2013. Methane Production from Cattle Manure Supplemented with Crude Glycerin from the Biodiesel Industry in CSTR and IBR. Bioresour. Technol. 127, 312–17.

Chernicharo, C. A.L., van Lier J. B., Noyola A., Bressani Ribeiro T., 2015. Anaerobic Sewage Treatment. State of the Art, Constraints and Challenges. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14(4), 649–79.

Chynoweth, D. P., Owens J., Legrand R., 2001. Renewable Energy from Anaerobic Digestion of Biomass. Renew. Energy 2, 1–8.

DiLallo, R., Albertson, O. E., 1961. Volatile acids by direct titration. J. Water Pollut. Control Fed. 356-365.

Nartker, S., Ammerman, M., Aurandt, J., Stogsdil, M., Hayden, O., Antle, C., 2014. Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. Waste Manag. 34(12), 2567-2571.

Penteado, E. D., Adorno, M. A. T., Zaiat, M., 2012. Simple and Accurate Method for Determination of Fatty Acids, Alcohols and Carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID Detectors. In HPLC 2012. 38th Internation Symposium on High Performance Liquide Phase. Separations and Related Techniques, Anaheim Marriot, Anaheim, California, USA.

Probiogás, 2015. Brasil: Secretaria Nacional de Samenamento Ambiental. Tecnologias de Digestão Anaeróbia Com Relevância Para o Brasil. Substratos, Digestores e Uso de Biogás, Brasília, DF.

Ripley, L. E., Boyle W. C., Converse J. C., 1986. Alkalimetric Improved for Anaerobic Digestion Wastes Monitoring of of high-strenght wastes. J. Water Pollut. Control Fed. 406–11.

Siles, J. A., Martín M. A., Chica A. F., Martín A., 2010. Anaerobic Co-Digestion of Glycerol and Wastewater Derived from Biodiesel Manufacturing. Bioresour. Technol. 101(16), 6315–21.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., (2013) Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy 38, 54–62.

IMPACTO DA HIDRÓLISE POR PRESSÃO TÉRMICA DO LODO ATIVADO EXCEDENTE NA GERAÇÃO DE METANO E NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DO DIGESTATO POR PROCESSO ANAMMOX

Guilherme Lelis Giglio [1]; Julius Bernardus van Lier [2] ;
Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic [3]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor da Seção de Engenharia Sanitária da Universidade Tecnológica de Delft-Holanda.
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;

Resumo. *O pré-tratamento do lodo ativado excedente (LAE) para aplicação em biodigestores anaeróbios vem sendo cogitado em estações de tratamento de águas residuárias visando o aumento da eficiência da digestão anaeróbia, a redução da quantidade de lodo e o aumento da recuperação energética. Apesar dos efeitos positivos da aplicação da hidrólise por pressão térmica (HPT) em LAE na biodegradabilidade do lodo, a geração potencial de compostos tóxicos inibidores precisa ser avaliada em relação aos organismos metanogênicos, mais especialmente quando se deseja aplicar o processo Anammox (oxidação anaeróbia de amônia) para remoção de compostos nitrogenados. Portanto, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar o incremento na produção de biogás em biodigestores, associados à HPT e sua influência na formação de compostos inibidores aos sistemas de desnitrificação autotrófica (Anammox), no percolado da unidade (digestato). Os resultados gerados nesta pesquisa pretendem contribuir para o estabelecimento de condições que associem os efeitos positivos da HTP na geração de biogás e na qualidade final de subprodutos gerados, especialmente em relação à remoção de nitrogênio do digestato, possibilitando a utilização do processo Anammox, o que contribui para o balanço energético positivo em ETEs com Lodos Ativados como coração da tecnologia aplicada.*

Introdução

A produção de energia limpa, a redução e a valoração dos resíduos gerados são demandas cada vez mais abordadas em sistemas de tratamento de águas residuárias em geral, como as ETEs. Nesse cenário, o tratamento de lodo primário e de Lodo Ativado Excedente (LAE) possibilita a geração de energia renovável (biogás) em biodigestores anaeróbios. A adoção de técnicas inovadoras, como a aplicação do processo Anammox para remoção de compostos nitrogenados das correntes líquidas, podem amenizar problemas comuns em corpos d'água como a eutrofização e reduzir custos operacionais, tornando as ETEs mais sustentáveis.

A Digestão Anaeróbia (DA) de lodo produz biogás (CH_4 e CO_2), contribuindo para o balanço financeiro da ETE, com economia de cerca de 50% dos custos operacionais (Spinosa et al., 2011). Segundo Garrido et al. (2013), em média, 50 a 60% dos poluentes orgânicos afluentes em ETEs são convertidos em LAE, que possui fração biodegradável limitada. A hidrólise do LAE, anteriormente à digestão anaeróbia, pode incrementar a produção de biogás, reduzir o volume de lodo gerado e do biodigestor, que poderá trabalhar com redução no tempo de detenção de lodo para 5 dias (Wandera et al., 2019).

A fim de melhorar a biodegradabilidade anaeróbia do lodo e posterior desidratação, estabilização e reciclagem, vários pesquisadores têm verificado que a estratégia de se adotar o pré-tratamento do lodo por meio de processos mecânicos, térmicos, químicos, biológicos ou combinações entre eles são eficazes (Zhen et al., 2017; Carlsson et al., 2012). Pesquisas recentes têm considerado que a hidrólise térmica, como a tecnologia de Hidrólise por Pressão

Térmica (HPT), é a opção mais promissora de pré-tratamento de lodo em ETEs (Cano et al., 2015). A HPT garante a desinfecção de agentes patogênicos, higienizando o efluente, reduz a torta de lodo e aumenta as possibilidades de sua disposição (Carrere et al., 2016).

No pré-tratamento por HPT, o lodo é submetido a altas temperaturas e pressões por um período de tempo definido. No final deste processo, uma descompressão abrupta – cerca de 5 bar à pressão ambiente – destrói as ligações químicas, a parede celular de proteínas e bactérias, permitindo aumentar a degradação biológica do lodo (Cano et al., 2015). Pesquisas que avaliaram a otimização da HPT relataram que as faixas ótimas do pré-tratamento variaram entre 160-180°C, 4-8 bar e 20-40 min de temperatura, pressão e tempo, respectivamente (Sapkaite et al., 2017; Fdz-Polanco et al., 2008; Bougrier et al., 2006). Independentemente da variabilidade desses parâmetros, constatou-se a formação de alguns compostos inibidores no pré-tratamento de LAE (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos inibidores formados a partir de diferentes condições de pré-tratamento térmico de LAE.

Condições de pré-tratamento		Possível inibidor	Comunidade afetada	Referência
Temperatura (°C)	Tempo (min)			
130-180	5-50	Melanoidinas	Arqueias metanogênicas	Sapkaite et al. (2017)
130-170	60	Compostos refratários	Arqueias metanogênicas acetoclásticas	Valo et al. (2004)
62-175	15-120	Compostos refratários	Lodo anaeróbio	Li e Noike (1992)
150-225	60	Melanoidinas e ácido húmico	Arqueias metanogênicas	Stuckey e McCarty (1984)

De acordo com Dwyer et al. (2008), o pré-tratamento térmico-pressurizado submetido a temperaturas superiores a 200°C pode ocasionar a reação Maillard e produzir melanoidinas como resultado da reação entre açúcares, aminoácidos e proteínas. As melanoidinas são polímeros heterogêneos de alto peso molecular difíceis de serem degradadas, podendo inibir a degradação de compostos orgânicos. Dessa forma, no presente estudo pretende-se avaliar as condições de hidrólise, com respeito à produção de metano no lodo hidrolisado.

Em grande parte das ETEs, o sobrenadante de lodo hidrolisado, que possui elevadas concentrações de compostos, como o íon amônio ($N\text{-}NH_4^+$), é reintroduzido ao sistema de lodos ativados sem qualquer tratamento. Esta prática pode prejudicar outras etapas de tratamento, depreciando comunidades microbianas específicas e podendo provocar o decaimento da produção de CH_4 e a redução da eficiência de remoção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo.

A remoção de compostos nitrogenados de correntes líquidas, quando em elevadas concentrações, pode ser realizada com vantagens sobre os processos biológicos tradicionais, como o processo de oxidação anaeróbia da amônia (Anammox, do inglês *ANaerobic AMMonium OXidation)*. Nessa alternativa é possível economizar cerca de 50% de oxigênio, dispensa a introdução de fonte de carbono orgânico como doador de elétrons e produz pouco lodo de excesso (Jianlong e Jing, 2005). No processo Anammox, o íon amônio (NH_4^+) é oxidado ao gás nitrogênio (N_2) sob condições anaeróbias, com nitrito (NO_2^-) como aceptor de elétrons e dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono. No entanto, a atividade

Anammox pode ser inibida por alguns compostos recalcitrantes originários na HPT de lodo biológico (Ali et al., 2015; Carvajal-Arroyo et al., 2013; Chamchoi al., 2008). Apesar da sensibilidade a compostos tóxicos, a oxidação anaeróbia de amônia apresenta uma série de vantagens em comparação com o tratamento convencional (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre os processos SHARON-Anammox e convencional de nitrificação-desnitrificação na remoção de nitrogênio.

Item	Unidade	Tratamento convencional	SHARON-Anammox
Energia	$kWh.(kg\text{-}N)^{-1}$	2,8	1,0
Metanol	$kg.(kg\text{-}N)^{-1}$	3,0	0,0
Produção de lodo	$kg\text{-}SSV.(kg\text{-}N)^{-1}$	0,5-1,0	0,1
Emissão de CO_2	$kg.(kg\text{-}N)^{-1}$	> 4,7	0,7
Custos totais	$€.(kg\text{-}N)^{-1}$	3,0-5,0	1,0-2,0

Fonte: Van Loosdrecht, 2008.

Embora a quantidade de ETEs utilizando o processo Anammox tenha aumentado nos últimos anos para 114 unidades (Ali e Okabe, 2015) ainda existem alguns desafios na aplicação dos processos Anammox em escala plena, como, por exemplo, longos períodos de partida (*start-up*), quando não se dispõe de inóculo apropriado (Li et al., 2011), limitando a aplicação no tratamento de efluentes em fluxos principais (*mainstream)* com baixa qualidade de efluente final (Ali e Okabe, 2015).

Apesar do fato da maioria dos reatores Anammox estarem instalados na Europa e, recentemente, na China há uma forte possibilidade de implementar estes reatores em ETEs em outras partes do mundo. Em regiões tropicais e subtropicais, dada a temperatura dos esgotos, o processo SHARON-Anammox pode ser uma opção (Gujer, 2010).

Dada a aplicabilidade do processo a correntes líquidas com concentrações de N-amoniacal superiores a 100 $mg.L^{-1}$ (Metcalf e Eddy, 2016), os efluentes de digestores de lodo de esgoto, entre outros estão entre sua aplicação potencial. Entretanto, a utilização de HTP, visando o incremento na produção de metano nos biodigestores, gera compostos potencialmente inibidores para organismos envolvidos na digestão anaeróbia de lodo e na remoção nitrogênio por processo Anammox, requerendo avaliação.

Dessa forma, na presente pesquisa, propõe-se avaliar os interferentes produzidos pela utilização de HTP de LAE na digestão anaeróbia do lodo hidrolisado e na remoção de nitrogênio do digestato, visando adequar as correntes líquidas ao descarte ao ambiente.

Material e Métodos

O lodo ativado excedente (LAE) gerado em estação de tratamento de esgoto sanitário, será periodicamente coletado e caracterizado por análises físico-químicas, como série de sólidos, DQO, DBO, pH conforme padronização internacional (APHA, 2012).

A pesquisa será realizada em 3 etapas. Na Etapa I será realizado o estudo da hidrólise do LAE por HTP, visando aumento da relação $DBO.DQO^{-1}$, associada à biodegradabilidade do lodo excedente de L.A. A HPT será inicialmente realizada variando-se temperatura, tempo e pressão entre 160 e 180°C, 20 e 60 minutos e de 2 e 6 bar, respectivamente, definidos com base em resultados positivos obtidos em estudos correlacionados à HPT (Sapkaite et al., 2017; Fdz-Polanco et al., 2008; Bougrier et al., 2006). Ensaios com condições específicas para as variáveis temperatura, tempo e pressão serão definidos conforme Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR). As respostas DBO e DQO obtidas na interação entre as variáveis

envolvidas serão analisadas por meio do Método de Superfície de Resposta (MSR). Ensaios em triplicata genuína validarão o modelo para a HPT estabelecida.

Na Etapa II, os hidrolisados, obtidos na Etapa I, serão submetidos à digestão anaeróbia em frascos reatores alimentados em batelada, para acompanhamento do processo de digestão anaeróbia e avaliação do potencial tóxico das substâncias produzidas no processo de hidrólise em relação à produção de metano. O acompanhamento do processo anaeróbio será feito por medida da pressão nos frascos reatores e análise da composição gasosa por cromatografia. Ao final do experimento, o sobrenadante líquido dos frascos reatores será caracterizado será caracterizado com respeito à DQO e DBO remanescentes, NTK e $N\text{-}NH_4^+$, substância húmicas e melanoidinas.

Na Etapa III, diferentes concentrações de melanoidinas, ácidos húmicos e matéria orgânica, previamente estabelecidas como potencialmente tóxicas aos organismos participantes do ciclo do nitrogênio (Ali e Okabe, 2015; Carvajal-Arroyo et al., 2013; e Chamchoi et al., 2008) serão utilizadas. Essas substâncias serão introduzidas em frascos reatores para avaliar matemática e estatisticamente as combinações de compostos que interferem na remoção de nitrogênio no processo Anammox, de acordo com planejamento experimental DCCR-MSR para avaliar a interferência de possíveis compostos inibidores (reversíveis ou irreversíveis) no processo Sharon-Anammox. Serão utilizadas concentrações de N-amoniacal no intervalo da potencialidade do processo Anammox, ante a relação estequiométrica de $1{,}32N\text{-}NO_2^-.(N\text{-}NH_4^+)^{-1}$

Referências Bibliográficas

Ali, M., Okabe, S., 2015. Anammox-based technologies for nitrogen removal: advances in process start-up and remaining issues. Chemosphere. 141, 144-153.

APHA/AWWA/WEF., 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th edition. American Public Health Association, Washington, DC, USA.

Bougrier, C., Delgenes, J. P., Carrere, H., 2006. Combination of thermal treatments and anaerobic digestion to reduce sewage sludge quantity and improve biogas yield. Process Saf. Environ., 84(4), 280-284.

Cano, R., Pérez-Elvira, S. I., Fdz-Polanco, F., 2015. Energy feasibility study of sludge pretreatments: a review. Appl. Energy, 149, 176-185.

Carlsson, M., Lagerkvist, A., Morgan-Sagastume, F., 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: a review. Waste Manage., 32(9), 1634-1650.

Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., Ferrer, I., 2016. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: from lab-scale research to full-scale application. Bioresour. Technol., 199, 386-397.

Carvajal-Arroyo, J. M., Sun, W., Sierra-Alvarez, R., Field, J. A., 2013. Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. Chemosphere, 91(1), 22-27.

Chamchoi, N., Nitisoravut, S., Schmidt, J. E., 2008. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification. Bioresour. Technol., 99(9), 3331-3336.

Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R., Jetten, M. S. M., 2007. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. Enzyme Microb. Technol., 40(4), 859-865.

Dwyer, J., Starrenburg, D., Tait, S., Barr, K., Batstone, D. J., Lant, P., 2008. Decreasing activated sludge thermal hydrolysis temperature reduces product colour, without decreasing degradability. Water Res., 42(18), 4699-4709.

Fdz-Polanco, F., Velazquez, R., Perez-Elvira, S. I., Casas, C., Del Barrio, D., Cantero, F. J., Fdz-Polanco, M., Rodrigues, M., Panizo, L., Serrat, J., Rouge, P., 2008. Continuous thermal hydrolysis and energy integration in sludge anaerobic digestion plants. Water Sci. Technol., 57(8), 1221-1226.

Garrido, J. M., Fdz-Polanco, M., Fdz-Polanco, F., 2013. Working with energy and mass balances: a conceptual framework to understand the limits of municipal wastewater treatment. Water Sci. Technol., 67(10), 2294-2301.

Gujer, W., 2010. Nitrification and me–A subjective review. Water Res., 44(1), 1-19.

Guillén, J. A. S., 2017. Autotrophic Nitrogen Removal from Low Concentrated Effluents: Study of system configurations and operational features for post-treatment of anaerobic effluents. CRC Press.

Jianlong, W., Jing, K., 2005. The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor. Process Biochemistry, 40(5), 1973-1978.

Li, Z., Ma, Y., Hira, D., Fujii, T., Furukawa, K., 2011. Factors affecting the treatment of reject water by the anammox process. Bioresour. Technol., 102(10), 5702-5708.

Li, Y., Noike, T., 1992. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. Water Sci. Technol., 26(3-4), 857-866.

Metcalf & Eddy (2016). Tratamento de Efluentes e Recuperação de Resíduos. Tradução: Ivanildo Hespanhol, José Carlos Mierzwa – 5. Ed. – Porto Alegre: AMGH. xxvii, 1980p.

Sapkaite, I., Barrado, E., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S. I., 2017. Optimization of a thermal hydrolysis process for sludge pre-treatment. J. Environ. Manage., 192, 25-30.

Spinosa, L., Ayol, A., Baudez, J. C., Canziani, R., Jenicek, P., Leonard, A., Rulkens, W., Xu, G., Van Dijk, L., 2011. Sustainable and innovative solutions for sewage sludge management. Water, 3(2), 702-717.

Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J. G., Jetten, M. S., 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. Water Research, 31(8), 1955-1962.

Stuckey, D. C., McCarty, P. L., 1984. The effect of thermal pretreatment on the anaerobic biodegradability and toxicity of waste activated sludge. Water Res., 18(11), 1343-1353.

Valo, A., Carrere, H., Delgenes, J. P., 2004. Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. J. Chemical Technol. Biotechnol., 79(11), 1197-1203.

Van Loosdrecht, M. C. M. Innovative nitrogen removal. Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, IWA Publishing, London, 139-155, 2008.

Wandera, S. M., Westerholm, M., Qiao, W., Yin, D., Jiang, M., Dong, R., 2019. The correlation of methanogenic communities' dynamics and process performance of anaerobic digestion of thermal hydrolyzed sludge at short hydraulic retention times. Bioresour. Technol., 272, 180-187.

Zhen, G., Lu, X., Kato, H., Zhao, Y., Li, Y. Y., 2017. Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. J. Renew. Sustain. Energy Reviews, 69, 559-577.

PRODUÇÃO DE METANO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DO BAGAÇO DE MALTE SUBMETIDO A DIFERENTES SEVERIDADES DE PRÉ-TRATAMENTO EM SISTEMA HIDROTÉRMICO

Marina Mauro Gomes [1]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [2]

[1] Mestranda no Programa de Pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Resumo. *O bagaço de malte (BM) é subproduto da indústria cervejeira e pode ser empregado na digestão anaeróbia com recuperação de gás metano, o qual tem potencial para abastecer etapas da fabricação da cerveja. O rompimento prévio da estrutura lignocelulósica do BM pode facilitar o acesso enzimático e a degradação anaeróbia. Neste estudo, utilizou-se o Delineamento Composto Central (DCC) e metodologia de superfície de resposta para avaliação dos efeitos da temperatura e do tempo no pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico e resposta na forma de produção máxima de metano. O BM pré-tratado foi utilizado como substrato em reatores anaeróbios em batelada, os quais foram inoculados com lodo de reator UASB de avícola e mantidos a 37°C. As condições ótimas do pré-tratamento foram de 210°C por 10 minutos e 12 bar (severidade de 4,2), cujo valor máximo de produção de metano predito foi de 415,15 ± 7,19 mL.gSTV^{-1}, a redução de carboidratos foi de 90,45% a partir de 142 ± 1,41mg.L^{-1} e a remoção de DQO foi de 81,12% a partir de 3.900 ± 7,77 mg.L^{-1}, com concentração final de ácidos orgânicos de 289,94 mg.L^{-1}.*

Introdução

Na indústria cervejeira são produzidas grandes quantidades de subprodutos, dentre eles os mais significativos são o bagaço de malte (BM), resultante da etapa de filtração e a levedura excedente da fermentação. Em 2017, o Brasil correspondia ao terceiro maior produtor mundial de cerveja do mundo, com volume de 14 bilhões de litros, atrás da China e Estados Unidos, os quais produziram 39,8 e 21,7 bilhões de litros no mesmo ano, respectivamente (Kirin Holdings, 2018).

Os resíduos sólidos da indústria cervejeira são biodegradáveis devido a sua composição rica em carboidratos e, diante da sua vasta disponibilidade, uma opção ambiental e economicamente interessante é a digestão anaeróbia. Considerando a crise energética em virtude do esgotamento progressivo dos combustíveis fósseis, a aplicação desse processo biológico torna-se promissora no que se refere à recuperação de energia e à reutilização de resíduos.

No entanto, a biodegradação do bagaço de malte é laboriosa para microrganismos anaeróbios em razão, sobretudo, da estrutura complexa formada pela lignina e hemicelulose (PANJIČKO et al.,2015). Pré-tratamentos de diversos tipos tem sido avaliados visando ao rompimento da estrutura lignocelulósica, os quais podem ser químicos, físicos e físico-químicos. Desse modo, a aplicação de pré-tratamentos ao BM pode favorecer o acesso microbiano ao substrato, obtendo-se melhor rendimento metanogênico.

Este estudo avaliou o potencial de produção de metano a partir do bagaço de malte em sistema hidrotérmico submetido a severidades distintas, a fim de indicar, por meio do Delineamento Composto Central (DCC) e metodologia de superfície de resposta, qual delas foi a mais adequada. Os ensaios foram operados em bateladas de reatores anaeróbios utilizando-se como fonte de inóculo lodo de reator UASB, o qual trata águas residuárias de avícola.

Material e Métodos

O bagaço de malte (BM) foi cedido pela cervejaria Kirchen, São Carlos, São Paulo. O resíduo foi lavado em água corrente e seco ao sol. Posteriormente, o BM foi submetido à maceração em moinho de facas (tipo Willey SL-31, marca Solab) e armazenado em ambiente refrigerado a 4º C. O pré-tratamento em sistema hidrotérmico ocorreu por alimentação de 5g de BM e 210 mL de água destilada Ao término da reação, a fração sólida foi separada da fração líquida por peneiramento (2 mm).

Como fonte de inóculo, foi empregado lodo granular de reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) da Avícola Pereira, localizada no município de Tietê-SP. O inóculo foi mantido em temperatura de 4 ºC até a inoculação dos reatores anaeróbios, antes da qual houve maceração do mesmo em liquidificador e aclimatização em temperatura de 37 ºC por 7 dias.

Segundo o Delineamento Composto Central (DCC), sete ensaios foram conduzidos com três repetições no ponto central (B5, B6 e B7). O BM empregado nesses ensaios foi pré-tratado nas seguintes condições: (B1) 150°C por 10 minutos a 5 bar; (B2) 210°C por 20 minutos a 5 bar; (B3) 150°C por 20 minutos a 9,6 bar ; (B4) 210°C por 10 minutos e 12 bar; (B5), (B6) e (B7) 180°C por 15 minutos a 12 bar.

O fator de severidade (Ro) de cada condição foi calculado pela Equação 1 (RUIZ et al., 2013):

$$logRo = log\left[texp\left(\frac{T-100}{14,75}\right)\right] \quad (1)$$

Em que:
T= temperatura (ºC);
t= tempo de pré-tratamento.

Foi utilizado o meio basal segundo Zinder et al. (1984) e solução de vitaminas segundo Dubouguier et al. (1987) a fim de fornecer nutrientes à comunidade microbiana. Desse modo, o meio reacional foi composto por meio Zinder, solução de vitaminas (10% v/v), bicarbonato de sódio (10% v/v) e extrato de levedura (1 $g.L^{-1}$).

Os reatores anaeróbios foram conduzidos em batelada de frascos Duran de 250 mL cujo *headspace* foi de 125 mL. Desse modo, foi adicionado o meio reacional com pH ajustado para 7,0 (HCl), BM (1 g $STV.L^{-1}$) e inóculo (2 g STV $.L^{-1}$) e N_2 gasoso (100%) por 10 minutos. Os reatores foram vedados com tampa de butila e rosca plástica e mantidos a 37ºC. Cada ensaio foi conduzido em triplicata de reatores cujas operações se estenderam até que houvesse queda da produção de metano após estabilização. Além disso, triplicata de reatores controle contendo apenas meio reacional foi operada.

Foi realizada cromatografia gasosa para monitoramento da produção de metano (GC 2010, Shimadzu®) provido de coluna capilar Carboxen™ 1010 PLOT (30m x 0,53 mm, Supelco) e argônio como gás de arraste. Os ácidos orgânicos foram quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, Shimadzu®) com detector ultravioleta (UV/DAD, 210 nm) e arranjos de diodos em coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad). O eluente foi uma solução de H_2SO_4 0,005M, a um fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$, temperatura do forno de 43ºC e injeção de 100 µL (Lazaro et al., 2008).

Amostras líquidas foram coletadas para análises de demanda química de oxigênio (DQO), carboidratos totais e pH (APHA,1995; Dubois et al., 1956). A amostragem foi realizada ao início, durante e ao término da operação. A curva de produção de metano foi ajustada pelo modelo de crescimento microbiano de Gompertz modificada (Zwietering *et al*., 1990) utilizando o software Origin 9.0 (Equação 2).

$$H = P\ exp\left\{-exp\left[\frac{Rm.e}{P}\right](\lambda - t) + 1\right\} \quad (2)$$

P = produção máxima de CH_4 (mL.g STV^{-1});
Rm = taxa de produção de metano (mL.g $STV^{-1}.h^{-1}$),
t = tempo de incubação dos reatores (horas),
e = número de Euler (2,71828),
λ = tempo de início da produção de CH_4 (horas).

Resultados e Discussão

O Delineamento Composto Central, planejamento experimental sem pontos axiais e com 3 repetições no ponto central, foi realizado com o intuito de apontar quais os efeitos das interações entre temperatura e tempo sob a resposta da variável produção de metano (*P*). Considerou-se significativos os fatores com nível de confiança superior a 90%, enquanto os efeitos significativos foram considerados em relação à produção máxima de metano (Tabela 1).

A análise da variância (ANOVA) foi realizada com a finalidade de testar a significância das variáveis independentes perante a produção de metano. O valor de p do coeficiente de regressão foi significativo ao nível de 0,10% e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 97,9%, com bom ajuste entre os valores experimentais e os preditos. Os dados experimentais ajustaram-se ao modelo linear por meio do método de superfície de resposta, o qual prediz a produção de metano (Equação 3):

$$Y_1 = 310{,}94 + 64{,}90\ x_1 + 15{,}90\ x_2 + 23{,}41\ x_1\ x_2 \quad (3)$$

Em que :
Y_1= produção predita de metano (mL. g STV^{-1});
X_1= temperatura do sistema hidrotérmico (ºC);
X_2 = tempo de pré-tratamento (minutos);

Tabela 1: Matriz do DCC para as variáveis (x1) temperatura e (x2) tempo de pré-tratamento e respostas obtidas e preditas.

	Valores codificados		Valores reais		Valor experimental	Valor predito
Ensaios	X_1	X_2	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Produção de metano (mL.g STV^{-1})	Produção de metano (mL.g STV^{-1})
B1	-1	-1	150	10	250,04	253,55
B2	1	-1	210	20	333,02	336,53
B3	-1	1	150	20	235,01	238,52
B4	1	1	210	10	411,64	415,15
B5	0	0	180	15	302,33	310,94
B6	0	0	180	15	318,15	310,94
B7	0	0	180	15	326,37	310,94

B1: 150 ºC-10 min; B2: 210 ºC - 20 min; B3:150 ºC- 20 min; B4:210 ºC -10 min; B5: 180 ºC- 15 min (I); B6: 180 ºC- 15 min (II) e B7:180 ºC- 15 min (III).

Comparando-se os valores das variáveis $t_{calculada}$ e $t_{tabelada}$ (2,35) conclui-se que foram significativos os efeitos da temperatura, da interação entre temperatura e tempo e do tempo e em relação à produção de metano, exibidos em ordem decrescentes de magnitude (Figura 1). A partir de então, observou-se que a variável resposta foi mais sensível à variação da

temperatura do que do tempo de pré-tratamento. A superfície de resposta tridimensional ilustra o efeito da temperatura e do tempo no pré-tratamento em sistema hidrotérmico em relação à produção de metano (Figura 2).

Figura 1: Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis (x_1) temperatura e (x_2) tempo.

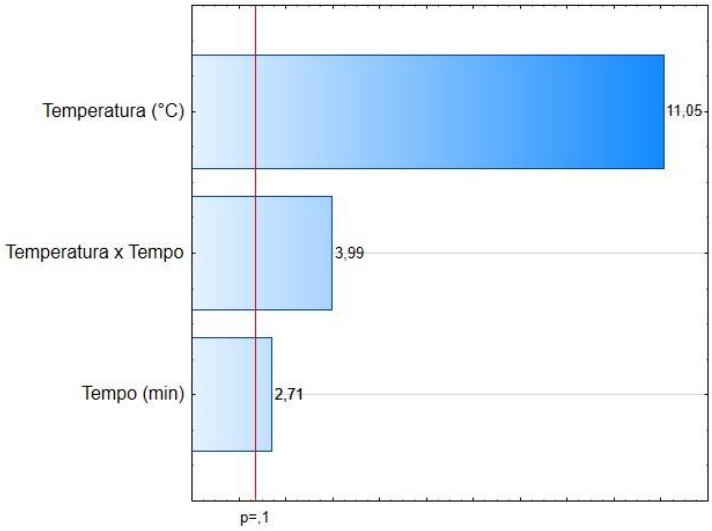
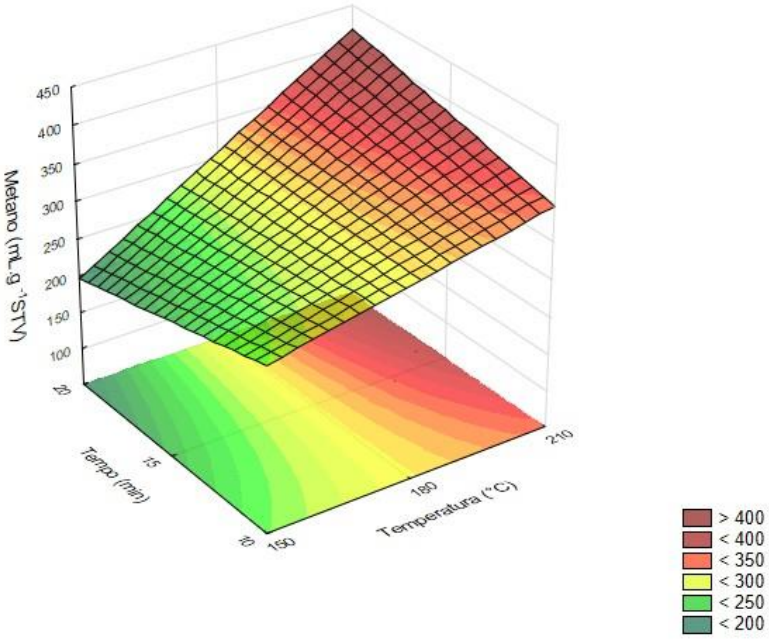


Figura 2: Superfície de resposta para os efeitos da temperatura e tempo do pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico.



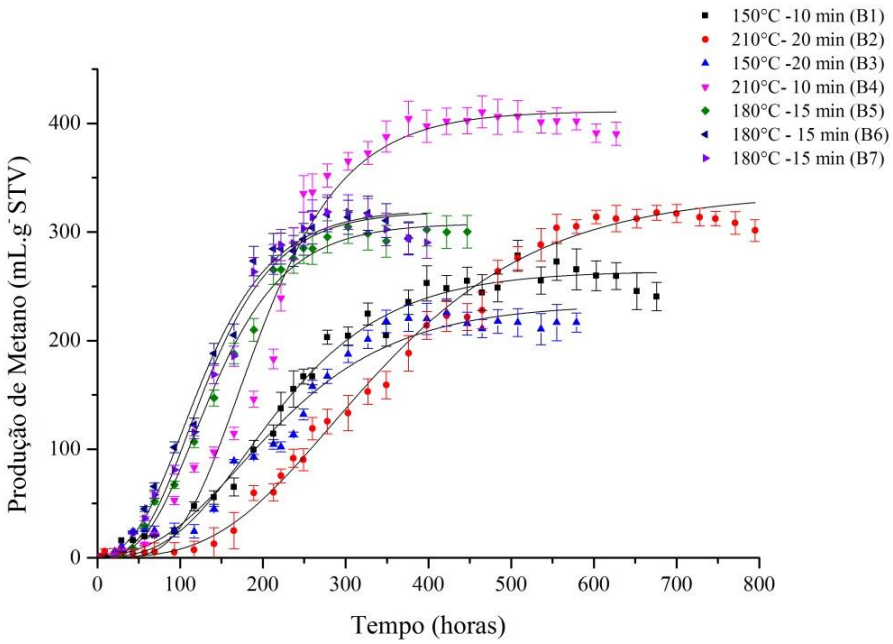
As severidades de cada condição de pré-tratamento, bem como as pressões atingidas e a produção de metano (*P*) obtida estão correlacionados na Tabela 2.

Tabela 2: Características dos pré-tratamentos em reator hidrotérmico e a produção máxima de metano.

Condição (Temperatura-tempo)	Severidade do pré-tratamento	Pressão (bar)	Produção de metano (mL. g STV^{-1})
150 ºC – 10 minutos	2,5	5,0	250,04 ± 9,93
150 ºC – 20 minutos	2,8	5,0	235,01 ± 10,14
180 ºC – 15 minutos	3,5	9,6	302,33 ± 3,85; 318,15 ± 6,12 e 326,37 ± 7,01
210 ºC – 10 minutos	4,2	12,0	411,64 ± 7,19
210 ºC – 20 minutos	4,5	12,0	333,02 ± 11,28

Obteve-se ajuste dos perfis temporais para a produção de metano ao modelo de Gompertz com $R^2 \geq 0,97$ para todos os sete ensaios (Figura 3 e Tabela 3).

Figura 3: Variação temporal de metano para os ensaios de DCC.



O maior potencial de metano (411,64 ± 7,19 mL. g STV^{-1}) foi verificado para (B4), com severidade de 4,2, enquanto o menor potencial (235,01± 10,14 mL.g $^{-1}$STV) foi obtido para (B3), com severidade de 2,8. Observou-se para os demais ensaios produção de metano (*P*) de 250,04 ± 9,93 mL. g STV^{-1} (B1); 235,01± 10,14 mL. g STV^{-1} (B3); 302,33± 3,85 mL. g STV^{-1} (B5); 318,15± 6, 12 g STV^{-1} (B6) e 326,37 ± 7,01 g STV^{-1} (B7).

Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada do DCC com diferentes condições de pré-tratamento do BM.

Ensaio	P (g STV^{-1})	Rm (mL.g^{-}STV^{-1}.h^{-1})	λ (h)	R^2
B1	250,05 ± 9,93	0,890 ± 0,06	77,11 ± 7,59	0,98
B2	333,02 ± 11,28	0,853 ± 0,03	144,27 ± 13,58	0,97
B3	235,01 ± 10,14	0,833 ± 0,14	70,98 ± 14, 31	0,98
B4	411,64 ± 7,19	2,121 ± 0,16	80,20 ± 8,35	0,98
B5	302,33 ± 3,85	1,866 ± 0,08	56,62 ± 3,77	0,99
B6	318,15 ± 6,12	1,978 ± 0,11	43,73 ± 4,44	0,99
B7	326,37 ± 7,01	2,022 ± 0,146	52,56 ± 5,74	0,98

Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 ºC-10 min; B2: 210 ºC - 20 min; B3:150 ºC- 20 min; B4:210 ºC -10 min; B5: 180 ºC- 15 min (I); B6: 180 ºC- 15 min (II) e B7:180 ºC- 15 min (III).

Em relação aos valores de *P* observados para (B1) e (B3), com severidades de 2,5 e 2,8, respectivamente, não se observou diferença estatística segundo o teste ANOVA com p > 0,05 e verificação por teste Tukey. Por outro lado, conforme foi aumentada a severidade do pré-tratamento de 2,8 para 3,5, houve acréscimo de *P* em até 38,7%. Quando aplicada severidade de 4,2, verificou-se aumento de 75% de *P* em relação a severidade de 2,8 (B3). Por outro lado, as condições de (B2), com severidade de 4,5, não favoreceram acréscimo de *P*, para o qual foi verificado 333,02 ± 11,28 mL. g STV^{-1},valor próximo àqueles obtidos para

severidade de 3,5. Portanto, o intervalo ótimo do pré-tratamento hidrotérmico para o BM neste estudo foi de 3,5 - 4,2. Após teste de diferentes severidades para pré-tratamento da palha de trigo com recuperação de metano em reatores anaeróbios, Ferreira et al. (2014) relataram severidade ótima de 3,6. No entanto, essa foi a máxima severidade empregada pelos autores. Por outro lado, Soares et al. (2018) concluíram que a melhor severidade para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e produção de hidrogênio foi de 4,87.

O período para início da produção de metano (λ) para os ensaios com menores severidades (B1) e (B3), foram 77,11 ± 7,59 e 70,98 ± 14, 31 horas, respectivamente, valores superiores aos observados para (B5), (B6) e (B7), com 56,62 ± 3,77; 43,73 ± 4,44 e 52,56 ± 5,74 horas, respectivamente. Provavelmente, as menores severidades do pré-tratamento implicou alterações mais brandas da estrutura do substrato lignocelulósico se comparado aos ensaios com severidade de 3,5, com menor solubilização de celulose e hemicelulose. Logo, a complexidade da estrutura do material manteve-se e acarretou maior tempo para acesso da microbiota aos açúcares fermentáveis. Nesse sentido, Rm foram inferiores para (B1) e (B3), com 0,890 ± 0,06 e 0,833 ± 0,14 mL.g $STV^{-1}.h^{-1}$, respectivamente.

Somado a isso, os desempenhos de *P* para (B1) e (B3) foram relativamente reduzidos, de 264,05 ± 9,93 mL g STV^{-1} para B1 e 233,01 ± 10,14 mL. g STV^{-1} para B3. Em torno de 150°C, provavelmente ocorreu solubilização de reduzidas frações de hemicelulose. A temperatura é um parâmetro de grande relevância para a dissolução da hemicelulose já que baixas temperaturas não promovem impactos em sua solubilização (Hendricks e Zeeman, 2009; Ahmad et al, 2018).

Em (B4) foi verificado λ de 80,20 ± 8,35 horas, semelhante a (B1) e (B3). Apesar da provável maior liberação de açúcares decorrente da severidade mais elevada, em B4 é possível que maiores concentrações de compostos inibidores tenham sido gerados, os quais impactaram na adaptação da biomassa. Fenóis, furfural, 5-HMF são potenciais inibidores liberados pela degradação de pentoses, glicose ou hexose (Hernandez e Edyvean, 2008; Rasmussem et.al., 2014) e podem ter afetado λ em B4. Apesar disso, provavelmente o consórcio microbiano se adaptou às condições e nos reatores (B4) foram verificadas Rm de 2,121 ± 0,16 mL.g $STV^{-1}.h^{-1}$, maior rendimento entre os ensaios.

Na condição (B2), cuja severidade de pré-tratamento foi de 4,5, verificou-se prolongamento de λ (144,27 ± 13,58 horas), menor Rm (0,853 ± 0,03 mL g $STV^{-1}.h^{-1}$) aliado à redução de *P*, evidenciando que houve prejuízo à digestão anaeróbia. De modo semelhante, Wang et al. (2018) observaram que o aumento da severidade do pré-tratamento aplicado à palha de arroz de 3,5 para 4,6 acarretou redução de 32,6% da produção de metano com aumento de λ de 14,8 para 19,8 dias, o que foi atribuído ao elevado teor de inibidores gerados pela alta severidade.

Neste estudo, para o BM observou-se que temperatura de 150°C implicou nos menores teores de carboidratos solúveis (B1) e (B3), de 56 ± 1,41 e 61 ± 1,41 $mg.L^{-1}$, respectivamente (Tabela 4). Quanto aos demais ensaios, no início da operação dos reatores verificou-se concentrações de carboidratos totais de 145 ± 1,41 $mg.L^{-1}$ (B2); 142 ± 1,41 $mg.L^{-1}$ (B4); 142,5 ± 2,12 $mg.L^{-1}$ (B5); 127 ± 2,12 $mg.L^{-1}$ (B6) e 120 ± 1,41 $mg.L^{-1}$ (B7). A aplicação de severidades elevadas em B2 e B4 acarretou maior solubilização de carboidratos já no momento inicial da operação. Houve tendência de consumo de carboidratos totais em todos os ensaios em 48 horas, nos quais foram observados valores de 18,5 ± 0,70 $mg.L^{-1}$ (B1); 38, 0 ± 0,70 $mg.L^{-1}$ (B2) ; 13,5 ± 1,41 $mg.L^{-1}$ (B3); 23,0 ± 2,12 $mg.L^{-1}$ (B4); 20,5 ± 0,70 $mg.L^{-1}$ (B5); 18,5 ± 2,87 $mg.L^{-1}$ (B6) e 23,7 ± 1,41 $mg.L^{-1}$ (B7). As concentrações finais para (B1), (B2), (B3), (B4), (B5), (B6) e (B7) foram de 18,0 ± 0,70; 48,9 ± 1,41; 15,0 ± 1,41; 14,0 ± 1,41; 30,0 ± 0,70;20,0 ± 1,41 e 24,0 ± 0,70 $mg.L^{-1}$, com remoção de carboidratos de 67,75; 66,90 ; 75,40; 90,45; 73,09; 84,25 e 80,0%. Desse modo, confirmou-se que grande parte dos carboidratos solubilizados foram convertidos a ácidos orgânicos, álcoois e cetonas, os quais são substratos para a acetogênese e influenciam diretamente no potencial metanogênico.

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos dos ensaios em batelada para o DCC em diferentes condições de pré-tratamento do BM.

	DQO		Carboidratos	
Ensaios	Máxima concentração ($mg.L^{-1}$)	Remoção (%)	Inicial ($mg.L^{-1}$)	Redução (%)
B1	2.077 ± 7,77	82,65	56 ± 1,41	67,85
B2	4.024 ± 3,53	75,74	145 ± 1,41	66,90
B3	2.076 ± 4,24	78,32	61 ±1,41	75,4
B4	3.900 ± 7,77	81,12	142 ± 1,41	90,45
B5	3.402 ± 7,80	81,55	111,5± 2,12	73,09
B6	2.580 ± 2,82	82,2	127 ± 2,12	84,25
B7	3.050 ± 2,82	83,6	120 ± 1,41	80,0

Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 ºC-10 min; B2: 210 ºC - 20 min; B3:150 ºC - 20 min; B4:210 ºC -10 min; B5: 180 ºC- 15 min; B6: 180 ºC- 15 min e B7:180 ºC- 15 min.

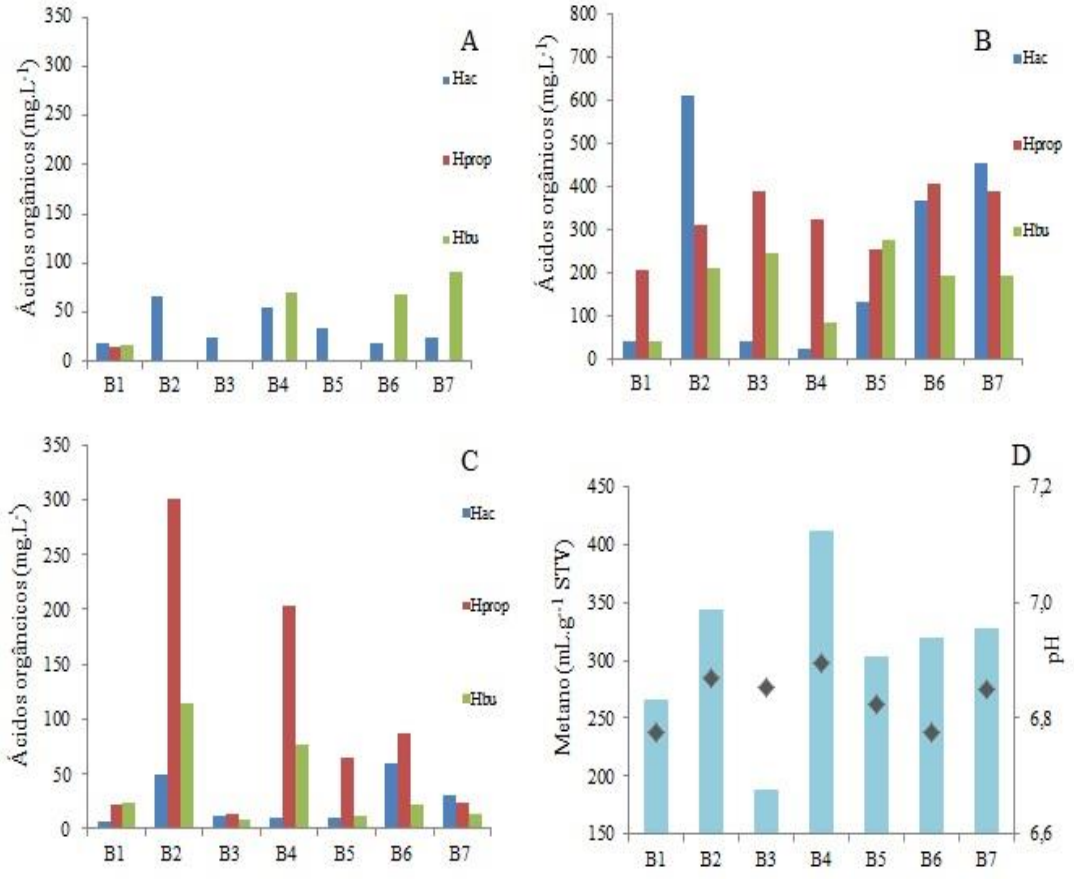
As máximas concentrações observadas em seus respectivos tempos de operação foram de (B1) 2.087 ± 17,67 $mg.L^{-1}$ em 144 horas; (B2) 4.024 ± 14,14 $mg.L^{-1}$ em 96 horas; (B3) 2.076 ± 10,6 $mg.L^{-1}$ em 144 horas; (B4) 3.900 ± 21,21 $mg.L^{-1}$ em 48 horas; (B5) 3.402 ± 21,21 $mg.L^{-1}$ em 48 horas; (B6) 2.580 ± 17,67 $mg.L^{-1}$ em 48 horas e (B7) 3.050 ± 10,6 $mg.L^{-1}$ em 48 horas. Ressalta-se que as máximas concentrações de matéria orgânica foram verificadas para os ensaios com maiores severidades (B2 e B4). Wang et al. (2018) também correlacionaram o acréscimo da carga orgânica em períodos iniciais da operação de ensaios em batelada a medida houve aumento da severidade do pré-tratamento da palha de trigo o que se deve a subprodutos da digestão anaeróbia.

Em virtude das máximas concentrações estarem relacionadas ao início da fase exponencial de produção de metano para todos os ensaios, é possível inferir que a carga orgânica foi o aporte para a obtenção de metano sem a ocorrência de excesso que ocasionasse a falha dos reatores. As concentrações de matéria orgânica no encerramento da operação foram de: 362,0 ± 3,53 $mg.L^{-1}$(B1), 976 ± 7,07 $mg.L^{-1}$ (B2), 450,0 ± 14,14 $mg.L^{-1}$(B3), 734 ± 10,6 $mg.L^{-1}$ (B4), 627,5 ± 7,07 $mg.L^{-1}$ (B5), 459 ± 4,43 $mg.L^{-1}$ (B6), 499 ± 7,77 $mg.L^{-1}$ (B7). Em relação aos valores iniciais, verificou-se menor remoção de matéria orgânica, exceto em (B2), o qual foi constatado acréscimo. Portanto, foi calculada remoção a partir dos valores máximos verificados a fim de certificar a capacidade de assimilação do consórcio microbiano. Assim, obteve-se 82,65 % (B1); 75,74 % (B2); 78,32 % (B3); 81,12 % (B4); 81,55 % (B5); 82,2 % (B6) e 83,6 % (B7).

Apesar das remoções de 82,65% e 78,32 %, respectivamente, os ensaios (B1) e (B3), com BM pré-tratado a 150°C, foram menos eficientes em solubilizar matéria orgânica proveniente da degradação do BM e, portanto, por meio destes foram obtidos menor *P*, de 250,05 ± 9,93 e 235,01 ± 10,14 mL. g STV^{-1}, respectivamente. Embora, em (B2) e (B4) tenha sido constatada remoção inferior de matéria orgânica, nessas condições foram verificadas maior solubilização para ambos, o que sugere melhor degradação da estrutura lignocelulósica do BM. A remoção menos eficaz de matéria orgânica em (B2), se comparada a (B4), está relacionada, entre outros fatores, a superiores concentrações de ácidos orgânicos detectadas na amostra final. Apesar disso, por meio atividade da comunidade de arqueias em (B2) resultou em produção de 333,02 ± 11,28 mL. g STV^{-1}.

Os ácidos acético, butírico e propiônico foram observados em concentrações mais expressivas no decorrer dos ensaios, ao passo que as concentrações dos ácidos valérico, isobutírico e isovalérico foram observadas abaixo do limite de detecção. As concentrações nas amostras iniciais eram de (B1) 18,72; 14,28 e 16,36 mg.L^{-1} de ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente; (B2) 66,43 mg.L^{-1}de ácido acético; (B3) 23,45 de ácido acético (B4) 53,88 e 69,78 mg.L^{-1}de ácido acético e butírico, respectivamente; (B5) 34,56 mg.L^{-1} de ácido acético; (B6) 18,71 e 67,62 mg.L^{-1} de ácido acético e butírico, respectivamente e (B7) 23,45 e 90,56 mg.L^{-1} de ácido acético e butírico, respectivamente (Figura 4). Ácido acético foi observado em todas as amostras iniciais, sendo derivado de grupos acetil da hemicelulose e liberado, possivelmente, em virtude da sua decomposição no pré-tratamento hidrotérmico (Panagiotopoulos et al., 2011).

Figura 4: Variação das concentrações de ácido acético, propiônico e butírico nos ensaios do DCC.



Hac= ácido acético; Hprop= ácido propiônico; Hbu= ácido butírico.

Em amostras coletadas na fase exponencial de produção de metano verificou-se concentrações de ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente, de (B1) 41,47; 209,08 e 43,21 mg.L^{-1}; (B2) 613,58; 312,76 e 212,20 mg.L^{-1}; (B3) 41,75; 389,76 e 247,04 mg.L^{-1}; (B4) 22,80; 326,46 e 86,67, mg.L^{-1}, respectivamente; (B5) 134,89 ; 257,04 e 277,91 mg.L^{-1}; (B6) 367,00; 406,60 e 195,87 mg.L^{-1}; (B7) 456,35; 389,35 e 195,67 mg.L^{-1}.

Ao término da operação foi observado ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente de (B1) 6,53; 22,3 e 23,3 mg.L^{-1}; (B2) 49,0; 300,85 e 114,63 mg.L^{-1}; (B3) 12,34; 13,32 e 8,34 mg.L^{-1}; (B4) 10,86; 202,40 e 76,68, mg.L^{-1}; (B5) 10,48; 64,18 e 11,82 mg.L^{-1}; (B6) 58,97; 87,45 e 22,34 mg.L^{-1}; (B7) 30,76; 23,45 e 13,45 mg.L^{-1} .Em relação ao pH, indicador direto da ocorrência excessiva de ácidos orgânicos no meio reacional, observou-se ligeira diminuição ao final de todos os ensaios, variando de (6,8-6,9).

Apesar das elevadas concentrações na etapa exponencial, sobretudo para (B2), (B6) e (B7), com 613,58; 367,00 e 456,35 mg.L^{-1}, respectivamente, verificou-se consumo de ácido acético em todos os reatores. A ocorrência de elevadas concentrações de ácido acético na fase exponencial, provavelmente ocorreu devido à taxa de crescimento relativamente reduzida das arqueias metanogênicas acetoclásticas diante das taxas de crescimento das bactérias formadoras de ácidos orgânicos. Portanto, o ambiente tornou-se susceptível ao acúmulo de ácidos (Mosey, 1983). Contudo, a sobrecarga orgânica de ácido acético foi absorvida pelo sistema com conversão a ácido butírico, cuja liberação foi comprovada na fase exponencial dos ensaios. A eficiente utilização de ácido acético certificada para os reatores dessa etapa é indício do predomínio da comunidade de arqueias metanogênicas acetoclásticas em detrimento de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (Ahmad et al., 2018).

Observou-se na fase exponencial para todos os ensaios elevadas concentrações de ácido propiônico (209,08 - 406,60 mg.L^{-1}) e provável consumo pelos microrganismos nas amostras finais (22,3 - 300,85 mg.L^{-1}). Observou-se concentração mais elevadas de ácido propiônico em (B4) e (B2), no entanto, segundo a literatura, arqueias metanogênicas são inibidas a partir de 900 mg.L^{-1} (Wang et al.,2009).

Conclusões

Tanto a temperatura quanto o tempo de pré-tratamento do BM em sistema hidrotérmico foram considerados significativos para a produção de metano. A maior magnitude de efeito na produção máxima de metano foi atribuída à temperatura. A condição do pré-tratamento mais adequada para produção de metano foi a 210 ^{o}C a 12 bar por 10 minutos (severidade de 4,2) com valor predito pelo modelo de 415,15 ± 7,19 mL. g STV^{-1} e valor observado de 411,64 ± 7,19 mL. g STV^{-1}. Nessa condição houve redução de carboidratos (90,45%) a partir de 142 ± 1,41 mg.L^{-1} e remoção de DQO (81,12%) a partir de 3.900 ± 7,77 mg.L^{-1}. O aumento da severidade para 4,5 (210 °C a 12 bar por 20 minutos) implicou em maior concentração de ácidos orgânicos no final dos ensaios (464,48 mg.L^{-1}) com produção máxima de metano de 333,02 ± 11,28 mL. g STV^{-1}. Logo, o aumento da severidade do pré-tratamento impactou negativamente a comunidade de arqueias metanogênicas.

Referências

APHA, AWWA, WPCF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation.

Ahmad, F; Sakamoto, I.K.; Adorno, M.A.T.; Motteran, F.; Silva, E.L.; Varesche; M.B.A., 2018. Methane production from hydrogen peroxide assisted hydrothermal pretreatment of solid fraction sugarcane bagasse. Waste and Biomass Valorization,v.1,1-20.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v.28, 350–356.

Dubouguier,H.C., Buisson, M.N., Tissier ,J.P.,Prensier,G., Albagnac, G.,1987.Structural characteriscs and metabolic activities of granular anaerobic sludge on a mixed difined substrate, in: Granular anaerobic slugde, Microbiology and technology, Proceedings of the GASTMAT- worshop.Pudoc, Netherlands,78-86.

Ferreira, L.C.; Nilsen, P.J.; Polanco-FDZ, F.; Perez- Elvira, S.I., 2014. Biomethane potencial of wheat straw: Influence of particle size, water impregnation and thermal hydrolis. Chemical Engineering Journal, v.242, 254-259.

Hendriks, A. T., Zeeman, G.,2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 100,10-18.

Hernandez, J.E.; Edyvean, R.G.J. Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge, 2008. Journal of Hazardous Materials, v. 160, 20-28.

Mosey, F.E., 1983. Mathematical modeling of the anaerobic preocess: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. Water Science Techonology, v.15, 209-232.

Panagiotopoulos, I.A., Bakker, R.R., Vrije, T.D. Koukios, E.G., 2011. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. Bioresource Techonology, v. 102, 11204-11211.

Panjicko, M.; Zupancic, G.D.; Zelic,B. Anaerobic biodegradation of raw and pre-treated brewery spent grain utilizing soild state anaerobic digestion. Acta Chimica Slovenica,v 62, n.4, p.818-827,2015.

Rasmussen, H.; Sørensen, H.R.; Meyer, A.S., 2014. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. Carbohydrate Research, 2014.

Ruiz, H.A., Rodriguez-Jasso, R.M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. Renewable Sustainable Energy, v. 21, p. 35–51, 2013.

Soares, L.A.; Kawanish, J.B.; Motteran, F.; Sakamoto, I. K.; Monteiro, P.A.S.; Seleghim, P.; Varesche, M.B.A., 2018. Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Celluloytic and Fermentative Communities. Waste and Biomass Valorization, v.1, 1-14.

Wang, D. Shen, F.; Yang, G. Zhang, Y.; Deng, S.; Zhang, J.; Zeng, Y.; Luo, T.; Mei, Z., 2018. Can hydrothermal pretreatment improve anaerobic digestion for biogas from lignocellulosic biomas? Bioresource Techonology, v. 249, 117-124.

Zinder, S.H., Cardwell,S.C., Anguish,T.,Lee,M., Koch,M.,1984. Methanogenesis in a Thermophilic (58ºC) Anaerobic Digestor: Methanothrix sp. as an Important Aceticlastic Methanogen,1984. Applied and Enviromental Microbiology.47, 796-807.

Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Applied and environmental microbiology. 56, 1875–1881.

AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES DICLOFENACO, IBUPROFENO, PROPRANOLOL E TRICLOSAN EM ESGOTO SANITÁRIO NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS COSSUBSTRATOS ETANOL, METANOL E FUMARATO

Caroline F. Granatto[1]; Guilherme Grosseli[2]; Pedro S. Fadini[3]; Maria Bernadete A. Varesche[4]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Químico do Departamento de Química da DQ/UFSCar;
[3] Professor do Departamento de Química da DQ/UFSCar;
[4] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Devido ao elevado consumo de fármacos, como diclofenaco, ibuprofeno e propranolol, e de produtos de higiene doméstico e industrial, como o bactericida triclosan, estes compostos acabam dispersos em diversos compartimentos ambientais, podendo causar graves alterações na biota. Por isto, a importância de estudos sobre a remoção e degradação desses poluentes. Para tanto, neste trabalho será avaliado em reatores em batelada o potencial metanogênico do lodo de inóculo submetido a diferentes concentrações dos compostos emergentes diclofenaco, propranolol, ibuprofeno e triclosan e a influência de cossubstrato (etanol, etanol: metanol e fumarato) na remoção desses compostos. Também serão realizadas análises de PCR/DGGE para bactérias e arquéias dos lodos ao final da operação dos reatores. A partir dos resultados parciais, foi observado que a presença dos compostos emergentes diclofenaco e ibuprofeno interferiu na cinética de transformação da matéria orgânica a metano e induziu o desenvolvimento de novas funções metabólicas dos microrganismos que constituíram o lodo anaeróbio de inóculo, ocasionando em maiores modificações no Domínio Bacteria.*

Introdução

A *Global Water Research Coalition* (GWRC) divulgou uma lista de fármacos relevantes para o ciclo da água, classificando os anti-inflamatórios diclofenaco e ibuprofeno de elevada prioridade para estudos de remoção e biodegradação (GWRC, 2008). O fármaco beta-bloqueador propranolol e o bactericida triclosan também foram observados em concentrações consideráveis (de até $\mu g.L^{-1}$) em águas residuárias (Santos et al., 2013; Oliveira et al., 2015) e em águas superficiais (Campanha et al., 2015). Do ponto de vista ecotoxicológico, os fármacos podem ser prejudiciais a biota, pois, são produzidos intencionalmente para provocar efeitos biológicos a organismos alvos. Consequentemente, organismos aquáticos não alvo podem sofrer efeitos adversos em decorrência da exposição contínua a esses compostos biologicamente ativos (Fent et al., 2006). Bactericidas também podem ser prejudiciais aos animais aquáticos e à comunidade microbiana responsável pelo processo de depuração natural da água.

A maior parte dos contaminantes emergentes está relacionada aos compostos orgânicos, com diferentes propriedades físico-químicas e, consequentemente, diferentes destinos e degradabilidade no ambiente (Luo et al., 2014). Os compostos emergentes diclofenaco, ibuprofeno, propranolol e triclosan são constituídos de anéis aromáticos, o que torna sua degradação anaeróbia um desafio, uma vez que o passo crucial para a degradação de compostos aromáticos é superar a energia de ressonância que estabiliza a estrutura do anel (Fuchs et al., 2011). A maioria dos estudos realizados com compostos emergentes são de monitoramento ambiental. Pesquisas com enfoque na remoção e, principalmente, nos microrganismos envolvidos na degradação dos compostos diclofenaco, ibuprofeno, propranolol e triclosan e na toxicidade desses compostos sobre a comunidade microbiana são escassos. Desta forma, destaca-se a importância de estudos relacionados à biorremediação de

tais compostos emergentes em condições anaeróbias. Além disso, apesar de condições estritamente anaeróbias prevalecerem em vários compartimentos ambientais, estudos de biodegradação de contaminantes orgânicos emergentes têm se concentrado principalmente em condições aeróbias. Uma das prováveis razões é a suposição de que a degradação aeróbia é energéticamente mais favorável do que a degradação sob condições anaeróbias. Todavia, a utilização de cossubstratos, como etanol e metanol pode favorecer o crescimento de arquéias metanogênicas semelhantes à *Methanosaeta* e *Methanosarcina* (Wu et al., 1992; Schmidt and Ahring, 1996; Boone and Castenholz, 2001). Adicionalmente, a utilização de fumarato pode favorecer energéticamente a degradação anaeróbia de compostos que contém anel aromático em sua estrutura molecular, uma vez que em uma das vias para quebra de hidrocarbonetos aromáticos de microrganismos anaeróbios há adição e regeneração de fumarato ($C_4H_4O_4$) (Fuchs et al., 2011).

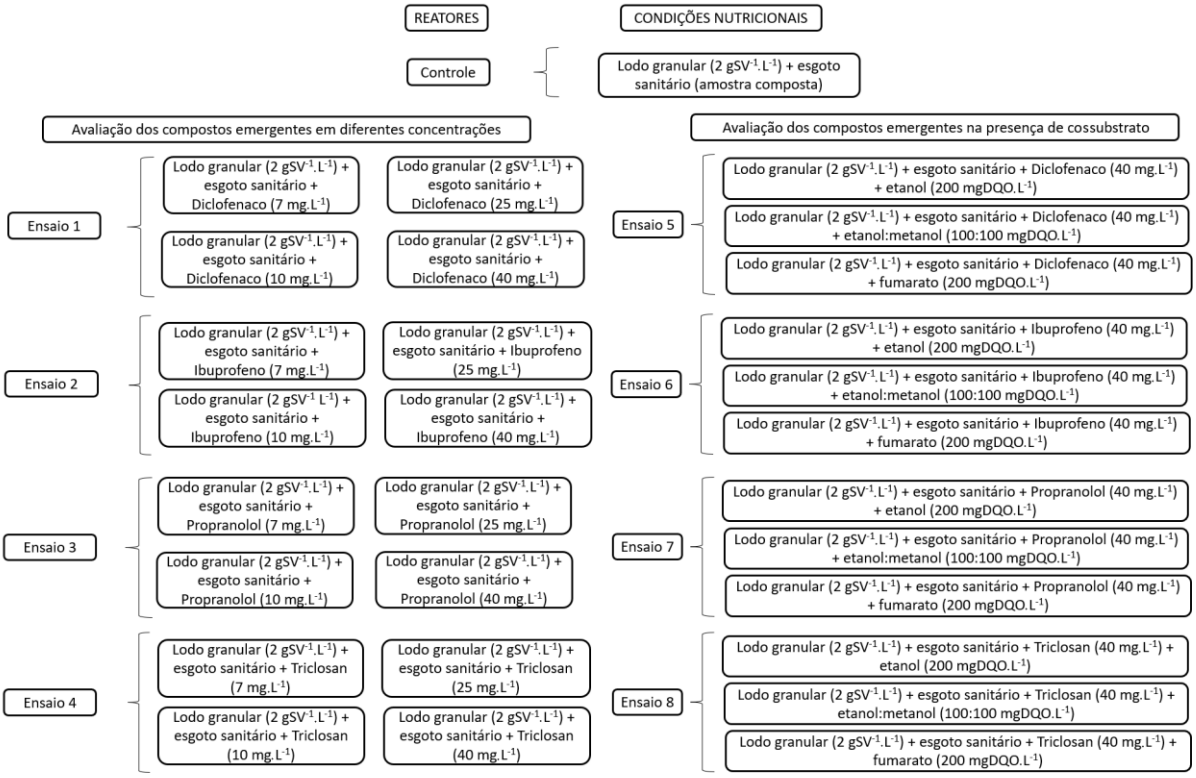
No presente estudo será avaliado o potencial metanogênico do lodo de inóculo na presença de diferentes concentrações dos compostos emergentes diclofenaco, ibuprofeno, propranolol e triclosan. A remoção desses compostos emergentes também será avaliada em esgoto sanitário na presença e ausência dos cossubstratos etanol, etanol: metanol e fumarato, em reatores em batelada. Além disso, serão realizadas análises de PCR/DGGE para bactérias e arquéias do lodo de inóculo e do lodo ao final da operação de cada reator.

Material e Métodos

Fluxograma operacional dos reatores em bateladas

O volume total dos reatores será de 500 ml, com 250 ml de volume reacional. Os reatores serão mantidos sob agitação de 100 rpm e climatizados à 30ºC. O lodo de inóculo será proveniente de um reator UASB que trata o efluente de uma avícola localizada na cidade de Pereiras-SP e será previamente acondicionado sob agitação e mantido em 30ºC até que sejam exauridas as fontes de carbono disponíveis. Os compostos emergentes (diclofenaco, ibuprofeno, propranolol e triclosan) serão provenientes de uma farmácia de manipulação localizada na cidade de Araraquara-SP. Para a quantificação dos compostos emergentes em Cromatografia de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS), os padrões serão de alto grau de pureza (>96%) e procedentes da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Os compostos isotopicamente lábeis serão procedentes da CDN Isotopes (Quebec, Canadá). No total serão realizados 8 ensaios, além do Controle, todos em triplicata (Figura 1). As concentrações dos compostos emergentes utilizadas foram baseados em dados disponíveis da literatura para a solubilidade dos compostos em soluções aquosas e a biodisponibilidade/sorção esperada na biomassa (Fountoulakis et al., 2004; Ying and Kookana, 2007; Langenhoff et al., 2013; Symsaris et al., 2015).

Figura 1: Fluxograma operacional dos reatores em bateladas.



Monitoramento de biogás

O metano será monitorado em cromatógrafo em fase gasosa (GC) 2010 (Shimadzu, Japão) equipado com detector de condutividade térmica e coluna Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm). O gás de arraste empregado será argônio (12 $ml.min^{-1}$), temperatura do injetor de 220ºC, temperatura da coluna de 130 ºC, temperatura do detector de 230 ºC e volume de amostra de 500 µL. O ajuste dos dados será feito pela equação de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990; Peixoto et al., 2012) no software OriginPro 8.0® para definição da produção máxima de metano (P), velocidade máxima de produção de metano (Vm) e tempo de início para produção de biogás (λ). A atividade metanogênica será calculada de acordo com (Sierra-Alvarez and Lettinga, 1991) e plotada junto com a produção de metano sobre as concentrações dos compostos emergentes e ajustadas por meio da equação dose-resposta usando o software OriginPro 8.0®. A IC_{50} será determinada por regressão da curva dose-resposta (% de inibição vs. concentração).

Análises de monitoramento

Serão realizadas análises físico-químicas e cromatográficas, tais como ácidos orgânicos voláteis (AOV) (Penteado et al., 2013), alcalinidade (Ripley et al., 1986), diclofenaco, ibuprofeno, propranolol, triclosan (Campanha et al., 2015), demanda química de oxigênio (DQO), pH (APHA, 2005) e extração dos compostos emergentes nos lodos (de Sousa et al., 2015).

Análise de biologia molecular PCR/DGGE

A análise da reação em cadeia da polimerase-eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) será realizada para amostra do lodo de inóculo e para amostra dos lodos dos reatores operados em bateladas. O sequenciamente de DNA será realizado na região do gene RNA ribossomal 16S (para bacteria e arquéias). O DNA será extraído por meio de kit comercial de extração por membrana filtrante “Power Soil DNA Isolation Kit” da MO BIO®. A purificação do DNA será realizada com o Kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band

Purification (GE Healthcare). A amplificação da polimerase em cadeia (PCR) será realizada com set primer 968FGC – 1401R para Domínio Bacteria (Nubel et al., 1996) e 1100FGC – 1401R para Dominio Archaea (Kudo et al., 1996), utilizando termociclador Eppendorf (AG - 22331 Hamburg). A confecção do gel com gradiente desnaturante (DGGE) será feita de acordo com Muyzer; De Waal; Uitterlinden (1993). O coeficiente de similaridade será calculado a partir do perfil das bandas padrões do DGGE por meio do programa Bionumerics versão 3.5 e o método de agrupamento será o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).

Resultados Parciais e Discussão

Monitoramento dos reatores do Ensaios 1 e Ensaio 2

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos da operação dos reatores do Controle, Ensaio 1 (RD_7, RD_{13}, RD_{26} e RD_{43}) e Ensaio 2 (RI_6, RI_{11}, RI_{26} e RI_{43}).

Tabela 1: Valores experimentais de monitoramento dos reatores.

Ensaio		Controle	RD_7	RD_{13}	RD_{26}	RD_{43}	RI_6	RI_{11}	RI_{26}	RI_{43}
pH	Ini.	6,71	7,06	6,86	6,71	6,91	7,06	6,86	6,91	6,91
	Fin.	7,02	7,53	7,1	7,35	7,14	7,56	7,53	7,5	7,4
AT (mg	Ini.	98,45	57,28	114,20	98,45	66,59	57,28	114,20	66,59	66,58
$CaCO_3.L^{-1}$)	Fin.	125,3	133,53	212,29	172,91	107,76	129,24	190,09	91,65	124,94
AOVt	Ini.	59,21	4,37	76,10	59,20	21,67	4,38	76,10	21,67	21,67
($mgHAC.L^{-1}$)	Fin.	103,63	4,38	7,99	2,39	52,99	5,59	0	9,78	9,61
CE ($mg.L^{-1}$)		-	7	13,6	26,2	43,1	6,1	11,2	26	43,4
Remoção CE (%)		-	5,72	7,66	4,09	13,8	3,01	0	0,55	15,31
λ (horas)		2,27±1,7	81,9±4,1	26,9±3,2	50,9±4,9	118±3,7	80,4±5,4	48,3±5,0	97,7±5,3	77,9±1,6
R^2		97	99	99	99	99	98	99	99	99
DQO ($mg.L^{-1}$)		562±25	430±24	816±13	562±25	372±9	430±24	816±14	372±9	372±9
Remoção DQO (%)		95	80	91	96	80	81	92	79	80
PT (µmolCH_4)		2203,4	1682,3	3757,2	2199,5	1495,9	1682,9	3757,2	1455,9	1455,9
PO (µmolCH_4)		71,4	49,73	143,48	103,87	344	54,7	155,2	299	341
Conversão DQO (%)		3,24	2,95	3,82	4,72	23	2,48	4,13	20,53	23,42
RE ($\mu molCH_4.mgDQO^{-1}$)		0,53	0,57	0,64	1,21	4,61	0,63	0,70	4,05	4,60

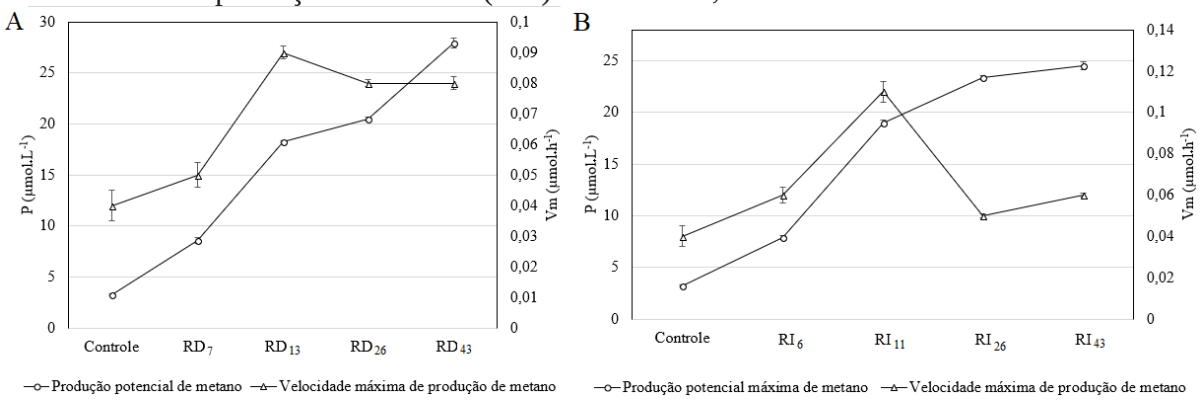
AT: Alcalinidade total; AOVt: Ácidos orgânicos voláteis total; CE: Composto emergente; λ: tempo para iniciar a produção de metano; PT: Produção teórica de metano; PO: Produção observada de metano; RE: Rendimento de metano (Produção de metano por mg de DQO consumida).

Por meio do monitoramento de pH e alcalinidade foi observado que todas as séries experimentais mantiveram estabilidade reacional. O pH inicial e final dos reatores dos Ensaios 1 e 2 mantiveram-se dentro da faixa preconizada como ideal para o processo metanogênico estável, entre 6,5 e 8,2 (Speece, 1996). Observou-se geração de alcalinidade ao final do processo de todos os ensaios, configurando o estabelecimento de processo metanogênico equilibrado, visto que indica o consumo de AOV gerados durante a etapa de acidogênese. Essa observação é corroborada pelo monitoramento de AOV efluentes de RD_{13}, RD_{26}, RI_{11}, RI_{26} e RI_{43}, uma vez que foi observado diminuição de AOV ao final do processo (Tabela 1). Todavia, para o Controle, notou-se aumento de AOV ao final da operação, de 59,21 $mgHAC.L^{-1}$ para 103,63 $mgHAC.L^{-1}$.

Pode-se observar que a presença dos compostos emergentes diclofenaco e ibuprofeno interferiu na cinética de transformação da matéria orgânica a metano. Foi observado aumento da produção potencial máxima de metano (P) na presença de diclofenaco (Figura 2-A) e ibuprofeno (Figura 2-B) em relação ao Controle. Notou-se também a diminuição da velocidade máxima de produção de metano (Vm) em RD_{26} e RI_{26}, todavia, P e Vm das séries experimentais contendo maior concentração de diclofenaco (RD_{26} e RD_{43}) e ibuprofeno (RI_{26} e RI_{43}) foram maiores que as do Controle (Figura 2). Destaca-se, portanto, que o aumento da

concentração de tais fármacos não inviabilizou o metabolismo anaeróbio das arquéias metanogênicas.

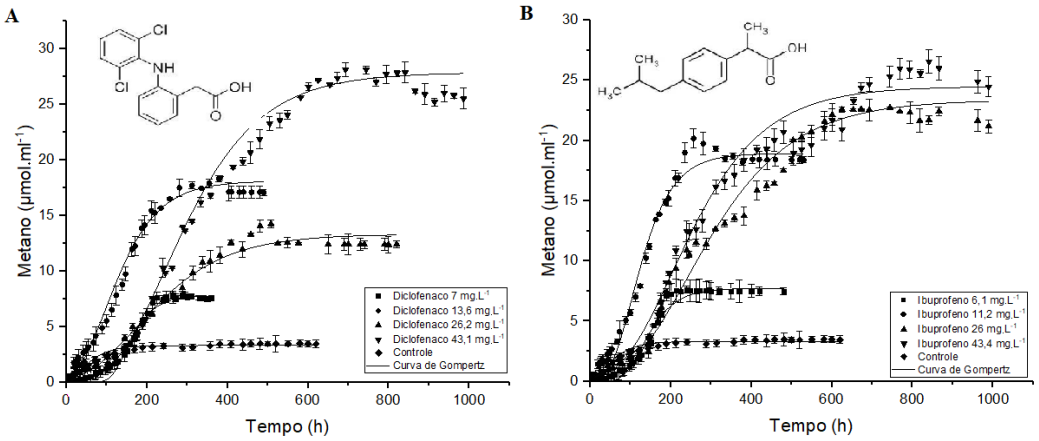
Figura 2: Produção potencial máxima de metano (P) e Velocidade mácima de produção de metano (Vm) do Controle, Ensaio 1 e Ensaio 2.



Por outro lado, todas as séries experimentais contendo diclofenaco e ibuprofeno apresentaram maior tempo para iniciar a produção de metano (λ) quando comparadas ao Controle, sendo λ de 2,27±1,7h, 81,9±4,1h e 80,4±5,4h para o Controle, RD_7 e RI_6, respectivamente. Além disso, foi observado maior tempo necessário para estabilização da produção de metano, conforme o aumento das concentrações de diclofenaco (Figura 3-A) e ibuprofeno (Figura 3-B). Em processos anaeróbios, o aumento da concentração de substratos complexos aumenta o tempo de início para produção de biogás (Esposito et al., 2012) e diminui a velocidade de produção de metano (Motteran et al., 2014). Desta forma, o maior λ observado na presença de tais anti-inflamatórios, deveu-se a característica complexa de suas estruturas moleculares (Figura 3) e, portanto, difícil assimilação pelos microrganismos.

Em relação à DQO, notou-se que as séries experimentais contendo diclofenaco ou ibuprofeno obtiveram remoções próximas a do Controle (Tabela 1). Além disso, foram observadas remoções de DQO semelhantes tanto para menores concentrações dos fármacos (RD_7: 80% e RI_6: 81%), como para maiores concentrações (RD_{43}: 80% e RI_{43}: 80%). Notou-se que as séries experimentais contendo maiores concentrações de diclofenaco e ibuprofeno ocasionaram em maior conversão de DQO a metano, sendo 3,24%, 23% e 23,42% para Controle, RD_{43} e RI_{43}, respectivamente. Essa observação é corroborada pelo maior rendimento de metano em RD_{43} e RI_{43} (4,61 µmolCH_4.mgDQO^{-1} e 4,60 µmolCH_4.mgDQO^{-1}, respectivamente) em relação as demais séries experimentais (Tabela 1) e ao Controle (0,53 µmolCH_4.mgDQO^{-1}). Evidenciando que tais compostos emergentes não interferiram na remoção da matéria orgânica e produção de metano.

Figura 3: Curva de Gompertz do Controle, Ensaio 1 (A: diclofenaco) e Ensaio 2 (B:ibuprofeno).



De forma geral, baixas remoções de diclofenaco e ibuprofeno foram observadas em todas as séries experimentais (Tabela 1). A transformação de compostos orgânicos ocorre por meio de microrganismos que visam certas frações funcionais (Ghattas et al., 2017), ou seja, a remoção de fármacos é governada pela estrutura de suas moléculas (presença ou ausência de grupos funcionais que doam/recebem elétrons) (Yang et al., 2016). Tanto a estrutura molecular do diclofenaco (Figura 3-A), como a do ibuprofeno (Figura 3-B), são constituídas de anel aromático e a densidade eletrônica de sistemas aromáticos reduz significativamente a disponibilidade de compostos como receptores de elétrons para os microorganismos (Fuchs et al., 2011; Ghattas et al., 2017). O diclofenaco também contém grupamentos como cloro e amino que são fortes receptores de elétrons e auxiliam para uma estrutura fortemente estável. Segundo Yang et al., (2016), compostos com grupamentos que são fortes receptores de elétrons são mais resistentes a biodegradação anaeróbia. Além disso, a presença de outras fontes de carbono orgânico, com estruturas semelhantes, diminui a eficiência de degradação de fármacos devido à competição pelos diferentes substratos com receptores de elétrons semelhantes (Langenhoff et al., 2013). Este caso pode ter ocorrido no presente estudo, pois os reatores foram alimentados com esgoto sanitário afluente a ETE de São Carlos, que é composto por baixa diversidade de ácidos orgânicos, diversos metais, compostos xenobióticos e outros compostos orgânicos que também contém anel aromático em sua estrutura molecular, como o LAS (Granatto et al., 2019), por exemplo.

Para concentração de diclofenaco próxima a do presente estudo (50 $mg.L^{-1}$) e maiores (250 $mg.L^{-1}$ e 300 $mg.L^{-1}$), Langenhoff et al., (2013) também não observaram remoção deste fármaco em reatores anaeróbios em condições anóxicas (com nitrato como receptor de elétrons) e sem nitrato. Os autores relataram que outras fontes de carbono orgânicos presentes nas águas residuárias afetaram a eficiência de degradação do diclofenaco. Em relação ao ibuprofeno, remoções maiores que as do presente estudo (máxima de 15,31%) foram observadas em estudos que utilizaram substrato sintético na alimentação de reatores. Para 50 $mg.L^{-1}$ de ibuprofeno, Langenhoff et al., (2013) observaram remoção de 20% em reatores em condições anóxicas e alimentados com substrato sintético. Para 0,1 $mg.L^{-1}$ de ibuprofeno, remoção de 27% foi observada por Gonzalez-Gil et al., (2018) em reator metanogênico alimentado com substrato sintético.

Entretanto, no presente estudo, notou-se maior remoção de diclofenaco (RD_{43}: 13,8%) e ibuprofeno (RI_{43}: 15,31%) para maiores concentrações aplicadas. Apesar do diclofenaco e ibuprofeno serem considerados persistentes em condições anaeróbias, na via de transformação aeróbia do diclofenaco, por exemplo, foram observadas reações que também podem ocorrer em condições anaeróbias (Ghattas et al., 2017), como a decloração redutiva (Jewell et al., 2016) e descarboxilação (Jewell et al., 2016; Zhang et al., 2015). Durante a digestão anaeróbia, os microrganismos produzem ampla diversidade de enzimas e a presença de poluentes em concentrações relativamente altas pode induzir processos de adaptação que, após uma fase de retardamento e desenvolvimento das atividades enzimáticas, levam à degradação de compostos devido ao desenvolvimento de novas funções metabólicas (Ghattas

et al., 2017). Dependendo da especificidade das enzimas, elas podem modificar as estruturas de poluentes orgânicos, mesmo que tais compostos não sejam substratos de crescimento. Tal processo bioquímico é conhecido como cometabolismo (Fernandez-Fontaina et al., 2013; Fischer and Majewsky, 2014). Por meio de ensaios enzimáticos, Gonzalez-Gil et al., (2017) confirmaram que a acetato quinase, enzima que catalisa a transferência de adenosina trifosfato (ATP) para acetato (sendo uma enzima chave na produção de metano) tem participação na modificação da estrutura molecular de diclofenaco e ibuprofeno. Além disso, por meio de reatores anaeróbios alimentados com substrato sintético (ácido acético, butírico e propiônico), tais autores relataram que a biomassa metanogênica tem capacidade de biotransformar ibuprofeno e diclofenaco (remoção menor que 20%), além de outros compostos, como triclosan (remoção menor que 60%).

Portanto, no presente estudo, provavelmente, as maiores concentrações de diclofenaco e ibuprofeno ocasionaram em desenvolvimento da atividade enzimática dos microrganismos anaeróbios presente no lodo de inóculo. Consequentemente, foi necessário maior tempo para adaptação da biomassa e maior tempo para estabilização da produção de metano, configurando o desenvolvimento de novas funções nos metabolismos microbianos. Tal fato resultou em maiores remoções de diclofenaco (RD_{43}: 13,8%) e ibuprofeno (RI_{43}: 15,31%) nas séries experimentais de maiores concentrações destes compostos emergentes.

Análise de biologia molecular PCR/DGGE do Ensaios 1 e Ensaio 2

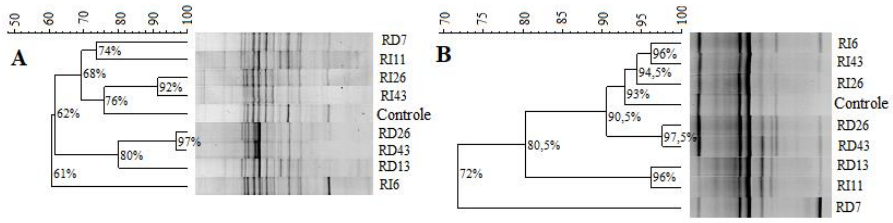
Mediante análise de cluster do perfil de bandas do DGGE (Figura 4), foram observadas mudanças nas populações microbianas. Para o Domínio Bacteria, notou-se que maiores concentrações de diclofenaco e ibuprofeno (Figura 4-A) ocasionaram em menor similaridade com o Controle.

No Ensaio 1, a similaridade de RD_7 em relação ao Controle foi de 68%, enquanto de RD_{43} foi de 61%. Para o Domínio Archaea, o contrário ocorreu (Figura 4-B). Maior concentração de diclofenaco resultou em maior similaridade com o Controle, sendo 90,5% de similaridade entre RD_{43} e Controle e 72% de similaridade entre RD_7 e Controle. Portanto, pode-se notar que maior concentração de diclofenaco acarretou em maiores modificações no Domínio Bacteria, uma vez que 39% da população bacteriana se modificou e apenas 9,5% da comunidade de arquéias foi modificada em RD_{43}.

No Ensaio 2, em relação ao Controle, a presença de ibuprofeno resultou em menor similaridade da população bacteriana (61%-76%), quando comparada com a população de arquéias (80,5%-94,5%). Além disso, notou-se maior variação dos coeficientes de similaridades para o Domínio Bacteria (61%-92%) (Figura 4-A) do que para o Domínio Archaea (80,5%-96%) (Figura 4-B). Ou seja, a população bacteriana sofreu maior modificação na presença de ibuprofeno.

Arquéias metanogênicas não degradam diretamente moléculas complexas e dependem do fornecimento de doadores de elétrons e substrato (H_2/CO_2, proprianato/acetato), coexistindo em sintrofismo com um consórcio microbiano de bactérias hidrolíticas, fermentativas e acidogênicas. Portanto, maiores concentrações de diclofenaco e ibuprofeno acarretaram em adaptação da comunidade microbiana do Domínio Bacteria, para posteriormente fornecerem mgtratos para a população do Domínio Archaea. Essas observações são corroboradas com os dados obtidos no monitoramente do biogás, uma vez que para maiores concentrações de diclofenaco (RD_{43}) e ibuprofeno (RI_{43}), notou-se maior tempo necessário para iniciar a produção de metano e maior tempo para estabilização da produção.

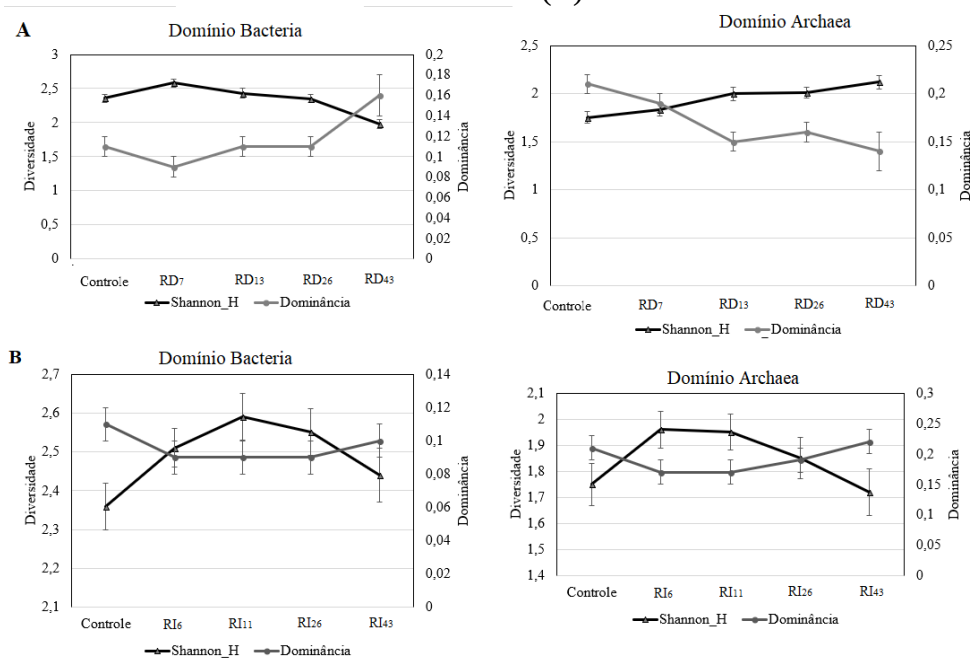
Figura 4: Análise de cluster (Correlação de Pearson, UPGMA) do perfil das bandas do DGGE dos fragmentos do RNAr 16S para o Domínio Bacteria (A) e Domínio Archaea (B).



No Ensaio 1, para o Domínio Bacteria, maior concentração de diclofenaco (RD_{43}) resultou em maior valor do índice ecológico de Dominância, que varia de 0 a 1 (Figura 5-A). Além disso, de acordo com os índices de Shannon_H, foi observado menor diversidade bacteriana para maior concentração de diclofenaco (Figura 5-A). O oposto ocorreu para o Domínio Archaea, ou seja, a dominância diminuiu e a diversidade de arquéias aumentou para maior concentração deste anti-inflamatório (Figura 5-B). Portanto, pode-se notar que a população do Domínio Bacteria foi mais sensível a maior concentração de diclofenaco, acarretando em diminuição da diversidade bacteriana e aumento da dominância. Para maiores concentrações de diclofenaco que as do presente estudo, resultados diferentes foram observados. Symsaris et al., (2015) observaram dominância do consórcio metanogênico a partir de 300 $mg.L^{-1}$ e relataram que as arquéias metanogênicas acetocláticas foram mais sensíveis a presença deste fármaco. Todavia, no presente estudo, a maior concentração utilizada (43,1 $mg.L^{-1}$ em RD_{43}) foi 7 vezes abaixo da concentração em que Symsaris et al., (2015) observaram mudança na população metanogênica.

De acordo com os índices ecológicos do Ensaio 2, para os Domínios Bacteria e Archaea, notou-se que menores concentrações de ibuprofeno (RI_6 e RI_{11}) ocasionaram em aumento da diversidade e diminuição da dominância em relação ao Controle (Figura 5-B). O aumento da diversidade microbiana pode estar relacionada a presença de ibuprofeno, uma vez que poluentes induzem processos de adaptação da biomassa (Ghattas et al., 2017), podendo acarretar em modificações na população de microrganismos. De fato, de acordo com correlação de *Pearson*, notou-se modificação no Domínio Bacteria na presença de ibuprofeno quando comparado ao Controle.

Figura 5: Diversidade e dominância dos Domínios Bacteria e Archaea do Ensaio 1 (A) e Ensaio 2 (B).



Conclusões

A presença dos compostos emergentes diclofenaco e ibuprofeno interferiu na cinética de transformação da matéria orgânica a metano. Maior concentração resultou aumento da produção potencial máxima de metano, maior rendimento de metano e maior conversão de DQO em metano. Além disso, o aumento da concentração de diclofenaco e ibuprofeno não interferiu na remoção de DQO. Por outro lado, maiores concentrações destes fármacos ocasionaram em maior tempo de adaptação da biomassa e maior tempo necessário para estabilização da produção de metano. Tal fato foi relacionado a característica complexa da composição do esgoto sanitário e da estrutura molecular desses compostos emergentes e, portanto, difícil assimilação pelos microrganismos. Entretanto, maior concentração de diclofenaco e ibuprofeno resultou em maior remoção de tais anti-inflamatórios, provávelmente, devido ao desenvolvimento de novas funções metabólicas dos microrganismos que constituíram o lodo anaeróbio de inóculo. Tanto o diclofenaco, como o ibuprofeno, ocasionaram em maiores modificações no Domínio Bacteria em relação ao Domínio Archaea. Notou-se que maior concentração de diclofenaco acarretou em menor similaridade com o Controle, sendo indicativo de maior modicação na população bacteriana. Em relação ao ibuprofeno, sua presença ocasionou em maiores variações nos coeficientes de similaridades para o Domínio Bacteria, quando comparado ao Domínio Archaea.

Referências Bibliográficas

APHA, AWWA, WPCF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA

Boone, D.R., Castenholz, R.W., 2001. The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria, in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York.

Campanha, M.B., Awan, A.T., de Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Fadini, P.S., 2015. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 7936–7947.

de Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Carneiro, R.L., Fadini, P.S., 2015. Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments. J. Sep. Sci. 38, 3454–3460.

Esposito, G., Frunzo, L., Panico, A., Pirozzi, F., 2012. Enhanced bio-methane production from co-digestion of different organic wastes. Environ. Technol. 33, 2733–2740.

Fent, K., Weston, A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 76, 122–159.

Fernandez-Fontaina, E., Pinho, I., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2013. Biodegradation kinetic constants and sorption coefficients of micropollutants in membrane bioreactors. Biodegradation 24, 165–177.

Fischer, K., Majewsky, M., 2014. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 6583–6597.

Fountoulakis, M., Drilla, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2004. Toxic effect of pharmaceuticals on methanogenesis. Water Sci. Technol. 50, 335–340.

Fuchs, G., Boll, M., Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. Nat. Rev. Microbiol. 9, 803–816.

Ghattas, A.-K., Fischer, F., Wick, A., Ternes, T.A., 2017. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. Water Res. 116, 268–295.

Gonzalez-Gil, L., Carballa, M., Lema, J.M., 2017. Cometabolic Enzymatic Transformation of Organic Micropollutants under Methanogenic Conditions. Environ. Sci. Technol. 51, 2963–2971.

Gonzalez-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Serrano, D., Lema, J.M., Carballa, M., 2018. Role of methanogenesis on the biotransformation of organic micropollutants during anaerobic digestion. Sci. Total Environ. 622–623, 459–466.

Granatto, C.F., Macedo, T.Z., Gerosa, L.E., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2019. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. Int. Biodeterior. Biodegrad. 138, 23–32.

GWRC, G.W.R.C., 2008. Development of an International Priority List of Pharmaceuticals Relevant for the Water Cycle. London.

Jewell, K.S., Falås, P., Wick, A., Joss, A., Ternes, T.A., 2016. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes. Water Res. 105, 559–567.

Kudo, Y., Nakajima, T., Miyaki, T., Oyaizu, H., 1996. Methanogen flore of paddy soils in Japan. FEMS Microbiol. Ecol. 10.

Langenhoff, A., Inderfurth, N., Veuskens, T., Schraa, G., Blokland, M., Kujawa-Roeleveld, K., Rijnaarts, H., 2013. Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater. Biomed Res. Int. 2013, 1–9.

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. Sci. Total Environ. 473–474, 619–641.

Motteran, F., Braga, J.K., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2014. Methanogenic potential of an anaerobic sludge in the presence of anionic and nonionic surfactants. Int. Biodeterior. Biodegradation 96, 198–204.

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16\thinspaceS rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. J Bacteriol 178, 5636–5643.

Oliveira, T.S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., Waring, L., 2015. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. Sci. Total Environ. 518–519, 459–478.

Peixoto, G., Pantoja-Filho, J.L.R., Agnelli, J.A.B., Barboza, M., Zaiat, M., 2012. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. Appl. Biochem. Biotechnol. 168, 651–671.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrogen Energy 38, 6137–6145.

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion wastes of high-strength wastes. Water Environ. Fed. 58, 406–411.

Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Sci. Total Environ. 461–462, 302–316.

Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Biotechnol. Bioeng. 49, 229–246.

Sierra-Alvarez, R., Lettinga, G., 1991. The Effect of Aromatic Structure on the Inhibition of Acetoclastic Methanogenesis in Granular Sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 544–550.

Speece, R.E., 1996. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press.

Symsaris, E.C., Fotidis, I.A., Stasinakis, A.S., Angelidaki, I., 2015. Effects of triclosan , diclofenac , and nonylphenol on mesophilic and thermophilic methanogenic activity and on the methanogenic communities. J. Hazard. Mater. 291, 45–51.

Wu, W.-M., Jain, M.K., de Macario, E.C., Thiele, J.H., Zeikus, J.G., 1992. Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 282–290.

Yang, S., Hai, F.I., Price, W.E., McDonald, J., Khan, S.J., Nghiem, L.D., 2016. Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 210, 153–159.

Ying, G.-G., Kookana, R.S., 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. Environ. Int. 33, 199–205.

Zhang, Y., Zhu, H., Szewzyk, U., Geissen, S.U., 2015. Removal of pharmaceuticals in aerated biofilters with manganese feeding. Water Res. 72, 218–226.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van'T Riet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. Environ. Microbiol. 1875–1881.

AVALIAÇÃO DE REATORES CONTÍNUOS TUBULARES PARA A PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA SINTÉTICA COM BASE EM SACAROSE

Luana Cardoso Grangeiro [1]; Lucas Tadeu Fuess [2]; Marcelo Zaiat [3]; Kelly Johana Dussán Medina [4]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do IQ/UNESP;
[2] Pós- Doutorando do Departamento de Engenharia Química da POLI/USP;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[4] Professora do Departamento de Engenharia Química IQ/UNESP.

Resumo. *Dois reatores anaeróbios e acidogênicos, um reator tubular único (RCTU) e um reator de tubos múltiplos (RCMT), foram testados como unidades de trabalho para a produção de biohidrogênio a partir de uma água residuária sintética à base de sacarose. Os reatores foram operados em fluxo contínuo, mantidos em câmara climatizada à temperatura de 25°C e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) de 96 gDQO.L^{-1}.d^{-1}. A condição experimental avaliada contemplou um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 horas e concentração do substrato de alimentação de 4000 mgDQO.L^{-1}. O monitoramento dos reatores foi realizado por meio dos parâmetros: pH, demanda química de oxigênio total (DQOt) e solúvel (DQOs), teor de sólidos suspensos voláteis (SSV), concentração de carboidratos totais (CH), concentração de ácidos orgânicos voláteis e etanol. O estudo está em finalização e tratamento dos dados, porém já foi observado que a conversão média de sacarose (*ER_{CH}, em %*) no RCTU foi de 33,5 $\pm$ 14,6% e no RCTM foi de 23,54 $\pm$ 14,14 e o rendimento médio de hidrogênio (HY molH$_2$.molCH^{-1}) obtido na operação do RCTU foi de 2,17 $\pm$ 3,67 molH$_2$.molCH^{-1}, enquanto o RCTM apresentou o rendimento médio de 2,77 $\pm$ 3,86 molH$_2$.molCH^{-1}.*

Introdução

Diversos artigos de revisão abordam que o desempenho da produção de hidrogênio em reatores anaeróbios pode ser influenciado por fatores como a configuração do reator, tipo de suporte, parâmetros operacionais como o tempo de detenção hidráulica (TDH), tipos e concentração de substrato, pH, temperatura e pressão parcial. De acordo com Fuess et al. (2016), as perdas de desempenho em sistemas acidogênicos podem estar associados a condições operacionais inadequadas, como o acúmulo excessivo de biomassa nos reatores, condições inadequadas de pH e a aplicação de sub ou sobrecargas orgânicas. Logo, para a obtenção de produção contínua de hidrogênio é preciso aplicar estratégias operacionais adequadas aos reatores.

O desempenho de RCTMS na produção de hidrogênio associado ao acúmulo de biomassa inadequado em reatores é retratado em poucos trabalhos na literatura. Gomes et. al. (2015) abordou a produção de biohidrogênio a partir de uma água residuária sintética em reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) como uma tentativa de controlar o acúmulo de biomassa no interior do reator para não afetar a taxa de carga orgânica específica. Os autores obtiveram taxas de produção de hidrogênio de 45 mmolH_2.d $^{-1}$ e concluíram que é necessário avaliar diferentes configurações do RCTM com o objetivo de maximizar a produção de biomassa para alcançar máximas produções de hidrogênio.

Em outro estudo, Gomes et. al. (2016) reportaram a avaliação do RCTM aplicado a água residuária real (processo de mandioca) para a produção de biohidrogênio. O estudo concluiu que a baixa produção de hidrogênio poderia estar associada à presença de ácidos orgânicos, ou poderia estar atribuída principalmente ao tipo de biomassa envolvida no processo e a sua adesão no interior dos tubos do reator, o que retoma desafios relacionados ao crescimento adequado de biomassa para produzir hidrogênio.

Em resumo, a configuração RCTM já foi investigada para os seguintes parâmetros: TDH, material suporte na câmara de saída, diferentes concentrações do meio sintético em termos de DQO (demanda química de oxigênio) (Gomes et al., 2014), tratamento térmico do substrato, estratégias de alimentação e suplementação de nutrientes (Gomes et al., 2016; Gomes et al., 2015). No entanto, ainda que o RCTM seja considerado uma configuração com grande potencial para a produção de hidrogênio sem a necessidade de meio suporte, as produções já investigadas com as características construtivas originais foram caracterizadas por instabilidade e curtos períodos de produção, com rendimentos máximos observados que não superaram 0,6 $molH_2.molCH^{-1}$. Portanto, ainda é necessário estudar e explorar a configuração RCTM a partir de modificações, como por exemplo, o aumento de número de tubos para promover o aumento da área superficial de tubos e otimizar a adesão de biomassa.

Dentro deste contexto, o grande desafio deste projeto foi estudar a operação de dois reatores contínuos (RCTU e RCTM modificado) como unidades de trabalho aplicadas à produção de hidrogênio a partir de água residuária sintética com base em sacarose. A configuração RCTU foi estudada apenas como um controle para verificar se a produção de hidrogênio, de fato, seria maior na configuração RCTM modificada com 18 tubos.

Material e Métodos

Sistema experimental

O sistema experimental (Figura 1) foi composto de dois reatores contínuos: (i) um reator contínuo tubular único (RCTU) confeccionado em acrílico e dividido em câmaras de entrada (altura de 170 mm) e saída (altura de 170 mm), e região intermediária sem tubos com diâmetro interno de 115 mm e altura de 530 mm; (ii) um reator de tubos múltiplos (RCTM) confeccionado em três segmentos: câmaras de entrada (altura de 100 mm) e saída (altura 250 mm), confeccionadas em acrílico, e região intermediária, composta por 18 tubos de PA com diâmetro externo e altura de 12 e 710 mm, respectivamente. A superfície interna dos tubos foi adaptada no formato de rosca sem fim com o intuito de melhorar a adesão da biomassa. O volume de operação inicial do RCTM foi de 1800 mL e do RCTU foi de 1466 mL.

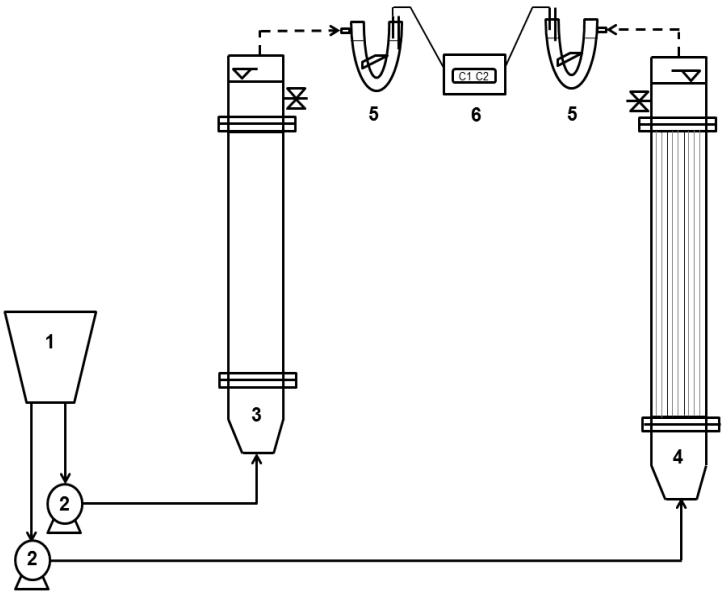


Figura 1: Sistema Experimental. Legenda: 1-reservatório de afluente sintético, 2- bombas peristálticas, 3- RCTU, 4- RCTM, 5- medidores de gás, 6- sistema arduino, (-) correntes líquidas, (--) correntes de biogás.

Composição da água residuária sintética

O meio sintético foi composto em $mg.L^{-1}$ por: $C_{12}H_{22}O_{11}$ (1781,24); CH_4N_2O (11,51);

SeO_2 (0,036); KH_2PO_4 (5,36); K_2HPO_4 (1,3); $Na_2HPO_4.2H_2O$ (2,76); $CaCl_2.6H_2O$ (1,4); $CaCl_2$ (2,06); $NiSO_4.6H_2O$ (0,5); $FeSO_4.7H_2O$ (2,5); $FeCl_3.6H_2O$ (0,25); $CoCl_2.2H_2O$ (0,04) (Penteado et al., 2013). O pH do afluente sintético foi corrigido para 6,5 com bicarbonato de sódio e ácido clorídrico.

Teste hidrodinâmico

O reator RCTM com 18 tubos foi avaliado hidrodinamicamente para verificar o padrão de fluxo desta configuração. Este reator foi continuamente alimentado com uma solução contendo um traçador inerte. Utilizou-se solução de NaCl 10 $mg.L^{-1}$ como traçador. O reator foi monitorado por 12h, correspondendo a três vezes o tempo teórico de detenção hidráulica (TDH, 4h). As concentrações de NaCl foram monitoradas on-line usando uma sonda de condutividade (Modelo CON-BTA) acoplada a uma interface para aquisição de dados (Modelo CBL 2). Os dados foram armazenados em um computador LG 90. Os dados verificados com o modelo N- CSTR em série são descritos na Tabela 1:

Tabela 1: Descrição do modelo N-CSTR em série

Modelo	Parâmetro	Equação
N- CSTR em série	$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2}$	$E_\theta = \frac{N(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} e^{N-\theta}$

θ: Tempo de residência médio; $\mathbf{E_\theta}$: Função de distribuição do tempo de residência; $\boldsymbol{\sigma^2}$: Variância; $\boldsymbol{\sigma^2\theta}$: Variância adimensional; **N**: Número de reatores em série.

Operação dos reatores acidogênicos

O inóculo utilizado nos reatores acidogênicos foi obtido a partir da fermentação natural da água residuária sintética, de acordo com o protocolo descrito por Penteado et al. (2013). Desta forma, um volume inicial de 15 litros de substrato sintético com pH corrigido (6,5) foi mantido em repouso e exposto à atmosfera durante três dias, à temperatura ambiente (25°C - 30ºC). Em seguida, o substrato sintético fermentado foi bombeado para os reatores tubulares e recirculado por um período de cinco dias em câmara fechada e temperatura controlada em 25°C, para promover a adesão da biomassa acidogênica no interior das paredes dos tubos dos reatores. Ao término da recirculação, iniciou-se a alimentação dos reatores com o meio sintético.

Os reatores acidogênicos foram operados por 73 dias em condições anaeróbias, fluxo ascendente contínuo e mantidos em câmara fechada e com temperatura controlada à 25ºC. A carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) foi mantida em aproximadamente 96 $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$, atingindo um TDH de ~4 h. Os valores para os parâmetros TDH e concentração do substrato de alimentação em termos de DQO foram selecionados com base nos estudos já realizados com essa configuração de reator (Gomes et al., 2014; Gomes et al., 2015; Gomes et al., 2016).

A avaliação e monitoramento do desempenho dos reatores foram baseados na coleta e análises de amostras: na fase líquida e na fase gasosa. As amostras na fase líquida foram coletadas na entrada (afluente) e saída do reator (efluente) para monitorar os seguintes parâmetros: pH, DQOt) e DQOs, SSV, CH, concentração de ácidos orgânicos voláteis e etanol. As amostras na fase gasosa foram coletadas utilizando um septo acoplado no headspace dos reatores para determinar a composição do biogás produzido.

Métodos analíticos

Todas as análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2005). As análises de CH foram realizadas por métodos colorimétricos (Dubois et al., 1956). As análises de ácidos orgânicos voláteis e etanol foram realizadas por cromatografia gasosa de acordo com Adorno et al. (2014) e as análises de composição de biogás foram realizadas por cromatografia gasosa segundo o protocolo de Perna et al. (2013).

Resultados e Discussão

Teste hidrodinâmico

A Figura 2 apresenta a curva-resposta ao pulso tipo degrau aplicado no teste hidrodinâmico do RCTM com 18 tubos.

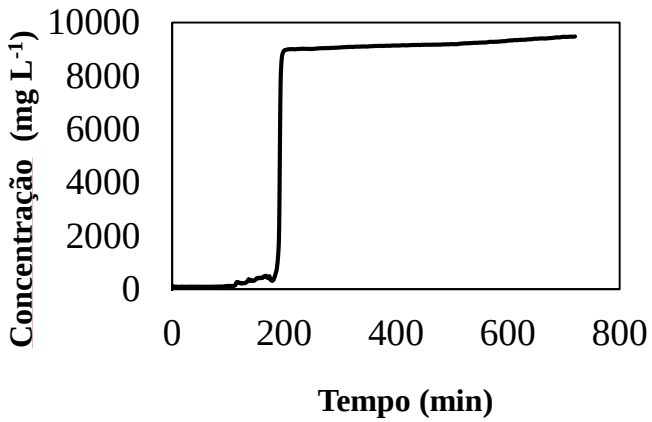


Figura 2: Curva-resposta típica à perturbação tipo degrau.

Os dados experimentais foram utilizados para determinar as curvas F normalizadas utilizando parâmetros da equação de Boltzmann ajustados com uma curva sigmoidal. Uma vez que as curvas ajustadas foram plotadas, os pontos Fxt foram usados para determinar a curva E (Distribuição do Tempo de Residência – DTR).

Os resultados demonstraram que o RCTM com 18 tubos apresentou N=6,3 quando ajustado ao modelo N-CSTR (Figura 3). Este valor 6,3 representa 6 reatores de mistura em série, quando mais reatores de mistura perfeita são conectados em série, o comportamento deste conjunto de reatores tenderá ao escoamento de um reator tubular ideal. Ainda, na aplicação deste modelo para N = 1, o reator apresenta o escoamento de um reator de mistura perfeita ideal, valores de N maiores que 1 indicam o desvio da idealidade, e o reator apresentará o escoamento tubular ideal quando N tender ao infinito (Levenspiel, 1999). Desta forma, é possível afirmar que o RCTM não apresenta o escoamento de mistura perfeita, e assim pode ter o seu escoamento aproximado para um reator tubular.

O TDH médio de ~4,3h, obtido neste teste, foi semelhante ao TDH teórico de 4h definido para a operação do reator, quando ocorre a diferença entre estes valores de TDH é um indicativo de anomalias no escoamento. É importante destacar que este teste permitiu associar o escoamento do reator em estudo com o escoamento de um reator tubular ideal. Para uma análise completa do perfil hidrodinâmico a fim de avaliar o desempenho e identificar possíveis obstáculos associados a falhas operacionais e de projeto, é necessário a obtenção de um modelo que represente adequadamente o escoamento não ideal do reator e a qualidade de mistura.

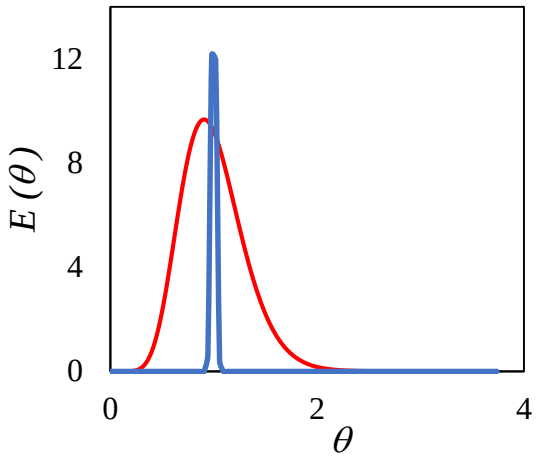


Figura 3: Curva E do RCMT com ajuste ao modelo N-CSTR em série. Legenda: (–) curva experimental, (–) curva do modelo.

Desempenho dos reatores acidogênicos

Os reatores acidogênicos foram monitorados durante 73 dias de operação. A Figura 4 apresenta o perfil temporal da conversão de carboidratos (ER_{CH}) ao longo da operação. É possível observar que ambos os reatores apresentaram períodos de instabilidade na conversão de carboidratos, sendo que os valores mínimos de conversão obtidos para RCTU foi 9,4% no 40º dia e 12,16% no 21º dia para o RCTM. A conversão máxima de carboidratos obtida nos reatores RCTM e RCTU foram de 48,54% e 52,6%, respectivamente no último dia de operação. Esses valores não são tão diferentes da conversão de carboidratos (64,4%) reportada no trabalho de Gomes et al., (2014), no qual investiga a produção de hidrogênio em meio sintético em um RCTM com 12 tubos, TDH de 4h, COVa 24 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ e temperatura de 25ºC. No estudo de Gomes et al. (2016) é reportado a conversão de carboidratos igual a 98,4% para produção de hidrogênio em RCTM com 12 tubos na condição E3 (meio sintético, TDH 4h, COVa 24 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$), os valores diferem bastante e podem estar associados a aplicação da elevada carga orgânica de 96 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ no RCTM com 18 tubos.

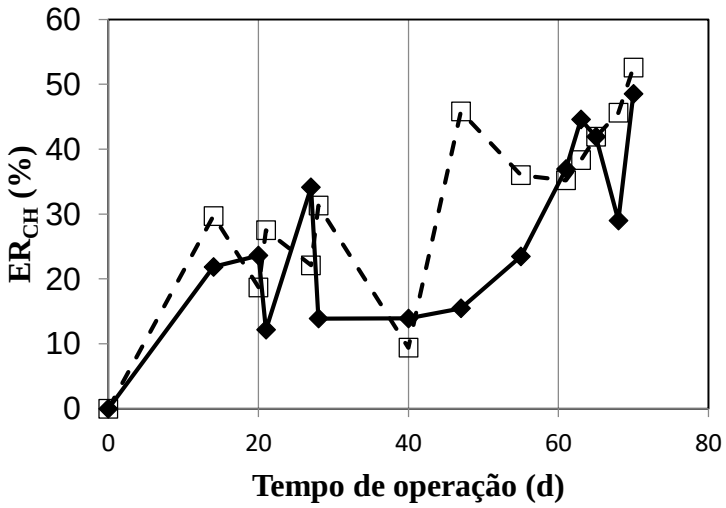


Figura 4: Monitoramento da eficiência de conversão de carboidratos do reatores acidogênicos. Legenda: eficiência de remoção no RCTM (-♦-), eficiência de remoção no RCTU (-□-).

Na Figura 5 a-b são apresentados, respectivamente, os perfis temporais para pH e remoção de DQO (total) ao longo da operação. Diversos estudos têm focado na influência do

pH na produção de hidrogênio em sistemas anaeróbios para produzir biogás, seja rico em metano ou rico em hidrogênio. O controle adequado do pH permite verificar alterações nas vias metabólicas ou nos fenômenos de floculação, produção e adesão de biomassa (Antonopoulou et al., 2010; Dareioti et al., 2014; Gomes et al., 2016). Ao longo da operação dos RCTU e RCTM verificou-se um comportamento semelhante de variação de pH em ambas configurações, e o pH permaneceu entre a faixa de 4-5, abaixo da faixa ótima indicada na literatura de aproximadamente 5,0 e 7,0 (Amorim, 2012, Gomes et al., 2015, Gomes et al., 2016, Fuess et. al, 2016).

Com relação à remoção de matéria orgânica, na Figura 5 b são apresentados os perfis temporais para remoção de DQO (total) ao longo da operação. Os valores de remoção de DQOt obtidos no final da operação foram 18,96% e 22,55%, para RCTM e RCTU, respectivamente. A eficiência de remoção de DQOt média observada neste trabalho compreendeu 12,38% (RCTM) e 9,57% (RCTU), estes valores são inferiores ao reportado em Gomes et al., (2015), igual a 19,2%. Em trabalhos reportados na literatura, para uma carga orgânica volumétrica ótima aplicada (COVa) de 84,2 kgDQO.m^{-3}.d^{-1}, em diferentes configurações de reatores, a redução média de DQOt obtida encontra-se na faixa de 15-20% (Ferraz JR. et al., 2014b, 2015a e 2015b; Fuess e Garcia, 2014 e 2015; Fuess et al., 2016 e 2018). Logo, em termos de redução de DQOt, o RCTM apresentou valor dentro do esperado.

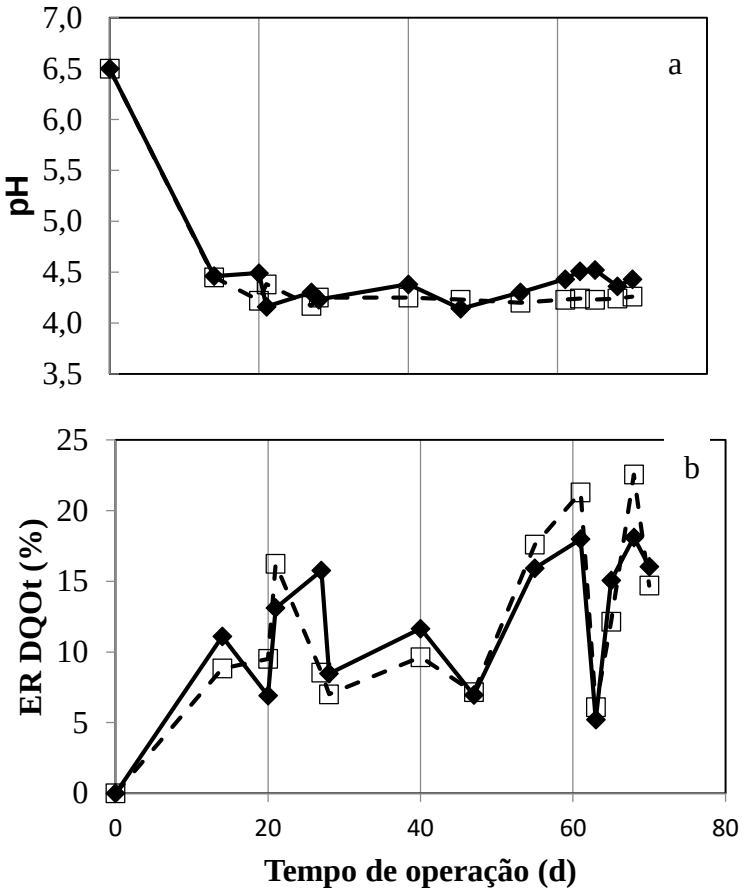


Figura 5: Monitoramento dos reatores acidogênicos: (a) pH e (b) eficiência de remoção de DQOt. Legenda: RCTM (-♦-) e RCTU (-□-).

Na Figura 6 a-b são apresentados os perfis temporais da produção volumétrica e rendimento de hidrogênio obtidos ao longo da operação. Inicialmente destaca-se que, embora as curvas remetam a períodos de instabilidade na produção de hidrogênio, é possível notar um comportamento de aumento de produção do gás nos primeiros 10 dias de operação, um

comportamento comum em reatores anaeróbios acidogênicos (Gomes et al. 2015, Anzola-Rojas et al., 2015, Gomes et al., 2016, Fuess et al., 2017, Fuess et al., 2018).

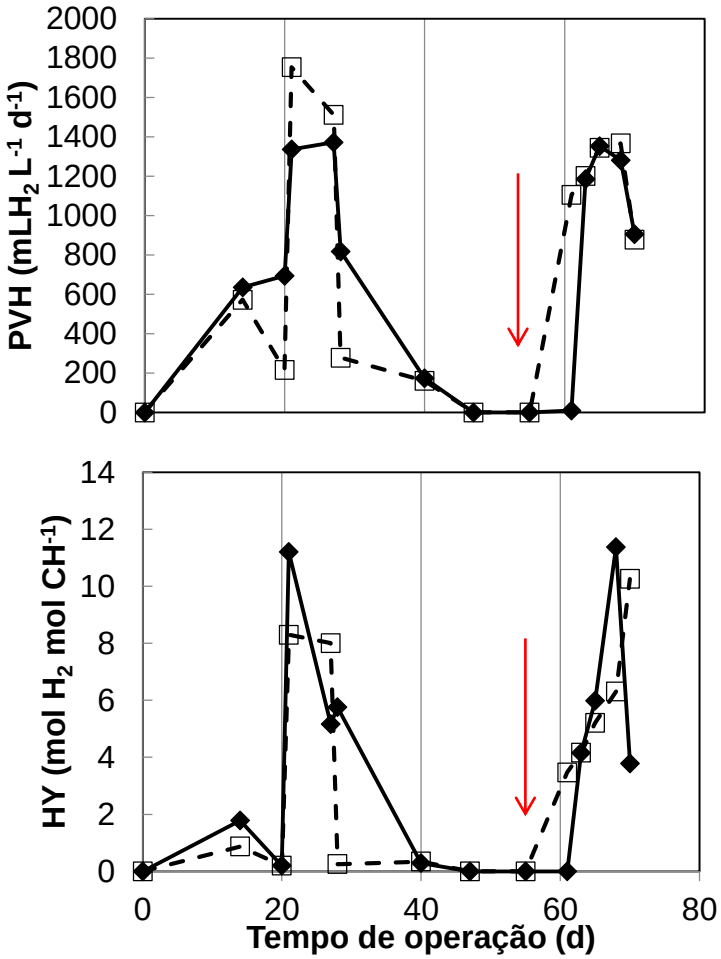


Figura 6: Produção de biogás nos reatores acidogênicos: (a) produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e (b) rendimento de hidrogênio (HY). Legenda: Legenda: RCTM (-♦-) e RCTU (-□-).

A PVH observada no RCTM (1372 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$) no 27º dia de operação é semelhante ao valor da produção de 1470 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$, reportado em Gomes et al. (2015), o qual investigou a mesma configuração de reator de tubos múltiplos. A PVH (905,31 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$) e HY (3,78 $molH_2.molCH^{-1}$) no RCTM com 18 tubos foram maiores que a PVH (52,97 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$) e HY (0,73 $molH_2.molCH^{-1}$) obtidas no RCTM com 12 tubos reportada em Gomes et al. (2016), o que permite concluir o potencial da configuração RCTM modificada na produção de hidrogênio quando comparada com a configuração original. Ainda, em trabalhos que utilizam reatores com meio suporte na produção de hidrogênio, como por exemplo, no trabalho de Anzola-Rojas et al. (2015), foi observado uma PVH de 1400 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$ e HY de 2,2 $molH_2.molCH^{-1}$, tais valores não são diferentes dos valores de PVH e HY observada no RCTM com 18 tubos, o que ratifica a produção de hidrogênio nesta configuração de reator tubular sem material suporte.

Na comparação dos valores de PVH obtidas no RCTU (876,98 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$) e RCTM (905,31 $mLH_2.L^{-1}.d^{-1}$) conclui-se que a produção de hidrogênio foi semelhante, porém a diferença de valor pode estar associada a presença dos tubos no RCTM, os quais permitem um maior contato superficial do efluente sintético com as paredes rugosas do interior dos tubos, permitindo assim, uma adesão de biomassa maior no RCTM do que no RCTU, este último apenas tubular e sem rugosidade.

Os valores nulos de PVH e HY vistos no período de 40-60 dias podem estar associados à comatação ocorrida na câmara de entrada de ambos os reatores em estudo, o que resultou no entupimento dos tubos do RCTM. Isto pode ter ocasionado à diminuição do fluxo do fluido ao longo do reator e consequentemente a perda na eficiência de produção de hidrogênio. Para promover a recuperação dos reatores foi realizado um descarte de biomassa no dia 58 de operação, indicado pela seta vermelha na Figura 6.

Conclusões

Os resultados obtidos com o desenvolvimento desta primeira etapa da pesquisa demonstram que a configuração RCTM com 18 tubos é capaz de produzir hidrogênio e pode ser utilizada como referencial teórico na aplicação dessa configuração na produção de hidrogênio a partir de efluente sintético com base em sacarose. O tratamento dos dados está em finalização e análises de ácidos orgânicos voláteis, solventes, biomassa e COVe poderão auxiliar em uma discussão mais completa e melhor fundamentada em relação a vias metabólicas e crescimento de biomassa associados a produção de hidrogênio nos reatores em estudo. Portanto, até o momento, é possível concluir que os reatores estudados, principalmente o RCTM com 18 tubos, apresentaram a capacidade para produzir hidrogênio em fase acidogênica e anaeróbia.

Evidencia-se que projetos relacionados à produção biológica de hidrogênio a partir de meio sintético e resíduos agroindustriais, em diferentes configurações de reatores, têm sido desenvolvidos pelo grupo de pesquisa onde está sendo desenvolvido este projeto, desde 2010. O que permite um leque de possibilidades e aplicações na configuração RCTM. Decorrentes disso, várias atividades se encontram em andamento ou ainda não foram realizadas, as quais estão informadas a seguir: teste de RCTM com 10 e 18 tubos na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana de açúcar; análise de biologia molecular antes, durante e no final da operação, simulação do processo utilizando *Aspen e* modelagem dos reatores acidogênicos usando ADM1.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). American J. Analytical Chemistry. 5, 406–414.

Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Lyberatos, G., 2010. Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. Int. J. Hydrogen Energy. 35, 1921-1928.

Anzola-Rojas, M. D. P., Fonseca, S. G., Silva, C. C., Oliveira, V. M., Zaiat, M., 2015. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. Biotechnol. Reports. 5, 46-54.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., 1956. Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 28, 350–356.

Amorim, E. L. C., Sader, L. T., Silva, E. L., 2012. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. Applied Biochemistry Biotechnol.166, 1248-1263.

APHA, AWWA, WEF (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st. ed. Washingtion DC, APHA.

DareiotI, M. A., Vavouraki, A. I., Kornaros, M., 2017. Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: a lab-scale evaluation using batch tests. Bioresour. Technol. 162, 218-227.

Gomes, S.D., Fuess, L.T., Penteado, E.D., Lucas, S.D.M., Gotardo, J.T., Zaiat, M, 2016. 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. Int. J. Hydrogen Energy. 41, 8120-8131.

Gomes, S.D., Fuess, L.T., Penteado, E.D., Lucas, S.D.M., Gotardo, J.T., Zaiat, M, 2015. 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. Bioresour. Technol. 197, 201-207.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014a. Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. Environ. Technol. 35, 333–339.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2015. Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. J. Environ. Manage. 162, 102–114.

Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Garcia, M. L., Zaiat, M, 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. International Journal of Hydrogen Energy. 41, 8132 - 8145.

Fuess, L.T., Rodrigues, I.J., Garcia, M.L, 2017. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. J. Environ. Sci. Health A. 52(11), 1063–1072.

Fuess, L.T., Klein, B.C., Chagas, M.F., Rezende, M.C.A.F., Garcia, M.L., Bonomi, A., Zaiat, M., 2018. Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and environmental approach. Renew. Energy. 122, 674–687.

Ferraz Jr., A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zait, M., 2014b. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy. 39, 16852–16862.

Ferraz Jr., A.D.N., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2015a. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed
reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. Bioresour. Technol. 186, 81–88.

Ferraz Jr., A.D.N., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2015b. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. Anaerobe 34, 94–105.

Levenspiel, O., 1999. Engenharia das Reações Químicas. 3rd edition. Prentice Hall PTR, New Jersey.

Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrogen Energy. 38, 6137-6145.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy 38, 54–62.

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMASSA ADERIDA E EM SUSPENSÃO ASSOCIADO À DESCOLORAÇÃO DE CORANTE AZO EM REATORES ANAERÓBIOS

Ivo Gabriel Guedes Alves [1]; Eugenio Foresti [2]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A indústria têxtil confecciona itens de vestuário a partir de uma linha de produção cujos processos demandam intenso consumo de água. Devido ao uso de corantes, necessários aos processos de tingimento, o efluente é tipificado, principalmente, pela forte coloração. Estes efluentes podem causar efeitos deletérios, como a redução da incidência da luz solar ao longo da profundidade e a alteração de padrões estéticos pela mudança da coloração natural da água. O tratamento por processos biológicos de efluentes têxteis, apesar de ainda não consolidado, mostra-se como uma possibilidade promissora para redução dos custos de operação. Este trabalho tem como objetivo avaliar o crescimento das populações de um consórcio microbiano especializado, sob diferentes configurações de reator, ao promover a descoloração de efluente têxtil sintético contendo o corante azo Direct Black 22 (DB22) com concentração de 65 mg.L^{-1}, utilizando glicose como fonte de co-substrato. Serão estudados dois reatores, sendo o primeiro com biomassa em suspensão e, no segundo, a mesma deverá crescer aderida ao suporte fixo de hastes de espuma de poliuretano.*

Introdução

A indústria têxtil é um setor de relevância na economia nacional. Com cadeia de produção completa, o Brasil é posto como o 5º maior provedor mundial de produtos neste mercado, além da maior cadeia têxtil completa nacional do ocidente (ABIT, 2018). A operação é dependente de grande volume de água devido ao processamento úmido dos tecidos e, por isso, a taxa de geração de águas residuárias é elevada (Cervantes et al., 2011). O efluente é caracterizado pela forte coloração advinda da presença de corantes sintéticos não fixados às fibras têxteis em etapas de tingimento (Sarayu e Sandhya, 2011; Santos et al., 2007; Forgacs et al., 2004). A manifestação de cor do corante está ligada a um grupo molecular específico denominado cromóforo. Neste trabalho, o corante azo *DirectBlack 22* será objeto de estudo dada a sua aplicabilidade na indústria (Amaral et al., 2017).

Existem hoje diversos métodos utilizados na remoção de corantes em efluentes, variando de natureza física, química ou biológica. Os métodos físico/químicos trazem desvantagens como o alto custo de operação, remoção incompleta dos corantes azo recalcitrantes e seus metabólitos e alto teor de geração de lodo (Forgacs et al., 2004; Zhang et al., 2004).

Os métodos biológicos de degradação, por outro lado, utilizam mecanismos naturais de microrganismos e enzimas. Quando comparados aos métodos físico-químicos, processos biológicos são uma alternativa ecologicamente viável e de custo competitivo, podendo gerar produtos finais não-tóxicos ou completamente mineralizados (Rai et al., 2005; Verma e Madamwar, 2003). Não obstante à grande complexidade dos efluentes têxteis, não há ainda um método ou combinação de métodos definitivamente eficaz para qualquer descarte têxtil.

Há uma grande variedade de microrganismos com potencial de degradação de corantes. Entre eles estão grupos de bactérias e fungos (Saratale et al., 2011). Os mecanismos enzimáticos utilizados por esses microrganismos estão associados tanto a enzimas específicas (*azoreductase),* como enzimas capazes de catalisar a redução de compostos variados, incluindo compostos azo (*lacase, lignina peroxidase, NADH-DCIP reductase*) (Van der Zee, 2002; Saratale et al., 2011). A ligação azo atua como aceptor final de elétrons e é quebrada redutivamente pela ação de enzimas extracelulares. A degradação pode ocorrer por diferentes

grupos tróficos sob condições anaeróbias, anóxicas ou aeróbias. A literatura reporta extensivamente maior eficiência dos processos anaeróbios. Na presença de outros aceptores, como sulfato ou nitrato, a descoloração pode ocorrer em paralelo, gerando competição por doadores de elétrons (Rasool et al., 2015).

Os efluentes têxteis são caracterizados por flutuações em seus parâmetros a depender, entre outros fatores, dos processos e produtos utilizados na instalação. Com isso, o efluente pode ser insuficiente para fornecer os equivalentes de redução necessários ao processo redutivo. São adicionados, então, co-substratos que possam fornecer os equivalentes de redução necessários (Santos et al., 2007; Rasool et al., 2015).

Os reatores anaeróbios contínuos são categorizados com relação à sua configuração de cultivo em dois tipos: culturas suspensas e culturas aderidas. Culturas suspensas precisam de certo grau de mistura dentro do reator que impeça a sedimentação da biomassa e facilite o contato entre microrganismos anaeróbios, enzimas e matéria orgânica presentes na mistura (Mostafa, 2017). Por outro lado, nas culturas aderidas, a imobilização da biomassa pode ocorrer pela adesão a superfícies (biofilme) ou a outros microrganismos por auto-adesão ou, ainda, por ligações químicas formando grânulos (Couto, 2009). A literatura reporta sobre variações no desempenho de reatores com diferentes configurações para um mesmo critério de avaliação, indicando que as populações que prevalecem em cada reator podem sofrer influência tão somente devido à configuração de cultivo (Van der Zee et al. 2001; Senan e Abraham, 2004; Mohan et al., 2013; Saba et al, 2013)

Material e Métodos

O trabalho será iniciado com a partida e conseguinte operação simultânea dos dois reatores biológicos de bancada submetidos à mesma carga orgânica volumétrica, alimentados por efluente sintético com concentração final de corante *DB22* de 65 $mg.L^{-1}$.

Corante e processo de hidrólise

O *Direct Black 22* (DB22; CAS 6473-13-8) foi cedido por uma indústria no município de Caruaru – PE. O composto possui peso molecular de 1083,97 $g.mol^{-1}$. Para simular a estrutura do corante hidrolisada encontrada em efluentes têxteis reais, o corante deverá ser hidrolisado, elevando-se o pH até 11 com adição de NaOH, aquecendo-se a 80 ºC e diminuindo-se ao pH 7 com a adição de HCl (Santos, 2003).

Composição da água residuária

A água residuária (AR) sintética será preparada de forma a prover os compostos comumente encontrados em efluentes têxteis, consistindo de corante, co-substrato e solução de macro e micronutrientes. Será composta especificamente por: DB22 (inicialmente 32,5 $mg.L^{-1}$ aumentando gradativamente no decorrer da operação), glicose (1 $g.L^{-1}$), KH_2PO_4 (0,25 $g.L^{-1}$), Na_2SO_4 (0,25-0,50 $g.L^{-1}$), $MgSO_4$ (0,1 $g.L^{-1}$) e NaCl (0,5 $g.L^{-1}$). Ademais, serão adicionados extrato de levedura (0,2 $g.L^{-1}$) como fonte de -nitrogênio e $NaHCO_3$ (1 $g.L^{-1}$) como fonte de alcalinidade. Os elementos traços serão fornecidos pela adição de uma alíquota de 1 $mL.L^{-1}$ de solução de elementos traços com a seguinte composição ($g.L^{-1}$): $FeSO_4.7H_2O$ (0,75), $NiSO_4.7H_2O$ (0,5), $MnCl_2.4H_2O$ (0,5), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,5), H_3BO_3 (0,1), $CoCl_2.6H_2O$ (0,05), $CuSO_4.5H_2O$ (0,005), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0,004) e EDTA (1,0).

Estrutura do reator

Os dois reatores (Figura 1) que serão utilizados são construídos em acrílico, operados em fluxo ascendente e são formados por uma base cônica (diâmetro interno = 8,2 cm e comprimento = 7,5 cm), destinada à retenção do excesso de biomassa; corpo cilíndrico de mesmo diâmetro (comprimento = 32,5 cm), *headspace* (Reator A = 11 cm; Reator B = 30 cm), com volume útil de 2,23 L (reator A) e 3,31 L (reator B) cujo volume corresponde à base

cônica e ao corpo cilíndrico. O reator A possui, ao longo de seu perfil, 9 hastes metálicas envoltas por espuma de poliuretano, que servirão como meio suporte para a biomassa. O reator B possui um sedimentador em 'Y' para viabilizar a permanência da biomassa no reator e evitar o arraste juntamente com o efluente. O tempo de detenção hidráulica (TDH) inicial do reator deverá ser de 72h até que se estabeleça equilíbrio do sistema.

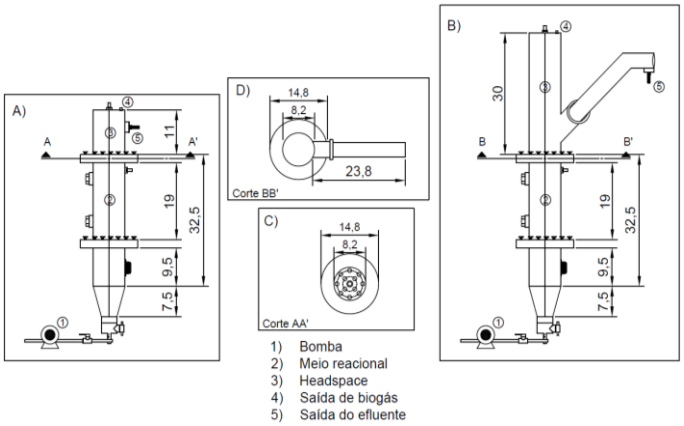


Figura 1: Modelos dos reatores. (A) Reator com meio suporte. (B) Reator de crescimento suspenso. (C) Corte do reator 'A' (D) Corte do reator 'B'. Fonte: Autor.

Suporte de imobilização de biomassa

O meio suporte da biomassa no reator anaeróbio de leito fixo (RALF) será composto por tiras de espuma de poliuretano fixas, alocadas ao longo do perfil do reator (Camiloti et al., 2014; Mockaitis et al., 2013). As hastes de poliuretano serão dispostas sobre um eixo vertical de ferro de comprimento idêntico ao do corpo cilíndrico do reator. A espuma de poliuretano foi escolhida como material suporte devido à sua elevada área superficial, propriedades químicas inertes, além da fácil obtenção e montagem no reator (Mockaitis et al., 2013).

Inóculo

O inóculo utilizado em ambos os reatores será de biomassa já adaptada às condições de salinidade e presença de corantes, que já se mostrou capaz de degradar o *Direct Black 22* por ensaios em batelada acidogênicas anteriormente realizados por Oliveira (2019), ainda não publicado. O consórcio microbiano encontra-se preservado em solução (50% glicerina/50% meio de cultura sem corante) a qual foi distribuída em alíquotas de 2 mL em tubos eppendorf dentro de ambiente refrigerado (-80 ºC). Para ser preparado para o uso, o consórcio microbiano deverá ser reativado mediante a transferência das alíquotas para um novo meio de cultura, diferenciado principalmente pela presença de glicose (co-substrato) e corante. Esse meio de cultura é adaptado de Senan e Abraham (2004) e é composto por glicose (30 $g.L^{-1}$), extrato de leveduras (6 $g.L^{-1}$), KH_2PO_4 (6 $g.L^{-1}$), Na_2CO_3 (10 $g.L^{-1}$) e DB22 (32,5 $mg.L^{-1}$).

Para realizar a inoculação, o MCC fermentado com a biomassa especializada já ativada será utilizado para preencher 50% do volume de cada reator que será completado com o efluente sintético. O reator será operado inicialmente com TDH de 72 h até que o inóculo se estabeleça no reator e haja o equilíbrio do sistema com remoção de cor representativa perceptível. A partir daí será ajustado o TDH de operação de 24 h.

Métodos analíticos

Para realizar o monitoramento dos reatores serão avaliados periodicamente os seguintes parâmetros: Demanda química de oxigênio (DQO), pH, condutividade elétrica, sólidos totais e sólidos suspensos voláteis (SSV) utilizando as metodologias descritas no manual *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 2012); ácidos orgânicos voláteis (AOV) por cromatografia gasosa de alta performance, segundo Adorno et al. (2014); cor pelo método descrito originalmente por Wu et al. (1998); sulfatos

por método turbidimétrico e sulfetos por método espectrofotométrico descritos por APHA (2005). A medição de vazão dos reatores será realizada pelo método volumétrico. A quantificação de biomassa aderida às hastes de poliuretano será realizada ao final do experimento por pesagem de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro (2001).

Análises de biologia molecular

As populações de bactéria presentes nos reatores serão comparadas em diferentes momentos da operação por sequenciamento do gene RNAr 16S. O DNA será extraído pelo FastDNA® Spin Kit for Soil. Será realizada a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction – PCR*) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*denaturing gradient gel electrophoresis – DGGE*) para análise de grau de similaridade entre as populações dos reatores. A PCR ampliará especificamente as regiões do gene 16S rDNA V6 a V8 de bactérias utilizando os primers específicos F-968-GC e 1401R (Nübel et al., 1996). A análise da técnica de DGGE será realizada de acordo com o método de Muyzer e Smalla (1998). Para a caracterização do gênero das populações, será realizado o sequenciamento do gene RNAr 16S por meio da plataforma Ilumina MiSeq

Referências Bibliográficas

ABIT. Perfil do setor. 2018. Disponível em: <http://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>. Acesso em: 30/01/2019.

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. v. 05, p. 406–414.

Amaral, F.M., Florêncio, L., Kato, M.T., Santa-Cruz, P.A., Gavazza, S., 2017. Hydraulic retention time influence on azo dye and sulfate removal during sequential anaerobic-aerobic treatment of real textile wastewater. Water Sci. Technol. v. 76, p. 3319–3327.

APHA/AWWA/WEF, A.P.H.A., 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed, APHA, American Publ. Health Assoc., Washington D.C., USA.

APHA/AWWA/WEF., 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Standard Methods. American Public Health Association Washington, DC, USA.

Camiloti, P.R.; Mockaitis, G.; Rodrigues J.A.D.; Damianovic, M.H.R.Z.; Foresti, E.; Zaiat, M., 2014. Innovative anaerobic bioreactor with fixed -structure bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. Soc. of Chem. Ind., v.89 p. 1044–1050.

Cervantes, F.J.; Santos, B., 2011. Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: microbiological and biochemical aspects. Environ Sci Biotechnol, v. 10, p. 125–137.

Couto S.R., 2009. Dye removal by immobilized fungi. Biotechnology Advances: v.27, p.227-235.

Forgacs, E.; Cserháti, T.; Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. Environment International, v.30, p. 953-971.

Mockaitis, G.; Pantoja, J.L.R.; Rodrigues J.A.D.; Foresti E.; Zaiat M., 2013. Continuous anaerobic bioreactor with a mixed fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. Bioprocess Biosyst Eng, p. 1-8.

Mohan, S.V.; Reddy, C.N.; Kumar, A.N.; Modestra, J.A., 2013. Relative performance of biofilm configuration over suspended growth operation on azo dye based wastewater treatment in periodic discontinuous batch mode operation. Biores. Technology, v. 147, p. 424-433.

Mostafa, A.; Elsamadony, M.; El-Dissouky, A.; Elhusseiny, A.; Tawfik, A., 2017. Biological H_2 potential harvested from complex gelatinaceous wastewater via attached versus suspended growth culture anaerobes. Bioresource Technology, v.31, p.1-29.

Muyzer, G.; Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek 73, 127–141.

Nübel, U.; Engelen, B.; Felske, A.; Snaidr, J.; Wieshuber, A.; Amann, R.I., Ludwig, W.; Backhaus, H. A., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. Journal of Bacteriology, 178, 5636–5643.

Rai, H.; Bhattacharya, M.; Singh, J.; Bansal, T. K.; Vats, P.; Banerjee, U. C., 2005. Removal of Dyes from the Effluent of Textile and Dyestuff Manufacturing Industry: A Review of Emerging Techniques with Reference to Biological Treatment. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 35, 219-238.

Rasool, K.; Mahmoud, K.A.; Lee, D.S., 2015. Influence of co-substrate on textile wastewater treatment and microbial community changes in the anaerobic biological sulfate reduction process. Journal of Hazardous Materials, v. 299, p. 453-461, 2015.

Ribeiro, R. Influência do tipo de substrato na dinâmica de formação do biofilme em matrizes de espuma de poliuretano., 2001. Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo. p. 221.

Saba, B.; Khalid A.; Nazir, A.; Kanwal, H.; Mahmood, T., 2013. Reactive black-5 azo dye treatment in suspended and attach growth sequencing batch bioreactor using different co-substrates. Internacional Bioteterioration & Biodegradation, v. 85, p. 556-562.

Santos, A.B., Cervantes, F.J., Yaya-Beas, R.E., Van Lier, J.B., 2003. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. Enzyme and Microb. Technol. 33, 942–951.

Santos, A. B.; Cervantes, F.J.; Van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresource Technology, v.98, n.12, p. 2369-2385.

Saratale, R.G.; Saratale, G.D.; Chang, J.S.; Govindwar, S.P., 2011. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. Journal of the Taiwan institute of chemical engineers, v. 42, n. 1, p. 138–157.

Sarayu, K.; Sandhya, S., 2011. Current Technologies for Biological Treatment of Textile Wastewater–A Review. Appl Biochem Biotechnol.

Senan R. C., Abraham T. E., 2004. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic consortium: Aerobic degradation of selected azo dyes by bacterial consortium. Biodegradation, v. 15, n. 4, p. 275-280.

Van der Zee, F. P.; Lettinga, G.; Field J.A., 2001. Azo decolourisation by anaerobic granular sludge. Chemosphere. v. 44, p. 1169–1176.

Van der Zee F. P., 2002. Anaerobic azo dye reduction. PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Verma, P.; Madamwar. D., 2003. Decolorization of Synthetic Dyes by a Newly Isolated Strain of Serratia maerascens. World j. Microbiol. Biotechnol. 19, 615-618.

Wu, J.; Eiteman, M.A.; Law, S.E., 1998. Evaluation of Membrane Filtration and Ozonation. J. Environ. Eng. 124, 272–277.

Zhang F.; Yediler A.; Liang X.; Kettrup A., 2004. Effects of Dye Additives on the Ozonation Process and Oxidation By-Products: A Comparative Study Using Hydrolyzed CI Reactive Red 120,'' Dyes Pigments, v.60, p.1-7.

REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE EFLUENTES DE REATORES UASB VIA NITRIFICAÇÃO SEGUIDA DE DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA

Renata de Bello Solcia Guerrero [1]; Marcelo Zaiat [2]

[1] Pós-doutoranda do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Este trabalho avaliou o processo de nitrificação seguido por desnitrificação autotrófica, utilizando H_2S como doador de elétrons, em dois reatores operados em paralelo, sendo o primeiro horizontal e o segundo vertical, ambos de leito fixo, recheados com espuma de poliuretano. Foram estudados 4 diferentes tempos de detenção hidráulico (TDH) no reator de nitrificação, 6, 8, 10 e 12 h, enquanto que o reator de desnitrificação foi operado com um TDH de 18,9 ± 2,9 h. A alcalinidade fornecida no afluente do reator de nitrificação foi variada entre 219,9 ± 6,0 e 440,2 ± 8,8 mg.L^{-1} $CaCO_3$. E a relação N/S aplicada no reator de desnitrificação foi de 0,21 ± 0,068. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na eficiência de nitrificação (>99 %) variando o TDH e a alcalinidade do afluente. Também foi observada uma alta eficiência de desnitrificação, 93,3 ± 8,4 %, durante todo o período de operação. No entanto, o reator de desnitrificação foi mais afetado com a variação da alcalinidade sendo que o pH caiu de 8,8 para 5,72 e a porcentagem de remoção de H_2S da fase gasosa caiu de 100 para 85 %.*

Introdução

O crescimento das atividades industriais tem aumentado continuamente a produção de águas residuárias contendo compostos nitrogenados (amônio, nitrato e nitrito) e seu lançamento tem aumentado os impactos ambientais pois está associado à eutrofização do ecossistema aquático (Kim et al., 2008; Morita et al., 2008; Sun and Nemati, 2012). Os 3 elementos chaves para o processo de eutrofização são: (1) aumento dos níveis de nutrientes que levam à (2) produção de matéria orgânica particulada e dissolvida, que quando sofre (3) degradação diminui a concentração de oxigênio (Gray et al., 2002). Consequentemente, isso provoca a redução da biodiversidade no ecossistema aquático e a deterioração da qualidade da água. Por esta razão, o estudo de novas tecnologias para remoção de nutrientes de águas residuárias é de extrema necessidade. Associado a isso, um dos grandes desafios atuais de inovação tecnológica é transformar o tratamento de efluentes em potencial recuperação de recursos.

A combinação da nitrificação com a desnitrificação autotrófica utilizando H_2S presente no biogás como doador de elétrons é muito interessante por algumas razões: remove dois contaminantes (N do efluente líquido e S do efluente gasoso) simultaneamente; o efluente oriundo do reator UASB não precisa ter grande quantidade de matéria orgânica disponível para a desnitrificação heterotrófica; além de existir a possibilidade de recuperar enxofre elementar (produto da oxidação parcial do H_2S) que pode se tornar uma fonte renovável para produção de ácido sulfúrico e fertilizantes (Celis-García et al., 2008; Chen et al., 2016; van Lier et al., 2001).

Existem dois grandes obstáculos para viabilizar a recuperação de enxofre elementar: minimizar a rota de conversão do H_2S a sulfato e separar o enxofre elementar coloidal biogênico já que ele forma suspensões estáveis possuindo partículas muito pequenas de difícil separação.

A proposta do presente trabalho foi desenvolver uma nova configuração de reator para o pós-tratamento de efluentes oriundos de reatores UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) para remoção de compostos nitrogenados, além de estudar a viabilidade de recuperar enxofre elementar favorecendo a oxidação parcial do H_2S.

Material e Métodos

Configuração do reator horizontal

O sistema experimental foi composto por dois reatores: um horizontal aeróbio de leito fixo para o processo de nitrificação; e um vertical anóxico para o processo de desnitrificação, ambos recheados com tiras de espuma de poliuretano. Na Figura 1 está apresentado um esquema do sistema experimental. O reator foi alimentado com água residuária sintética simulando efluentes oriundos de reatores UASB.

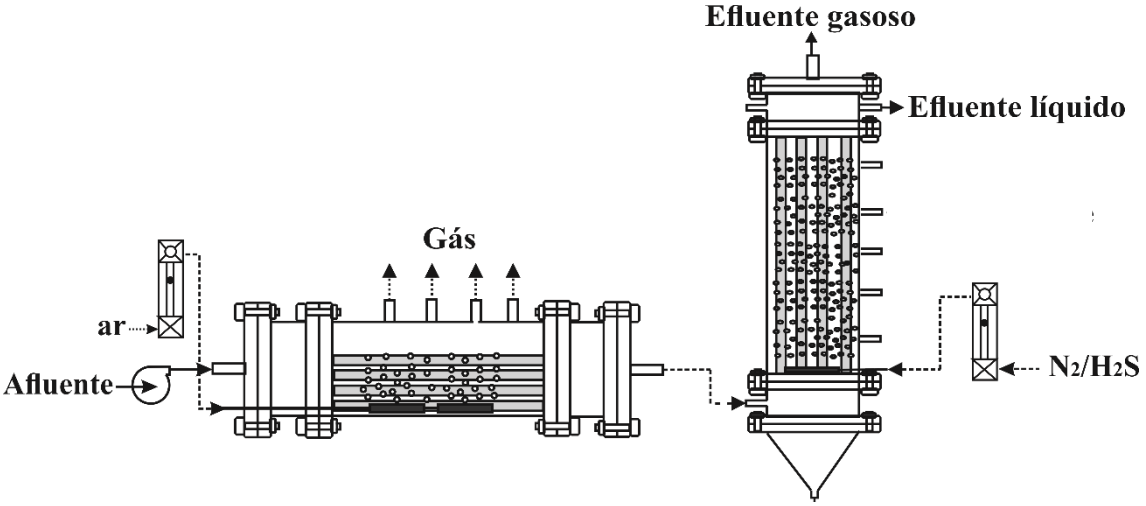


Figura 1: Sistema experimental.

Material suporte

Os reatores foram preenchidos com tiras de espuma de poliuretano pois a mesma apresenta alta porosidade, boa resistência mecânica, resistência à corrosão e já demonstrou ser eficiente para imobilização dos microrganismos. A espuma possui as seguintes características: densidade de 23 $kg.m^{-3}$, porosidade de 95% e tamanho de poro médio de 543 µm.

Inóculo e composição da água residuária sintética

O reator aeróbio (nitrificante) foi inoculado com lodo ativado obtido de uma estação de tratamento de esgoto sanitário e o reator anóxico (desnitrificante) foi inoculado com lodo de um reator UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) para o tratamento de efluentes de um abatedouro de aves.

A composição da água residuária sintética simulou efluentes de reatores UASB que tratam esgoto doméstico e em $mg.L^{-1}$ era: NH_4Cl (153,0); KH_2PO_4 (65,9); NaCl (50,0); $MgCl_2$ $6H_2O$ (1,4); $CaCl_2$ $2H_2O$ (0,9); $NaHCO_3$ (500-1000); Ácido acético (3,7); Ácido isobutírico (1,0); Ácido butírico (0,7); Ácido isovalérico (3,14); Etanol (11,5) (Guerrero and Zaiat, 2018).

Estudo de algumas variáveis operacionais

O reator de nitrificação foi operado por 170 dias e foram estudados quatro diferentes valores de TDH, sendo eles 6, 8, 10 e 12 h. Foram monitorados periodicamente a concentração de amônio, nitrato, nitrito, pH e alcalinidade.

O reator de desnitrificação autotrófica foi operado por 80 dias, com um TDH de 18,9 ± 2,9 h e com uma relação N/S de 0.21 ± 0.068 para favorecer a formação de enxofre elementar. A concentração de nitrato, nitrito, sulfato, sulfeto, pH e alcalinidade foram monitorados periodicamente na fase líquida, além da concentração de H_2S da fase gasosa.

Métodos analíticos

Todas as análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2005). As análises de DQO, amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e sulfetos totais dissolvidos (H_2S, HS^- e S^{2-}) foram realizadas por métodos colorimétricos. As análises de NO_3^- foram realizadas pelo método espectrofotométrico no ultravioleta, e sulfato (SO_4^{2-}) foi medido por um método turbidimétrico. A concentração de H_2S

na fase gasosa foi realizada com um analisador de sulfeto de hidrogênio (RMT-EP, Los Gatos Research, Mountain View, CA). E a alcalinidade foi determinada pelo Método de Kapp (Kapp, 1984).

Resultados e Discussão

Após 8 dias de imobilização (em batelada), o reator de nitrificação foi operado por mais 170 dias em modo contínuo. Com apenas 15 dias de operação contínua, a eficiência de nitrificação alcançou valores superiores a 99% (Figura 2). Foi observada a nitrificação parcial do amônio a nitrito apenas nos primeiros 20 dias de operação, sendo que a concentração máxima de nitrito alcançada foi de 28 $mg.L^{-1}$. Depois desse período a concentração de nitrito no efluente permaneceu abaixo de 0.21 $mg.L^{-1}$.

Os quatro diferentes TDHs estudados (6, 8, 10 e 12 h) não mostraram diferença significativa em termos de eficiência de nitrificação atingindo valores superiores a 99 % (Figura 3). A variação da alcalinidade fornecida no afluente também não afetou a eficiência do reator. A média de pH entre os dias 0 - 69 (440,2 ± 8,8 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$) e 126 - 170 (428,8 ± 10,5 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$) foi de 8,00 no afluente e 8,29 no efluente, e entre os dias 70 e 125 (219,9 ± 6,0 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$) foi de 7,72 no afluente e 7,40 no efluente. É conhecido que o processo de nitrificação consome 7,1 mg $CaCO_3.mg^{-1}$ N, portanto considerando os 40 $mg.L^{-1}$ de $N\text{-}NH_4^+$ do afluente, o consumo de alcalinidade teórico seria de 284 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$. No entanto, o consumo observado foi de 180,9 ± 9,7 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$.

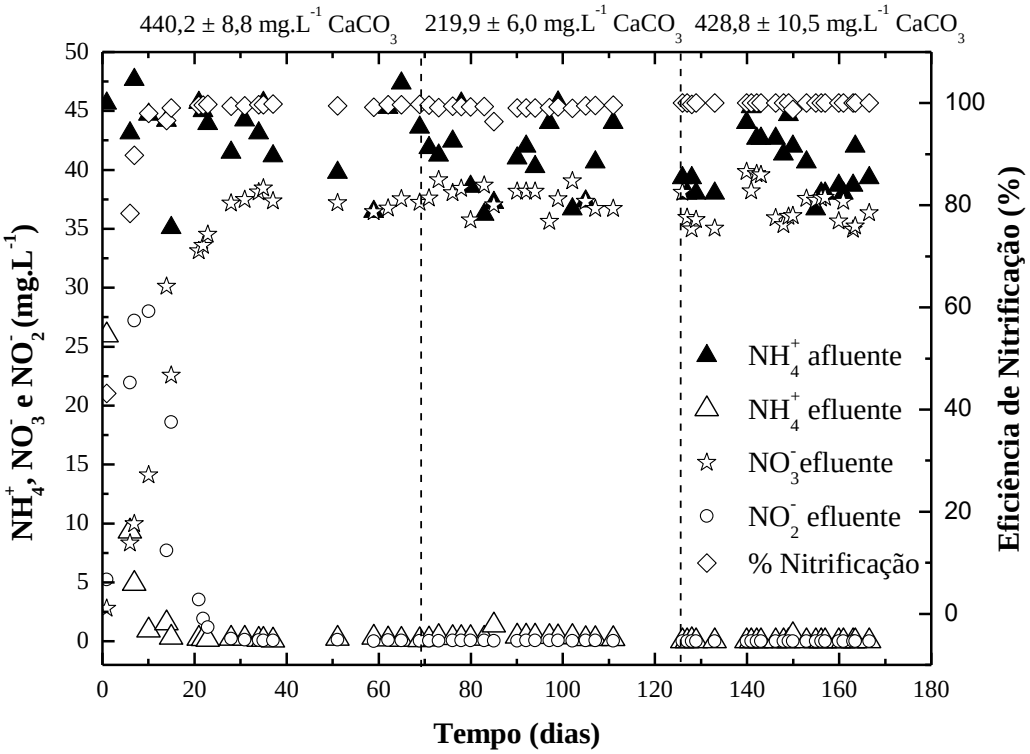


Figura 2: Evolução da concentração de $N\text{-}NH_4^+$; $N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NO_2^-$ e eficiência de nitrificação durante o período de operação do reator de nitrificação. Os valores apresentados acima do gráfico representam a alcalinidade fornecida no afluente naquele período.

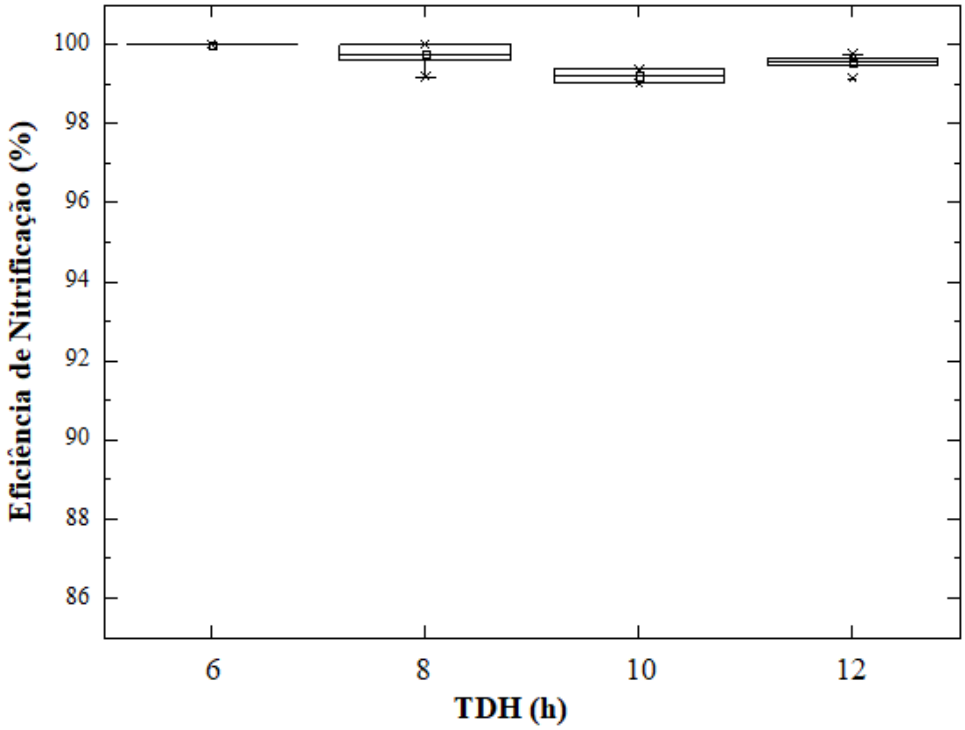


Figura 3: Eficiência de nitrificação em função do TDH aplicado no reator de nitrificação.

O reator de desnitrificação atingiu eficiências superiores a 99 % após 10 dias de operação contínua, sendo que a porcentagem de remoção de H_2S da fase gasosa foi de 100 % desde o início da operação (Figura 4). No entanto, após 50 dias de operação, a porcentagem de remoção de H_2S da fase gasosa caiu para 60 % e a concentração de sulfeto dissolvido no meio líquido aumentou para 7,3 $mg.L^{-1}$. A alimentação de H_2S no sistema foi cessada por alguns dias considerando o efeito inibitório do sulfeto para os microrganismos oxidantes de enxofre. Na Figura 5 é possível ver que nesse mesmo período a concentração de nitrato aumentou, alcançando aproximandamente 35 $mg.L^{-1}$.

A média da razão N/S aplicada no reator durante o período de operação foi de 0,21 ± 0,068. No entanto, o balanço de massa de enxofre demonstrou que apesar da relação N/S estar adequada para favorecer a formação de enxofre elementar (N/S<0,4), a oxidação do H_2S foi predominantemente a sulfato. Considerando a concentração de $N\text{-}NO_3^-$ alimentado no reator, a concentração teórica de sulfato gerada pela oxidação completa do sulfeto seria de 129,1 ± 47,8 $mg.L^{-1}$ enquanto que a concentração medida foi de 151.8 ± 48.8 mg L^{-1}. Uma hipótese pra explicar isso seria a presença de O_2 no reator. As possíveis fontes de O_2 seriam: 1) do nitrogênio gasoso (industrial) utilizado como gás de arraste na geração de H_2S e, 2) do efluente proveniente do processo de nitrificação que sai saturado em O_2. Segundo as equações [1], [2], [3] e [4] (Beristain-Cardoso et al., 2006; McComas et al., 2001)(Beristain-Cardoso et al., 2006), a oxidação aeróbia do sulfeto é termodinamicamente mais favorável do que a oxidação utilizando nitrato como aceptor final de elétrons.

$$H_2S + 0{,}5\ O_2 \rightarrow S^0 + H_2O \qquad \Delta G^0 = -209{,}4\ kJ \qquad [1]$$

$$H_2S + 2\ O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2\ H^+ \qquad \Delta G^0 = -798{,}2\ kJ \qquad [2]$$

$$S^{2-} + 1{,}6\ NO_3^- + 1{,}6\ H^+ \rightarrow SO_4^{2-} + 0{,}8\ N_2 + 0{,}8\ H_2O \qquad \Delta G^0 = -743{,}9\ kJ \qquad [3]$$

$$S^{2-} + 0{,}4\ NO_3^- + 2{,}4\ H^+ \rightarrow S^0 + 0{,}2\ N_2 + 1{,}2\ H_2O \qquad \Delta G^0 = -191{,}0\ kJ \qquad [4]$$

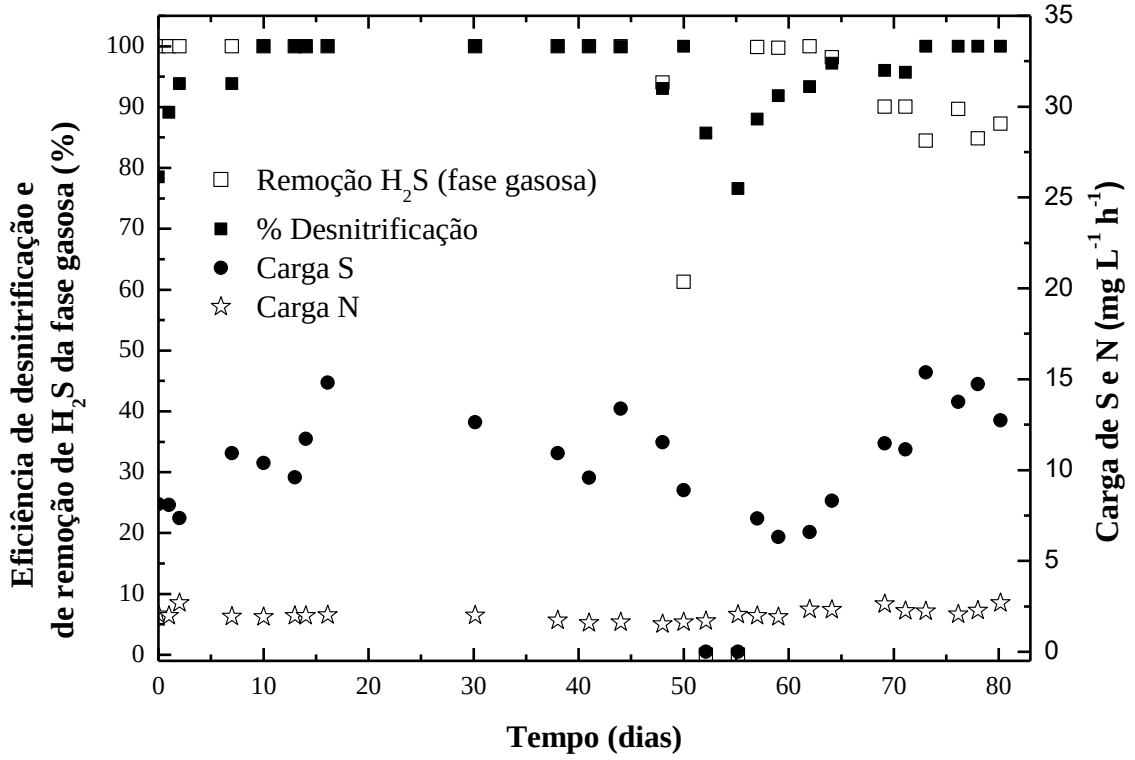


Figura 4: Evolução da eficiência de desnitrificação, eficiência de remoção de H_2S da fase gasosa e carga de nitrogênio e H_2S aplicada no reator durante o período de operação do reator de desnitrificação autotrófica.

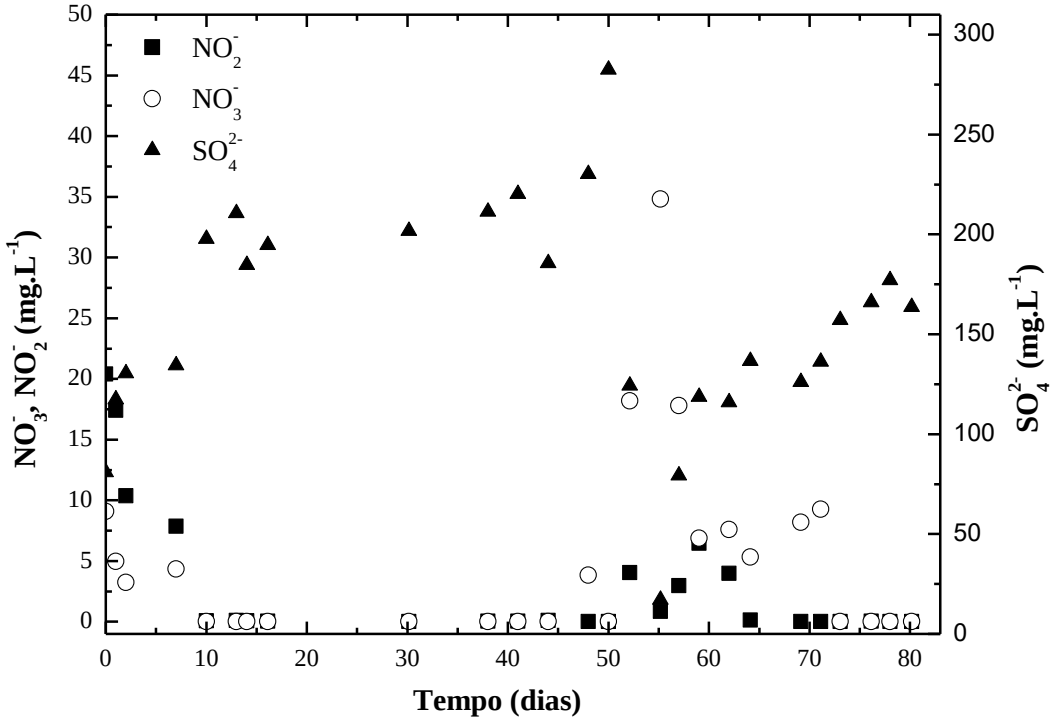


Figura 5: Evolução da concentração de $N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NO_2^-$ e SO_4^{2-} durante o período de operação do reator de desnitrificação autotrófica.

Outro dado importante que é possível observar comparando as Figuras 4 e 6 é o efeito da alcalinidade no desempenho do reator de desnitrificação. Com a diminuição da alcalinidade após o dia 50, praticamente toda a alcalinidade disponível no afluente foi consumida durante a

nitrificação e consequentemente o pH do efluente do reator de desnitrificação caiu drasticamente de 8,8 para 5,72. Como resultado, a porcentagem de remoção do H_2S da fase gasosa caiu de 100 para 85 %. Isto porque segundo a equação [5] (Zhang et al., 2008), em valores de pH inferiores a 7,04, a espécie majoritária é o H_2S, ou seja, em pH inferior a 7,0, a solubilidade do H_2S na fase aquosa é reduzida, dificultando a transferência de massa do mesmo da fase gasosa para a fase líquida.

$$H_2S \leftrightarrow H^+ + HS^- \qquad pKa1 \approx 7,04 \qquad [5]$$

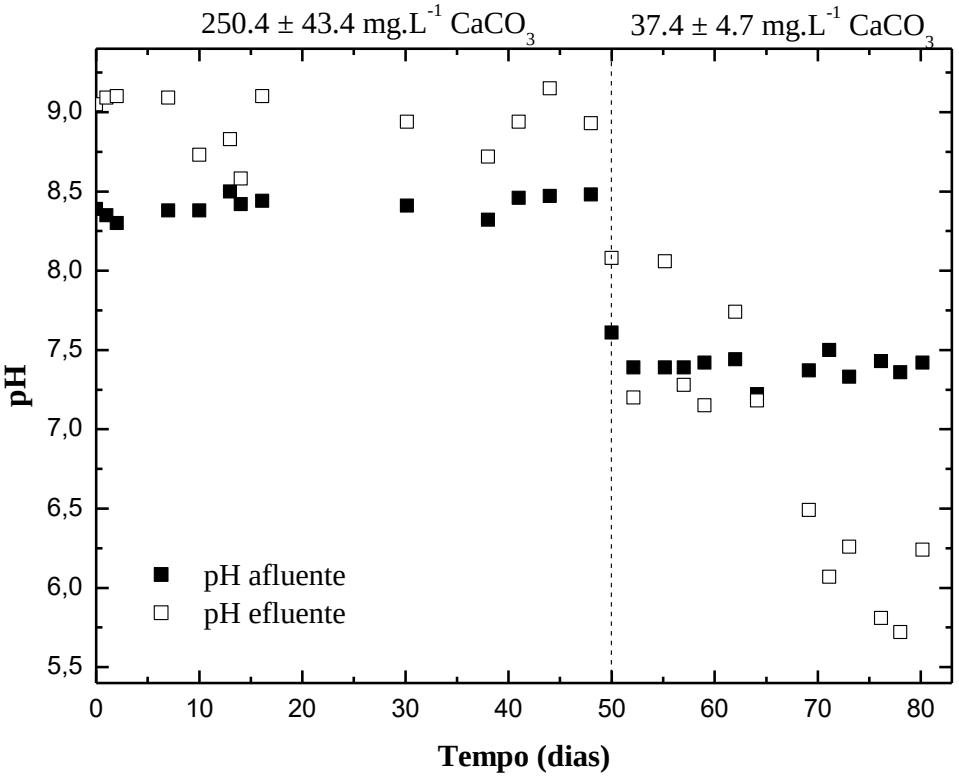


Figura 6: Evolução do pH afluente e efluente durante o período de operação do reator de desnitrificação autotrófica.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. Fernández et al. (2014) observou uma alta eficiência de remoção de H_2S em um biofiltro percolador em valores de pH entre 7,3 e 7,5, enquanto que instabilidades foram observadas em valores entre 6,8 e 7,0, e baixas eficiências foram obtidas em pH 6,5. Solcia et al. (2014) observou eficiências ótimas entre pH 7,6 e 8,5.

Conclusões

A proposta de configuração de reatores apresentada neste trabalho, que acopla um reator horizontal de nitrificação e um vertical anóxico de desnitrificação autotrófica mostrou ser muito eficiente para o pós-tratamento de águas residuárias oriundas de reatores UASB, para remoção de nitrogênio e para a remoção simultânea do H_2S presente em efluentes gasosos. No entanto, a produção de enxofre elementar não foi favorecida provavelmente devido à presença de oxigênio que favoreceu a oxidação completa do sulfeto a sulfato. Será necessário realizar ensaios com controle rigoroso da concentração de oxigênio na fase gasosa e na fase líquida.

Referências Bibliográficas

APHA/AWWA/WEF, 2005. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21st ed. ed. American Public Health Association, Washington D.C.

Beristain-Cardoso, R., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E.R., Gómez, J., Field, J.A., 2006. Sulfide Oxidation under Chemolithoautotrophic Denitrifying Conditions. Biotechnol. Bioeng. 95, 1148–1157.

Celis-García, L.B., González-Blanco, G., Meraz, M., 2008. Removal of sulfur inorganic compounds by a biofilm of sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a down-flow fluidized bed reactor. J. Chem. Technol. Biotechnol. 83, 260–268.

Chen, F., Yuan, Y., Chen, C., Zhao, Y., Tan, W., Huang, C., Xu, X., Wang, A., 2016. Investigation of colloidal biogenic sulfur flocculation: Optimization using response surface analysis. J. Environ. Sci. (China) 42, 227–235.

Fernández, M., Ramírez, M., Gómez, J.M., Cantero, D., 2014. Biogas biodesulfurization in an anoxic biotrickling filter packed with open-pore polyurethane foam. J. Hazard. Mater. 264, 529–535.

Gray, J.S., Wu, R.S., Or, Y.Y., 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. Mar. Ecol. Prog. Ser. 238, 249–279.

Guerrero, R.B.S., Zaiat, M., 2018. Wastewater post-treatment for simultaneous ammonium removal and elemental sulfur recovery using a novel horizontal mixed aerobic-anoxic fixed-bed reactor configuration. J. Environ. Manage. 215, 358–365.

Kapp, H., 1984. Schlammfaulung mit hohem Feststoffgehalt (Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft), Band 86. Oldenbourg Verlag, Munchen.

Kim, Y.M., Park, D., Lee, D.S., Park, J.M., 2008. Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. J. Hazard. Mater. 152, 915–921.

McComas, C., Sublette, K.L., Jenneman, G., Bala, G., 2001. Characterization of a novel biocatalyst system for sulfide oxidation. Biotechnol. Prog. 17, 439–446.

Morita, M., Uemoto, H., Watanabe, A., 2008. Nitrogen-removal bioreactor capable of simultaneous nitrification and denitrification for application to industrial wastewater treatment. Biochem. Eng. J. 41, 59–66.

Solcia, R.B., Ramírez, M., Fernández, M., Cantero, D., Bevilaqua, D., 2014. Hydrogen sulphide removal from air by biotrickling filter using open-pore polyurethane foam as a carrier. Biochem. Eng. J. 84, 1–8.

Sun, Y., Nemati, M., 2012. Evaluation of sulfur-based autotrophic denitrification and denitritation for biological removal of nitrate and nitrite from contaminated waters. Bioresour. Technol. 114, 207–216.

van Lier, J.B., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Pol, L.W., Lens, P., Verstraete, W., 2001. New perspectives in anaerobic digestion. Water Sci. Technol. 43, 1–18.

Zhang, L., De Schryver, P., De Gusseme, B., De Muynck, W., Boon, N., Verstraete, W., 2008. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: A review. Water Res. 42, 1–12.

EFEITO DAS TAXAS DE RECIRCULAÇÃO E DAS CARGAS ORGÂNICAS NOS GRÂNULOS DA MANTA DE LODO DE REATORES UASB UTILIZADOS NO PROCESSAMENTO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Inaê Alves[1]; Valéria Del Nery[2]; Eduardo C. Pires[3]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Quatro reatores UASB, escala piloto, foram utilizados para o processamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar. Os reatores foram submetidos à diferentes taxas de recirculação (50, 100, 200 e 400%) e ao aumento gradativo da carga orgânica volumétrica (COV) de 0,3 a 20 gDQO.L^{-1}.d^{-1}. Foram estudadas a distribuição de tamanho e resistência dos grânulos, a estrutura microbiana por microscopia de contraste de fase e fluorescência e por microscopia eletrônica de varredura e a diversidade populacional por PCR e DGGE. As mudanças operacionais não prejudicaram a eficiência global dos sistemas. Observou-se redução do diâmetro granular e acúmulo de manganês, magnésio, sódio e potássio em todos os reatores. Nos reatores com 50 e 100% de recirculação, mais cocos foram observados e Methanosaetas pareceram diminuir com o incremento da COV de 10 para 20 gDQO.L^{-1}.d^{-1}. Nos reatores com 200 e 400% de recirculação, arqueias metanogênicas pareceram predominar e o incremento de COV de 10 para 20 gDQO.L^{-1}.d^{-1} favoreceu as Methanosaetas. O índice de similaridade das populações de arqueias foi maior e menos variável, com mínimo de 48%. As populações de bactérias, no entanto, apresentaram índices de similaridade mais variáveis e geralmente menores que os das arqueias, entre 18 e 88%.*

Introdução

A produção crescente de álcool e do resíduo gerado (vinhaça) em grande volume no Brasil e no mundo, associada à preocupação com a disposição inadequada desse resíduo no meio ambiente, são incentivos para mais estudos e investimentos em tecnologias de tratamento.

O potencial de aplicação dos reatores UASB no tratamento de vinhaça vem sendo explorado. No entanto, o que se observa nas pesquisas realizadas são reatores funcionando sob tempo de operação curto e sem análise da biomassa, que é a responsável pela biodigestão da carga orgânica e pela produção de biogás. Estudos prolongados dos reatores com analises da manta de lodo e da eficiência dos reatores são imprescindíveis, pois o tempo de exposição delongado da biomassa à vinhaça pode proporcionar modificações de suas características e acúmulo de elementos, causando mineralização do lodo e inibição da biomassa devido a determinadas substâncias presentes em excesso na vinhaça.

As análises da manta de lodo dos reatores UASB são fundamentais para compreender o funcionamento desses sistemas de tratamento e, assim, possibilitar a manutenção da biomassa ativa nos reatores. O monitoramento com análises na manta de lodo, principalmente análises físicas, como tamanho de grânulos e série de sólidos, para a determinação da concentração de biomassa e avaliação da mineralização do lodo, são análises simples e de baixo custo que podem antecipar futuros problemas nos digestores anaeróbios. As análises químicas são importantes para a avaliação dos elementos que podem estar acumulando na manta de lodo e seus efeitos na biomassa.

O monitoramento da biomassa em associação com as análises de eficiência de remoção de carga orgânica e de produção de biogás é ferramenta eficaz e necessária para avaliação momentânea dos reatores e para a previsão de possíveis problemas nos digestores anaeróbios. Ademais, as análises microbiológicas, embora não sejam de baixo custo e de resposta rápida, auxiliam no entendimento dos possíveis efeitos observados nos sistemas de tratamento.

Material e Métodos

Esta pesquisa foi dividida em cinco etapas principais, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.

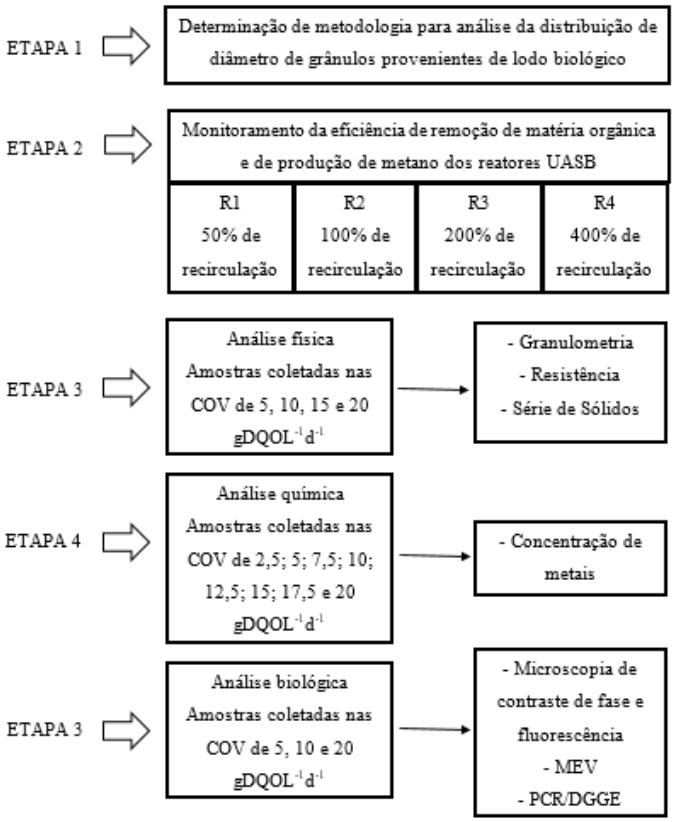


Figura 1: Fluxograma das etapas de trabalho.

Reator UASB

Foram utilizados no estudo quatro reatores do tipo UASB, reatores R1, R2, R3 e R4, em escala piloto, para processamento da vinhaça de destilaria de álcool da cana-de-açúcar. Os reatores (Figura 2) foram construídos em coluna de PVC com altura total de 4 m, diâmetro interno de 19,5 cm e capacidade de aproximadamente 120 L, equipado com separador trifásico modificado e provido de dispositivo de recirculação.

A coleta das amostras da manta de lodo para as análises realizadas nas etapas 3, 4 e 5 (Figura 1) era feita uma semana depois dos reatores atingirem as cargas estabelecidas para coleta. O lodo era retirado de cinco pontos do perfil vertical da área reacional (área inoculada com lodo anaeróbio) (Figura 2). Coletava-se um litro de amostra composta, sendo 200 mL de cada um dos cinco pontos de amostragem. A retirada era feita de cima (ponto 5) para baixo (ponto 1) devido à reacomodação das partículas de lodo. Da amostra composta homogeneizada, retirava-se a alíquota para as análises.

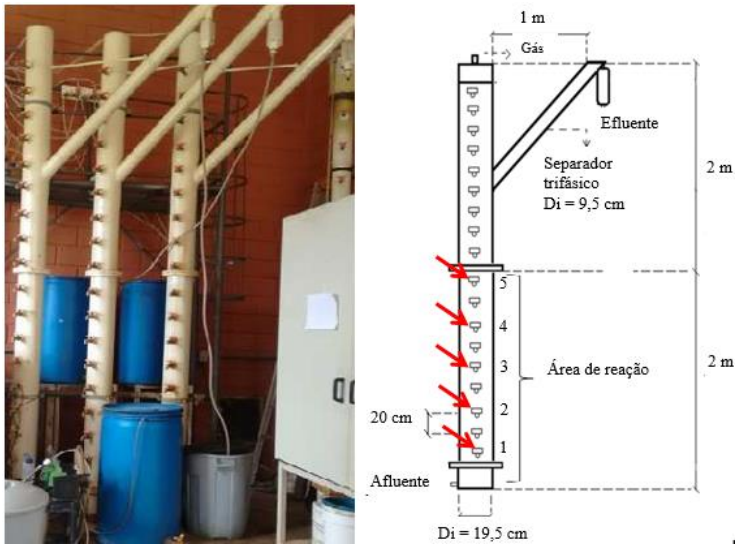


Figura 2: Esquema do reator do tipo UASB.

Inóculo

Os reatores foram inoculados uma única vez com 60 L de lodo proveniente de reator UASB, tratando resíduo do abatedouro de aves Rosaves, localizado em Pereira, São Paulo. Não foi realizado nenhum tipo de tratamento no lodo.

Água residuária

A vinhaça utilizada foi coletada na Usina Rio Pardo, Cerqueira César-SP. Esta vinhaça era concentrada por evaporação na indústria. Sua carga orgânica, portanto, era elevada e variava entre 180 a 200 $gDQO.L^{-1}$, necessitando de diluição antes de sua utilização. A concentração de alimentação estabelecida foi de aproximadamente 20 $gDQO.L^{-1}$.

Variação dos parâmetros operacionais

As taxas hidráulicas e cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas aos reatores UASB foram escalonadas e crescentes, visando, principalmente, à adaptação do lodo anaeróbio à vinhaça e à verificação do potencial de redução da matéria orgânica e de geração de metano. Os reatores diferiram entre si da seguinte maneira: R1 teve recirculação de 50%; R2, recirculação de 100%; R3, recirculação de 200%; e R4, recirculação de 400%. A COV variou de 0,3 a 20 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$. O aumento da carga orgânica ocorreu com o aumento da vazão de vinhaça, que apresentou concentração de matéria orgânica, em termos de DQO, constante (20 $g.L^{-1}$). Na Tabela 1 estão apresentadas as vazões, taxas de recirculação e cargas orgânicas aplicadas ao lodo.

Tabela 1: Variação dos parâmetros operacionais.

Reator	Vazão da vinhaça ($L.d^{-1}$)	Recirculação (%)	Vazão total ($L.d^{-1}$)	COV ($gDQO.L^{-1}.d^{-1}$)	Velocidade ascensional ($m.h^{-1}$)	Tempo de operação (dias)
R1	1-60	50	1,5 – 90	0,3-20	0,002 - 0,125	285
R2	1-60	100	2 – 120	0,3-20	0,003 - 0,167	372
R3	1-60	200	3 – 180	0,3-20	0,004 - 0,250	617
R4	1-60	400	5 – 300	0,3 – 20	0,007 - 0,417	727

A temperatura média de operação dos reatores foi 22 ± 3°C. No inverno foi colocado aquecedor ambiente próximo aos reatores para evitar oscilações bruscas de temperatura. O

tempo de operação dos reatores foram relativamente longos, chegando a 727 dias para o reator R4 (Tabela 1). O tempo de observação prolongado é fator importante a ser considerado, pois esse parâmetro pode alterar muitas características da manta de lodo. Além disso, o maior tempo de operação permite uma análise mais consistente dos dados observados.

Análise da eficiência global dos reatores UASB

O aumento de COV e de vazão somente foram efetivadas quando os reatores se encontravam estáveis, com remoção de carga orgânica superior a 80% e conteúdo de metano no biogás acima de 60%, por período mínimo de sete dias.

As análises de DQO foram realizadas de acordo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* APHA/AWWA/WEF (2005). O volume de gás produzido foi mensurado com medidor Ritter Drum-type Gas Meter TG05/5. A faixa de vazão de medição é de 1 a 60 $L.h^{-1}$. A avaliação da composição do biogás foi feita por cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo Shimadzu (modelo GC 2014), com detector térmico de condutividade e coluna HP-PLOT (30m x 0,53mm).

Granulometria e resistência dos grânulos

As amostras de lodo para realização das análises de granulometria e resistência foram coletadas nas COV de 5, 10, 15 e 20 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$. A granulometria foi realizada de acordo com Alves et al. (2018). No teste de resistência, os grânulos foram agitados com gradiente de velocidade de 770 s^{-1}, durante 60 minutos em *Jar Test*. A análise qualitativa da resistência foi realizada através da comparação das dimensões dos grânulos antes e depois de serem submetidos a agitação, segundo metodologia proposta por Alves (2015). Nesta metodologia, os grânulos são considerados resistentes quando, apesar da agitação, mantêm a estrutura granular, podendo apresentar ou não redução do diâmetro dos grânulos.

Mineralização do lodo

As amostras de lodo para realização das análises de sólidos foram coletadas nas COV de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15, 17,5 e 20 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$. O conteúdo mineral foi mensurado pela relação de sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais (ST). A determinação dos STF e dos ST foi feita de acordo com *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* APHA/AWWA/WEF 2005.

Análise química da manta de lodo

As amostras de lodo para realização das análises químicas foram coletadas nas COV de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15, 17,5 e 20 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$. Os metais determinados foram zinco, chumbo, cádmio, níquel, ferro, manganês, cobre, cromo total, cálcio, magnésio, sódio, potássio. A análise foi realizada por absorção atômica, através das cinzas do lodo anaeróbio (obtidas por ignição em mufla de 450º C) dissolvidas em ácidos.

Análise da morfologia e disposição espacial microbiana

As amostras de lodo para realização das análises da morfologia e da disposição espacial microbiana foram coletadas nas COV de 10 e 20 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$. A disposição espacial microbiana foi investigada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, foi utilizado o Microscópio FEG (*Field Emission Gun*), modelo SIGMA, fabricante ZEISS. A morfologia microbiana foi analisada por observação sob microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência. O microscópio utilizado foi o Olympus BX60, com câmera acoplada para aquisição da imagem.

Diversidade microbiana por PCR e DGGE

As amostras de lodo para realização das análises da diversidade microbiana foram coletadas nas COV 5, 10 e 20 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$. Os padrões de bandas de DGGE foram

analisados utilizando *software* BioNumerics V.2.5, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, e método de aglomeração UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) para a construção do dendrograma. A diversidade microbiana foi analisada pelo índice de diversidade de Shannon (H).

Resultado e Discussão

Análise da eficiência global dos reatores

A COV removida representou mais de 80% da COV aplicada, sugerindo, portanto, que a recirculação do efluente, independente da taxa, foi positiva para o desempenho dos reatores. A recirculação incrementou a velocidade ascensional, melhorando o transporte de massa no interior dos grânulos, a eficiência da degradação anaeróbia, além de contribuir com o desprendimento do biogás dos grânulos e com a diluição da vinhaça, reduzindo os efeitos negativos da elevada concentração de matéria orgânica e da presença de substâncias inibidoras do processo anaeróbio.

A eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 2**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) e os resultados da composição do biogás dos reatores (Tabela 3) e do rendimento de metano (Tabela 4) mostram que as alterações da composição de sólidos e metais na manta de lodo dos reatores, causados pelo incremento de vinhaça, não foram prejudiciais às populações metanogênicas.

Tabela 2: Variação da DQO bruta e filtrada da vinhaça e dos reatores e da eficiência de remoção de DQO em relação à DQO bruta e filtrada.

Parâmetros	Vinhaça	R1	R2	*R3	R4
DQO bruta ($g.L^{-1}$)	19,4±2,5	3,0±1,3	2,8±1,7	2,5±1,2	2,1±1,2
DQO solúvel ($g.L^{-1}$)	15,2±2,0	1,6±0,5	1,4±0,6	1,5±0,7	1,2±0,7
Efic. de rem. bruta (%)		85±5	85±8	87±5	89 ±7
Efic. de rem. solúvel (%)		90±4	91±4	90±3	92±5

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

Tabela 3: Porcentagem de metano nos gases dos reatores R1, R2, R3 e R4**.**

Reator	Metano (%)
R1 (50% de recirculação)	66,7±0,05
R2 (100% de recirculação)	64,7±4,27
* R3 (200% de recirculação)	68,8±7,14
R4 (400% de recirculação)	69,7±8,36

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

Tabela 4: Rendimento de metano em R1, R2, R3 e R4 comparado com o rendimento teórico.

Reator	Rendimento real ($LCH_4.gDQO^{-1}$ $_{removida}$)	Rendimento teórico ($LCH_4.gDQO^{-1}$ $_{removida}$)	Taxa (%)
R1	0,344±0,064	0,395±0,001	87
R2	0,302±0,070	0,393±0,003	77
* R3	0,299±0,066	0,391±0,004	76
R4	0,289±0,060	0,391±0,004	74

* Dado publicado (Del Nery et al. 2018)

A porcentagem de metano no biogás foi superior a 60%. As taxas de rendimento de metano nos reatores, em relação aos valores teóricos, variaram de 74 a 87%. Os resultados indicaram que a população microbiana presente no reator estava em equilíbrio e ativa e que não houve toxicidade a metais para a população metanogênica.

Granulometria e resistência dos grânulos

Os grânulos analisados apresentaram diâmetro variando entre 0,4 e 5,0 mm em todas as amostras. Os reatores submetidos às porcentagens de recirculação mais elevadas (R3 com 200% e R4 com 400%) apresentaram, na COV 5 $gDQOL^{-1}d^{-1}$, maior frequência de grânulos na faixa entre 1,6 e 2,0 mm de diâmetro, com 39,4 e 37% de frequência, respectivamente. O aumento gradativo de carga orgânica e velocidade ascensional gerou redução do diâmetro granular para a menor faixa estabelecida, 0,4 a 1,0 mm. Na COV 20 $gDQOL^{-1}d^{-1}$, R3 e R4 apresentaram 63,6 e 79,1% de grânulos com diâmetro médio na faixa 0,4 a 1,0 mm, respectivamente. Os reatores submetidos às porcentagens de recirculação menores (R1 com 50% e R2 com 100%) apresentaram maior frequência de diâmetro médio de grânulos na menor faixa estabelecida (0,4 a 1,0 mm) em todas as fases analisadas. O incremento gradativo de carga orgânica de 0,3 até 20 $gDQOL^{-1}d^{-1}$ e velocidade ascensional ocasionou aumento da frequência de grânulos na menor faixa de diâmetro: R1 passou de 47,8 para 87,9% e R2, de 39,4 para 52,1%.

A diluição baixa da vinhaça em R1 e a elevada velocidade ascensional em R4 causaram alteração mais abrupta no tamanho dos grânulos, em relação aos grânulos dos reatores R2 e R3. Na última fase analisada (COV de 20 $gDQOL^{-1}d^{-1}$), os reatores R1 e R4 apresentaram 87,9 e 79,1% dos grânulos com diâmetros entre 0,4 e 1 mm (menor faixa estabelecida), respectivamente; enquanto que em R2 e R3, foi de 52,1 e 63,6%, respectivamente. Diante do analisado, concluiu-se que a menor recirculação (50%) e a maior (400%) influenciaram mais significativamente a redução da dimensão granular que as recirculações intermediárias, 100 e 200%. Estatisticamente, a recirculação de 100% foi a que menos causou alterações significativas do diâmetro granular, considerando todo o período de operação.

A agitação de 770 s^{-1} aplicada às amostras reforçou que a agitação hidráulica dentro do reator, que pode ser causada por mecanismos diferentes, como vazão hidráulica e vazão de biogás, causou redução no diâmetro granular. Nas amostras dos reatores R3 e R4 submetidos a COV 5 $gDQOL^{-1}d^{-1}$, a agitação fez com que a maior frequência de grânulos passasse a apresentar diâmetro médio entre 0,4 e 1,0 mm, com 44,8 e 46,2%, respectivamente. Nas demais cargas, 10, 15 e 20 $gDQOL^{-1}d^{-1}$, observou-se tendência a diminuição da frequência de grânulos na faixa de 0,4 a 1,0 mm. A diminuição notada ocorreu devido à redução do diâmetro dos grânulos pequenos (0,4 a 1,0 mm) a tamanhos que não puderam ser contabilizados (<0,4 mm).

Observou-se que após agitação ocorreu alteração no montante de partículas. Em alguns casos ocorreu aumento da quantidade de grânulos presentes nas amostras após agitação, quando comparado ao número de grânulos nas amostras antes da agitação. Em outros casos, o número de grânulos na amostra diminuiu. Esse comportamento evidenciou que a agitação de fato causou modificação nos grânulos avaliados. O aumento do número de partículas nas amostras após agitação se deu pela quebra dos grânulos maiores em partículas menores, elevando o montante final de grânulos; e a redução ocorreu devido ao fato das partículas menores que 0,4 mm não serem contabilizadas, devido à limitação do método.

Apesar de terem ocorrido mudanças no tamanho das partículas após a agitação aplicada (teste de resistência), a estrutura granular se manteve, evidenciando que os grânulos analisados eram resistentes, apesar da redução dos diâmetros.

Mineralização do lodo

Por meio da relação de STF/ST foi possível mensurar a mineralização do lodo no decorrer da operação dos reatores. A relação STF/ST do inóculo era 0,17. Esse valor aumentou consideravelmente nos sistemas, quando os reatores passaram a ser submetidos à vinhaça de cana-de-açúcar. Em R1, a relação variou de 0,32 a 0,49; em R2 de 0,27 a 0,60; em R3, de 0,25 a 0,54; e em R4 de 0,30 a 0,52.

Em termos de tratamento, sabe-se que a estabilidade da biomassa é o fator determinante. No entanto, o aumento da mineralização no lodo dos reatores pode ter contribuído para a resistência da estrutura granular e, dessa forma, ter colaborado para a eficiência do tratamento, já que estruturas consolidadas em grânulos auxiliam no sintrofismo microbiano.

Análise química da manta de lodo

Em relação ao inóculo verificou-se aumento da concentração de manganês, magnésio, sódio e potássio no lodo dos reatores, com o tempo de operação devido ao aporte desses elementos contidos na água residuária (Tabela 5), cuja concentração de manganês, magnésio, potássio e sódio era 4,7 ± 1,7 $mg.L^{-1}$, 254 ± 76 $mg.L^{-1}$, 1625 ± 600 $mg.L^{-1}$ e 23 ± 6 $mg.L^{-1}$, respectivamente. A adição de bicarbonato de sódio para tamponamento dos sistemas contribuiu para o aumento do conteúdo de sódio na manta de lodo. A quantidade adicionada foi reduzida gradativamente de 1 a 0,125 g $NaHCO_3$ $gDQO^{-1}L^{-1}$.

Observou-se que ocorreu diminuição da concentração de cobre, em relação ao inóculo (1689 $mg.kg^{-1}$), nas fases analisadas. O cobre foi sendo liberado dos grânulos gradualmente, apresentando redução de percentual entre 54 e 72% ao final do período operacional. O conteúdo de cromo foi significativamente alterado na manta de lodo do reator R1, reduzindo de 34,5 $mgKg^{-1}$ (inóculo) para 2 $mgKg^{-1}$ (Tabela 5). Cobre e cromo apareceram em concentrações baixas na vinhaça de alimentação: 0,25 ± 0,08 e 0,07 ± 0,06 mgL^{-1}, respectivamente.

O ferro, presente em expressiva quantidade na alimentação dos reatores (43,50 ± 24,31 mgL^{-1}), não acumulou na manta de lodo, mantendo-se com variação relativamente constante do decorrer da operação: entre 9910 e 14740 $mgKg^{-1}$, 8610 e 15410 $mgKg^{-1}$, 10610 e 13820 $mgKg^{-1}$, 12150 e 18610 $mgKg^{-1}$ para R1, R2, R3 e R4, respectivamente (Tabela 5). A variação da concentração de cálcio na manta de lodo dos reatores R2, R3 e R4 (Tabela 5) foi relacionada com a elevada alteração do conteúdo de cálcio na vinhaça de alimentação, 527 ± 222 mgL^{-1}, que pode ser notada pelo desvio padrão.

Tabela 5: Variação da concentração dos elementos químicos na manta de lodo durante o período operacional dos reatores

Metais	Inóculo	Valores mínimos e máximos			
		R1	R2	R3	R4
Manganês $mg.kg^{-1}$	131	199 e 295	140 e 475	194 e 509	245 e 503
Magnésio $mg.kg^{-1}$	1913	6590 e 9260	3692 e 12400	4760 e 12140	4080 e 10000
Sódio $mg.kg^{-1}$	9000	21500 e 37100	18400 e 62500	11500 e 41200	9500 e 33500
Potássio $mg.kg^{-1}$	3040	40800 e 52000	17800 e 47600	23200 e 34600	17000 e 27200
Cobre $mg.kg^{-1}$	1689	Reduziu até 472	Reduziu até 765	Reduziu até 544	Reduziu até 704
Cromo $mg.kg^{-1}$	34	Reduziu até 19	23 e 47	14 e 36	Reduziu até 2
Ferro $mg.kg^{-1}$	13718	9910 e 14740	8610 e 15410	10610 e 13820	12150 e 18610
Cálcio	13400	7100 e 1330	9600 e 60700	10300 e 90300	19400 e 44400

mg.kg^{-1}

Embora a caracterização da manta de lodo dos reatores tenha apresentado alterações, como o aumento na concentração de alguns minerais, com o incremento crescente de COV e de velocidade ascensional, verificou-se que não ocorreu prejuízo ao desempenho dos sistemas. O descarte de sólidos não foi necessário. Todos os reatores apresentaram boa performance quanto à remoção de matéria orgânica e produção de metano. Os resultados mostraram que após adaptação, lenta e gradual, da biomassa aos constituintes da vinhaça, os produtos e elementos químicos presentes não apresentaram efeito deletério na composição granular e no consequente desempenho dos reatores.

Análise da morfologia e disposição espacial microbiana

Em todos os reatores, observaram-se organismos metanogênicos dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, grupos importantes na produção de metano por meio do acetato. No reator R1, com menor taxa de recirculação, reduziu-se aparentemente a densidade de *Methanosaeta* com o incremento da COV de 10 para 20 gDQOL^{-1}d^{-1}. Mais cocos foram visualizados nas amostras de grânulos desse reator submetido a maior COV. No reator R2, nas duas fases analisadas, poucas células de *Methanosaeta* foram visualizadas. Os bacilos, por sua vez, apareceram nitidamente no reator R2 na fase com maior COV (20 gDQOL^{-1}d^{-1}). Nos reatores com maior taxa de recirculação, R3 e R4, arqueias metanogênicas predominaram em relação as bactérias nas duas cargas analisadas (10 e 20 gDQOL^{-1}d^{-1}). O incremento de COV de 10 para 20 gDQOL^{-1}d^{-1} favoreceu as células de *Methanosaeta*.

Diversidade microbiana por PCR e DGGE

Observou-se comportamento diferente entre as populações de arqueias e de bactérias. O índice de similaridade das populações de arqueias, analisando o efeito da recirculação e da COV, foi maior e menos variável, com mínimo de 48% (Figura 3 e Figura 4). As populações de bactérias, no entanto, apresentaram índices de similaridade mais variáveis e geralmente menores que os das arqueias, entre 18 e 88% % (Figura 5 e Figura 6). Observou-se também que a maior recirculação (400%) provocou maior instabilidade para as populações de bactérias e arqueias.

As eficiências de remoção de matéria orgânica e de produção de metano foram satisfatórias para todos os reatores, inclusive o de maior recirculação, mas observou-se por meio das análises de microbiologia que o reator submetido a 400% de recirculação foi mais instável, sugerindo que recirculações menores que 400% são opções adequadas para manutenção da biomassa.

De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que o incremento da carga orgânica e hidráulica proporcionou mudanças nas populações de arqueias e principalmente de bactérias. A maior instabilidade das populações de bactérias esteve relacionada com seu papel na digestão anaeróbia. Por serem responsáveis pela primeira etapa de tratamento da água residuária, as bactérias provavelmente são mais impactadas pelo substrato complexo utilizado, a vinhaça.

O índice de diversidade de Shannon (H), no domínio *Archaea*, aumentou com o incremento de vinhaça até COV 20 gDQOL^{-1}d^{-1}, em relação ao inóculo, em todos os reatores indo de 2 (inóculo) para 2,2 em R1; de 2 para 2,3 em R2; de 2 para 2,2 em R3 e de 2 para 2,3 em R4 (Tabela 6). O índice de Shannon (H) para o domínio *Bacteria* aumentou de 2,5 (inóculo) para 2,7, com o incremento da COV para 20 gDQOL^{-1}d^{-1}, em todos os reatores (Tabela 6). A introdução crescente de vinhaça propiciou aumento na diversidade microbiana para os dois domínios, *Archaea* e *Bacteria*.

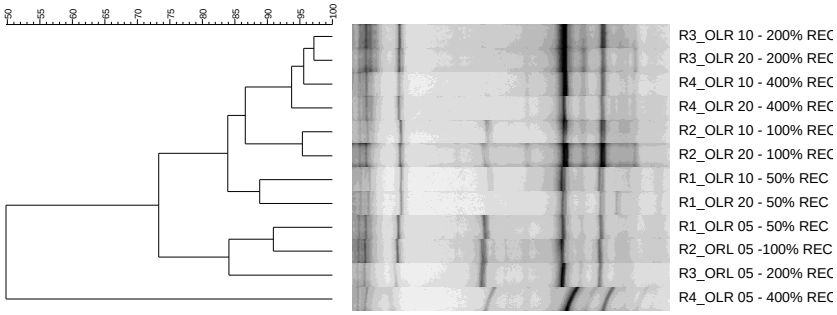


Figura 3: Dendograma relativo aos perfis de banda do domínio *Archaea.*

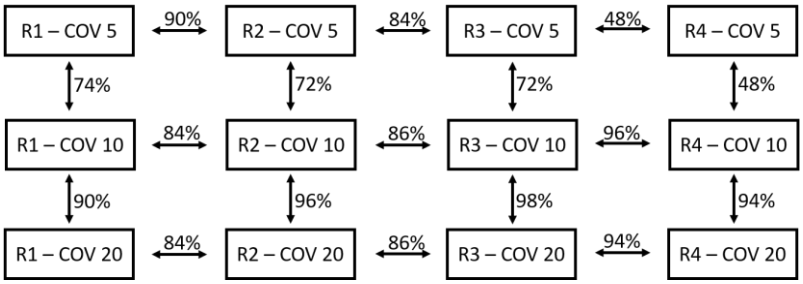


Figura 4: Índices de similaridade, em porcentagem, obtidas por DGGE considerando a correlação de Pearson para o domínio *Archaea.*

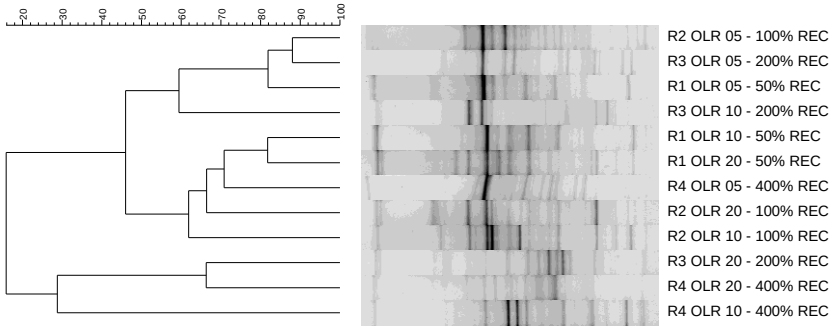


Figura 5: Dendograma relativo aos perfis de banda do domínio *Bacteria* e os respectivos índices de similaridade em percentagem (correlação de Pearson).

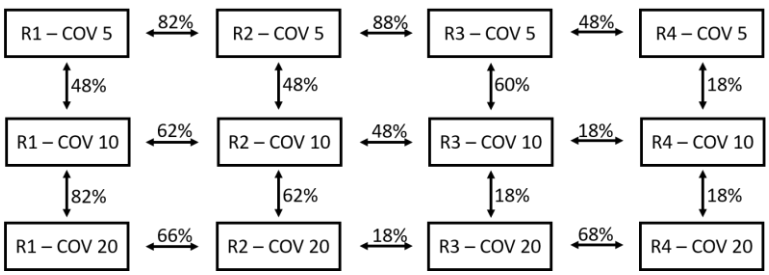


Figura 6. Índices de similaridade, em porcentagem, obtidas por DGGE considerando a correlação de Pearson para o domínio *Bacteria*.

Tabela 6**:** Índice de diversidade-Shannon (H)**.**

Shannon (H)			R1			R2	
	Inóculo	COV 5	COV 10	COV 20	COV 5	COV 10	COV 20
Domínio *Archaea*	2,03	2,03	2,29	2,18	2,05	2,12	2,25
Domínio *Bacteria*	2,53	2,46	2,50	2,75	2,75	2,56	2,71
Shannon			R3			R4	
	Inóculo	COV 5	COV 10	COV 20	COV 5	COV 10	COV 20
Domínio *Archaea*	2,03	1,95	2,33	2,35	2,15	2,15	2,16
Domínio *Bacteria*	2,53	2,47	2,20	2,66	2,38	2,57	2,71

Conclusões

Mesmo com resultados de eficiência de tratamento elevados para todos os sistemas, a redução mais acentuada do diâmetro granular, observada para os reatores R1 e R4, e a instabilidade notada pelas análises biológicas para o reator R4, sugere que as taxas de recirculação de 100 e 200% são mais estáveis para o tratamento de vinhaça em reatores UASB. A análise estatística indicou que, do ponto de vista da dimensão granulométrica, o reator com 100% de recirculação foi ainda mais estável.

O fator observado que foi fundamental para a manutenção do sistema em equilíbrio foi o controle da exposição dos grânulos aos constituintes da vinhaça, promovendo a adaptação da biomassa. Dessa forma, a concentração relativamente alta de metais provenientes da vinhaça não prejudicou a eficiência de tratamento em nenhum dos reatores analisados. A recirculação teve papel importante para o amortecimento da carga orgânica e diluição dos nutrientes em excesso.

Referências Bibliográficas

Alves, I., 2015. Caracterização de grânulos de reator UASB empregado no processamento de vinhaça. Universidade de São Carlos.

Alves, I., Del Nery, V., Pozzi, E., Damianovic, M.H.R.Z., Pires, E. C., 2018. Determining the distribution of granule diameter from biological sludge. MethodsX 5, 727-736.

APHA, AWWA, WEF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 st. ed. Washington DC, APHA.

Del Nery, V., Alves, I., Damianovic, M.H.R.Z., Pires, E. C., 2018. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. Biomass and Bioenergy 119, 411–417.

REMOÇÃO DE DQO E NITROGÊNIO TOTAL EM ALAGADOS CONSTRUÍDOS COM AERAÇÃO INTERMITENTE EM RELAÇÃO AO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA

Isabela Pires da Silva [1]; João Gabriel Thomaz Queluz [2]; Marcelo Loureiro Garcia [3]

[1]Aluna de Iniciação Científica do Departamento de Petrologia e Metalogenia do IGCE/UNESP;
[2] Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação do IGCE/UNESP;
[3] Professor do Departamento de Petrologia e Metalogenia do IGCE/UNESP.

Resumo. *O objetido do presente trabalho foi avaliar o efeito do tempo de detenção hidráulica na remoção de DQO e Nitrogênio Total em alagados construídos com aeração intermitente. Foram avaliados dois alagados construídos de fluxo subsuperficial horizontal onde cada um recebe uma vazão diária de 8,7 L.dia^{-1} de água residuária doméstica sintética, resultando em tempo de detenção de 3 dias, sendo um sistema controle sem aeração (AC1) e um sistema aerado intermitentemente (AC2) e ambos cultivados com taboa (Typha latifolia). Observou-se que altas eficiências de remoção foram alcançadas no sistema aerado em comparação com o sistema controle, onde os valores médios de remoção obtidos para o AC2 e AC1 são iguais a 98,25% e 93,89% para DQO; 83,6% e 48,6% para NT e 78,1% e 58,66% para PT, demonstrando que a aplicação de aeração contribui para o processo de nitrificação e desnitrificação de forma simultânea, além de elevar a remoção de DQO em tempos de detenção hidráulica menores de 3 dias*.

Introdução

O Sistema Alagado Construído (SAC) é uma tecnologia simples, com custo acessível e de fácil operação e manutenção, tornando-se crescente o interesse por essa tecnologia nas últimas décadas para tratamento de diversos tipos de águas residuárias ricas em material orgânico biodegradável (Matos et al, 2010a). Possui como principais componentes o meio suporte, o qual pode ser utilizado, entre outros materiais, solo, areia e brita, espécies vegetais características de ambientes alagados e micro-organismos associados a estes elementos, sendo necessário a sua projeção de forma a maximizar os processos que ocorrem quando os componentes interagem entre si para que promova o tratamento da água residuária (Fia, 2009).

As macrófitas exercem papel importante para a manutenção de tratamento dos alagados construídos, principalmente em sistemas com alta matéria orgânica e amônia (Ciria; Solano; Soiano, 2005). Entretanto, mesmo que ocorra uma grande variedade de espécies que podem desempenhar este papel, é necessário observar características dos vegetais tais como a adaptabilidade ao clima local, taxa fotossintética, capacidade de transporte de oxigênio, capacidade de absorção de poluentes , resistência a pragas e doenças e sistema radicular bem desenvolvido, sendo as mais utilizadas a taboa (*Typha sp*), caniço-de-água (*Phragmites sp.)* e navalha de mico (Scirpus sp.) (Matos; Lo Monaco, 2003; Reed 1993; Reddy; Debusk, 1987; Vymazal, 1998).

Para Metcalf e Eddy (1991) e Suliman et al. (2004), as principais variáveis para se dimensionar o tratamento da água residuária em alagados construídos são o tempo de detenção hidráulica, largura, altura e comprimento do tanque e a taxa de aplicação hidráulica. A carga hidráulica e o tempo de detenção hidráulica possuem grande importância na eficiência de remoção dos SACs (WU et al., 2015). Um baixo tempo de detenção hidráulico pode ser associado a uma desnitrificação pouco eficiente, onde é necessário um tempo de detenção maior para remoção de nitrogênio em relação ao necessário para a remoção de matéria orgânica (Lee; Fletcher; Sun, 2009).

Face à escassez de entendimento dos processos envolvidos nos sistemas alagados construídos em condições de clima tropical, objetivou-se, no presente estudo, avaliar o desempenho de SACs na remoção de DQO e NT com enfoque no tempo de detenção hidráulica em alagados construídos com aeração intermitente.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em ambiente protegido (estufa agrícola) no Centro de Estudos Ambientais (CEA) do Instituto de Geociências e Ciências Exatas - UNESP, Rio Claro, SP. O clima da região é definido como Cwa (Koppën): clima temperado quente (mesotérmico) com verão chuvoso e inverno seco, a temperatura média do mês mais quente é superior a 22ºC. A precipitação média anual e temperatura média anual são respectivamente, 1.366,8 mm e 21,6ºC.

Cada sistema de tratamento foi composto por uma caixa d'água em formato retangular de polipropileno com capacidade aproximadamente 61 litros, sendo as dimensões iguais a 310 x 355 x 555 mm. O meio suporte utilizado foi a brita #0, com porosidade de 53%, que ocupou a caixa até a altura de 30 cm e saturada pelo efluente até a altura de 25 cm, apresentando um volume útil de 26 litros. Na seção longitudinal de cada alagado construído foram instalados dois tubos perfurados de PVC de 32 mm, com espaçamento de 18,5 cm entre eles, para que desta forma seja efetuado a coleta de amostras de águas residuárias no sistema.

A espécie de macrófita aquática utilizada nos SACs é a taboa (*Typha latifolia*), às quais foram coletadas em brejo natural e podadas à meia altura. O replantio nos alagados construídos foi realizado no dia 07/03/2018 com propágulos constituídos de plantas completas e a densidade de plantio foi de aproximadamente 15 plantas por m², resultando em um cultivo de três plantas em cada sistema, no qual durante o período de replantio e fixação da macrófita ficaram saturados de água e somente após a fixação da taboa foi iniciada a aplicação da água residuária no dia 02/04/2018.

O experimento foi conduzido utilizando-se água residuária sintética que apresenta características físico-químicas semelhantes a um efluente de tanque séptico. A cada três semanas o efluente sintético foi preparado em solução concentrada e armazenada em refrigerador. Posteriormente, a solução concentrada era diluída com água de abastecimento para ser aplicada nos SACs. Na Tabela 1 são mostradas as concentrações e os compostos utilizados na solução concentrada e no efluente sintético, conforme descrito nos trabalhos de Fan et al. (2016), WU et al. (2015) e WU et al. (2016).

Tabela 1: Composição do efluente primário sintético.

Componente	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Sacarose	386
$(NH_4)_2SO_4$	188
KH_2PO_4	18
$MgSO_4$	10
$FeSO_4$	10
$CaCl_2$	10

Para avaliar o efeito da aeração intermitente na remoção de DQO e NT cada alagado construído foi avaliado utilizando diferentes intervalos diários de aeração: Alagado construído 1 (AC1): sem aeração; Alagado construído 2 (AC2): aerado intermitentemente em 3 períodos

com duração de 1 hora (1 h aerando/7 h sem aeração) distribuídos igualmente ao longo do dia. A aeração do alagado construído 2 é realizada utilizando compressor de ar para aquário com vazão média de 20 $L.min^{-1}$, resultando em taxa de aplicação superficial de oxigênio de aproximadamente 101,5 $L.m^{-2}.min^{-1}$.

Tendo em vista que o volume útil estimado de cada alagado construído é de 26 litros, determinou-se que o tempo de detenção hidráulica nominal, desconsiderando os efeitos da evapotranspiração, é de 3 dias, com taxa de aplicação hidráulica de 0,044 $m^3.m^{-2}.d^{-1}$.Porém, como em cada caixa d'água foram instalados tubos perfurados ao longo da seção longitudinal, foi possível avaliar a concentração de poluentes em relação à distância do ponto de entrada do afluente e, consequentemente, diferentes tempos de detenção de 0; 1; 2 e 3 dias.

Para a análise dos parâmetros físicos e químicos foram realizadas cinco coletas de amostras das águas residuárias, tanto do efluente de entrada quanto de cada tubo perfurado correspondente aos TDH. As análises foram realizadas no CEA-UNESP, Campus de Rio Claro, conforme as metodologias descritas no *Standard Methods* (APHA. 2012).

Resultados e Discussão

Os resultados médios obtidos no presente estudo para os parâmetros DQO, NH_4^+ NO_2^-, NO_3^- NT, TP, pH e temperatura, bem como suas respectivas eficiências de remoção estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Características do efluente e suas respectivas eficiências de remoção.

Parâmetro	**Afluente**	TDH (d) AC1			TDH (d) AC2		
		1	2	3	1	2	3
DQO ($mg.L^{-1}$)	388,8±19,7	119±29,9	43±10,4	23,8±6,6	42,2±15	9,6±5,6	6,8±2,9
ε (%)		69,37±8,0	88,98±2,5	93,89±1,6	89,24±3,6	97,51±1,5	98,25±0,8
NH_4^+ ($mg.L^{-1}$)	39,16±6,2	25,08±5,6	18,86±8	16,48±2,3	6,52±3,3	0,82±1,9	0,58±0,6
ε (%)		35,64±7,9	51,54±9,7	57,72±4,5	83,23±3,6	97,89±2,1	98,52±0,7
NO_2^- ($mg.L^{-1}$)	0,0042	0,043±0,04	0,03±0,05	0,019±0,01	0,059±0,04	0,027±0,02	0,048±0,08
NO_3^- ($mg.L^{-1}$)	1,36±0,3	8,02±1,2	3,96±1,3	4,26±1,6	6,98±2,6	7,9±1,4	5,98±1,1
NT ($mg.L^{-1}$)	40,52±2,1	33,14±3,3	22,85±5,0	20,76±3,1		13,56±3,2	8,75±1,8
ε (%)		17,81±8,8	43,40±9,3	48,60±6,3	66,42±7,2	78,23±4,7	83,60±3,2
PT ($mg.L^{-1}$)	3,88±0,48			1,58±0,56			0,89±0,69
ε (%)				58,66±17,8			78,1±16,36
pH	6,96±0,25			7,09±0,45			6,68±0,49
S ($\mu S.cm^{-1}$)	562±19,34			397±15,56			578,5±72,8
T (ºC)	23,06±1,52			21,48±1,67			20,25±1,77

Demanda química de oxigênio

A variação da concentração de DQO ao longo do tempo de detenção hidráulica pode ser visto na Figura 1. A partir dos resultados foi possível verificar que a eficiência de remoção de ambos os sistemas são altos para 3 dias de TDH, obtendo-se uma remoção de 93,89±1,63% para o AC1 e de 98,25±0,76% para o AC2, sendo os resultados bem próximos. Porém,

destaca-se que a eficiência de remoção de 1 dia de TDH para o AC2 é na ordem de 89,24± 3,57% enquanto que, para o AC1 o valor obtido cai para 69,37±8,04% (Tabela 2). Valores semelhantes são encontrados na literatura, sendo que, Matos et al. (2010b) apresentam eficiências com cultivo de taboa que variam de 71% a 96%, para um tempo de detenção hidráulico aproximadamente de 4,8 dias abastecido com água residuária da suinocultura. Chagas et al. (2011) apresenta eficiência de remoção na ordem de 63,7 a 72,2% para TDH de 0,75 a 2 dias abastecidos com efluente de tanque séptico. Brasil et al. (2005) obtiveram eficiências médias na remoção de DQO entre 84% e 93% em sistemas cultivados com taboa, no tratamento de água residuária doméstica com TDH de 1,9 e 3,8 dias respectivamente.

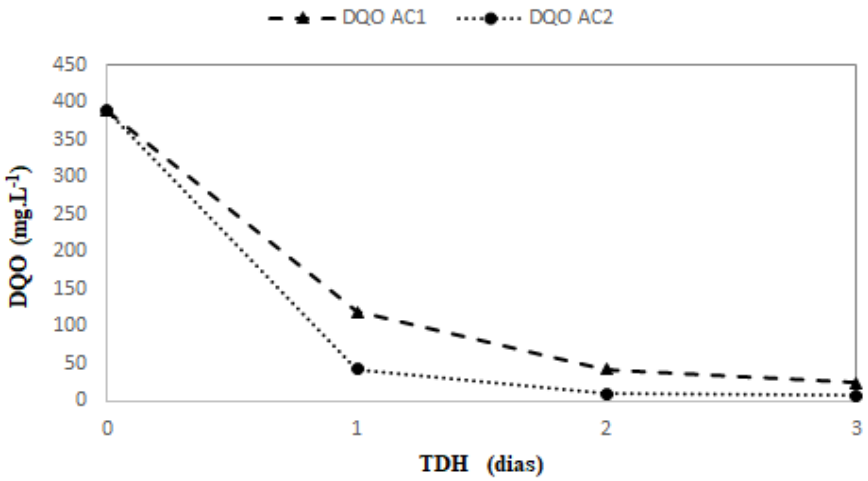


Figura 1: Variação da concentração de DQO em ambos os SACs.

Os resultados de eficiência de DQO podem ser considerados satisfatórios, uma vez que a taxa de carga orgânica superficial (TCO), calculada em termos de DQO, varia de 160,73 a 180,16 $kg.ha^{-1}.d^{-1}$, sendo que, de acordo com Brasil et al (2005) e Abrahão (2006), SACs que operaram com maiores TCOs apresentaram maior eficiência na remoção de DQO, uma vez que a intensificação na formação do biofilme no meio suporte proporcionado com o aumento da TCO possa aumentar a capacidade do sistema em remover DQO. Brasil (2005), com aplicação de TCO que variam de 52 a 236 $kg.ha^{-1}.d^{-1}$, apresentou uma eficiência média de remoção na ordem de 86 a 90%, para o tratamento de águas residuárias domésticas durante um TDH de 1,9 a 3,8 dias, enquanto que Queluz (2016), com aplicação de baixas TCO que variam de 31,72 a 76,2 $kg.ha^{-1}.d^{-1}$, apresentou eficiência média em torno de 44 a 81% para TDH de 2,98 a 3,63 dias. Além disso, os valores obtidos são superiores ao encontrados por Valentim (2003) que mostram uma eficiência de 70% na remoção de DQO no tratamento de água residuária doméstica em SACs cultivados com taboa.

A elevada eficiência do AC2 em relação ao AC1 nos primeiros tempos de detenção hidráulica é resultado da aeração artificial intermitente que estimula o aumento da atividade biológica contribuindo para uma alta eficiência de remoção de DQO, nitrificação e desnitrificação de forma simultânea, sendo que os períodos aerados tem-se a digestão da DQO através de microrganismos heterotróficos aeróbios, que utilizam a matéria orgânica como fonte de energia e nos períodos sem aeração (anóxicos), a DQO é consumida pelos microrganismos heterotróficos desnitrificantes (Schmidt et al., 2003; Chiu et al., 2007; Fan et al., 2013; Wendling, 2017), evidenciando a ocorrência do processo de desnitrificação. Wu et al (2015) apresentam resultados semelhantes para SACs com aeração intermitente, com eficiências que variam de 96,42±1,61% a 98,49±4,31% e para sistemas sem aeração, com eficiências que variam de 62,68±8,55% a 85,49±4,31%, tratando água residuária doméstica.

Série nitrogenada

A variação da concentração de NH_4^+ e NT podem ser vistas na Figura 2. Os resultados obtidos no experimento mostram que no AC1 a concentração média final foi de 16,48 $mg.L^{-1}$ e 20,76 $mg.L^{-1}$ para NH_4^+ e NT, respectivamente, sendo assim, a média de eficiência de remoção final (Tabela 2) é de 57,7±4,5% e 48,6±6,3% enquanto que para o AC2, os resultados indicam uma eficiência de remoção de 98,5±0,7% e 83,6±3,2% para NH_4^+ e NT, respectivamente. Ressalta-se que para apenas 1 dia de TDH, as eficiências de remoção encontradas para NH_4^+ e NT do AC1 são, de forma consecutiva, 35,64±7,9% e 17,8±8,8%, porém, para o mesmo TDH, o AC2 demonstra eficiência de 83,23±3,6% e 66,4±7,17%. Ou seja, para o sistema aerado, a eficiência atinge níveis cerca de 47,6% a mais para NH_4^+ e 48,6% a mais para NT, superando as taxas de eficiência final de remoção do AC1 já nas primeiras 24 horas de tratamento.

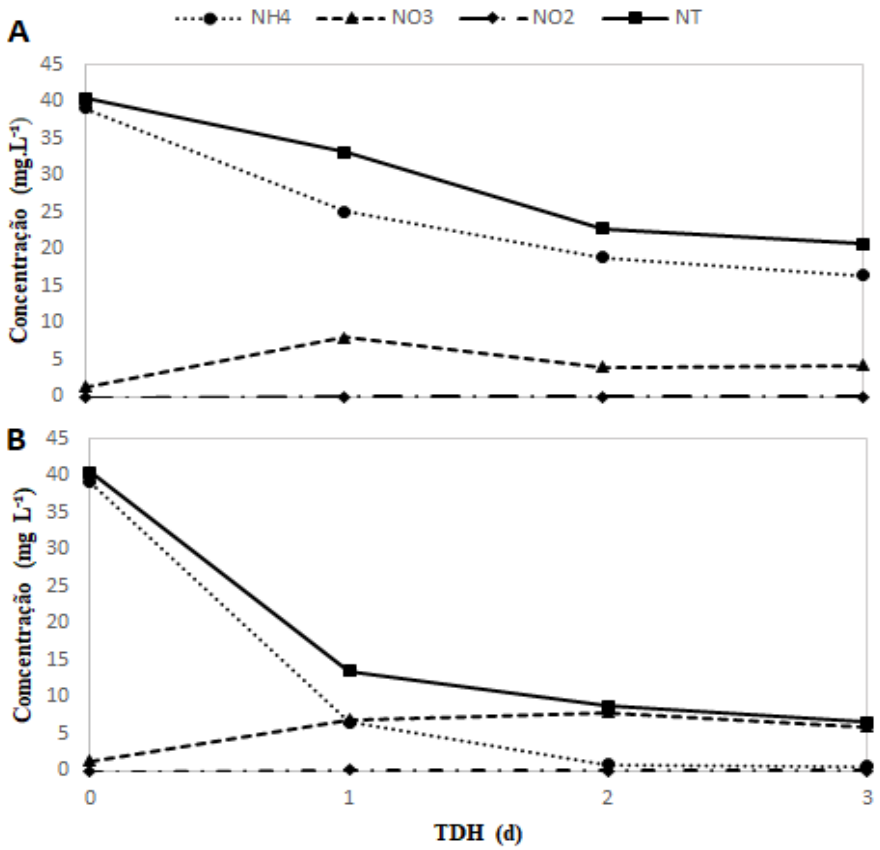


Figura 2: Variação da concentração da série nitrogenada no AC1 (A) e AC2 (B).

Os resultados podem ser considerados satisfatórios para ambos os SACs pois possuem eficiência média acima das encontrados por Ramos et al. (2017), que apresenta eficiência de remoção de NT de 38 a 48% para TDH de 3,2 dias em SACs cultivados com *Polygonum punctatum* (erva-de-bicho) e *Chrysopogon zizanioides* (capim-vetiver), sendo esta eficiência ultrapassada em apenas 24 horas no AC2. Resultados encontrados por Wang et al. (2016), apresentou eficiência de remoção média de 46% de NH_4^+ e de 43% para NT em SACs cultivados com *Canna indica L*. com TDH de 5 dias, sendo os valores de eficiência de remoção encontrados no SAC 2 para ambos os parâmetros em apenas 1 dia de TDH significativamente maiores que os encontrados pelos autores.

Observa-se que a concentração média efluente de NH_4^+ e NT (Figura 2) do AC2 é muito menor que a do AC1 já nos primeiros TDH, resultado esse devido ao rápido consumo de oxigênio dissolvido (OD) no AC1, causando assim um ambiente anaeróbio no substrato, comprometendo seriamente a remoção de NH_4^+. Além disso, a presença de um valor alto de NO_3^- no efluente indica a desnitrificação limitada de ambos os SACs, no entanto, houve uma

pequena remoção de nitrato, pois somente uma parte deste ficou no efluente, mostrando assim que a nitrificação e a desnitrificação ocorrem de forma simultânea, resultado esse observado também por Boog at al (2014).

Vymazal e Kröpfelová (2008) concluíram que em maioria, a remoção de NT é baixa se comparado à remoção de carga orgânica e de sólidos, variando de 40 a 50%, e raramente são maiores por não serem capazes de proporcionar, de forma simultânea, condições aeróbias para a nitrificação e anaeróbias para a desnitrificação. Essa análise pode ser observada durante o experimento, onde as condições aeróbias e anaeróbias proporcionadas pela aeração intermitente do AC2 proporcionou alto oxigênio dissolvido (OD), presente na aeração, melhorando a nitrificação e a desnitrificação de alta eficiência foi alcançada pelo fornecimento de fonte de carbono quando a aeração encontrava-se desligada, sendo que, juntamente com volatilização e a absorção por plantas, pode ser considerado o grande fator relacionado à alta eficiência desse sistema, se comparado ao AC1 (Hu, Ao ,Yang, 2008; Fan et al., 2013).

Fósforo total

Os valores das análises de Fósforo podem ser observadas na figura 3, sendo esses resultados considerados satisfatórios, uma vez que alagados construídos são eficientes para a remoção de DBO e Sólidos Suspensos Totais (SST), porém a remoção de fósforo ainda é considerado um desafio (Ayaz et al., 2012; Abou-Elela et al., 2013; De Rozari et al., 2015). Além disso, os resultados contrariam em parte Ayaz et al. (2003) e Vymazal (2007), sendo que o primeiro autor afirmou que a eficiência de remoção de Fósforo varia entre 20 e 70%, dependendo do tipo de planta usada e do regime de alimentação e o segundo afirmou que a remoção de fósforo total varia entre 40 a 60% entre todos os tipos de sistemas alagados.

Os resultados apresentam concentrações médias finais de 1,58 e 0,89 $mg.L^{-1}$, respectivamente para o AC1 e AC2, representando uma eficiência média de 58,66±17,8% e 78,1±16,36%, sendo estes resultados muito acima dos encontrados por Mendonça et al (2012), que obteve eficiência média de 33,6% e 34,3% em SACs cultivados com taboa com TDH de 2 dias, porém são semelhantes ao encontrado por Ramos et al (2017) que obteve eficiências médias de remoção de 51±24, 69±22 e 45±19% para TDH de 3,2 dias em SACs controle, onde não há vegetação e os cultivados com *Polygonum punctatum* (erva-de-bicho) e *Chrysopogon zizanioides* (capim-vetiver), respectivamente, para tratamento de águas residuárias da suinocultura (ARS) e Fia et al. (2017) que obteve valores médios de eficiência de 73% a 78% para tratamento de ARS, em SACs cultivados com taboa com TDH variando de 11,8 a 12 dias.

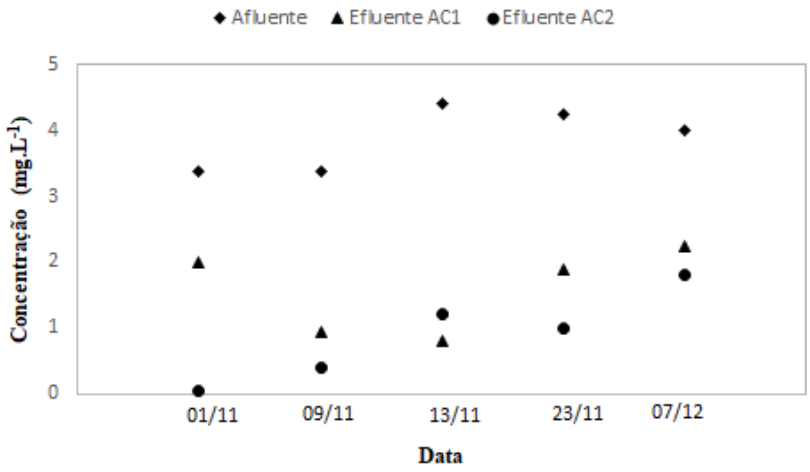


Figura 3: Concentrações de entrada e saída de Fósforo Total.

De acordo Vymazal (2007), a remoção de fósforo pode ser associada principalmente a processos físicos, como adsorção, precipitação e acúmulo na matéria orgânica no substrato, além disso, a atividade microbiana e a absorção de plantas também podem contribuir para a remoção do fósforo, porém Fia et al. (2017), verificou que a presença de plantas e a espécie cultivada não influenciaram de forma considerável na remoção de macro e micronutrientes, mas a baixa produtividade das plantas e a alta carga aplicada foram, no entanto, fatores de interferência nos resultados. Freitas (2006) ao tratar águas residuárias da suinocultura em SAC(s) de fluxo subsuperficial, concluiu que a fração de fósforo orgânico foi removida pela imobilização microbiológica no meio suporte, tal como observado por Lee et al. (2004).

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a aeração intermitente melhorou o desempenho do tratamento no que se refere a eficiência de remoção de matéria orgânica, representada pela DQO, e na remoção de nutrientes, principalmente no desempenho do processo de nitrificação. A melhor média de remoção de DQO (98,25%), NH_4^+ (98,52%), NT (83,6%) e PT (78,1%) foi obtido no sistema que se utiliza aeração intermitente, o que demonstra a importância do papel da aeração na remoção de nitrogênio ao criar de forma excelente condições aeróbias e anaeróbias de forma alternada, contribuindo, inclusive na remoção de matéria orgânica ao ser consumida no processo de desnitrificação. Observou-se que a aeração intermitente para TDH maiores que 3 dias não melhora de forma considerável o desempenho na remoção de DQO, diferente do que é observado para a remoção da série nitrogenada, mas para tempos menores que esse, mostra-se uma alternativa que eleva significativamente a eficiência no tratamento de matéria orgânica e de nutrientes, sugerindo ser uma alternativa apropriada para alcançar elevado desempenho em sistemas alagados construídos.

Referências Bibliográficas

Abrahão, S.S, 2006. Tratamento de água residuária de laticínios em sistemas alagados construídos cultivados com forrageira. Dissertação Mestrado. Viçosa: UFV, 110p.

Abou-elela, S.I., Golinielli, G., Abou-taleb, E.M., hellal, M. S., 2013. Municipal wastewater treatment in horizontal and vertical flows constructed wetlands. Ecol. Eng. 61, 460-468.

APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination for water and wastewater. 22. ed. Washington, Dc: APHA-AWWA-WEF, 2012. 1496 p.

Ayaz, S.Ç., Akça, L., Tunçsiper, B., 2003. Removal of organic, inorganic and microbial pollution from waters discharged to drinking water dams by constructed wetland systems, TUBITAK-Marmara Research Center, Project No:5022410, Turkey.

Ayaz, S.Ç., Aktas, Ö., Findik, N., Akca, L., 2012. Phosphorus removal and effect of adsorbent type in a constructed wetland system. Desalin. Water Treat. 37, 152–159.

Boog, J., Nivala, J., Aubron, T., Wallace, S., Van Afferden, M., & Müller, R.A., 2014. Hydraulic characterization and optimization of total nitrogen removal in an aerated vertical subsurface flow treatment wetland. Bioresour. Technol. 162, 166-174.

Brasil, M.S. Desempenho de sistema alagado construído para tratamento de esgoto doméstico. 2005. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

Brasil, M.S.; Matos, A.T.; Soares, A.A.; Ferreira, P.A., 2005. Qualidade do efluente de sistemas alagados construidos de sistemas alagados construídos, utilizados no tratamento de esgoto doméstico utilizados no tratamento de esgoto doméstico. Eng. Agri. Amb.9,133-137.

Chiu, Y., Lee, L., Chang, C.; Chao, A.C., 2007. Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. Int. Biodeterior. Biodegrad. 59, 1-7.

Ciria, M.P.; Solano, M.L.; Soriano, P., 2005. Role of macrophyte typha latifolia in a constructed wetland for wastewater treatment and assessment of its potential as a biomass fuel. Bios. Enging., 92, 535-544.

Fan, J., Wang, W., Zhang, B., Guo, Y., Ngo, H.H., Guo, W., Zhang, J., Wu, H., 2013. Nitrogen removal in intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: Impact of influent COD/N ratios. Bioresour. Technol. 143, 461–466.

Fan, J., Zhang, J., Guo, W., Liang, S., Wu, H., 2016. Enhanced long-term organics and nitrogen removal and associated microbial community in intermittently aerated subsurface flow constructed wetlands. Bioresour. Technol. 214, 871–875.

Fia, F.R.L., 2009. Modelos de remoção de matéria orgânica e nutrientes de águas residuárias da suinocultura em sistemas alagados construídos. 2009. 146 f. Tese (doutorado) - Programa de pós-graduação em Engenharia Agrícola,Viçosa.

Fia, F.R.L., Matos, A.T.D., Fia, R., Borges, A.C., Cecon, P.R., 2017 Efeito da vegetação em sistemas alagados construídos para tratar águas residuárias da suinocultura. Eng. Sanit. Ambient. 22, 303-311.

Hu, M., Ao, Y., Yang, X., 2008. Treating eutrophic water for nutrient reduction using an aquatic macrophyte (Ipomoea aquatic Forsskal) in a deep flow technique system. Agric. Water Manage. 95, 607-615.

Lee, C., Fletcher, T.D., Sun, G., 2009. Nitrogen removal in constructed wetland systems. Eng. Life Sci. 9, 11–22.

Lee, CY., Lee, C.C., Lee, F.Y., Tseng, S.K., Liao, C.J. 2004. Performance of subsurface flow constructed wetland taking pretreated swine effluent under heavy loads. Bioresour. Technol. 92, 173-179.

Matos, A.T., Abrahão, S.S, Borges, A.C., Matos, M.P., 2010a. Influência da taxa de carga orgânica no desempenho de sistemas alagados construídos cultivados com forrageiras. Eng. Sanit. Ambient. 15, 83-92

Matos, A.T., Freitas, W.S., Lo Monaco, P.A.V., 2010b. Eficiência de sistemas alagados construídos na remoção de poluentes de águas residuárias da suinocultura. Ambi-Água. 5, 119-132.

Matos, A.T, Lo Monaco, P.A., 2003. Tratamento e aproveitamento agrícola de resíduos sólidos e líquidos da lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro. Viçosa: UFV, 2003. 68p.

Mendonça, H.V., Ribeiro, C.B.M., Borges, A.C., Bastos, R. R., 2012. Remoção de nitrogênio e fósforo de águas residuárias de laticínios por sistemas alagados construídos operando em bateladas. Ambi-Agua. 7, 75-87.

Metcalf & Eddy. Wasterwater engineering, treatment, disposa, and reuse. 3 ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1991.

Queluz, J.G.T. 2016. Eficiência de alagados construídos para o tratamento de águas residuárias com baixas cargas orgânicas. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Ramos, N.D.F.S., Borges, A.C., Gonçalves, G.C., Matos, A.T.D., 2017. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em sistemas alagados construídos, com Chrysopogon zizanioides e Polygonum punctatum cultivadas em leito de argila expandida. Eng. Sanit. Ambient. 22,123-132.

Reed, S.C. 1993. Subsurface Flow Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: A Technology Assessment, (EPA 832-R-93-008). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 87p.

Reddy, K.R., Debusk, T.A., 1987. State of the art utilization of aquatic plants in water pollution control. Water Sci. Technol. 19, 61-79.

Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., 2003. Jetten, M. S. M.; Strous, M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. FEMS Microbiology Reviews, 27.

Suliman, F.; French, H.; Haugen, L. ; Kløve B.; Jenssen, P. The effect of scale on the flow and transport parameters in horizontal subsurface flow constructed wetlands. 9th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. Avignon, France, Proceedings… IWA/Astee, 26th of Sept. - 1th of October 2004. OC, CD-ROM. French H, Haugen LE.

Valentim, M.A.A., 2003. Desempenho de leitos cultivados ("construted wetland") para tratamento de esgoto: contribuições para concepção e operação. Tese Doutorado Campinas: UNICAMP/FEAGRI, pp. 210.

Vymazal, J., 1989.Types of constructed wetlands for wastewater treatment. International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, 6, 1998, Águas de São Pedro. Anais pp.150-166.

Vymazal, J., 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. Sci. Total Environ. 380, 48-65.

Vymazal, J., Kröpfelová, L., 2008. Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Subsurface Flow (Series of Environmental Pollution). Springer Science. 14, pp. 566.

Wang, W., Ding, Y., Wang, Y., Song, X., Ambrose, R. F., Ullman, J. L., GONG, J., 2016. Treatment of rich ammonia nitrogen wastewater with polyvinyl alcohol immobilized nitrifier biofortified constructed wetlands. Ecol. Eng. 94, 7-11.

Wendling, A. C., 2017.Remoção simultânea de matéria orgânica e nitrogênio total em reator de leito estruturado com aeração intermitente tratando efluente composto por esgoto bruto e efluente de ralf. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., 2015. Decentralized domestic wastewater treatment using intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: impact of influent strengths. Bioresour. Technol. 176, 163–168.

Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Liang, S, Lv, J., Lu, S., Wu, W., Wu, S., 2016. Intensified organics and nitrogen removal in the intermittent-aerated constructed wetland using a novel sludge-ceramsite as substrate. Bioresour. Technol. 210, 101–107.

APLICAÇÃO DE AERAÇÃO INTERMITENTE PARA A BIODEGRADAÇÃO DE CORANTE AZO

Jean M. S. Oliveira [1], Mara R. de Lima e Silva; Carina G. Issa, Juliano J. Corbi [2], Márcia H. R. Z. Damianovic [2], Eugenio Foresti [2]

[1]Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento;
[2]Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A maioria das soluções em tratamento biológico de corantes azo é baseada nos processos convencionais anaeróbio-aeróbios, mas a transição para a escala plena requer simplificação tecnológica e redução de custos. Este estudo propõe uma nova abordagem, em que a aeração intermitente é utilizada para a remoção simultânea de cor e de metabólitos tóxicos no mesmo compartimento reacional. Os efeitos da estratégia de aeração e concentração de glicose sobre a descoloração e remoção de matéria orgânica foram investigados por planejamento fatorial (3^2) e análise de superfície de resposta. Os biorreatores foram inoculados com microrganismos previamente adaptados ao Direct Black 22 (DB22) – composto azo utilizado no estudo. Os ensaios conduzidos com água residuária (AR) têxtil sintética mostraram que a descoloração no longo prazo não foi prejudicada para ciclos de aeração de até 4 h d^{-1}, embora tenha sido observada redução nas velocidades de remoção de cor nestes experimentos. Os impactos negativos da aeração foram reduzidos com o aumento da concentração inicial de glicose. Maiores graus de mineralização do composto azo e maiores remoções de matéria orgânica foram obtidos nos experimentos aerados intermitentemente, o que resultou na menor toxicidade ao bioindicador Daphnia magna. Análises de biologia molecular revelaram que os parâmetros de eficiências estão fortemente relacionados à estrutura da comunidade microbiana. Os resultados sugerem que a aeração intermitente pode ser utilizada para melhorar a performance da degradação biológica de corantes da classe azo.*

Introdução

Soluções baseadas em processos físico-químicos, especialmente em processos oxidativos avançados (POAs), têm sido consideradas para a degradação de corantes da classe azo (Martínez-López et al., 2019; Punzi et al., 2015; Waghmode et al., 2019). Entretanto, estas tecnologias requerem a adição de elevadas concentrações de compostos químicos (e.g. oxidantes e catalisadores), além de que a completa mineralização do contaminante é raramente alcançada (Litter, 2005). Essas desvantagens levaram a atenção de muitos pesquisadores ao tratamento biológico, que é uma alternativa mais segura e econômica.

Os azo-corantes são mais facilmente descoloridos por bactérias anaeróbias ou facultativas em ambientes reduzidos, na ausência de aceptores de elétrons eficientes que podem competir com o azo (Santos et al., 2007). Contudo, os metabólitos gerados na descoloração redutiva são recalcitrantes à digestão anaeróbia, o que inclui as aminas aromáticas tóxicas (Pandey et al., 2007; Pinheiro et al., 2004). Os processos combinados anaeróbio-aeróbios são comprovadamente mais eficientes na obtenção de maiores graus de mineralização desses corantes (Van Der Zee e Villaverde, 2005).

Os sistemas sequenciais anaeróbio-aeróbios são compostos de uma unidade preliminar anaeróbia (geralmente um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente ou reator de leito fixo), visando à remoção de cor; acoplado a um pós-tratamento aeróbio, e.g. biofiltro aerado submerso, reator de batelada sequencial, entre outros (Amaral et al., 2017, 2014; Jonstrup et al., 2011; Shoukat et al., 2019; Van Der Zee e Villaverde, 2005). Alguns processos biológicos também são integrados com plantas ou empregam POAs ao invés do tratamento aeróbio para a remoção de subprodutos (Jayapal et al., 2018; Punzi et al., 2015; Wang et al.,

2019). No entanto, todos estes sistemas são projetados para que os processos ocorram em ao menos dois reatores. Alternativas mais compactas e econômicas podem ser desenvolvidas por meio do estabelecimento de diferentes condições de oxirredução em um único ambiente.

Reddy et al. (2014) observaram que a descoloração de um corante azo foi aperfeiçoada pela indução de condições anóxicas em um reator de batelada sequencial, visto que a existência de múltiplos microambientes auxiliou tanto a oxidação, quanto a redução das moléculas no biorreator. Paralelamente, outros autores exploraram o uso de condições microaerofílicas para o aumento da capacidade de transferência de elétrons no tratamento biológico de corantes azo por consórcio microbiano misto (Kumar et al., 2015). Entretanto, não há estudos que enfatizam os potenciais efeitos inibitórios da aeração na remoção de cor em sistemas com aeração intermitente. Adicionalmente, o efeito do aumento da concentração de doadores de elétrons na competição por equivalentes redutores entre o oxigênio e o composto azo é pouco conhecido.

Neste estudo, foram avaliados os efeitos da aeração intermitente e suplementação de glicose na biodegradação do Direct Black 22 (DB22) por um consórcio microbiano previamente adaptado. A remoção de cor e de matéria orgânica foram adotadas como parâmetros de eficiência no planejamento fatorial completo com análise de superfície de resposta. Testes de toxicidade, espectrofotometria UV-VIS, e análises de biologia molecular também foram realizados para o melhor entendimento desta nova abordagem baseada na aplicação de aeração intermitente.

Material e Métodos

Corante e processo de hidrólise

O Direct Black 22 (DB22; CAS 6473-13-8) foi escolhido como corante azo modelo por ser utilizado em grandes quantidades em lavanderias têxteis do Brasil (Amaral et al., 2014). O composto cedido pela distribuidora de corantes ExataCor© (Recife, Brazil) possuía peso molecular de 1083,97 g mol^{-1} e pureza de 50% (informação pessoal). O corante foi hidrolisado de acordo com o método descrito por Santos et al. (2004), simulando o processo de hidrólise comumente realizado industrialmente.

Fonte de microrganismos e meio de cultura

Os microrganismos foram obtidos a partir de material lignocelulósico – madeira pútrida e solo de regiões naturais. As coletas foram realizadas em três pontos distintos geograficamente com o objetivo de obter maior diversidade microbiana, a saber: Parque do Sabiá (48,239° O e 18,912° S), localizado no município de Uberlândia – MG; Bosque de Pinnus da UFSCar (47,884° W e 21,985° S), situado no distrito de São Carlos – SP; e Fazenda Cassorova (47,994° O e 22,414° S), no munícipio de Brotas – SP. O meio de cultivo utilizado para a seleção de microrganismos foi adaptado de Senan & Abraham (2004), com a seguinte composição ($g.L^{-1}$): sacarose 30,0, extrato de leveduras 6,0, KH_2PO_4 6,0 e Na_2CO_3 10,0 (pH 9,6). O enriquecimento do consórcio microbiano foi conduzido em frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL do meio de cultura previamente descrito com concentração inicial de DB22 de 10 $mg.L^{-1}$. As culturas foram incubadas no escuro a 30ºC e em condições estáticas, i.e. sem agitação, por período de 24 h, após o qual 1 mL de suspensão foi transferida para meio de cultura fresco. Foram realizadas transferências sucessivas durante 25 dias com concentrações crescentes de DB22 (10-32,5 $mg.L^{-1}$).

O consórcio microbiano obtido foi preservado a -80ºC em glicerina 50% ($v.v^{-1}$). Anteriormente ao uso nos experimentos, os microrganismos foram pré-cultivados no mesmo meio de cultivo contendo 32,5 $mg.L^{-1}$ do corante. As culturas incubadas a 30ºC renderam uma produção média de biomassa de 2,7 g-$SSV.L^{-1}$ (em massa seca) após 24 h.

Operação das bateladas

Os ensaios foram conduzidos a 30ºC em frascos de Duran (1 L) contendo 0,5 L de efluente sintético com a seguinte composição: DB22 (32,5 $mg.L^{-1}$), extrato de levedura (0,2

$g.L^{-1}$), glicose (1-3 $g.L^{-1}$), KH_2PO_4 (0,25 $g.L^{-1}$), Na_2SO_4 (0,5 $g.L^{-1}$), NaCl (0,5 $g.L^{-1}$), $NaHCO_3$ (1:1 g-glicose) e 1 $mL.L^{-1}$ de solução de elementos traços. Os biorreatores foram inoculados com a suspensão da biomassa microbiana pré-cultivada no meio basal (270 mg-$SSV.L^{-1}$). Nos ensaios aerados intermitentemente, a aeração foi providenciada com o auxílio de um compressor de ar (2,5 $L.min^{-1}$), em ciclos de uma hora, homogeneamente distribuídos em um período de 24 h. Foi utilizada uma pedra porosa (12 mm diâmetro x 25 mm altura) para facilitar a difusão do ar no meio líquido.

Planejamento experimental e análise de superfície de resposta

Os efeitos da concentração de glicose (X_1) e aeração intermitente (X_2) sobre as variáveis respostas descoloração final (Y_1), taxa constante de descoloração (Y_2) e remoção de DQO (Y_3) foram investigados por meio de planejamento fatorial. O método utilizado foi o planejamento fatorial completo 3^2 com duas repetições, totalizando 18 ensaios. X_1 e X_2 foram tratados como variáveis contínuas codificadas com os níveis -1, 0, 1; que corresponderam a concentrações de glicose de 1, 2 e 3 $g.L^{-1}$ e frequências de aeração de 0, 4 e 8 $h.d^{-1}$. Um modelo quadrático com interações de primeira ordem foi ajustado aos dados para quantificar os efeitos de cada fator sobre as variáveis dependentes. A qualidade do ajuste do modelo quadrático foi testada por meio do método de Análise de Variância (ANOVA) realizado na plataforma Protimiza Experimental Design (Campinas, Brasil). Os coeficientes não significativos ($p>0,1$) foram eliminados e os parâmetros do modelo foram recalculados. A superfície de resposta contendo apenas os coeficientes significativos foi gerada com o auxílio do software Statistica Enterprise (Statsoft Inc., Tulsa, EUA)

Método analítico

As análises de DQO, pH e cor foram realizadas, respectivamente, pelos métodos colorimétrico, potenciométrico e do registro do espectro visível (APHA, 2005). A biodegradação do DB22 foi avaliada por espectrofotometria UV-VIS (Pinheiro et al., 2004). Para estimativa da velocidade de descoloração (K), utilizou-se um modelo cinético de pseudo-primeira ordem (Santos et al., 2004). Os ensaios de toxicidade foram realizados utilizando *Daphnia magna* como bioindicador, seguindo as recomendações da NBR 12.713 (ABNT, 2016).

Metabarcoding do gene 16S rRNA

A identificação filogenética dos microrganismos (inóculo e experimentos E-02 e E-04) foi realizada a partir da amplificação e caracterização de fragmentos do gene 16S rRNA por técnica de sequenciamento metabarcoding. Foram utilizados os primers universais 341F e 806R de Bacteria. As leituras foram previamente montadas e filtradas (QPhred $\geq$ 33) para a remoção de sequências contendo bases de baixa qualidade. Após o alinhamento das sequências, utilizou-se o algoritmo UPARSE-OTU para a determinação de unidades taxonômicas operacionais com 97% de similaridade. A classificação taxonômica das OTUs foi realizada com o RDP classifier (Ribossomal Database Project; http://rdp.cme.msu.edu/).

Resultados e Discussão

Efeitos da concentração de glicose

Os efeitos da concentração inicial de glicose na descoloração do DB22 em função do tempo foram avaliados na faixa de 1 a 3 $g.L^{-1}$. Nos experimentos não-aerados, os reatores biológicos atingiram eficiências de remoção de cor satisfatórias, a despeito do nível de glicose testado (Fig. 1-A). Para as concentrações de 2 e 3 $g.L^{-1}$, a descoloração ao final do processo foi, em média, de 90 e 88,5%, respectivamente. O desempenho foi inferior para a concentração de 1 $g.L^{-1}$, obtendo-se a eficiência média de 73,1%. Os ensaios com estratégias de aeração distintas seguiram padrão similar (Fig. 1-B e 1-C).

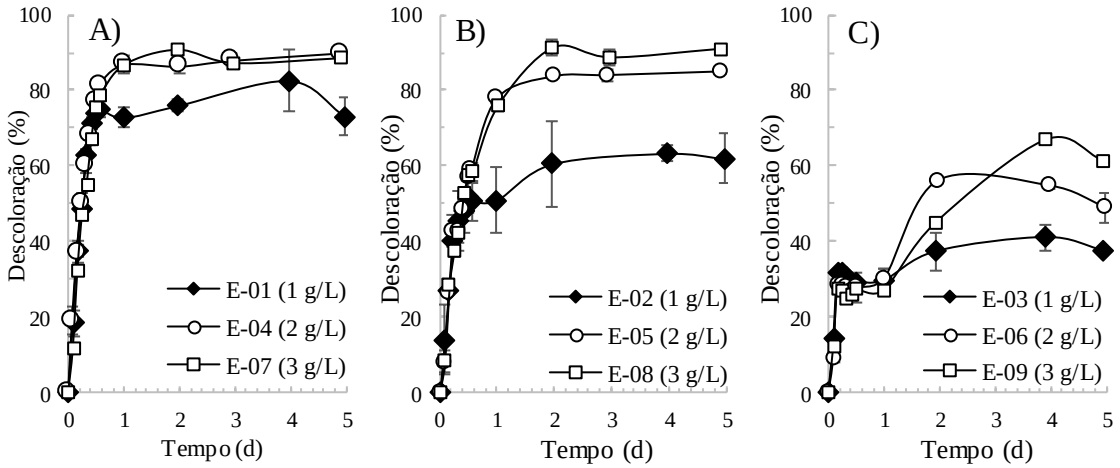


Figura 1: Efeitos da concentração de glicose na remoção de cor ao longo do tempo. Condições de aeração intermitente: A) 0 $h.d^{-1}$; B) 4 $h.d^{-1}$; e C) 8 $h.d^{-1}$.

A concentração do co-substrato não afetou a resposta durante as horas iniciais do experimento. Em certo momento, porém, o doador de elétrons passou a ser limitante nos ensaios com menor disponibilidade de fonte de carbono. Dai et al. (2018) observaram que a concentração de glicose limitou a descoloração redutiva de um corante azo nas concentrações de até 1 $g.L^{-1}$. Os ensaios foram realizados em ambiente anaeróbio e utilizando meio basal livre de sulfato e com concentração variável de Acid Orange 7 (200-1000 $mg.L^{-1}$). Resultados similares foram obtidos por outros autores, inclusive para concentrações do composto azo similares à deste estudo (Tan et al., 2016, 2013; Yang et al., 2009). Isto ocorre porque a redução do cromóforo é mediada por cofatores enzimáticos produzidos na metabolização desse co-substrato, i.e. cofatores reduzidos como o NADH e NADPH agem transferindo elétrons provenientes do substrato ao corante azo (Imran et al., 2016).

Efeitos da aeração intermitente

Os efeitos da aeração intermitente sobre a remoção de cor também foram investigados. As estratégias testadas foram de 0, 4 e 8 ciclos diários de aeração, com duração de 1 hora cada. Observa-se que a eficiência de remoção de cor decresce com o aumento da frequência de aeração. Para a concentração de 1 $g.L^{-1}$ de glicose, o nível intermediário de aeração foi suficiente para causar o decréscimo significativo no desempenho dos reatores biológicos (Fig. 1-B). Por outro lado, a ocorrência foi pouco expressiva para as concentrações de 2 e 3 $g.L^{-1}$ de glicose, em que a eficiência de descoloração foi prejudicada somente para níveis mais elevados de aeração intermitente, i.e. 8 $h.d^{-1}$.

A redução do azo por cofatores enzimáticos é prejudicada pela aeração porque o oxigênio é um aceptor de elétrons mais eficiente (Santos et al., 2007). A inibição competitiva causada pelo oxigênio explica o porquê de, no cálculo dos valores de K, o modelo de pseudo-primeira ter se ajustado melhor aos dados dos ensaios sem aeração intermitente ou com maiores concentrações de glicose (Tabela 1). Nestes casos, em que o doador de elétrons não é limitante, a reação depende quase que exclusivamente da concentração do corante no meio reacional, aproximando-se de uma cinética de primeira ordem. Estes resultados sugerem que o aumento do nível de aeração intermitente pode ser compensado por um incremento da concentração inicial de co-substrato na AR, impedindo, deste modo, a inibição do mecanismo de descoloração redutiva pela respiração aeróbia.

Tabela 1: Parâmetros do ajuste de um modelo de primeira ordem aos dados de descoloração do DB22 ao longo do tempo.

Experimento	Glicose ($g.L^{-1}$)	Aeração ($h.d^{-1}$)	K (d^{-1})		
			Réplica 1	Réplica 2	Média
E-01	1 (-1)	0 (-1)	1,56 (R^2 = 0,70)	1,34 (R^2 = 0,67)	1,45
E-02	1 (-1)	4 (0)	0,51 (R^2 = 0,67)	0,27 (R^2 = 0,48)	0,39
E-03	1 (-1)	8 (+1)	0,05 (R^2 = 0,36)	0,06 (R^2 = 0,43)	0,06
E-04	2 (0)	0 (-1)	2,29 (R^2 = 0,93)	2,06 (R^2 = 0,91)	2,18
E-05	2 (0)	4 (0)	1,46 (R^2 = 0,98)	1,54 (R^2 = 0,97)	1,50
E-06	2 (0)	8 (+1)	0,23 (R^2 = 0,81)	0,24 (R^2 = 0,80)	0,24
E-07	3 (+1)	0 (-1)	2,28 (R^2 = 0,97)	2,08 (R^2 = 0,91)	2,18
E-08	3 (+1)	4 (0)	1,15 (R^2 = 0,97)	1,30 (R^2 = 0,99)	1,23
E-09	3 (+1)	8 (+1)	0,28 (R^2 = 0,94)	0,20 (R^2 = 0,89)	0,24

A DQO residual também foi monitorada ao longo do tempo nos experimentos (Figura 2). Nos ensaios sem aeração, observou-se baixo desempenho de remoção de matéria orgânica, a despeito das elevadas eficiências de degradação do composto azo. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo de Dafale et al. (2010), em que se obteve remoção média de DQO de 35% no compartimento anóxico de um sistema de reatores anóxico-aeróbio. O fato pode ser atribuído à ausência de comunidades microbianas que atuam, em sintrofismo, na conversão do substrato orgânico em metano (Stams e Plugge, 2009). Nos demais casos, a presença de aceptor exógeno de elétrons possibilitou a oxidação microbiana de parte da matéria orgânica a CO_2 pelo metabolismo aeróbio, resultando em maior remoção de DQO.

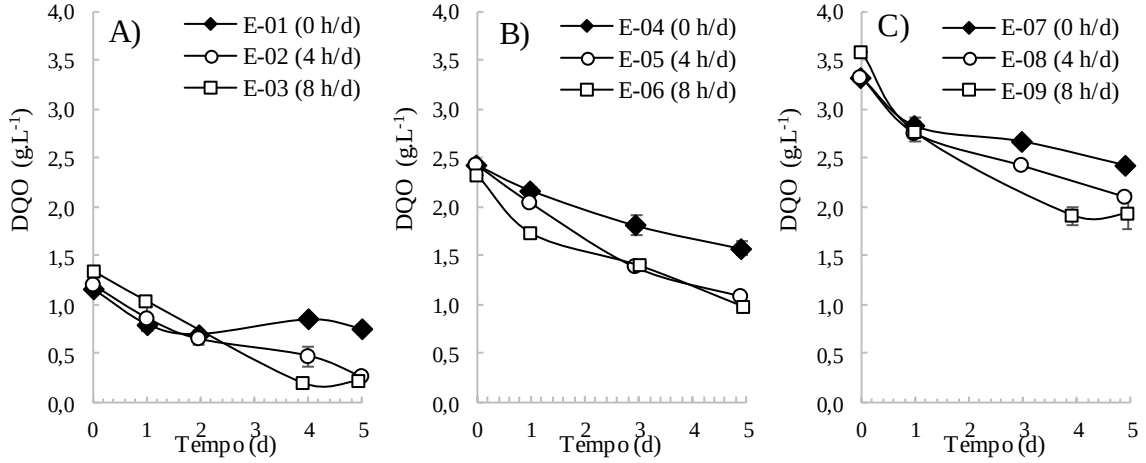


Figura 2: Efeitos da aeração intermitente na evolução da demanda química de oxigênio (DQO) média ao longo do tempo. Concentração inicial de glicose: A) 1 $g.L^{-1}$; B) 2 $g.L^{-1}$; e C) 3 $g.L^{-1}$.

Modelo empírico e superfície de resposta

Os dados do experimento fatorial foram utilizados para a construção de um modelo empírico para a previsão de valores de descoloração (Y_1), K (Y_2) e remoção de DQO (Y_3). A concentração de glicose (X_1) e aeração intermitente (X_2) foram tratadas como variáveis contínuas representadas pelos códigos -1, 0 e 1 para os fins de cálculo.

$$Y_1 = 83{,}100 + 11{,}392\,X_1 - 5{,}775\,X_1^2 - 17{,}275\,X_2 - 12{,}675\,X_2^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 1{,}303 + 0{,}292\,X_1 - 0{,}380\,X_1^2 - 0{,}879\,X_2 - 0{,}136\,X_1X_2 \quad (2)$$

$$Y_3 = 632{,}322 + 107{,}767\,X_1 - 70{,}233\,X_1^2 + 164{,}342\,X_2 - 62{,}908\,X_2^2 \quad (3)$$

Os coeficientes estatisticamente significativos (p-valor<0,1) com seus respectivos erros padrão são mostrados na Tabela 2. Os efeitos lineares da aeração foram os mais importantes sobre as respostas Y_1 e Y_2, impactando negativamente a remoção de cor. A interação dos fatores foi significativa na previsão dos valores de K, mas não para a descoloração no longo prazo. Apesar do impacto positivo da glicose sobre essas variáveis, os valores negativos obtidos para as correlações quadráticas apontaram para uma inibição da remoção de cor e K para concentrações elevadas do co-substrato. Isto pode estar relacionado a outros fatores limitantes da reação, a saber: atividade das enzimas envolvidas na descoloração; transferência de massas do composto azo através da membrana celular; e capacidade de regeneração de cofatores enzimáticos que atuam como doadores de elétrons à molécula de azo (Chang et al., 2001; Imran et al., 2016).

Conforme a Eq. (3), a remoção de DQO aumenta com os aumentos da concentração inicial de glicose e da frequência de aeração. Os termos lineares de X_1 e X_2 são positivos, mas a remoção de DQO também é limitada para níveis mais elevados de glicose e aeração. Os efeitos da concentração do co-substrato sobre essa resposta, menos visíveis pela análise da Figura 2, também se mostraram significativos na ANOVA dos fatores, a 90% de probabilidade. Considerando esta fonte de carbono como fator limitante do crescimento microbiano, a taxa de todas as reações é dependente da concentração de glicose (Monod, 1949). Os efeitos interativos não foram estatisticamente significativos na previsão de Y_3.

A qualidade do ajuste do modelo quadrático também foi avaliada por ANOVA, que mostrou que todas as regressões foram altamente significativas (resultados não demonstrados). Os valores de R^2 foram de 0,93, 0,96 e 0,94 para Y_1, Y_2 e Y_3, respectivamente. O modelo se ajustou bem aos dados de descoloração no longo prazo (p-valor da falta de ajuste = 0,2937), mas o ajuste foi menos confiável para as demais respostas.

Tabela 2: Análise de variância dos coeficientes de regressão para as respostas descoloração (Y_1), K (Y_2) e remoção de DQO (Y_3). Nível de significância de 10%.

	Y_1 - Descoloração (120 h)				Y_2 - K				Y_3 – Remoção de DQO			
Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t_{calc}	p-valor	Coeficiente	Erro padrão	t_{calc}	p-valor	Coeficiente	Erro padrão	t_{calc}	p-valor
Média	83,100	3,066	27,1	<0,001	1,303	0,077	17,0	<0,0001	632,322	27,180	23,3	<0,001
X_1	11,392	1,680	6,8	<0,001	0,292	0,054	5,4	<0,001	107,767	14,887	7,2	<0,001
X_1^2	-5,775	2,909	-2,0	0,0686	-0,380	0,094	-4,1	0,0014	-70,233	25,785	-2,7	0,0174
X_2	-17,275	1,680	-10,3	<0,001	-0,879	0,054	-16,2	<0,0001	164,342	14,887	11,0	<0,001
X_2^2	-12,675	2,909	-4,4	<0,001					-62,908	25,785	-2,4	0,0298
$X_1 \cdot X_2$					-0,136	0,066	-2,1	0,0608				

Biodegradação do DB22

Durante o tratamento biológico, o pico no intervalo de luz visível (483 nm) foi gradualmente extinto na maioria das condições. Nos experimentos não sujeitos à aeração intermitente, o máximo se deslocou do intervalo visível em direção a menores comprimentos de onda (Figura 3). Sob condições anóxicas em conjunto com maiores concentrações de glicose, houve formação de novos picos nos comprimento de onda de 215 e 255 nm, o que não foi observado nos experimentos aerados intermitentemente (Fig. 3-B). Os metabólitos da descoloração do azo detectáveis nesta faixa do espectro são normalmente associados às aminas aromáticas (Pinheiro et al., 2004).

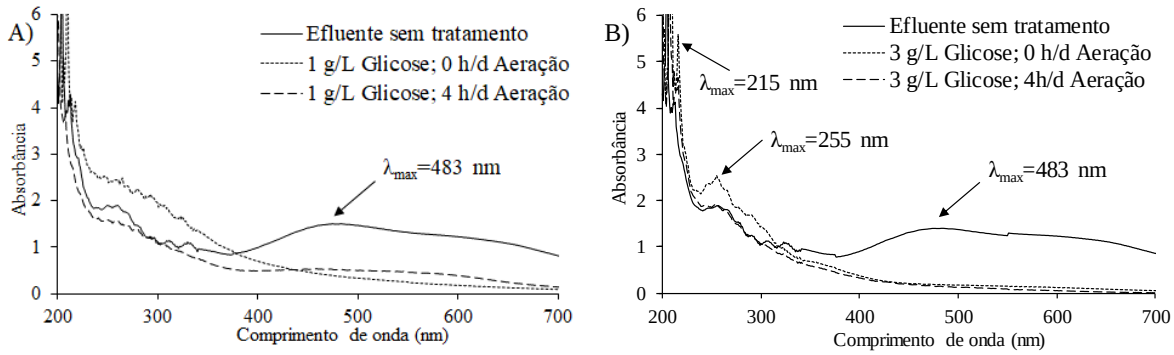


Figura 3: Espectro UV-VIS de efluente sintético no tempo inicial (efluente sem tratamento) e após tratamento biológico (120 h) em condições modelo. Comparação entre amostras de: **A)** experimentos E-01 (1 g.L^{-1} glicose, 0 h.d^{-1} aeração intermitente) e E-02 (1 g.L^{-1} glicose, 4 h.d^{-1} aeração intermitente); e **B)** experimentos E-07 (3 g.L^{-1} glicose, 0 h.d^{-1} aeração intermitente) e E-08 (3 g.L^{-1} glicose, 4 h.d^{-1} aeração intermitente).

A degradação do DB22 pode liberar moléculas de anilina e ácido sulfanílico (Gavazza et al., 2015). Este último e seu sal correspondente de sódio possuem picos nas regiões de 215, 247 e 258-269 nm (Hsueh e Chen, 2007; Pinheiro et al., 2004). Possivelmente, houve acúmulo de ácido sulfanílico ou de outros derivativos da anilina após a descoloração do DB22 nos ensaios não-aerados. Em contraste, observou-se um decréscimo nos valores de absorbância na faixa do UV no experimento E-02 *(*1 g.L^{-1} glicose, 4 h.d^{-1} aeração intermitente), como demonstrado na Fig. 3-A. Em outros experimentos com aeração intermitente, não foram observados aumento ou redução nessas regiões do espectro. Os resultados sugerem que a aplicação de aeração intermitente melhorou o grau de mineralização do DB22.

Comunidade bacteriana

As amostras de biomassa do inóculo e de experimentos modelo foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2000. Duas condições foram escolhidas: 1 g.L^{-1} glicose e tempo de aeração intermitente de 4 h.d^{-1} (E-02); e 2 g.L^{-1} glicose e tempo de aeração intermitente de 0 h.d^{-1} (E-04). E-02 apresentou maior grau de mineralização do DB22 e E-04 destacou-se pela maior velocidade média de descoloração e maior diversidade bacteriana (resultados não demonstrados). A maioria dos gêneros identificados são capazes de produzir enzimas que podem estar envolvidas na biodegradação de corantes azo, como será discutido a seguir.

No experimento aerado intermitentemente (E-02), microrganismos facultativos foram positivamente selecionados. Bactérias similares a *Klebsiella* aumentaram sua proporção de 1,3%, no inóculo, para 54,4% (Figura 4). Representantes deste gênero podem degradar compostos azo em condições anaeróbias, aeróbias ou microaerofílicas (Wong and Yuen, 1996; Yu et al., 2012; Zhang et al., 2010). Alguns estudos relataram que estirpes de *Klebsiella* também degradaram as aminas aromáticas produzidas na descoloração do azo quando prevaleceram condições aeróbias (Cui et al., 2012; Franciscon et al., 2009b).

Indivíduos semelhantes a *Enterococcus*, que compunham 53,9% do inóculo, quase desapareceram em E-02. Contudo, o gênero continuou presente no ensaio não-aerado (E-04) com elevada abundância relativa (16,0%), indicando que a aeração não foi favorável ao crescimento destes organismos. A descoloração de corantes azo por *Enterococcus* foi referida por muitos autores (Chen et al., 2004; Chung et al., 1992; Wang et al., 2004). Estes estudos associam a capacidade de degradação do azo à produção de enzimas da classe azoredutase pelo gênero. Em geral, a enzima depende da presença de cofatores enzimáticos – e.g. NADH, NADPH, Riboflavina, FMN, entre outros – e ausência de oxigênio para catalisar a reação de quebra da ligação que causa cor.

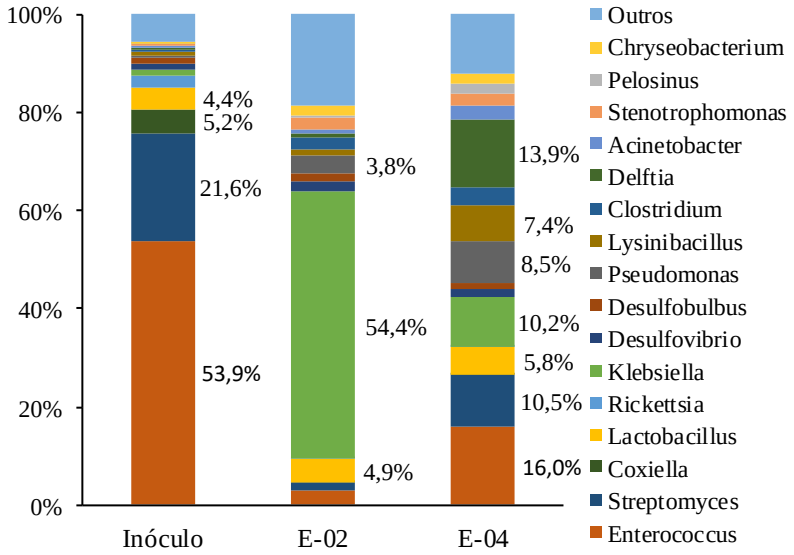


Figura 4: Abundância relativa dos principais gêneros do domínio Bacteria presentes nas amostras do inóculo e de dois experimentos. E-02: 1 $g.L^{-1}$ glicose, 4 $h.d^{-1}$ aeração intermitente; E-04: 2 $g.L^{-1}$ glicose, 0 $h.d^{-1}$ aeração intermitente.

Padrão similar foi observado para bactérias semelhantes a *Streptomyces*, que decresceram em proporção de 21,6% para 1,6%, em E-02, e para 10,5% em E-04. Este gênero é comumente encontrado em solos alcalinos e pode produzir enzimas hidrolíticas (Madigan et al., 2014). Estudos demonstraram que estirpes de *Streptomyces* foram capazes de degradar corantes azo sulfonados e o ácido sulfanílico, um metabólito comum, após modificações na estrutura química destas moléculas para conferir maior semelhança à lignina (Pasti-Grigsby et al., 1992; Paszczynski et al., 1992, 1991). Estes estudos indicam que o gênero é capaz de converter compostos aromáticos semelhantes à lignina, que é o caso de muitos corantes da classe azo.

Curiosamente, diversos gêneros pouco abundantes no tempo inicial do experimento assumiram proporções elevadas no experimento E-04. Congêneres de *Pseudomonas* e *Delftia* aumentaram suas abundâncias relativas de 0,7 a 8,5% e de 0,4 a 13,9%, respectivamente. Gêneros semelhantes a *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pelosinus*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, entre outros, estão entre as taxa positivamente selecionadas neste ensaio. Muitas dessas bactérias são capazes de produzir azoredutases e enzimas ligninolíticas, que podem atuar na biodegradação do azo (Phugare et al., 2011; Saratale et al., 2013; Telke et al., 2010). A interação sinérgica entre essas enzimas resultou em excelente remoção de cor nesta condição. Alguns desses microrganismos também são capazes de degradar compostos aromáticos (Konopka et al., 1989; Xiao et al., 2009).

Testes de toxicidade

A toxicidade do efluente bruto e tratado (E-02 e E-04) foi avaliada utilizando *D. magna* como organismo-teste. Não houve sobreviventes nas amostras de AR sem tratamento em nenhuma das diluições testadas (Tabela 3). Após tratamento biológico, a mortalidade média nas amostras com diluição de 1:10 decresceu para 11±11 e 7±13% nos ensaios E-02 e E-04, respectivamente. Para a diluição de 1:4, porém, observou-se um aumento considerável da toxicidade aguda no experimento não-aerado (mortalidade de 47±12%), enquanto não foram observadas mudanças significativas em E-02. A mortalidade aumentou continuamente até que não houve sobrevivência nos experimentos E-02 e E-04, respectivamente, nas diluições de 1:1 e 1:2.

Tabela 3: Mortalidade média de neonatos de *D. magna* expostos durante 48 h a diferentes diluições de amostras de efluente têxtil sintético contendo DB22 (32,5 $mg.L^{-1}$), antes e após tratamento biológico por 120 h em duas condições. E-02: 1 $g.L^{-1}$ glicose, 4 $h.d^{-1}$ aeração intermitente; E-04: 2 $g.L^{-1}$ glicose, 0 $h.d^{-1}$ aeração intermitente.

		Mortalidade (%)				
		1:10	**1:4**	**1:2**	**3:4**	**1:1**
E-02	Efluente bruto	100	100	100	100	100
	Efluente tratado	11±11	10±10	17±11	40±10	100
E-04	Efluente bruto	100	100	100	100	100
	Efluente tratado	7±13	47±12	100	100	100

A menor toxicidade de E-02 pode ser atribuída à biodegradação de subprodutos da descoloração do DB22 e à maior remoção de matéria orgânica nos experimentos com aeração intermitente. Amaral et al. (2014) observaram que não houve redução da toxicidade à *D. magna* em amostras de um efluente têxtil tratado em condição anaeróbia. Após utilização do pós-tratamento aeróbio, a ecotoxicidade dessa AR reduziu significativamente. Em outros estudos, também houve redução da mortalidade do bioindicador quando exposto a uma solução de corantes azo submetida a tratamento sequencial microaerofílico-aeróbio (Franciscon et al., 2009b, 2009a). Sabe-se que a as aminas aromáticas são recalcitrantes ao tratamento anaeróbio, embora sejam facilmente degradáveis em condições aeróbias (Pandey et al., 2007). A presença do oxigênio melhorou a eficiência de degradação de intermediários tóxicos e de demais compostos orgânicos que conferem DQO, reduzindo a ecotoxicidade da AR analisada.

Conclusões

O uso da aeração intermitente melhorou a biodegradação do DB22 e a remoção de DQO, mas diminuiu a velocidade de descoloração. A remoção de cor no longo prazo também foi afetada para frequências muito elevadas de aeração (8 $h.d^{-1}$), o que está relacionado ao uso preferencial do O_2 como aceptor de elétrons em detrimento do azo. Curiosamente, estes impactos negativos foram reduzidos sob condições específicas e velocidades de descoloração satisfatórias foram obtidas para níveis intermediários de aeração, especialmente quando houve maior suplementação de glicose. A menor toxicidade aguda a *D. magna* em testes conduzidos com experimento aerado intermitentemente confirmaram o menor impacto ambiental da estratégia. O alcance de eficiências equiparáveis àquelas dos processos convencionais anaeróbio-aeróbios em um único compartimento reacional mostra que tecnologias mais compactas podem ser desenvolvidas com base na aplicação de aeração intermitente.

Referências bibliográficas

Amaral, F.M., Kato, M.T., Florêncio, L., Gavazza, S., 2014. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. Bioresour. Technol. 163, 364–369.

Bandounas, L., Wierckx, N.J., de Winde, J.H., Ruijssenaars, H.J., 2011. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. BMC Biotechnol. 11, 94.

Chen, H., Wang, R.F., Cerniglia, C.E., 2004. Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from Enterococcus faecalis. Protein Expr. Purif. 34, 302–310.

Cui, D., Li, G., Zhao, D., Gu, X., Wang, C., Zhao, M., 2012. Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. J. Hazard. Mater. 221–222, 185–192.

Dafale, N., Agrawal, L., Kapley, A., Meshram, S., Purohit, H., Wate, S., 2010. Selection of indicator bacteria based on screening of 16S rDNA metagenomic library from a two-stage anoxic-oxic bioreactor system degrading azo dyes. Bioresour. Technol. 101, 476–484.

Dai, R., Chen, X., Xiang, X., Wang, Y., Wang, F., 2018. Understanding azo dye anaerobic bio-decolorization with artificial redox mediator supplement: Considering the methane production. Bioresour. Technol. 249, 799–808.

Ferraz, A.D.N., Kato, M.T., Florencio, L., Gavazza, S., 2011. Textile effluent treatment in a UASB reactor followed by submerged aerated biofiltration. Water Sci. Technol. 64, 1581–1589.

Gavazza, S., Guzman, J.J.L., Angenent, L.T., 2015. Electrolysis within anaerobic bioreactors stimulates breakdown of toxic products from azo dye treatment. Biodegradation 26, 151–160.

Imran, M., Arshad, M., Negm, F., Khalid, A., Shaharoona, B., Hussain, S., Mahmood Nadeem, S., Crowley, D.E., 2016. Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in Shewanella sp. strain IFN4. Ecotoxicol. Environ. Saf. 124, 42–49.

Litter, M.I., 2005. Introduction to Photochemical Advanced Oxidation Processes for Water Treatment, in: Environmental Photochemistry Part II. pp. 325–366.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2014. Brock Biology of Microorganisms, Igarss 2014. Pearson.

Monod, J., 1949. The Growth of Bacterial Cultures. Annu. Rev. Microbiol. 3, 371–394.

Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L., 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. Int. Biodeterior. Biodegrad. 59, 73–84.

Phugare, S.S., Kalyani, D.C., Surwase, S.N., Jadhav, J.P., 2011. Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed bacterial consortium. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1288–1296.

Pinheiro, H.M., Touraud, E., Thomas, O., 2004. Aromatic amines from azo dye reduction: Status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. Dye. Pigment. 61, 121–139.

Santos, A.B., Cervantes, F.J., van Lier, J.B., 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresour. Technol. 98, 2369–2385.

Santos, A.B., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., 2004. Azo dye reduction by thermophilic anaerobic granular sludge, and the impact of the redox mediator anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) on the reductive biochemical transformation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 62–69.

Senan, R.C., Abraham, T.E., 2004. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. Biodegradation 15, 275–280.

Stams, A.J.M., Plugge, C.M., 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. Nat. Rev. Microbiol. 7, 568–577.

Tan, L., He, M., Song, L., Fu, X., Shi, S., 2016. Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast Scheffersomyces spartinae TLHS-SF1. Bioresour. Technol. 203, 287–294.

Van Der Zee, F.P., Villaverde, S., 2005. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - A short review of bioreactor studies. Water Res. 39, 1425–1440.

Waghmode, T.R., Kurade, M.B., Sapkal, R.T., Bhosale, C.H., Jeon, B.H., Govindwar, S.P., 2019. Sequential photocatalysis and biological treatment for the enhanced degradation of the persistent azo dye methyl red. J. Hazard. Mater. 115–122.

Xiao, C., NING, J., YAN, H., SUN, X., HU, J., 2009. Biodegradation of Aniline by a Newly Isolated Delftia sp. XYJ6. Chinese J. Chem. Eng. 17, 500–505.

Yang, Q., Li, C., Li, H., Li, Y., Yu, N., 2009. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. Biochem. Eng. J. 43, 225–230.

TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ESGOTO DOMÉSTICO EM UM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO ESTRUTURADO: PERFORMANCE E ESTABILIDADE

Julliana Alves da Silva[1]; Fernando G. Fermoso[2], Marcelo Zaiat[3], Adriana Ferreira Maluf Braga[4], Gustavo Henrique Ribeiro da Silva[5]

[1]Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental daFEB/UNESP;
[2] Pesquisador do Instituto *La Grasa*, Sevilha-Espanha
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.
[4]Pós-doutorandado Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[5]Professor orientador do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da FEB/UNESP.

Resumo. *Avaliou-se o Reator Anaeróbio de Leito Fixo Estruturado (RALFE) no tratamento de esgoto doméstico, com foco no desempenho e estabilidade operacionais, comparando-se com um convencional reator UASB.Três tempos de detenção hidráulicos (TDH) (12; 8; 6 horas) foram aplicados em ambos os reatores, RALFE e UASB, operados em paralelo, por 430 dias, em escala piloto, alimentados com esgoto doméstico. As concentrações médias de matéria orgânica (MO)no afluente do RALFE e UASB foram de 539±164 e 692±202mg.L^{-1}, respectivamente, com concentrações médias de MO no efluente de 160 ± 70 e 153± 50 mg.L^{-1}, respectivamente. O RALFE apresentou uma eficiência média de remoção de MO de 67±14% (TDH 12h); 74±9% (TDH 8h) e 63±14% (TDH 6h), comparado a 73±9% (TDH 12h); 81±5% (TDH 8h) e 70±12% (TDH 6h) apresentados pelo UASB. O RALFE manteve o pH estável e neutro, com valor médio de 7,2±0,1 no efluente e concentração média de ácidos graxos voláteis no efluente de 17±4 mg.L^{-1}, durante a operação. Os resultados indicaram que o RALFE é uma alternativa adequada para o tratamento de esgoto doméstico, sendo compatível e estatisticamente similar ao reator UASB, mostrando diferença estatística somente no TDH de 8 horas.*

Introdução

Embora a maioria dos reatores anaeróbios de alta taxa tenha provado sua aplicabilidade para diferentes tipos de águas residuárias, com carga orgânicas variáveis, existem certas divergências para a seleção de um tipo particular de reator em relação à controle de condições operacionais (Rajeshwari, et al., 2000), eficácia do tratamento, estabilidade, configuração mais adequada dependendo do objetivo a ser alcançado e finalidade da aplicação.

Reatores que alcancem altos valores de remoção de matéria orgânica (MO), estabilidade no tratamento, gerando um efluente que se enquadre em padrões de lançamento de legislação ambiental por exemplo são cruciais, principalmente em países em desenvolvimento, onde grande quantidade de efluentes não tratados ainda é lançada no meio ambiente, como no Brasil. No caso particular de esgoto sanitário, em muitos países, os reatores UASB têm sido utilizados desde a última década para tratar este tipo de água residuária e não há dúvida de que ele ganhou fama na última década (Bhatti et al., 2014). As condições climáticas favoráveis e os grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento fizeram com que a América Latina, notadamente o Brasil, a Colômbia e o México, se tornassem os principais candidatos no uso de reatores UASB para o tratamento de esgoto doméstico. Sendo considerada uma configuração consolidada, especialmente na América Latina e na Índia, onde possui várias plantas em escala real (Chernicharo et al., 2015).

No entanto, O UASB ao longo de sua aplicação no tratamento de esgoto doméstico, tem demonstrado problemas com perda de sólidos no efluente, perda de gases dissolvidos no efluente e o acúmulo de escuma no separador trifásico (Pereira et al., 2015), com difícil

disposição no ambiente após o descrate. Desse modo, os reatores UASB foram desenvolvidos para tratar efluentes cuja concentração favoreça a mistura e a ocorrência da granulação do lodo promovidas pelos gases, e não pelo fluxo do líquido

Uma das alternativas é o aumento da concentração inicial de biomassa no sistema, fazendo com que o substrato seja o fator limitante nos processos de produção e manutenção celular. Essa condição pode ser alcançada por meio de reatores de leito fixo, nos quais observa-se um crescimento regulado da biomassa (Zaiat, Cabral e Foresti, 1994).Os reatores de leito fixo podem ser expandidos, estruturados e fluidizados (Mockaitis et al., 2014)

Tradicionalmente, os reatores anaeróbios de leito fixo empregados no tratamento de águas residuárias são embalados aleatoriamente, o que é semelhante aos filtros anaeróbios dos quais eles evoluíram, entretanto, mesmo com os benefícios relacionados à fixação de biomassa, a distribuição aleatória dos meios tende a limitar sua aplicação em águas residuárias ricas em sólidos, pois o crescimento contínuo de biomassa leva a um certo entupimento do leito em operações de longo prazo (de Aquino, Fuess e Pires, 2017). Devido a essas limitações, autores propuseram recentemente o uso de suporte fixo estruturado (Mockaitis et al., 2014;Camiloti et al., 2014). Segundo os autores, a configuração do suporte estruturado evita que os sólidos se acumulem e o uso de material de alta porosidade (> 90%) também pode prevenir problemas hidrodinâmico.

Alguns estudos já foram realizados com o Reator Anaeróbio de Leito Fixo Estruturado (RALFE) para remoção de nitrogênio do substrato sintético (Santos et al., 2016); produção de hidrogênio a partir de águas residuárias sintéticas (Blanco, Fuess e Zaiat, 2017) e tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar (Fuess et al., 2017). No entanto, até onde sabemos, não há estudos na literatura utilizando o RALFE no tratamento de esgoto doméstico.

Neste sentido, a presente pesquisa avaliou o desempenho de uma recém configuração de reator, o RALFE, no tratamento de esgoto doméstico, comparado com um convencional UASB.

Materiale Métodos

Descrição da pesquisa e aparato experimental

O esgoto doméstico é proveniente de um desvio na rede municipal de esgoto de São Carlos, o qual é peneirado para remoção de sólidos grosseiros (1,5 mm) e bombeado para dois reatores anaeróbios, o Reator Anaeróbio de Leito Fixo Estruturado (RALFE) e Reator Anaeróbio de Manta de Lodo de Fluxo Ascendente, o convencional UASB, construídos em acrílico com volume útil de 5,7 L (RALFE) e 11.3 L (UASB) .Ambos foram inoculados com lodo de reator UASB, proveniente da Avícola Dacar S.A., localizada em Tiête-SP.O leito de fixação da biomassa no RALFE foi composto de 8 tiras de espuma de poliuretano, com hastes internas de plástico para proporcionar rigidez. As faixas de espuma tinham 600 mm de comprimento, com formato cúbico (10x10 mm). As 8 hastes foram fixas ao reator por uma grade de metal afixada na parte superior do reator.

Operação dos reatores

A operação foi dividida em 4 TDHs, que foram reduzidos ao longo da operação. No presente artigo são apresentados os resultados referentes à 3 TDHs. No total, os reatores foram operados por 430 dias, com as mudanças de TDH baseando-se na maior estabilidade de cada etapa. As condições operacionais de cada TDH estão descritas na Tabela 1 e o esquema dos reatores com as respectivas dimensões estão apresentados na Figura 1. O último TDH de 5 horas ainda está em operação, com previsão de mudança para a etapa 4 em Junho de 2019.

Tabela 1: Condições operacionais dos reatores RALFE e UASBR .

Fase	Período (dias)		Vazão (L.h^{-1})		TDH (horas)	
	RALFE	UASB	RALFE	UASB	RALFE	UASB
1	122	113	0,45	0,94	12	12
2	189	171	0,67	1,41	8	8
3	119	146	0,90	1,88	6	6

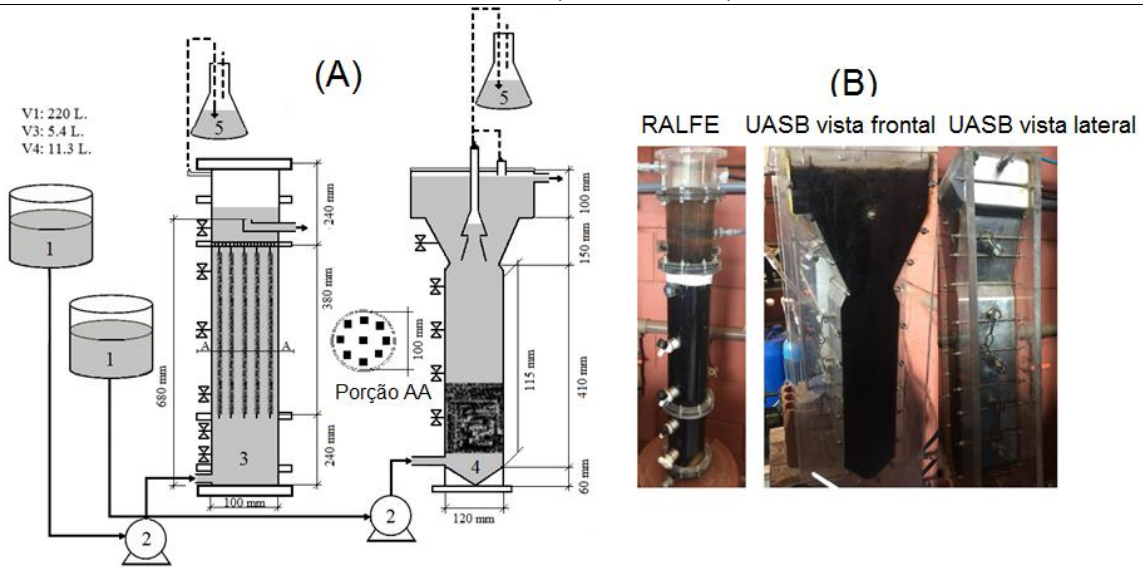


Figura 1: Layout do sistema de tratamento anaeróbico: (A) Esquema do sistema de tratamento. Legenda: 1 - esgoto doméstico bruto (tanque de armazenamento), 2 - bombas, 3 - RALFE, 4 - UASB; 5 - selos de água. Fluxos líquidos (──), fluxos de biogás (- - -). (B) Figuras frontais e laterais dos reatores RALFE e UASB.

Métodos de análise

Os sistemas foram monitorados em termos de estabilidade operacional e desempenho na remoção de Matéria Orgânica (MO), com levantamento da composição do biogás, com foco no metano. As amostras foram analisadas por Demanda Química de Oxigênio (DQO) para a concentração de matéria orgânica (MO), dividida em total e coloidal (total: amostras brutas; coloidais: amostras brutas filtradas com membrana de porosidade de 1,2 μm), sólidos suspensos totais/voláteis (SST; SSV) e pH de acordo com APHA, AWWA e WEF (2005); Alcalinidade (Total, Parcial e Intermediária - AT, AP e AI) de acordo com (Ripley, Boyle e Converse, 1986); Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV) de acordo com Dillalo e Albertson, (1961). A composição do biogás foi determinada em cromatógrafo a gás (GC 2014 Shimadzu, Kyoto, Japão).

Análise estatística

Os resultados de $MO_{\%}$ e porcentagem de metano de cada reator foram trabalhados estatisticamente da seguinte forma: Comparação entre os reatores: Cada TDH operado de cada reator, foi comparado com seu TDH respectivo, entre os reatores (12x12; 8x8; 6x6), utilizando o teste *t* para amostras independentes; Comparação entre os TDH de um mesmo reator: Os 3 TDHs foram comparados entre si, de cada reator, utilizado o teste One-way-ANOVA, seguido do teste de Tuckey HSD.

Estes parâmetros foram testados quanto à significância estatística em nível de confiança de 95%, com um valor de p de 0,05, usando o software Statistica 10 (Stat Soft, Inc., Tulsa, EUA) e a normalidade dos dados foi testada antes dos testes estatísticos, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

Resultados e Discussão

Avaliação do desempenho do RALFE

A temperatura média ambiente, durante a operação do RALFE, foi de 23±3 °C. Os perfis temporais do RALFE para remoção de MO em porcentagem ($MO_{\%}$), AOV, SST e AT estão apresentados na Figura 2.

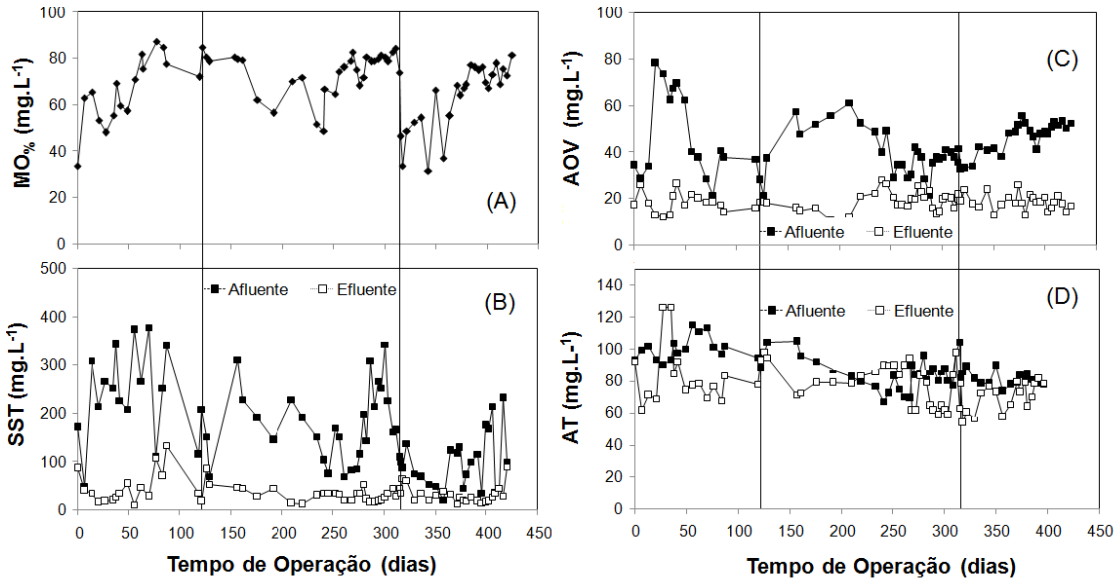


Figura 2: Perfis temporais do RALFE: (A) Remoção de matéria orgânica ($MO_{\%}$); (B) Sólidos em suspensão totais (SST); (C) Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV); (D) Alcalinidade Total (AT).

Durante o período de partida (TDH 12h), a $MO_{\%}$ permaneceu abaixo de 60% na maior parte do tempo, aumentando para 71% após 55 dias de operação (Figura 2A). Os valores menores de $MO_{\%}$ ocorridos no início da partida deve-se ao fato de que o consórcio microbiano oriundo do inóculo estava em processo de adaptação à nova fonte de carbono, com concentração de MO muito menor que um afluente de abatedouro de aves, o qual o reator do inóculo tratava.

Após a redução de TDH para 8horas, o reator apresentou diminuição no desempenho (126º a 250º dia), com valores médios de 68±11%. Após esse período, durante os 256º a 315º dias, o reator recuperou a estabilidade e os valores de $MO_{\%}$ alcançaram uma média de 78±4%. Pode-se observar na Figura 2A que, após a redução do TDH para 6 horas, o RALFE apresentou uma média de $MO_{\%}$ de 54±13, aumentando para uma média de $MO_{\%}$ de 75±4%, após o dia 387.Com base nos testes estatísticos, comparando-se os valores de $MO_{\%}$ entre os TDHs operados, os dados normais mostraram diferença significativa apenas entre os TDHs 8h e 6h, utilizando o teste One-way-ANOVA/Tuckey, com variâncias desiguais, sendo o TDH 8h com a maior variação em relação aos outros TDHs operados. Ao realizar a análise estatística com os dados de $MO_{\%}$ após a recuperação da eficiência de cada TDH, mais especificamente entre os dias 56 a 122 (TDH 12h), 256 a 315 (TDH 8h) e 388 a 425 (TDH 6h), o reator mostrou que mesmo após sofrer com a mudança no TDH, diminuindo os valores de $MO_{\%}$, conseguiu recuperar seu desempenho, sem diferença estatística entre os períodos, apresentando média de 79±6%; 78±4% e 74±4%, respectivamente.

A Figura 3 mostra a Carga Orgânica Aplicada (COP) ao longo da operação do RALFE, expressa em $mg.DQO.L^{-1}.d^{-1}$. Observando-se a COP é possível verificar que houve redução de carga no início do TDH de 6h (315º dia), fato que também pode ter afetado a perda de eficiência deste período. Porém, o aumento da COP não afetou a $MO_{\%}$ do RALFE, onde houve o aumento das porcentagens de remoção de MO após esse período.

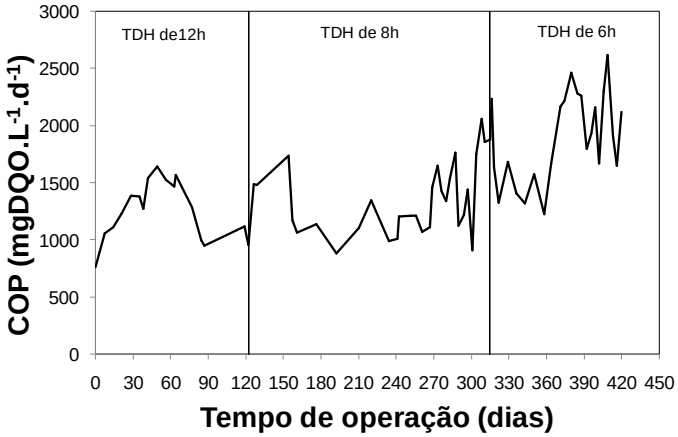


Figure 3: Carga orgânica aplicada (COP) do RALFE durante a operação.

Mockaitis et al., (2014) avaliaram um RALFE alimentado com efluente sintético de baixo teor de sólidos, para evitar a variação na composição que ocorre com o esgoto doméstico real. O reator operado pelos autores alcançou uma remoção média de MO de 78±5% (TDH de 12h), com uma concentração afluente de MO de 404,4 $mg.L^{-1}$ e efluente de 88±19 $mg.L^{-1}$, em um reator de bancada, com um volume de trabalho de 4,77 L. No entanto, como afirmam os autores, esta tecnologia está sendo desenvolvida para evitar o entupimento da cama durante o tratamento de efluentes com alto teor de sólidos, o que é a principal vantagem deste reator.

Com relação aos SSVs, houve grande variação na concentração de afluentes (Tabela 2). No HRT 12 (77o a 87º dia) houve uma oscilação abrupta nos valores do efluente, o que pode estar relacionado à lavagem dos sólidos do inóculo, usual durante o período de partida. O valor médio no efluente, durante os dias 1 a 76, foi de 35 ± 19, aumentando para 104 ± 26 durante os dias 77 a 87.

No TDH de 8h e 6h, o RALFE demonstrou uma retenção estável de sólidos, mesmo com variação de concentração no afluente (Figura 2B) e diminuição do TDH. Um decréscimo do TDH pode propiciar o descolamento particulado da biomassa e a lavagem do consórcio microbiano do reator, devido à maior velocidade do líquido, aumentando a concentração de sólidos no efluente. No entanto, os RALFEs geralmente retêm biomassa, mesmo com altas concentrações de sólidos no afluente (Cuel et al., 2011).

Em Mockaitis et al., (2014) o RALFE não mostrou instabilidade durante a operação e os autores enfatizaram a necessidade de estudos adicionais com essa configuração, utilizando diferentes condições e efluentes reais.

De acordo com os resultados do presente trabalho, o AFSBR cumpriu seu papel no tratamento de esgoto doméstico. A estabilidade do RALFE foi vinculada à produção de AT e aos valores da relação AI/AP. De acordo com a Figura 2 (D), os valores de AT ao longo da operação tiveram um aumento no início do TDH de 12h, obtendo valores acima dos valores afluentes. Durante o restante da operação, os valores do efluente permaneceram estáveis. Estes valores podem estar relacionados aos valores médios de AOVs no afluente dos dias 30 a 60 no TDH de 12 h (70±6 $mg.L^{-1}$), diferente do valor médio para os dias restantes para este TDH (33±5 $mg.L^{-1}$), produzindo mais AT para tamponar o sistema. Os valores médios de AT de afluente e efluente, após a estabilização do TDH de 8h (a partir do dia 250 de operação) foram de 84±9 e 74±13 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Após a estabilização da TDH de 6h, que ocorreu após o dia 380, o valores médiosforam de 83±4 e 77±7 $mg.L^{-1}$. Na Figura 4 estão apresentados os valores da relação AI/AP do efluente do RALFE.

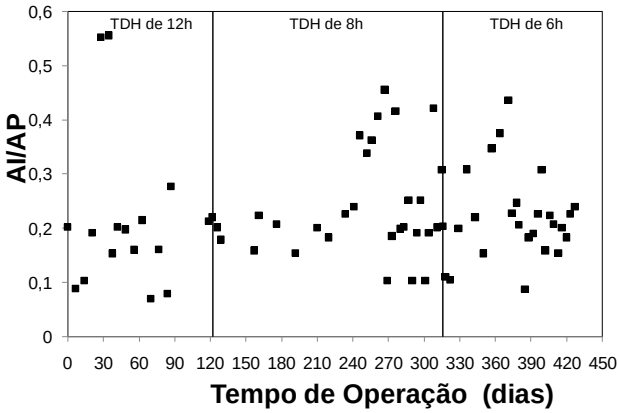


Figura 4: Valores da relação Alcalinidade Intermadiária (AI)/Alcalinidade Parcial (AP) para o efluente do RALFE.

Os valores médios de relação AI/AP no efluente do RALFE, nos TDH operados foram de 0,2±0,13; 0,2±0,09 e 0,2±0,09, para os respectivos TDHs de 12h, 8h, e 6h. Os valores variaram de 0,06 a 0,55 no TDH de 12 h, de 0,10 a 0,45 no TDH de 8h e 0,08 a 0,43 no TDH de 6h. Segundo Ripley, Boyle e Converse (1986) a relação AI/AP com valores maiores que 0,3 indica a ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia, mas segundo Foresti, (1994) quanto mais próximo de 0,3 a razão Quanto mais estável for o sistema, é possível ocorrer estabilidade no processo mesmo para valores diferentes de 0,3 se houver pouca variação durante a operação. Dos valores médios apresentados, observou-se que não houve variação considerável ao longo de cada TDH, portanto, pode-se afirmar que essas pequenas variações de mínimo e máximo de cada TDH não influenciaram estabilidade do sistema. Os valores médios de pH, do afluente e efluente, em cada TDH foram: 7,1±0,3, 7,2±0,1, 7,1±0,1 para o afluente (TDHs de 12h, 8h e 6h) e 7,2±0,1, 7,2±0,2 e 7,3±0,2. Esses valores indicaram que o RALFE manteve o pH estável e neutro durante a operação. Essa capacidade reforça a estabilidade do reator pois ele operou em um pH ótimo e constante, mesmo com uma flutuação nos valores de AOV no TDH de 12h, o que é muito importante para os consórcios metanogênicos.

Comparação entre os Reatores RALFE e UASB: Desempenho na remoção de matéria orgânica, retenção de sólidos em suspensão e aspectos físico-químicos

Os valores médios e desvios padrão das concentração de MO total (MO_T), MO coloidal (MO_C), SST e SSV do afluente e efluente de ambos os reatores operados neste estudo, nos diferentes TDHs, bem como as porcentagens de remoção de MO_T ($MO_{\%}$), estão apresentados na Tabela 2.

Houve uma variação substancial nos valores de MO_T ao longo da operação, o que é esperado para as operações que usam esgoto doméstico bruto. Metcalf e Eddy, (2003) classificam as águas residuais em fracas, médias e fortes de acordo com as concentrações de OM, com valores de 250, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Assim, o esgoto doméstico utilizado neste estudo é considerado de médio.

Por ser consolidado no tratamento de esgoto, o UASB serviu como um guia para avaliar o desempenho do RALFE. Nesta pesquisa, os valores médios de $MO_{\%}$ obtidos pelo UASB em cada TDH foram de 73±9% ; 81±5% e 70±12% (Tab. 2). Rizvi et al., (2015), utilizando dois reatores UASB em escala de bancada, com 10,2 L cada e tratando esgoto doméstico (MO_T afluente: 474 ± 36 $mgO_2.L^{-1}$; SST: 379 ± 38 $mg.L^{-1}$), operados em 4 TDHs diferentes (3, 6, 9 e 12 horas), encontraram valores de $MO_{\%}$ entre 70 a 84%. Segundo Khan et al., (2011), porcentagem de remoção de MO em UASB no máximo de 70%. Dentro do que foi descrito pelos autores, o UASB no presente estudo esteve de acordo para a comparação com o RALFE, apresentando até melhores porcentagens de remoção.

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão das concentração de Matéria Orgânica total (MO_T), Matéria Orgânica coloidal (MO_C), SST e SSV do afluente e efluente dos RALFE e UASB, nos diferentes TDHs.

	Parâmetros	RALFE			UASB		
		TDHde 12h	TDHde 8h	TDHde 6h	TDHde 12h	TDHde 8h	TDHde 6h
	$MO_{\%}$	67±14	74±9	63±14	73±9	80±5	70±12
Afluente	MO_T ($mg.L^{-1}$)	664±119	459±141	551±159	739±360	777±159	470±238
	MO_C ($mg.L^{-1}$)	230±64	126±47	158±60	207±70	170±55	133±84
	SST ($mg.L^{-1}$)	240±90	175±75	101±56	280±163	303±134	284±112
	SSV ($mg.L^{-1}$)	188±70	136±58	81±44	185±100	184±79	191±64
Efluente	MO_T ($mg.L^{-1}$)	210±79	112±30	185±55	180±58	143±30	117±38
	MO_C ($mg.L^{-1}$)	161±63	64±18	101±41	131±12	100±9	64±37
	SST ($mg.L^{-1}$)	46±34	34±15	29±16	46±36	45±40	33±18
	SSV ($mg.L^{-1}$)	31±19	24±8	23±12	35±31	37±35	24±9

Por ser considerada uma configuração já consolidada no tratamento de esgoto, o UASB foi utilizado como um guia para avaliar o desempenho do RALFE. Nesta pesquisa, os valores médios de $MO_{\%}$ obtidos pelo UASB em cada TDH foram de 73±9% ; 81±5% e 70±12% (Tab. 2). Rizvi et al., (2015), utilizando dois reatores UASB em escala de bancada, com 10,2 L cada e tratando esgoto doméstico (MO_T afluente: 474 ± 36 $mgO_2.L^{-1}$; SST: 379 ± 38 $mg.L^{-1}$), operados em 4 TDHs diferentes (3, 6, 9 e 12 horas), encontraram valores de $MO_{\%}$ entre 70 a 84%. Segundo Khan et al., (2011), porcentagem de remoção de MO em UASB no máximo de 70%. Dentro do que foi descrito pelos autores, o UASB no presente estudo esteve de acordo para a comparação com o RALFE, apresentando até melhores porcentagens de remoção.

Os valores médios de $MO_{\%}$ do RALFE em cada TDH foram de 67±14%, 74±9% e 64±14%, respectivamente (Tabela 2), atingindo até valores máximos de 87% e 84%, que ocorreram durante o TDH 12 e 8, respectivamente. Nos gráficos Box-plot da Figura 5 (A; B) é possível visualizar a variação da $MO_{\%}$ para ambos os reatores operados neste estudo. Os resultados não mostraram valores de *Outliers* e *Extremes*, que são pontos que diferem dramaticamente dos outros, que escapam à normalidade e podem causar anomalias nos resultados.

Outro ponto importante a ser destacado com relação ao RALFE, é que houve o ruptura dos grânulos do inóculo durante a inoculação, ao triturar o lodo, o que não aconteceu na inoculação do UASB, sendo relevante no aspecto de performance do RALFE, já que obteve valores acima de 60% de remoção de MO já na partida

A distribuição dos dados obtidos de $MO_{\%}$ nos reatores operados foi considerada normal de acordo com o teste K-S, com p>0,2. Comparando-se os reatores para $MO_{\%}$, em cada TDH, utilizando o teste t, os TDHs de 8h e 6h apresentaram diferença significativa entre o RALFE e UASB, com p=0,001 e p=0,0002, respectivamente. A Tabela 3 mostra os valores estatísticos para cada TDH comparado entre o RALFE e UASB.

Em relação à concentração de SST, os valores médios no afluente para os reatores RALFE e UASB foram de 240±90, 175±75, 101±56 $mg.L^{-1}$ e 280±163, 303±134, 284±112 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Os valores médios no efluente foram de 46±34, 34±15 e 29±16 $mg.L^{-1}$ para o RALFE e 46±36, 45±40 e 33±18 $mg.L^{-1}$, para o UASB (Tabela 2).

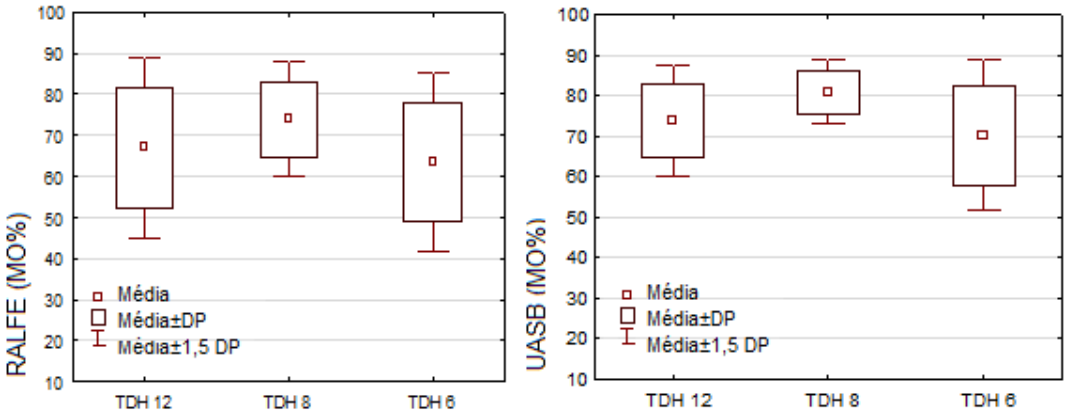


Figura 5: Box-plots dos valores de remoção de Matéria Orgânica (MO%) para o RALFEe UASB,nos diferentes TDHs operados.

Tabela 3: Teste *t* para amostras independentes, comparando a porcentagem de remoção de matéria orgânica (MO%) em cada TDH, entre os reatores RALFE e UASB.

	RALFE x UASB		
	TDHde 12h	TDHde 8h	TDHde 6h
Valor*p*	0,057	0,001	0,0002
Variância *p*	0,026	0,006	0,004
Valor *t*	1,95	3,36	3,97
Grupo 1(UASB)	74	81	76
Grupo 2 (RALFE)	67	74	64

Houve o descarte de escuma no UASB, na altura do separador trifásico, a cada 120 dias aproximadamente, removendo-se cerca de 250 ml de escuma. A escuma no interior do separador trifásico é considerada com uma limitação evidente do UASB (Foresti, Zaiat e Vallero, 2006). No caso da MO% e SST no efluente do UASB, porém pode ter influenciado na medição de volume de Biogás produzido, que não foi satisfatório durante a operação. NO caso do RALFE, não houve a remoção de lodo excedente, nem formação de escuma, porém a medição do volume de biogás também não foi satisfatória.

A capacidade do RALFE em tratar águas residuárias ricas em sólidos foi destacada por Fuess et al., (2017). Os autores usaram um RALFE comparado com um UASB no tratamento da vinhaça. A concentração média de MO no afluente foi de 29.000±5 $mgO_2.L^{-1}$, o SSV foi de 1002±243 $mg.L^{-1}$ e o pH foi de 4,5±0,1. O volume de trabalho foi de 2,5 L. (RALFE) e 3,5 L. (UASB). Os TDHs aplicados foram de 37h, 20 e 18 horas, e os reatores foram operados por 210 e 240 dias, respectivamente.

Na presente pesquisa, não houve tratamento preliminar, somente uma peneiração simples. Neste caso, ambos os reatores foram capazes de reter sólidos, sem perder eficiência, sendo viáveis como tratamento principal. Os valores médios de AT, AOV, pH e valores da relação AI/AP no afluente e no efluente de ambos os reatores utilizados neste estudo são mostrados na Tabela 4.

Os valores de pH afluente e efluente permaneceram estáveis e neutros entre os 3 TDHs operados (Tabela 3). O UASB também manteve a neutralidade entre o afluente e o efluente. Os sistemas anaeróbicos são altamente dependentes do pH e a faixa ideal de pH para as bactérias produtoras de metano é em torno de 6,8 e 7,2 (Mudrak e Kunst, 1986). O pH de um sistema anaeróbico é tipicamente mantido entre limites metanogênicos para evitar a predominância das bactérias formadoras de ácido, que podem causar acúmulo de ácidos voláteis. É essencial que o conteúdo do reator forneça capacidade tampão suficiente para neutralizar qualquer eventual acúmulo de AOV e, assim, evitar o acúmulo de digestores de zonas ácidas localizadas (Hulshoff Pol, 1995).

Tabela 4: Valores médios de Alcalinidade Total (AT), Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV), pH e relação AI/AP.

	Parâmetros	RALFE			UASB		
		TDH de 12h	TDH de 8h	TDH de 6h	TDH de 12h	TDH de 8h	TDH de 6h
Afluente	AT ($mg.L^{-1}$)	100±7	85±10	81±4	113±29	98±9	83±13
	AOV ($mg.L^{-1}$)	47±18	40±10	46±7	42±12	42±9	55±15
	AI/AP	0,2±0,1	0,2±0,06	0,3±0,05	0,4±0,12	0,3±0,13	0,3±0,1
	pH	7,1±0,3	7,2±0,1	7,1±0,1	7,1±0,2	7,2±0,2	7,1±0,2
Efluente	AT ($mg.L^{-1}$)	83±18	78±12	70±9	114±28	99±16	86±12
	AOV ($mg.L^{-1}$)	18±4	19±4	19±3	19±9	20±9	26±13
	AI/AP	0,2±0,13	0,2±0,09	0,2±0,09	0,2±0,11	0,3±0,12	0,3±0,1
	pH	7,2±0,1	7,2±0,2	7,3±0,2	7,2±0,1	7,4±0,2	7,1±0,2

Os valores médios de AOV no efluente do RALFE demonstram um consumo de ácidos, ligado à estabilidade do sistema, pois os AOV produzidos no interior do reator durante a acidogênese foram consumidos na fase de metanogênese, além de coincidir com os valores de pH neutros. Um fato importante relacionado aos valores de pH e AOV é que o tanque de armazenamento usado para controlar o fluxo, pode ter promovido uma digestão inicial, mas não acidificou o afluente, comprovado por pH neutro e estável e baixos valores de AOV, não impactando o desempenho dos reatores.

Conclusões

Constatou-se que houve viabilidade técnica da aplicação RALFE como unidade principal de tratamento de esgoto doméstico, sem a aplicação de um tratamento primário robusto, somente uma peneiração simples, quando comparado à um UASB operado em condições similares. O RALFE foi estatisticamente semelhante ao UASB, apresentando diferença significativa somente no TDH de 8h. Apresentou robustez para o tratamento de esgoto doméstico, mesmo com grande variação do afluente, atingindo valores de $MO_{\%}$ superiores a 60%. Suportou mudanças no TDH, recuperando a $MO_{\%}$ e estabilizando os fatores físico-químicos. Durante o período de recuperação, o RALFE apresentando valores médios de $MO_{\%}$de79±6%, 78±4% e 74±4%, para os respectivos TDH de 12h, 8h e 6h operados, sem diferença estatística entre os períodos de recuperação.

Referências Bibliográficas

APHA, AWWA, WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Bhatti, Z.A., Maqbool, F., Malik, A.H., Mehmood, Q., 2014. UASB reactor startup for the treatment of municipal wastewater followed by advanced oxidation process. Brazilian J. Chem. Eng. 31, 715–726.

Blanco, V.M.C., Fuess, L.T., Zaiat, M., 2017. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. Int. J. Hydrogen Energy 42, 12181–12196.

Camiloti, P.R., Mockaitis, G., Rodrigues, J.A.D., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., Zaiat, M., 2014. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. J. Chem. Technol. Biotechnol. 89, 1044–1050.

Chernicharo, C.A.L., van Lier, J.B., Noyola, A., Bressani Ribeiro, T., 2015. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14, 649–679.

Cuel, M.F., Kwong, W.H., Zaiat, M., Foresti, E., 2011. Solution of a heterogeneous modeling of a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor by the sequencing method. Can. J. Civ. Eng. 38, 415–421.

de Aquino, S., Fuess, L.T., Pires, E.C., 2017. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. Bioresour. Technol. 235, 219–228.

Dillalo, R; Albertson, O.E., 1961. Volatile acids by direct titration. Journal Water Pollution Control Federation, v. 33, n.4, 350-364

Foresti, E., 1994. Fundamentos do processo de digestão anaeróbia, in: Anais III Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Montevideo, pp. 97–110.

Foresti, E., Zaiat, M., Vallero, M., 2006. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment : Consolidated applications , new trends , perspectives , and challenges 3–19.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Ferraz, A.D.N., Persinoti, G.F., Squina, F.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. Appl. Energy, 189, 480–491.

Hulshoff Pol, L.H.W., 1995. Waste characteristics and factors affecting reactor performance.

Khan, A.A., Gaur, R.Z., Tyagi, V.K., Khursheed, A., Lew, B., Mehrotra, I., Kazmi, A.A., 2011. Sustainable options of post treatment of UASB effluent treating sewage: A review. Resour., Conserv., and Recyc., v. 55, n.12, 1232-1251.

Metcalf and Eddy, 2003. Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse, Forth. ed. McGraw-Hill Inc., New York.

Mockaitis, G., Pantoja, J.L.R., Rodrigues, J.A.D., Foresti, E., Zaiat, M., 2014. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. Bioprocess Biosyst. Eng. 37, 1361–1368.

Mudrak, K., Kunst, S., 1986. Biology of Sewage Treatment and Water Pollution Control. Ellis Horwood Ltd, England.

Pereira, J. de O., Raposo, L.R., Rodrigues, A.F., Aguiar, W.D.S., 2015. Aplicação de uma inovadora configuração de reator UASB ao tratamento de esgoto doméstico objetivando o controle da escuma, in: ABES. Rio de Janeiro, RJ, p. 10.

Rajeshwari, K.V.; Balakrishnan, M.; Kansal, A.; Lata, K.; Kishore, V.V., 2000. State-of-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. Renew. Sustain. Energy Rev. 4, 135–156.

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. J. Water Pollut. Control Fed. 58, 406–411.

Rizvi, H., Ahmad, N., Abbas, F., Bukhari, I.H., Yasar, A., Ali, S., Yasmeen, T., Riaz, M., 2015. Start-up of UASB reactors treating municipal wastewater and effect of temperature/sludge age and hydraulic retention time (HRT) on its performance. Arab. J. Chem. 8, 780–786.

Santos, C.E.D., Moura, R.B., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2016. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). J. Environ. Manage. 166, 519–524.

Zaiat, M., Cabral, A.K.A., Foresti, E., 1994. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo para Tratamento de Águas Residuárias: Concepção e Avaliação Preliminar de Desempenho. Rev. Bras. Eng. 11, 33–42.

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM REATOR DESENVOLVIDO PARA O TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO EM AMBIENTES DE BAIXAS TEMPERATURAS

Elias de Lima Neto[1]; Eduardo Cleto Pires[2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *O tratamento de efluentes sob baixa temperatura é um desafio para os processos anaeróbios nas atuais configurações de reatores utilizados. Neste sentido, o presente trabalho propôs um novo conceito de reator anaeróbio de fluxo ascendente com aquecimento localizado da biomassa aderida ao meio suporte. O reator foi testado nos TDHs de 24h e 12 h, e mantido em uma câmara climatizada a 15ºC. A diversidade de microrganismos e a eficiência na remoção de matéria orgânica foram parâmetros avaliados para estimar a performance do reator.*

Introdução

O tratamento biológico sob baixas temperaturas (<20ºC) ainda é um desafio para as concepções de reatores existentes, principalmente conciliando elevada eficiência na remoção de matéria orgânica e baixo gasto energético. Evidentemente, a temperatura é uma das principais variáveis deste processo, por estar atrelada ao crescimento, metabolismo e diversidade microbiológica, essencial para o tratamento biológico. (Adams, Crump, and Kling 2010).

Dentre as opções de tratamento biológico, sistemas de tratamento embasados no processo anaeróbio são amplamente adotados em função do menor custo de manutenção, potencial produção de biogás, baixa produção de lodo (Foresti, 2002; Lettinga, 1995). Baseado nestas potencialidades, diversos estudos avaliaram a aplicação da digestão anaeróbia em condições psicrofílicas (<20ºC) para vários conceitos de reatores (Akila e Chandra 2007; Álvarez et al. 2008; Gao et al. 2014; Gouveia et al. 2015; Kayranli e Ugurlu 2011; Martinez-Sosa et al. 2011; Shin et al. 2014; Singh e Viraraghavan 1998; Smith, Skerlos, and Raskin 2013; Uemura e Harada 2000; Zhang et al. 2018).

Os principais achados nesses estudos demonstram que o aumento do tempo de detenção hidráulica (TDH), aumento do grau de da mistura no reator, e incremento do tempo de detenção celular (TDC), por meio de crescimento aderido em materiais suportes inseridos nos reatores ou em reatores de membrana, contribuem positivamente para a eficiência da remoção de matéria orgânica sob condição psicrofílica (Martinez-Sosa, Helmreich, et al., 2011; Singh e Viraraghavan, 1998; Lettinga, 2001; Vanlier, Rebac, et al., 1997; Elmitwalli, Sklyar, et al., 2002).

Complementarmente às propostas apresentadas anteriormente, uma abordagem focada na suplementação térmica da fase hidrolítica da digestão anaeróbia, reconhecida como etapa limitante (Donoso-Bravo et al. 2009), foi proposta por Zhang et al. (2016). Tal estratégia levou ao aumento da eficiência da remoção de matéria orgânica, com baixo gasto energético, uma vez que um pequeno volume anexo ao reator foi aquecido para fomentar a produção de enzimas hidrolíticas, que permaneceram em atividade mesmo sob baixas temperaturas (Zhang et al. 2016, 2018).

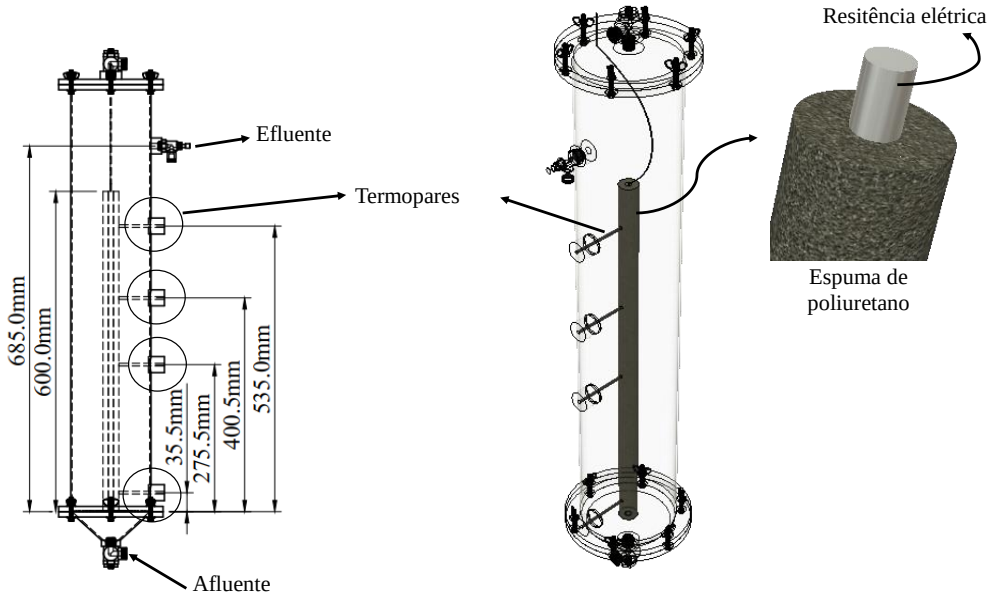
Com isso, o presente trabalho utilizou o conceito de reator com biomassa aderida ao meio suporte assistido termicamente e mantido a 35ºC alimentado com esgoto doméstico sintético e exposto a um ambiente climatizado de 15ºC de temperatura.

Material e Métodos

Aparato experimental

O reator com biofilme termicamente estimulado (acrônimo em inglês TSBR) apresentado na Figura **1**, que está sob pedido de patente, foi projetado para o tratamento de águas residuárias em baixas temperaturas, especialmente em condição psicrofílica (neste experimento 15ºC). Como controle do experimento um outro reator denominado reator controle (RC) foi mantido em uma câmara simulando a condição mesofílica de 35ºC, considerada ideal para o desenvolvimento microbiológico em ambiente mesofílico. Ambos os reatores foram construídos em material acrílico totalizando 11,5 L (Figura **1**). O meio suporte utilizado foi montando combinando espuma de poliuretano envolta em uma resistência elétrica. As características da espuma de poliuretano são semelhantes as descritas por Silva et al. (2006), e as dimensões do material utilizado foram:150 cm de comprimento, 3.5 cm de largura e 1 cm de espessura. A resistência elétrica utilizada apresentava as seguintes características: 220V, 500W, diâmetro da haste de 3/8'', e 60 cm de comprimento. A resistência elétrica foi mantida em funcionamento apenas durante o funcionamento do reator TSBR, quando foi mantida à temperatura constante de 35ºC por meio do auxílio de um *dimmer* comercial de 500W.

Figura 1- esquema do reator TSBR com seus detalhes e dimensões



Métodos analíticos

As variáveis físico-químicas analisadas e as metodologias analíticas empregadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Análises físico-químicas a serem realizadas

Parâmetros	Unidade	Método	Referência
Alcalinidade	mg CaCO3/L	Titulométrico*	Mota *et al.* 2015
pH	-	Potenciométrico	
Ácidos Voláteis	mg L^{-1}	Cromatógrafo**	Lazaro *et al.* (2008)
Temperatura	ºC	Termopares	
DQO	mg L^{-1}	Colorimétrico	APHA (20xx)

Operação do reator

Os reatores TSBR e RC foram operados primeiramente em TDH de 24 h (Fase 1), e subsequentemente em TDH de12 h (Fase 2). Para o reator TSBR cada fase de operação teve duração de 90 dias, já para o reator controle (RC), cada fase teve duração de 40 dias. Para a alimentação do reator, foi utilizada água residuária sintética simulando esgoto doméstico, de acordo com Torres (1992).

Análise da comunidade microbiológica por PCR – DGGE

A biomassa aderida ao meio suporte foi coletada ao final do experimento em três diferentes alturas do meio suporte: as amostras foram coletadas a 15 cm, 30 cm e 45 cm a partir da base da haste. Os pedações de espuma coletados foram lavados com uma solução tampão de fosfato e os sólidos foram obtidos por centrifugação a 6000 rpm por 10 min. O DNA foi extraído de acordo com Griffiths et al. (2000). O procedimento de amplificação por PCR foi realizado com os *primers* 968FGC e 1401R para o domínio das Bacterias (Nübel, Engelen, et al., 1996), e com os *primers* 1100FGC e 1400R para o domínio das Archaeas (Kudo, Nakajima, et al., 1997). Os padrões de banda obtidos por DGGE foram analisados pelo *software* BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A análise para determinação dos coeficientes similaridade, foi realizado por meio da correlação de Pearson a partir das bandas obtidas por DGGE. Os índices de diversidade (Shannon-Wiener) e dominância foram calculados por meio do programa Past 3.20 (Hammer, Harper, and Ryan 2001).

Resultados e Discussão

Monitoramento do pH e alcalinidade

Os reatores TSBR e reator controle (RC) foram monitorados ao longo do período operacional. O valor médio de pH obtido durante o período de monitoramento, para as duas fases operacionais, tanto para o reator TSBR quanto o reator RC manteve-se dentro dos limites, 6,8 a 7,4 (Tabela 2) adequado ao processo metanogênico (Grady Jr. et al. 2011). A relação IA/PA permaneceu entre 0,1 a 0,35 (tabela 2), indicando que não houve acidificação do sistema (Ripley, Boyle, and Converse 1986).

Tabela 2- pH e relação AI/AP durante o período operacional

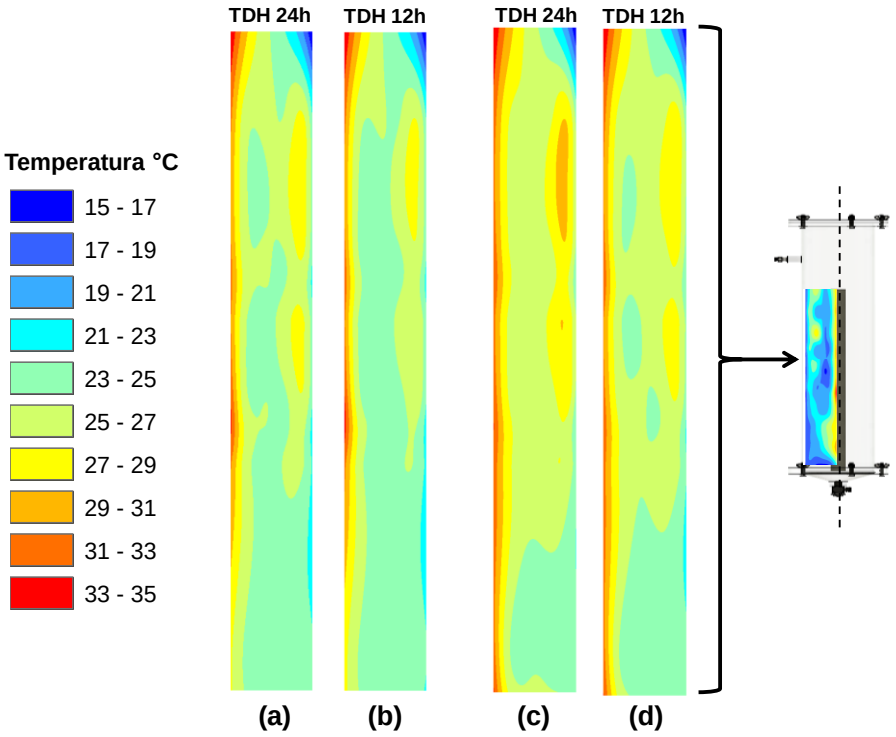
Reator	R1		R2	
TDH	24h	12h	24h	12h
		pH		
Média	6,87	6,78	6,82	6,90
Desv.Padrão	0,12	0,17	0,16	0,09
		Relação AI/AP		
Média	0,22	0,18	0,18	0,11
Desv.Padrão	0,08	0,07	0,05	0,03

Monitoramento da temperatura no reator TSBR

A Figura **2**-a,b indica o predomínio das machas térmicas relativas à faixa de temperatura de 23 a 25ºC, em ambas as fases operacionais (TDHs de 12 e 24 h) na zona reacional dos reatores TSBR. Ao passo que, na Figura **2**-c,d, relativa aos reatores RC, há o predomínio das manchas relativas à faixa de temperatura de 25 a 27 °C. Embora, a abordagem utilizada no tratamento dos dados leve a discordâncias entre qual a temperatura predominante

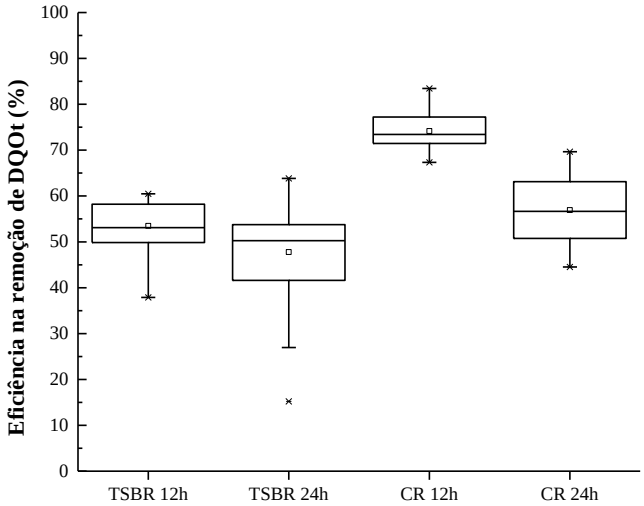
no interior do reator, destaca-se o predomínio da condição térmica mesofílica. Tal fato é especialmente importante para o tratamento de águas residuárias em ambientes cujas temperaturas são psicrofílicas, uma vez que as reações biológicas e químicas ocorrem lentamente em tais condições (Lettinga 2001).

Figura 2- Distribuição da temperatura no interior do reator TSBR



Remoção de DQO

Figura 3- Resultados da eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO total removida pelos reatores TSBR e pelo reator controle (CR) nos TDHs de 24h e 12h



As eficiências na remoção de DQOt para os reatores TSBR e controle, durante os TDHs de 12 h e 24 h são apresentados na Figura 3. A diferença entre as condições térmicas operacionais levou a resultados de eficiência significativamente diferentes entre os reatores TSBR e RC, afirmado pelo teste -t e P = 0.05. Para o TDH de 12 h, ambos os reatores

apresentaram menor amplitude de variação da eficiência de remoção de DQOt, comparado à variabilidade para TDH de 24h (Figura 3).). O aumento da velocidade ascensional pode estar associado a esse desempenho, uma vez que maiores velocidades, associadas a menores TDH, promovem melhor contato entre o substrato e a biomassa, reduz a formação de bolhas de gás e consequentemente diminui o arraste de sólidos (Rizvi et al., 2014).

Comunidade microbiológica aderida ao meio suporte

A diversidade e riqueza microbiológicas foram avaliadas pelos índices de diversidade de Shannon (H') e pelo índice de riqueza Chao-1 (Tabela 3). A diversidade e riqueza do domínio das bactérias e archaea para o reator controle foram pouco maiores que os mesmos índices para o reator TSBR. No entanto, em algumas regiões do meio suporte do reator TSBR, os índices de diversidade e riqueza para o domínio das bactérias foram superiores aos índices do reator controle, possivelmente em função da efetiva assistência térmica promovida pela configuração do reator TSBR. Um outro importante fato foi a capacidade de recuperação da comunidade archaea, uma vez que os índices de diversidade e riqueza foram 7,22 vezes e 3 vezes, respectivamente, maiores, quando comparados os resultados dos reatores TSBR e o reator TSBR $_{\text{(teste do inóculo)}}$. Sendo o reator TSBR $_{\text{(teste do inóculo)}}$ um teste inicial de 10 dias de inoculação do reator às mesmas condições operacionais impostas ao reator TSBR. Outros autores reportaram resultados semelhantes com relação a recuperação da comunidade das archaeas durante o período de aclimatação do reator às baixas temperaturas (O'Reilly et al. 2009).

Tabela 3- Índices de diversidade e riqueza da biomassa presente no meio suporte dos reatores TSBR, TSBR$_{\text{teste do inóculo}}$ e reator controle (RC); Representação da posição de coleta das amostras em relação ao meio suporte: base (1,4,6:),meio (2,7), parte superior (3,5,8).

	Domínio Bacteria		**Domínio Archaea**	
Samples	Shannone-Wiener (H')	Chao-1	Shannone-Wiener (H')	Chao-1
TSBR 1	2.58	19	2.26	12
TSBR 2	2.78	23	2.30	12
TSBR 3	2.58	21	2.12	11
RC 4	2.88	23	2.47	15
RC 5	2.74	22	2.38	15
TSBR $_{\text{teste do inóculo}}$ 6	2.63	18	0.876	4
TSBR $_{\text{teste do inóculo}}$ 7	2.44	14	0.319	5
TSBR $_{\text{teste do inóculo}}$ 8	2.70	19	0.356	5

Conclusões

O reator TSBR pode ser uma solução atrativa para o tratamento de águas residuárias em baixas temperaturas. A estratégia de assistência térmica à biomassa promoveu a manutenção da condição mesofílica à biomassa aderida ao meio suporte, favorecendo o desempenho do reator TRSB, próximo ao reator controle. O abaixamento do TDH de 24 h para 12 h favoreceu a estabilidade do reator em termos de remoção de DQOt, possivelmente em função da melhor transferência de massa. Os índices diversidade e riqueza indicaram a capacidade do reator TSBR em trabalhar sob baixas temperaturas, uma vez que não ocorreram mudanças expressivas em tais índices, comparados aos reatores controle.

Referências Bibliográficas

Adams, Heather E., Byron C. Crump, and George W. Kling. 2010. "Temperature Controls on Aquatic Bacterial Production and Community Dynamics in Arctic Lakes and Streams." Environmental Microbiology 12(5):1319–33.

Akila, G. and T. S. Chandra. 2007. "Performance of an UASB Reactor Treating Synthetic Wastewater at Low-Temperature Using Cold-Adapted Seed Slurry." Process Biochemistry 42(3):466–71. Retrieved April 4, 2015.

Álvarez, J. A., E. Armstrong, M. Gómez, and M. Soto. 2008. "Anaerobic Treatment of Low-Strength Municipal Wastewater by a Two-Stage Pilot Plant under Psychrophilic Conditions." Bioresource Technology 99(15):7051–62.

Donoso-Bravo, A., C. Retamal, M. Carballa, G. Ruiz-Filippi, and R. Chamy. 2009. "Influence of Temperature on the Hydrolysis, Acidogenesis and Methanogenesis in Mesophilic Anaerobic Digestion: Parameter Identification and Modeling Application." Water Science and Technology 60(1):9–17.

Elmitwalli, Tarek A., Vladimir Sklyar, Grietje Zeeman, and Gatze Lettinga. 2002. "Low Temperature Pre-Treatment of Domestic Sewage in an Anaerobic Hybrid or an Anaerobic Filter Reactor." Bioresource Technology 82(3):233–39. Retrieved July 25, 2018.

Elmitwalli, Tarek A., Marcel H. Zandvoort, Grietje Zeeman, Harry Burning, and Gatze Lettinga. 1999. "Low Temperature Treatment of Domestic Sewage in Upflow Anaerobic Sludge Blanket and Anaerobic Hybrid Reactors." Water Science and Technology 39(5):177–85.

Foresti, L. 2002. "Anaerobic Treatment of Domestic Sewage: Established Technologies and Perspectives." Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research 45(10):181–86.

Gao, Da-Wen, Qi Hu, Chen Yao, and Nan-Qi Ren. 2014. "Treatment of Domestic Wastewater by an Integrated Anaerobic Fluidized-Bed Membrane Bioreactor under Moderate to Low Temperature Conditions." Bioresource Technology 159:193–98.

Gouveia, J., F. Plaza, G. Garralon, F. Fdz-Polanco, and M. Peña. 2015. "Long-Term Operation of a Pilot Scale Anaerobic Membrane Bioreactor (AnMBR) for the Treatment of Municipal Wastewater under Psychrophilic Conditions." Bioresource Technology 185:225–33. Retrieved March 10, 2015.

Grady Jr., C. P. Leslie, Glen T. Daigger, Nancy G. Love, and Carlos D. M. Filipe. 2011. Biological Wastewater Treatment. 3rd Editio. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

Griffiths, Robert I. et al. 2000. "Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and RRNA-Based Microbial Community Composition Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- And." Applied and Environmental Microbiology 66(12):5488–91.

Hammer, Øyvind, David A. T. Harper, and Paul D. Ryan. 2001. "PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS." 9.

Kayranli, Birol and Aysenur Ugurlu. 2011. "Effects of Temperature and Biomass Concentration on the Performance of Anaerobic Sequencing Batch Reactor Treating Low Strength Wastewater." Desalination 278(1–3):77–83. Retrieved July 25, 2018.

Lettinga, G. 1995. "Anaerobic Digestion and Wastewater Treatment Systems." Antonie van Leeuwenhoek 67(1):3–28.

Lettinga, Gatze. 2001. "Challenge of Psychrophilic Anaerobic Wastewater Treatment." Trends in Biotechnology 19(9):363–70.

Martinez-Sosa, David et al. 2011. "Anaerobic Submerged Membrane Bioreactor (AnSMBR)

for Municipal Wastewater Treatment under Mesophilic and Psychrophilic Temperature Conditions." Bioresource Technology 102(22):10377–85.

O'Reilly, Joe et al. 2009. "Quantitative and Qualitative Analysis of Methanogenic Communities in Mesophilically and Psychrophilically Cultivated Anaerobic Granular Biofilims." Water Research 43(14):3365–74.

Ripley, L. E., W. C. Boyle, and J. C. Converse. 1986. "Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes." Journal of Water Pollution Control Federation 58(5):406–11.

Shin, Chungheon, Perry L. McCarty, Jeonghwan Kim, and Jaeho Bae. 2014. "Pilot-Scale Temperate-Climate Treatment of Domestic Wastewater with a Staged Anaerobic Fluidized Membrane Bioreactor (SAF-MBR)." Bioresource Technology 159:95–103.

Silva, A. J., J. S. Hirasawa, M. B. Varesche, E. Foresti, and M. Zaiat. 2006. "Evaluation of Support Materials for the Immobilization of Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea." Anaerobe 12(2):93–98.

Singh, Kripa Shankar AND and Thiruvenkatachari Viraraghavan. 1998. "Start-Up and Operation of UASB Reactors at 20 ° C for Municipal Wastewater Treatment." JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING 85(6):609–14.

Smith, Adam L., Steven J. Skerlos, and Lutgarde Raskin. 2013. "Psychrophilic Anaerobic Membrane Bioreactor Treatment of Domestic Wastewater." Water Research 47(4):1655–65.

Torres, Patrícia. 1992. "Desempenho de Um Reator Anaeróbio de Manta de Lodo (UASB) de Bancada No Tratamento de Substrato Sintético Simulando Esgotos Sanitários." .Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP.

Uemura, Shigeki and Hideki Harada. 2000. "Treatment of Sewage by a UASB Reactor under Moderate to Low Temperature Conditions." Bioresource Technology 72(3):275–82.

Vanlier, J., S. Rebac, and G. Lettinga. 1997. "High-Rate Anaerobic Wastewater Treatment under Psychrophilic and Thermophilic Conditions." Water Science and Technology 35(10):199–206. Retrieved April 5, 2015.

Zhang, L. et al. 2016. "Hydrolysis Rate Constants at 10–25 °C Can Be More than Doubled by a Short Anaerobic Pre-Hydrolysis at 35 °C." Water Research 104:283–91.

Zhang, Lei et al. 2018. "Anaerobic Treatment of Raw Domestic Wastewater in a UASB-Digester at 10 °C and Microbial Community Dynamics." Chemical Engineering Journal 334:2088–97.

ESTUDO DO TRANSPORTE DE MASSA DA AMÔNIA EM BIOFILME ADERIDO A ESPUMA DE POLIURETANO APLICADO À NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS

Mário Berni De Marque [1]; Bruno Garcia Silva [2]; Eugênio Foresti [3]

[1] Aluno de Iniciação Científica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *O tratamento de água residual tem como principal objetivo remover os compostos orgânicos e nutrientes. Uma forma de realizar tal processo é com reator anaeróbio de manta de lodo, porém, a eficiência de remoção de macronutrientes é baixa. A remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios pode ser realizada em unidades que promovem o processo de nitrificação e a desnitrificação simultâneas, como os reatores de leito fixo. Apesar de essencial para o estabelecimento desse processo, o transporte de massa dos diferentes substratos através do biofilme é pouco estudado. Com o objetivo de estudar esse fenômeno, foram operadas três células de fluxo, com camada de espuma de poliuretano de 2, 5 e 10mm entre as zonas aerada e não aerada, alimentadas com esgoto sintético. Essas células permitem simular um segmento de reator de biofilme fixo aerado submetido à contra-difusão. As eficiências nas remoções da carga orgânica e amônia foram, em média, de 74, 71 e 56% e 70, 59 e 38% respectivamente nos reatores 2, 5 e 10. Durante a operação, foram realizados ensaios para a determinação do coeficiente efetivo de transporte de massa da amônia com auxílio do software AQUASIM. O decréscimo do coeficiente de difusividade observado ao longo do tempo de operação foi atribuído à possível colmatação dos poros, devido ao crescimento do biofilme, dificultando o transporte de substratos.*

Introdução

O tratamento biológico de águas residuárias é utilizado principalmente para a remoção de matéria orgânica biodegradável e nutrientes presentes em águas residuárias. O reator anaeróbio de manta de lodo (Upflow anaerobic sludge blanket/UASB) é capaz de remover a maior parte da matéria orgânica, caracterizando-se pela baixa complexidade operacional, além de produzir biogás. Entretanto, este reator não altera as concentrações de macronutrientes, como o nitrogênio e fósforo, havendo a necessidade de pós-tratamento do efluente.

Uma alternativa tecnológica para remoção de nitrogênio proveniente do efluente do UASB é o processo de nitrificação e desnitrificação simultânea (NDS). Neste processo, que ocorre em uma única unidade, a amônia é oxidada a nitrito e nitrato e, em seguida, esse compostos são reduzidos a nitrogênio gasoso com biomassa aderida ao meio suporte, grânulo ou floco contendo microorganismos anóxicos e aeróbios (Münch et al. 1996; Canto et al. 2008).

Como material suporte do biofilme, a espuma de poliuretano mantém bactérias anóxicas e aeróbias dentro do mesmo reator. O uso de espuma de poliuretano para promover a SND vem sendo investigado há alguns anos. Moura et al. (2012) usou um reator de leito estruturado submetido à recirculação e aeração intermitente no tratamento de água residuária sintética simulando esgoto sanitário. Nesse reator, treze cilindros de espuma de poliuretano (3cm de diametro e 60cm de altura) fixados em hastes de plástico serviram como material suporte para o crescimento do biofilme. Nessas condições, o melhor resultado de eficiência de remoção de nitrogênio total (NT) foi obtido com o tempo de detenção hidráulico (TDH) de 12 horas, com 2 horas de aeração e 1 hora sem aeração (82%). As piores eficiências de remoção de NT ocorreu com valores de TDH de 8 horas e 10 horas (49% e 45%, respectivamente).

O mesmo tipo de reator foi utilizado por Silva et al. (2018) para o pós-tratamento de efluente de reator UASB no tratamento de esgoto sanitário. O melhor resultado ocorreu com 1 hora de aeração seguida de 2 horas sem aeração, com eficiência de remoção 29% de NT. A limitação do processo ocorreu devido à baixa disponibilidade de doadores de elétrons para a desnitrificação (relação DQO/N próxima a 3).

O transporte de massa dos substratos do meio líquido para a biofilme é essencial para descrever o processo NDS. É bem aceito que a difusividade efetiva do substrato no biofilme determina seu transporte de massa e que sua estimativa é cerca de 80% da difusividade do substrato na água (Vela et al, 1999). Contudo, há vários fatores que podem influenciar o transporte dos substratos através do biofilme formado em espuma de poliuretano. Entre eles, a tortuosidade, distribuição ao acaso e arranjo interconectados dos poros, além de que o transporte pode ocorrer por entre o sólido através de adsorção e dessorção dentro do poro.

Há a necessidade de se conhecer, em maior profundidade, o processo de transporte de massa dos substratos em biofilme aderido em leito fixo. Assim, este estudo busca avaliar o coeficiente de difusividade da amônia em biofilme fixado em espuma de poliuretano e que promove a NDS, bem como a influencia da espessura deste meio no transporte difuso.

O transporte de massa no biofilme ocorre pela demanda de substratos pelas comunidades bacterianas em realizar suas atividades metabólicas. Com o biofilme separando os ambientes anaeróbio e aeróbio, a contra-difusão dos doadores e receptores de elétrons fornece os substratos necessários para tais atividades e, consequentemente, para remoção da amônia. O compartimento anóxico recebe o afluente contendo matéria orgânica e nitrogênio amoniacal, os quais são transportados até o biofilme. No compartimento aerado, a amônia é oxidada a nitrito e, então, a nitrato. O compartimento anóxico recebe os compostos oxidados de nitrogênio por difusão, no qual a matéria orgânica é utilizada como doador de elétrons, reduzindo-os a N_2.

Contudo, o crescimento bacteriano heterotrófico no biofilme impacta diretamente no processo de transporte dos substratos utilizados na NDS, devido à colmatação dos poros da espuma. Este crescimento também varia de acordo com a espessura da espuma utilizada, possibilitando melhor fixação e, por conseguinte, comprometendo a contra-difusão dos substratos.

Visando entender o transporte de massa, o objetivo do trabalho é obter o coeficiente de difusividade efetivo da amônia em biofilme de NDS estabelecido em espuma de poliuretano.

Material e Métodos

Aparato experimental

O aparato experimental foi constituído de três células de fluxo construídas em acrílico, com volume útil de aproximadamente 360 mL (Figura 1). As células de fluxo simulam o reator de biofilme fixo aerado submetido à contra-difusão de aceptores e doadores de elétrons. Cada célula de fluxo possui fatias de espuma de poliuretano que servem de material suporte à biomassa. Foram utilizadas espumas de espessura de 2, 5 e 10 mm. A espuma de poliuretano divide a célula de fluxo ao meio na direção horizontal, criando dois compartimentos, superior e inferior. O afluente entra pelo compartimento inferior, o qual também é submetido à recirculação do efluente para garantir condições de mistura adequadas. No compartimento superior, é realizada a aeração através de duas pedras porosas acopladas a um compressor de ar.

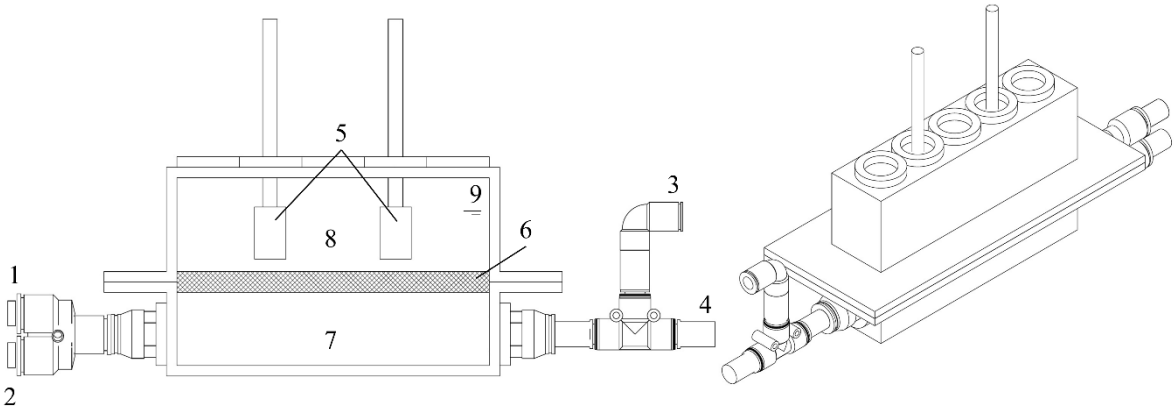


Figura 1: célula de fluxo. 1 afluente, 2 entrada da recirculação, 3 efluente, 4 saída da recirculação, 5 pedras porosas, 6 espuma de poliuretano, 7 compartimento inferior 8 compartimento superior. 9 nível de água.

Inóculo

As células de fluxo foram inoculadas segundo a metodologia utilizada por Santos (2014), com uma mistura de lodo biológico anaeróbio da estação de tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar e lodo proveniente de um sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP). O lodo foi inserido no reator, com concentração de sólidos de 59,7 mg $SSV.L^{-1}$, por 24 horas. Após este período o excesso de lodo foi removido permanecendo apenas o lodo fixo na espuma.

Estabelecimento do biofilme e monitoramento das células de fluxo

Para o estabelecimento do biofilme, as células de fluxo foram alimentadas com água residuária sintética. Os principais constituintes foram: acetato de sódio como fonte de doador de elétrons (200 mg $O_2.L^{-1}$, como DQO); cloreto de amônia como fonte de nitrogênio (40 $mgN.L^{-1}$) e bicarbonato de sódio para garantir a alcalinidade (300 $mgCaCO_3.L^{-1}$). Além desses componentes, macro e micronutrientes foram adicionados para suprir as necessidades nutricionais (Torres, 1992) e promover o desenvolvimento dos microrganismos presentes no sistema. Para garantir o crescimento e a fixação da comunidade autotrófica no biofilme, o acetado de sódio foi adicionado na alimentação somente após 56 dias de operação.

As células de fluxo foram operadas com vazão de 16 $mL.h^{-1}$, resultando no tempo de detenção hidráulico teórico de 22,4 horas. Durante a operação, o afluente, efluente e compartimento superior foram monitorados para verificar a estabelecimento do processo NDS. As variáveis que analisadas, tanto para amostras afluentes quanto efluentes do reator, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Análises Físico Químicas

Variáveis	**Metodologia**
Demanda Química de Oxigênio	Colorimétrico (APHA, 2005)
pH	Potenciométrico (APHA, 2005)
Oxigênio Dissolvido	Luminescência, Sonda HACH LDO 101
Nitrogênio Amoniacal	Colorimétrico (APHA, 2005)
Nitrito	Colorimétrico (APHA, 2005)
Nitrato	Análise por UV (APHA, 2005)

Ensaios de determinação do coeficiente de difusividade efetivo da amônia

Os ensaios para a determinação do coeficiente de difusividade efetivo foram realizados para avaliar o impacto do desenvolvimento do biofilme no transporte de massas. O ensaio consiste em substituir o ar do sistema de aeração por argônio. Sem a presença de oxigênio qualquer reação que utiliza amônia como substrato é considerada negligenciável. O ensaio tem início quando a bomba de alimentação é ligada com vazão de 19,8 $mL.min^{-1}$, fornecendo meio com concentração de amônia entorno de 70 $mg.L^{-1}$ e livre de oxigênio. A vazão de recirculação durante o ensaio é ajustada para que seja igual à da alimentação. Estas vazões permitem que a concentração de amônia seja praticamente constante no compartimento inferior durante o tempo de ensaio e condições próximas à de mistura completa. As amostras do compartimento superior são coletadas em intervalos de 30 e 60 minutos para a análise de concentração de amônia.

O coeficiente de difusividade efetiva é determinado a partir da solução das equações de transporte de massa no biofilme com o auxílio do software AQUASIM. No programa, o sistema é composto por um compartimento de biofilme (correspondente ao compartimento inferior) e um compartimento de reator de mistura completa (correspondente ao compartimento superior). Um "difussive link" foi criado para conectar os compartimentos pela base do biofilme. Na variável de estado relativa à concentração de amônia, a difusividade nos poros corresponde à difusividade da amônia em solução infinita de água multiplicada por um fator de efetividade. Os demais parâmetros incluídos no programa são listados na Tabela 2. O fator de efetividade é estimado pelo programa para obter a menor diferença entre os valores medidos no compartimento superior e os calculados pelo modelo.

Tabela 2: Parâmetros incluídos do software AQUASIM para estimar o fator de efetividade

Parâmetro	**Valor**	**Unidade**
Área do biofilme	15	cm^2
Volume compartimento superior	150	mL
Volume compartimento inferior	160	mL
Espessura do biofilme	0,2; 0,5 ou 1	cm
Concentração de amônia afluente	Medida no ensaio	$mg.L^{-1}$
Concentração inicial de amônia no compartimento superior	Medida no ensaio	$mg.L^{-1}$
Concentração inicial de amônia no compartimento inferior	Medida no ensaio	$mg.L^{-1}$
Vazão de entrada compartimento inferior	19,8	$mL.h^{-1}$
Difussividade da amônia em água	0.0617	$cm.h^{-1}$
Fator de efetividade	Valor estimado pelo programa	-

Resultados e Discussão

Para garantir a fixação das bactérias autotróficas pós inóculo, as células de fluxo foram alimentadas sem carga orgânica para evitar a competição entre as diferentes comunidades bacterianas (autotróficas e heterotróficas). Após 56 dias de operação, com a obtenção de altas taxas de nitrificação, adicionou-se o acetato de sódio para promover o crescimento das bactérias heterotróficas desnitrificantes.

Remoção de DQO e nitrogênio

Com 165 dias de operação, foram analisados os resultados do monitoramento de eficiência na remoção de DQO e amônia no afluente, no compartimento superior e no efluente das células de fluxo de 2, 5 e 10 mm, como mostrado nas Figuras de 2 a 13.

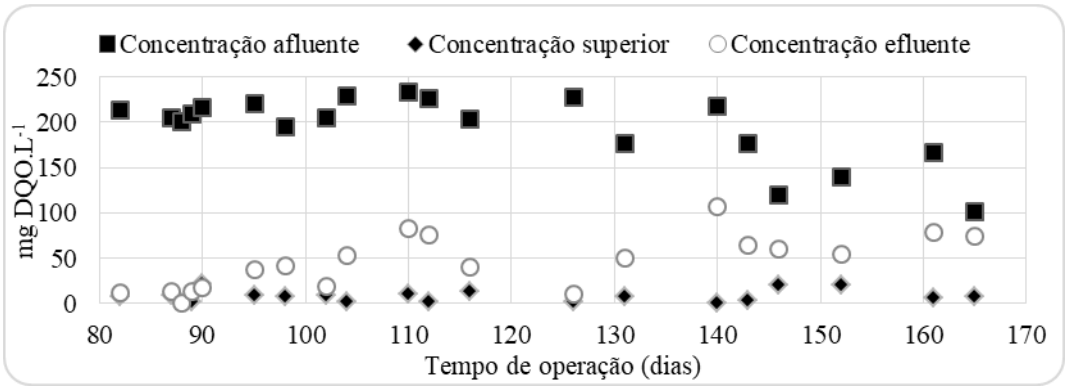


Figura 2: Concentração da DQO na Célula de fluxo 2 mm

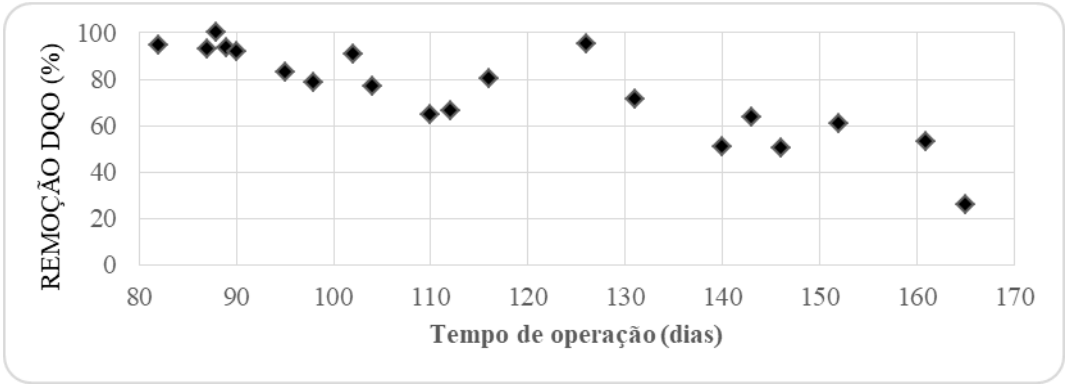


Figura 3: Eficiência na remoção da DQO na Célula de fluxo 2 mm

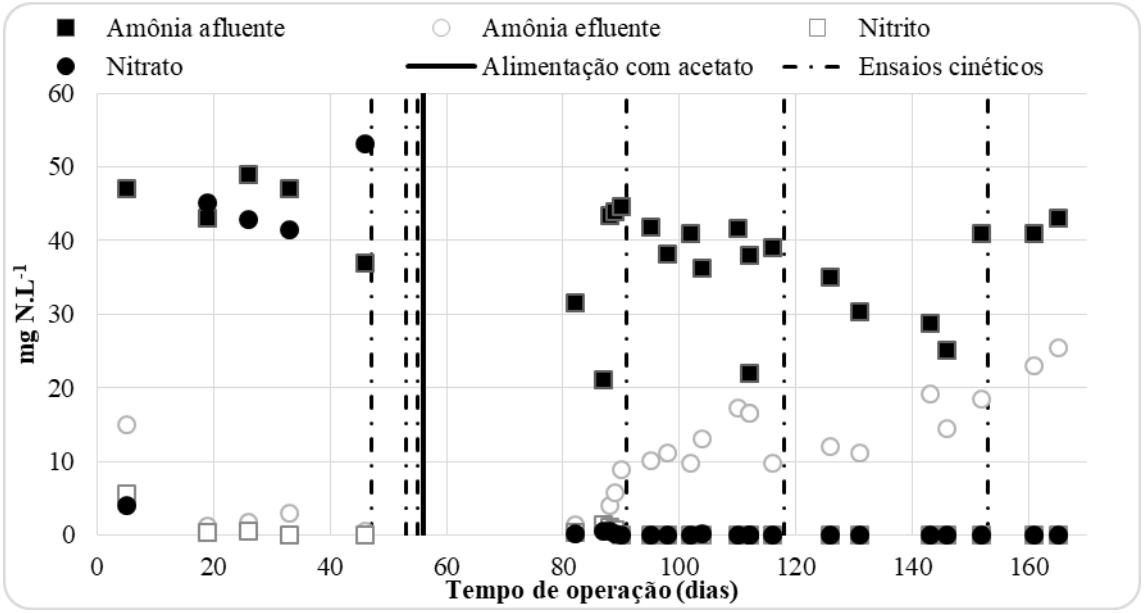


Figura 4: Concentração dos compostos nitrogenados na Célula de fluxo 2 mm

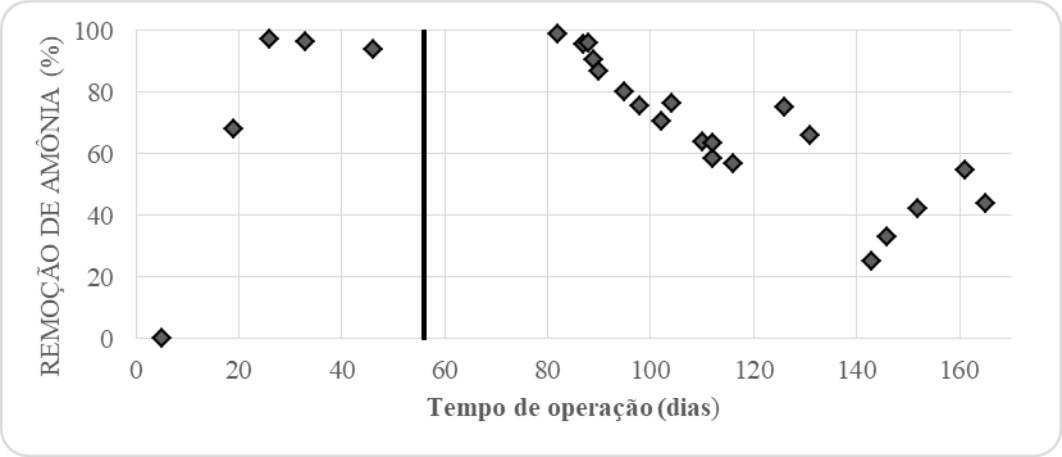


Figura 5: Eficiência na remoção de amônia na Célula de fluxo 2 mm

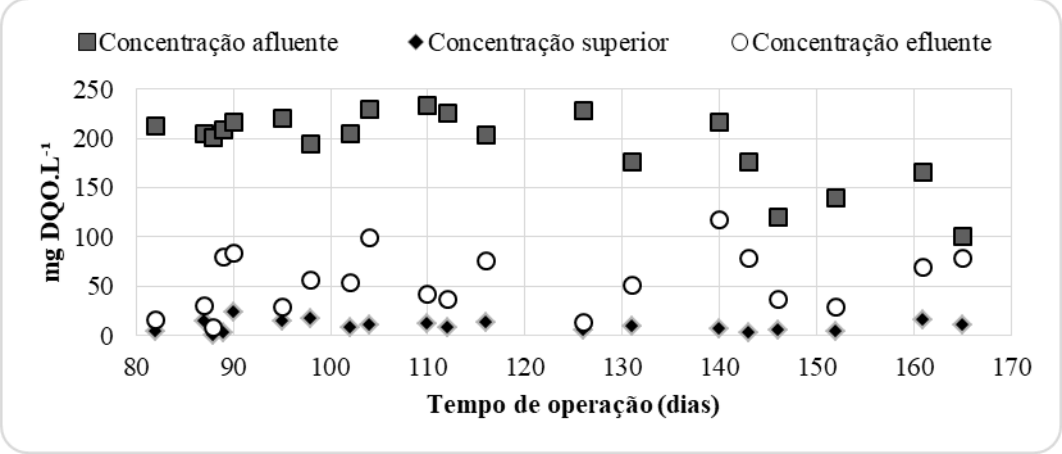


Figura 6: Concentração da DQO na Célula de fluxo 5 mm

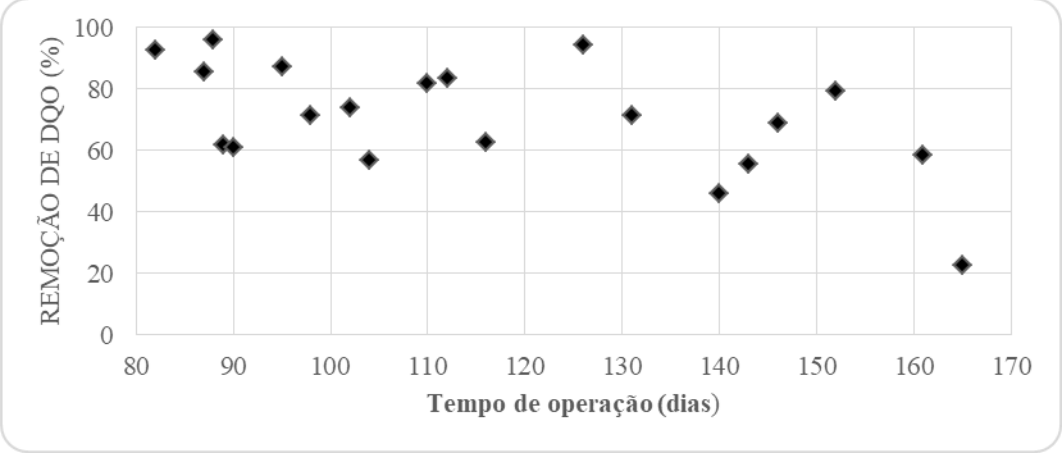


Figura 7: Eficiência na remoção da DQO na Célula de fluxo 5 mm

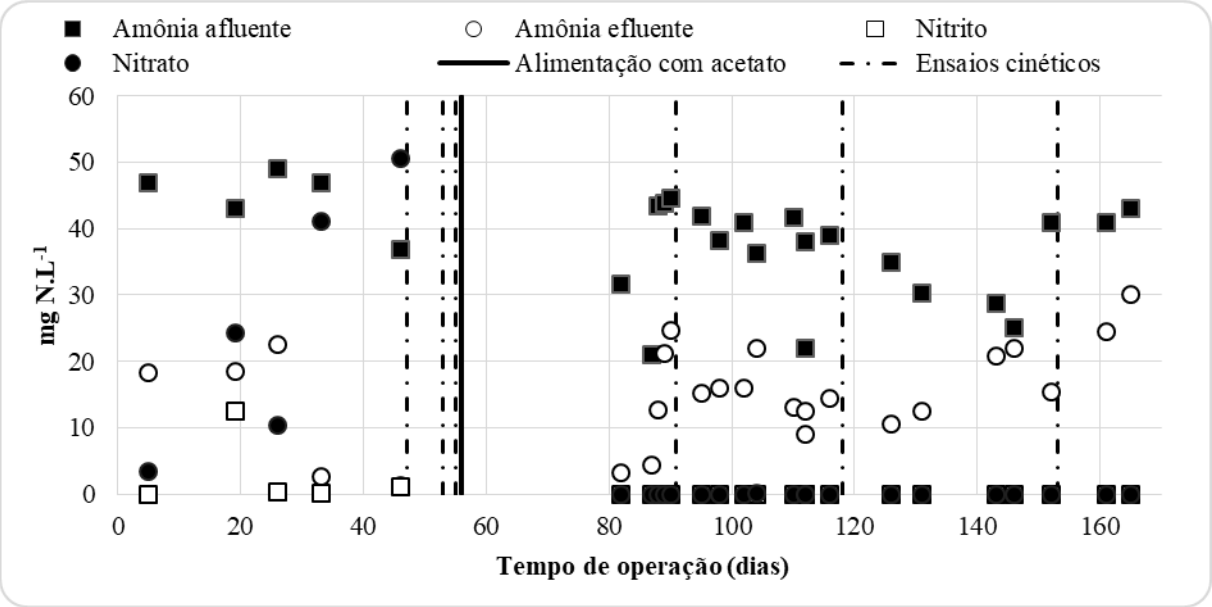


Figura 8: Concentração dos compostos nitrogenados na Célula de fluxo 5 mm

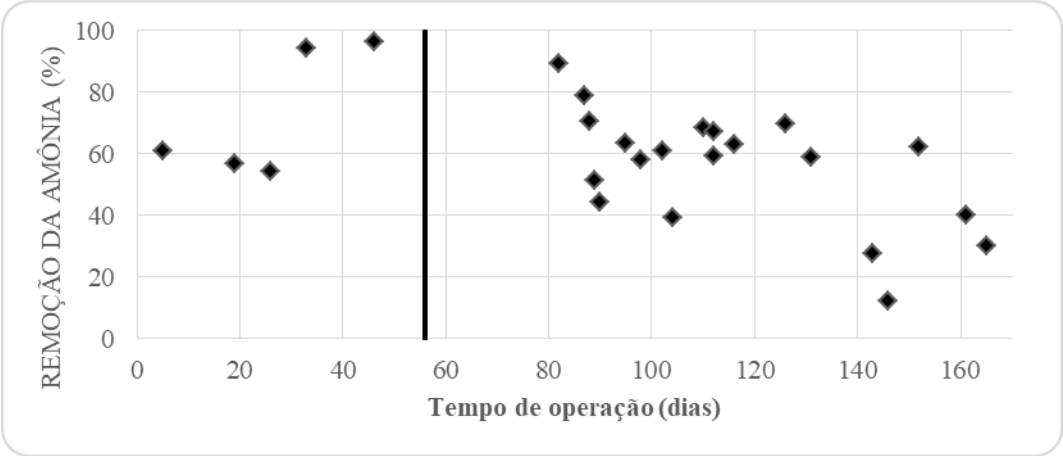


Figura 9: Eficiência na remoção de amônia na Célula de fluxo 5 mm

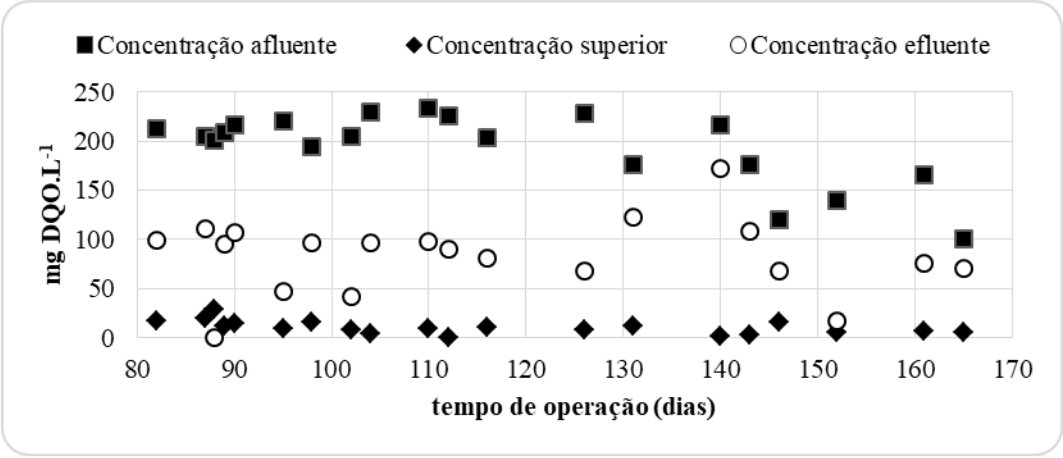


Figura 10: Concentração da DQO na Célula de fluxo 10 mm

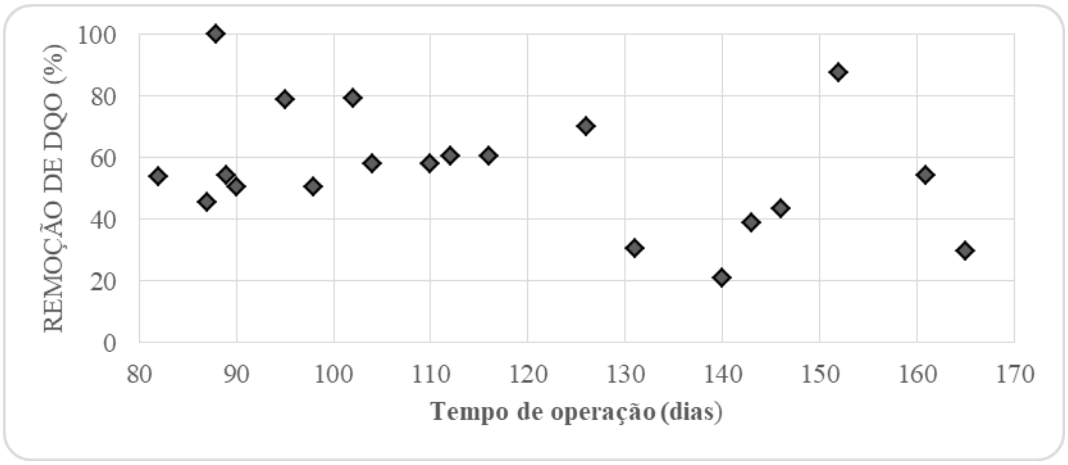


Figura 11: Eficiência na remoção da DQO na Célula de fluxo 10 mm

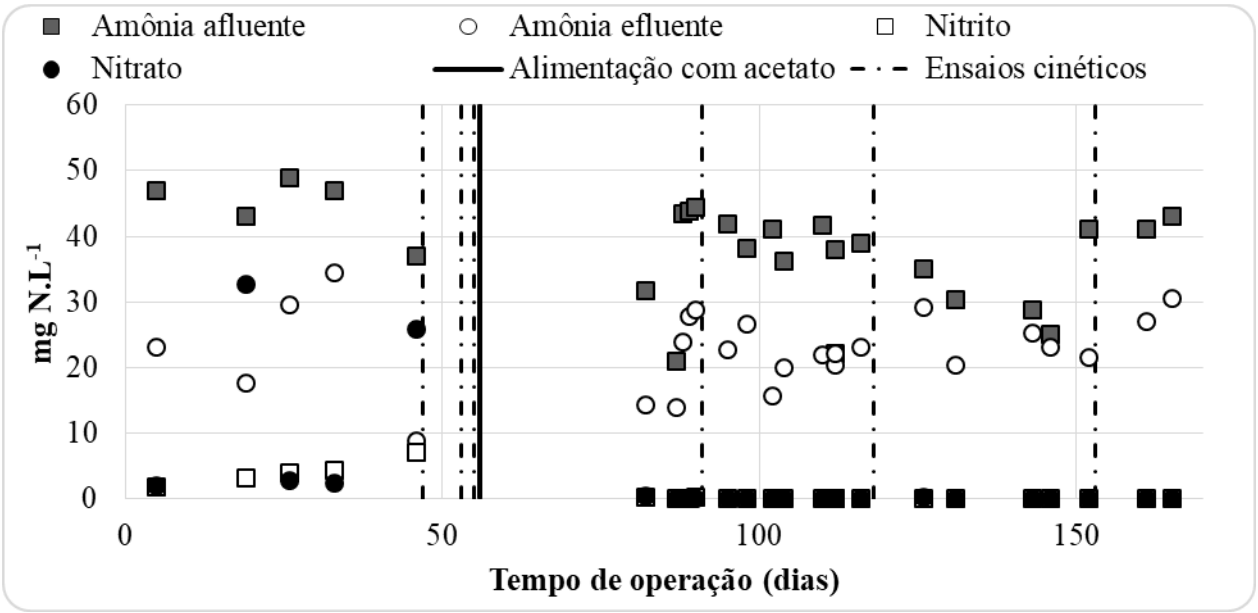


Figura 12: Concentração dos compostos nitrogenados na Célula de fluxo 10 mm

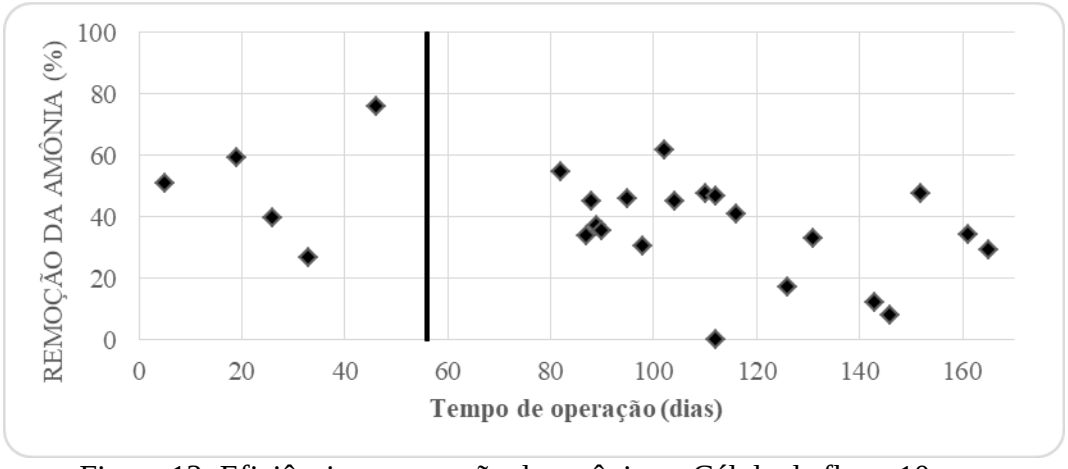


Figura 13: Eficiência na remoção de amônia na Célula de fluxo 10 mm

Analisando-se os gráficos de remoção, foi possível observar a queda da eficiência do tratamento em todas as células de fluxo, depois da adição de carga orgânica na alimentação.

Quanto à DQO, a queda na remoção pode ter sido devida ao mesmo fenômeno, qual seja, a colmatação dos poros da espuma, dificultando a passagem do nitrato pelo biofilme. Como a matéria orgânica é utilizada como doador de elétrons na desnitrificação, a redução do

nitrato a N_2 se faz através da oxidação da matéria orgânica.

Na célula de fluxo 2mm (CF 2), a remoção de DQO esteve entre 26 a 100%, com média de 74%. Na CF 5, a média de remoção de DQO foi de 71%, variando de 22 a 96%. Já na CF 10, os resultados foram mais baixos, com média de remoção de DQO de 56% (variando de 21 a 100%).

Para analisar a eficiência em remoção de N-amoniacal, o tempo de operação foi dividido nos 56 primeiros dias (sem acetato), de 57 a 110, com o processo de estabilização da comunidade heterotrófica desnitrificante e de 111 a 165, com a biomassa já estabelecida no meio suporte (Tabela 3).

Tabela 3: Eficiência na remoção de nitrogênio amoniacal

Dias de operação	CF 2	CF 5	CF 10
0 a 56	90,86	72,61	50,57
57 a 110	79,24	62,08	43,08
111 a 165	49,90	48,72	26,51

Observa-se que a menor espessura de espuma comportou melhor a comunidade autotrófica nitrificante no meio suporte, com grande taxa de conversão da amônia em 2mm e baixa taxa em 10 mm. Durante a estabilização da comunidade heterotrófica, notou-se queda em todas as eficiências de remoção de amônia do afluente. Contudo, ao estabilizar a biomassa no meio suporte, as células de fluxo 2 e 5 obtiveram taxas médias semelhantes quanto à eficiência na NDS, demonstrando certa estabilidade microbiana, sem haver, necessariamente, interferência pela espessura da espuma. Na CF 10, a eficiência após dia 111 foi mais baixa quando relacionada com as outras CF, provavelmente devido à má fixação da comunidade autotrófica no suporte ou pela dificuldade no transporte de massa dos substratos doadores e receptores de elétrons no biofilme, por se tratar de uma espuma mais grossa, com mais chances de colmatação de seus poros.

Pelas baixas concentrações de nitrito e nitrato no efluente, é possível observar que a comunidade heterotrófica está bem estabelecida no biofilme e, com isso, nota-se que o limitante da NDS é a nitrificação para a remoção de N-amoniacal do afluente.

A alta variação na remoção dos compostos foi observada ao longo do tempo de operação e da espessura da espuma, visto que sua eficiência caiu inversamente proporcional ao crescimento bacteriano no meio suporte.

Avaliação do fator de efetividade

Foi feito ensaio para a determinação do coeficiente de difusividade efetiva antes da adição de acetato, quando a comunidade bacteriana autotrófica estava bem estabelecida, ou seja, com grande taxa de nitrificação. Após a adição de acetato de sódio, foram realizados mais 3 ensaios cinéticos, 35, 62 e 97 dias depois. Assim, com auxílio do software AQUASIM, foi calculado os valores do fator de difusividade efetivo da amônia no biofilme (Tabelas 4.)

Tabela 4: Fator de difusividade da amônia

Dia de operação depois da adição de acetato	Fator de difusividade		
	CF 2	CF 5	CF 10
0	22,04±1,36	17,22±0,76	22,00±2,91
35	1,29±0,05	1,89±0,08	2,46±0,13
62	0,79±0,02	1,04±0,05	1,58±0,06
97	0,29±0,01	1,68±0,08	4,07±0,39

Analisando-se a Tabela 4, fica evidente que o crescimento bacteriano heterotrófico influencia na difusividade efetiva da amônia ao longo do tempo e a espessura no biofilme. Quando comparado ao monitoramento das células de fluxo, a menor difusividade da amônia é explicada pela queda na eficiência do tratamento, pois a colmatação dos poros da espuma dificulta a contra-difusão dos componentes necessários para a NDS.

O valor de 1 para o fator de difusividade da amônia significa que é a mesma na água (0.0617). Com a maioria dos resultados acima de 1, demonstra-se que a difusividade da amônia no biofilme estudado é maior que na água. Assim, com novo parâmetro do transporte de massa da amônia, pode-se modular e redimensionar a área de contato.

Conclusões

A colmatação dos poros da espuma é a explicação mais plausível do decréscimo do fator de difusividade da amônia, como o resultado do AQUASIM demonstrou e os gráficos de eficiência de remoção da DQO e amônia comprovam.

A CF 2 apresentou melhor taxas de remoção dos compostos estudados e menores valores para fator de difusividade da amônia, que foram diminuindo conforme o tempo de operação.

Assim, pretende-se seguir com a operação das células de fluxo, monitorando e realizando ensaios cinéticos para comprovar a teoria, conhecer se há um limite de colmatação e gerar mais dados para obter valores mais precisos do fator de difusividade da amônia no biofilme estudado.

Referências Bibliográficas

Canto CSA, Rodrigues JAD, Ratusznei SM, Zaiat M, Foresti E. Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. Bioresour Technol. 99(3):644–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336516

Moura RB, Damianovic MHRZ, Foresti E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. J Environ Manage 98:163–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22277346

Münch E V., Lant P, Keller J. Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. Water Res. 1996;30(2):277–84.

Santos CED, Moura RB, Damianovic MHRZ, Foresti E. In fluence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). J Environ Manage. 2016;166:519–24.

Silva BG, Damianovic MHRZ, Foresti E. Effects of intermittent aeration periods on a structured-bed reactor continuously fed on the post-treatment of sewage anaerobic effluent. Bioprocess Biosyst Eng .2018;20(0):1–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00449-018-1940-1

Torres P. Performance of an Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor for Treatment of Synthetic Substrate Simulating Sewage. School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo São Carlos, Brazil (in Portuguese).; 1992.

F. J. Vela , E. P. Gianotti , E. Foresti & M. Zaiat (1999) Estimation of Substrate Effective Diffusivities in Anaerobic Bioparticles, Environmental Technology, 20:11, 1163-1170, DOI: 10.1080/09593332008616914

TRATAMENTO DE EFLUENTE DE LATICÍNIO COM ELEVADO TEOR DE GORDURA EM SISTEMA COMBINADO COMPOSTO POR REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM FUNGOS FILAMENTOSOS SEGUIDO DE REATOR ANAERÓBIO

Alex Marquiti Alves [1]; Rafael Brito de Moura [2]; Márcia Helena R. Zamariolli Damianovic [3]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Ambiental da UNIFAL;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *O presente projeto propõe o desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos, oriundos do cultivo de células íntegras do fungo filamentoso Penicillium citrinum, para serem utilizados em associação ao tratamento anaeróbio de águas residuárias com elevado teor de gordura. Essa proposta representa um importante avanço, uma vez que dispensa etapas de extração e purificação de enzimas, requeridas em um processo de biocatálise convencional. No presente trabalho, espera-se determinar as condições ótimas quanto a temperatura, o pH e a carga de biomassa fúngica para o processo de hidrólise enzimática em reator batelada, visando a maximização da hidrólise para posterior aplicação em sistema contínuo. Em uma segunda etapa, pretende-se otimizar o processo de digestão anaeróbia do efluente pré-hidrolisado, avaliando-se a carga aplicada ao lodo anaeróbio, a temperatura e o pH em reator batelada, para aplicação posteriormente em sistema contínuo. Na terceira etapa, será proposto um sistema combinado de tratamento, composto por reator para hidrólise enzimática seguido de reator anaeróbio, aplicado ao tratamento de águas residuárias ricas em lipídeos.*

Introdução

O efluente da indústria de laticínio apresenta em média uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) em torno de 50.000 $mg.L^{-1}$, quando relacionado a produção de queijo e derivados, apresentando, deste montante, um teor de lipídeos superior a 800 $mg.L^{-1}$ (Alves, 2018). Efluentes contendo elevadas concentrações de lipídeos apresentam um obstáculo diante à aplicação de sistemas de tratamento convencionais, tendo como etapa limitante a liberação lenta de ácidos graxos pelos microrganismos específicos com atividade lipolítica durante o processo de biodigestão anaeróbia (Mendes, 2004).

Como alternativa, o processo enzimático atuando na biodegradação de lipídeos, por meio da utilização de lipases, vem mostrando-se cada vez mais promissor no tratamento de efluentes com elevado teor de lipídeos. As vantagens associadas a esse tipo de tratamento compreendem o controle de produtos, permitindo o aumento dos rendimentos pela ausência de geração de subprodutos tóxicos, utilização de pressão e temperatura próxima a ambiente e a redução de custos em termos de energia e de equipamentos (Alves, 2018).

Devido ao alto custo de produção de enzima e associado à baixa produtividade, para que o processo se torne viável, alternativas de produção via processos de baixo custo, dispensando etapas onerosas de separação e purificação de enzimas, requeridas em um processo de biocatálise convencional, precisam ser consideradas.

Neste contexto, o presente trabalho visará produzir e empregar células íntegras, livres e imobilizadas, com elevada atividade lipolítica no tratamento de efluentes com alto teores de lipídeos, associado ao processo de tratamento anaeróbio, em reatores contínuos sequenciais.

Material e Métodos

Microrganismo e meio de cultura

Para produção das células íntegras com elevada atividade lipolítica será utilizado o fungo filamentoso *Penicillium citrinum*, conservado em geladeira (4°C), em meio sólido PDA (Difco®) e repicado a cada 4 meses.

O meio de cultura líquido, para o cultivo das células íntegras, será composto por fonte de carbono 30 $g.L^{-1}$ (óleo de oliva comercial Carbonell®), fonte de nitrogênio 70 $g.L^{-1}$ (peptona de soja Himedia), $NaNO_3$ 1 $g.L^{-1}$ (Synth®), KH_2PO_4 1 $g.L^{-1}$ (Synth®) e $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 $g.L^{-1}$ (Synth®), devidamente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Suporte de imobilização

Para a imobilização das células íntegras e do lodo anaeróbio, serão utilizados cubos de 0,6 cm de arestas de espumas de poliuretano (Esfrebon®), previamente tratadas em solução HNO_3 0,1 $mol.L^{-1}$ por 2 horas e lavadas em água até pH neutro.

Fonte de substrato

Como fonte de substrato, será utilizado soro de leite sintético na forma sólida, disponível comercialmente pela indústria de Laticínios Porto Alegre®, reconstituído para simulação da água residuária.

Lodo anaeróbio

Será empregado lodo granular anaeróbio da avícola Dacar®, sediada no município de Tietê-SP, para inoculação da etapa anaeróbia do reator modular contínuo de fluxo ascendente com leito estruturado utilizado nos experimentos.

Reatores

Os ensaios que visam a determinação das condições ótimas, via planejamento experimental, tanto para o processo de hidrólise enzimática, como para o processo de digestão anaeróbia do hidrolisado, serão conduzidos em reatores com volume útil de 500 mL alimentados, em batelada.

Os reatores contínuos hidrolíticos serão compostos por 2 reatores modulares de fluxo ascendente, um com células íntegras de *Penicillium citrinum* livres e outro com as células imobilizadas em espumas de poliuretano. A biomassa com capacidade hidrólitica será mantida em câmara inferior nos reatores de fluxo ascendente alimentados continuamente, delimitadas por anteparos, permitindo o fluxo do meio reacional e o confinamento das células íntegras. Já os reatores contínuos metanogênicos serão compostos por reatores modulares de fluxo ascendente de leito estruturado nos quais a biomassa anaeróbia estará imobilizada.

Procedimento experimental

Na Etapa 1 do presente projeto, as células íntegras cultivadas serão utilizadas em um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, sendo a carga de biomassa fúngica/volume de reator, a temperatura e pH do processo de hidrólise definidas como as variáveis independentes. Como variável resposta, este planejamento experimental terá como objetivo maximizar a porcentagem de hidrólise enzimática do efluente contendo elevadas cargas de lipídeos. Todos os ensaios serão conduzidos em reatores bateladas.

Posterior ao planejamento experimental, as células íntegras, livres e imobilizadas, serão inoculadas em reatores modulares de fluxo ascendente, conforme apresentado pela Figura 1, na Etapa 2. O afluente aos reatores será saturado com oxigênio, anteriormente à sua entrada nos reatores, obtendo-se condição favorável para o crescimento celular e síntese de novas enzimas lipolíticas.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) será definido com base no perfil de consumo de oxigênio e nas condições ótimas de operação definidas pelo planejamento experimental. O perfil de consumo de oxigênio será avaliado acoplando-se uma sonda interna ao longo do

comprimento do reator, permitindo-se a determinação do oxigênio dissolvido à medida que o escoamento do afluente previamente saturado avança. Também será avaliado o perfil de mineralização da matéria orgânica ao longo do comprimento do reator, pela análise de alíquotas do meio reacional, retiradas pelos pontos de amostragem laterais, a fim de se observar a capacidade de degradação/transformação da matéria orgânica pelo fungo filamentoso *P. citrinum*.

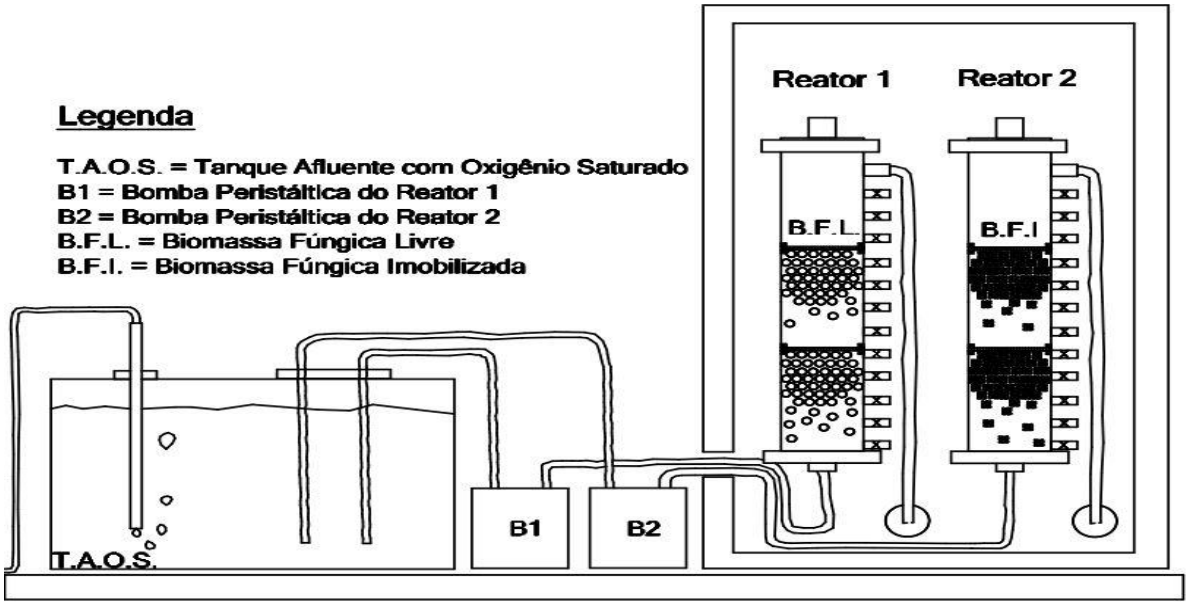


Figura 1: Etapa de hidrólise enzimática, utilizando-se células íntegras livres e imobilizadas, do efluente contendo elevados teores de gorduras em um reator modular de fluxo ascendente.

A Etapa 3 será conduzida com água residuária sintética (soro de leite reconstituído) hidrolisado, pelos métodos ajustados na Etapa 2. Nesta etapa, serão avaliadas as condições ótimas do processo de digestão anaeróbia, via planejamento experimental, em reatores bateladas.

O efluente pré-hidrolisado será utilizado, assim como na etapa anterior, em um DCCR 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, sendo a carga aplicada ao lodo anaeróbio, a temperatura e pH do processo de biodigestão anaeróbia serão definidas como as variáveis independentes. Como variável resposta, o planejamento experimental visará a maximização da degradação de matéria orgânica, avaliada em termos de DQO, associada à maximização da produção de metano, utilizando efluente rico em gordura.

Posteriormente, na Etapa 4, o efluente pré-hidrolisado será direcionado para reatores modulares de fluxo ascendente de leito estruturado, inoculados com lodo anaeróbio, obtendo-se um valor de TDH que satisfaça as condições encontradas pelo planejamento experimental, conforme apresentado pela Figura 2.

A Figura 3 apresenta um esquema proposto preliminarmente para um sistema de tratamento combinado de água residuária rica em lipídeos, envolvendo um reator de fluxo ascendente para processo hidrolítico, empregando células íntegras lipolíticas do fungo filamentoso *P. citrinum*, seguida de unidade de tratamento anaeróbio em reator modular de fluxo ascendente de leito estruturado.

A operação de um sistema completo (reator hidrolítico seguido de reator metanogênico) será avaliada na Etapa 5. Variáveis como a temperatura, pH do meio reacional, relação entre carga orgânica aplicada, carga aplicada ao lodo anaeróbio e concentração de células íntegras, para cada reator empregado, visando a produção de metano e remoção de DQO da água residuária contendo elevados teores de lipídeos, serão avaliadas. Deste modo, ao final desta etapa, objetiva-se determinar o potencial de biodegradabilidade do efluente industrial para sistema de tratamento proposto.

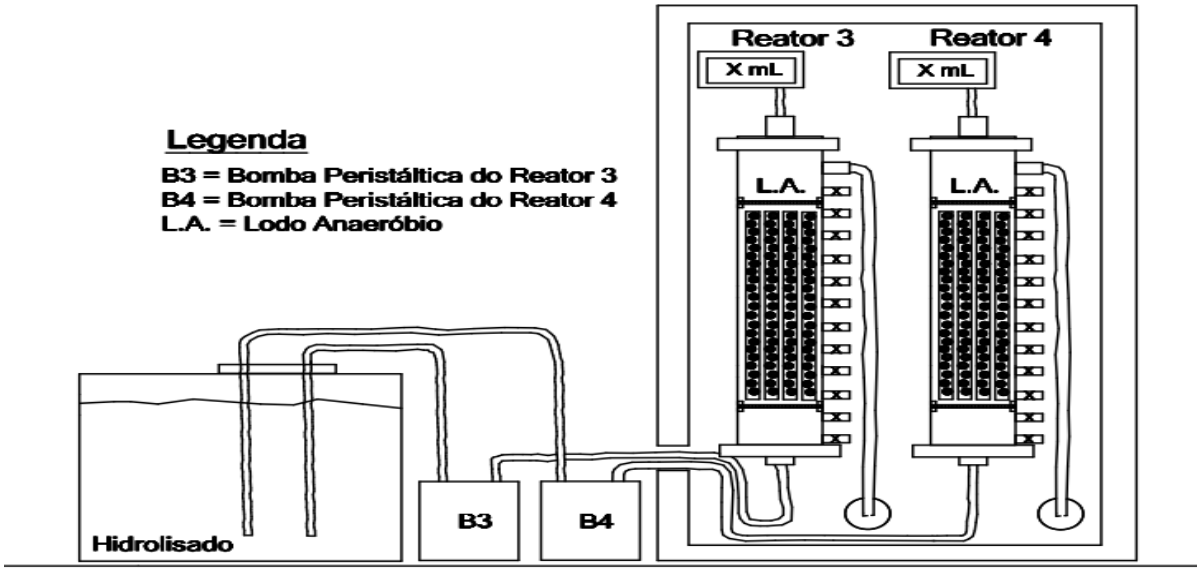


Figura 2: Etapa de biodigestão anaeróbia do efluente reconstituído (hidrolisado) utilizando células íntegras lipolíticas livres (reator 3) e células íntegras imobilizadas (reator 4).

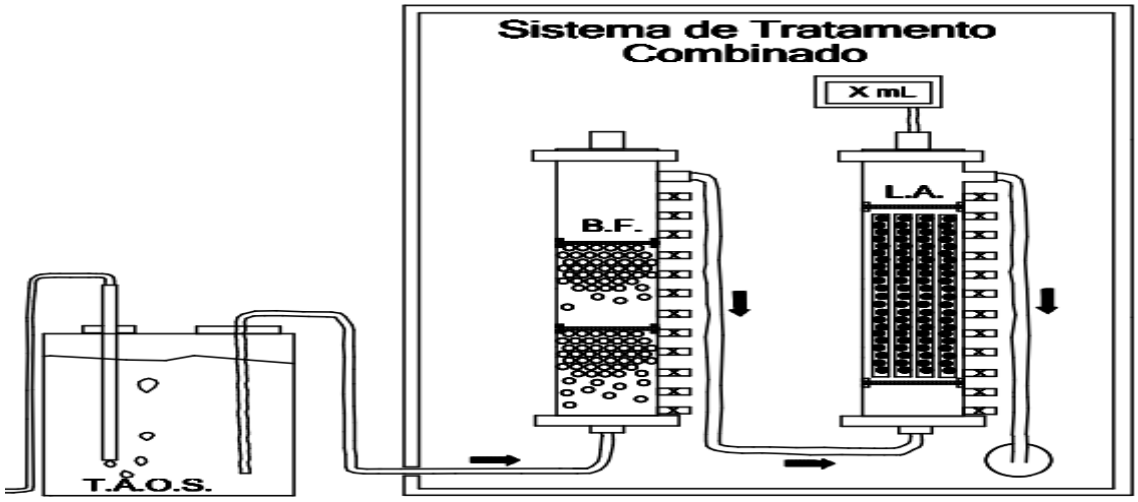


Figura 3: Sistema de tratamento combinado para o tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos.

Serão realizados ensaios preliminares antes de se determinar as faixas de estudo dos parâmetros a serem otimizados, visto que não há menção em literatura a respeito da otimização do tratamento combinado de efluentes com alto teor de lipídeos, por meio da utilização de células íntegras de fungos filamentosos.

Na Figura 4 apresenta-se um resumo das condições a ser aplicadas nas Etapas 1 a 5 do projeto proposto.

Preparo e imobilização das células íntegras

O preparo e imobilização das células íntegras serão realizados conforme metodologia descrita por Alves (2018).

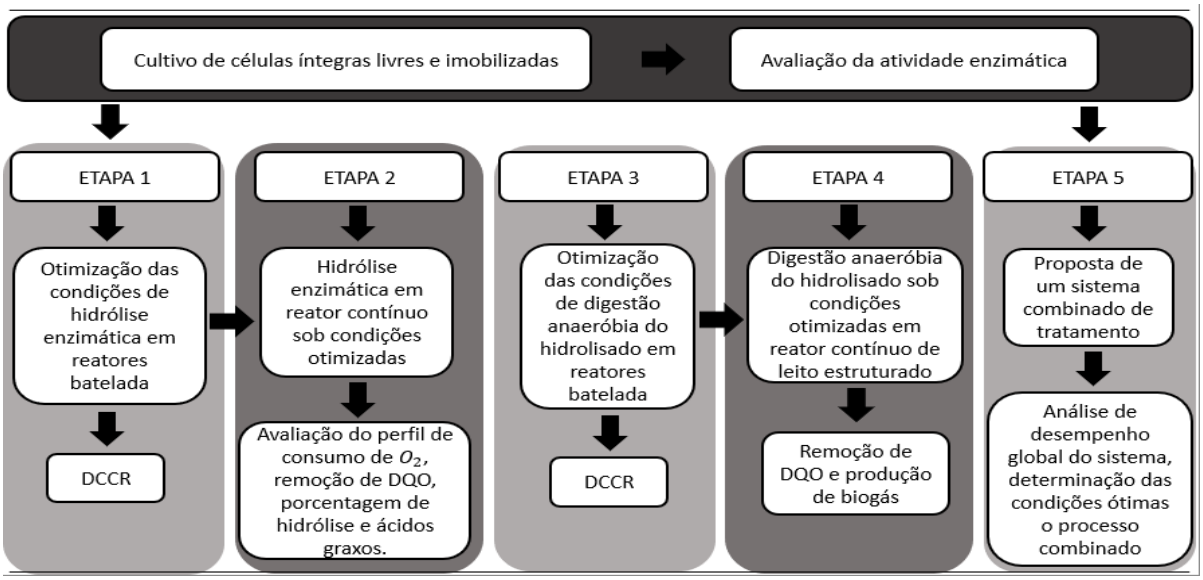


Figura 4: Fluxograma referente ao procedimento de execução do projeto de pesquisa.

Metodologia analítica

A atividade hidrolítica das células livres e imobilizadas será determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada descrita por Andrade et al. (2014). A análise de porcentagem de ácidos graxos livres será realizada por titulação mediante metodologia descrita por AOAC (2003) e porcentagem de hidrólise por Rooney e Weatherley (2001). Análises de teor de umidade, teor de lipídeos, teor de sólidos, alcalinidade a bicarbonato, pH, oxigênio dissolvido (OD) e DQO serão realizadas conforme metodologia padrão descrita em APHA (2012). Análise do teor de proteína será determinada pelo método descrito por Peterson (1979) e o teor de carboidratos de acordo com Dubois et al. (1956).

O biogás gerado no reator metanogênico será encaminhado e quantificado por um selo hídrico e a análise de sua composição será avaliada por cromatografia gasosa. A análise dos grânulos tanto do lodo anaeróbio, como das células íntegras de fungos filamentosos, será conduzida pelo método de microscopia eletrônica de varredura.

Referências Bibliográficas

Alves, A.M., 2018. Pré-tratamento enzimático de efluentes com elevado teor de gordura empregando células íntegras lipolíticas. Universidade Federal de Alfenas.

Andrade, G.S.S., Carvalho, A.K.F., Romero, C.M., Oliveira, P.C, Castro, H.F., 2014. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. Bioprocess Biosyst Eng. 37, 2539-2548.

APHA, AWWA, WEF., 2012. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. Washington, D.C.

Association of official analytical chemists (AOAC), 2003. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Washington. 369-406.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350 – 356.

Mendes, A.A., 2004. Avaliação da biodegradabilidade de efluentes com alto teor de lipídeos previamente tratados com enzimas hidrolíticas. Universidade de São Paulo.

Peterson, G.L., 1979. Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem. 100, 201-219.

Rooney, D., Weatherley, L.R., 2001. The effect of reaction conditions upon lipase catalyzed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. Process Biochem. 36, 947–953.

ISOLAMENTO DE *BACILLUS sp.* A PARTIR DE RESÍDUOS DE BANANA E ANÁLISE DE ROTAS METABÓLICAS EM SISTEMAS ACIDOGÊNICOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

Raissa C. da Silva Mazareli [1]; Isabel Kimiko Sakamoto [2]; Edson Luiz Silva [3]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [4]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Técnica do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFscar;
[4] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP

Resumo. *A viabilidade e desempenho de uma linhagem de bactéria isolada do resíduo de banana (RB) na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos utilizando RB (5 g.L^{-1}) como única fonte carbono, pH inicial 7,0 à 37ºC foi avaliada. A bactéria mesofílica foi identificada como Bacillus sp. (semelhança de 100%) com base na sequência do gene 16S rRNA. A substituição de açúcares puros por resíduo de banana como substrato resultou na produção e rendimento de hidrogênio de 71 mL e 94,66 mL H_2 g^{-1} de carboidratos adicionados, respectivamente. Os principais ácidos carboxílicos obtidos no final da fermentação foram o ácido acético (0,48 g.L^{-1}), butírico (0,39 g.L^{-1}) e capróico (0,81 g.L^{-1}), inferindo que a principal via de produção de H_2 foi a clostridial (acético/butírico). A diminuição do pH inicial de 7,0 para em torno de 4,0 resultou na estabilização da produção de H_2 e contribuiu para o desvio da rota acidogênica para a rota solventogênica, com produção de etanol entre 0,06 e 0,24 g.L^{-1} durante a fermentação. Estes resultados demonstram que Bacillus sp. RM1 é uma forte candidata para produção de hidrogênio e ácidos carboxílicos utilizando resíduos frutícolas.*

Introdução

A produção de bio-hidrogênio catalisada por micro-organismos, recupera e concentra energia a partir de fontes orgânicas residuais. A aplicabilidade do hidrogênio em processos industriais está em constante crescimento devido ao seu alto poder calorífico líquido (122 kJ.g^{-1}) e suas diversas aplicações como material de partida na indústria de energia, química, petroquímica e indústrias farmacêuticas (Lukajtis et al., 2018). Tais processos são tecnologias adequadas para a produção de energia descentralizada em pequenas instalações onde a biomassa ou resíduos orgânicos estão abundantemente disponíveis, evitando gastos e custos com energia para transporte (Lee et al., 2011).

O bio-hidrogênio tem sido obtido a partir da biofotólise e foto-decomposição utilizando algas, cianobactérias e bactérias fotossintéticas. Todavia, por meio da fermentação escura, além da obtenção de hidrogênio, tem-se a produção de ácido acético, butírico, láctico, propiônico, bem como solventes como etanol, metanol e acetona (Cai et al., 2011). Os micro-organismos que estão envolvidos em processos fermentativos incluem bactérias anaeróbias facultativas e/ou obrigatórias, tais como *Clostridium*, *Enterobacter*, *Ruminococcus*, *Bacillus* e *Escherichia*. As bactérias do gênero *Bacillus*, da mesma forma que *Clostridium*, são bacilos Gram-positivas, produtoras de hidrogênio e ácidos orgânicos, incluindo espécies de *Bacillus macerans*, *Bacillus cloacae*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus polymyxa* (Lukajtis et al., 2018). *Bacillus* são bem conhecidos por suas diversas aplicações, como secreção de proteínas, síntese de produtos químicos, biopolímeros, desenvolvimento de

produtos farmacêuticos e nutracêuticos, tais como Condroitina, Nacetilglucosamina e ácido poligamaglutâmico (Yim et al., 2011; Liu et al., 2015; Mohapatra et al., 2017), sendo extremamente importante o isolamento e caracterização de novas linhagens.

Uma nova linhagem bacteriana mesófila, identificada como *Bacillus anthracis* PUNAJAN 1 foi isolada a partir de efluente da fábrica do óleo de palma (POME). Efeito de fatores físico-químicos como temperatura, pH inicial, fonte de nitrogênio e fontes de carbono foram avaliados para determinar as condições ótimas para a produção de hidrogênio. O rendimento máximo de hidrogênio de 2,42 mol $H_2.mol^{-1}$ manose foi obtido a 35°C e pH inicial de 6,5. Extrato de levedura e manose foram as principais fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, utilizadas por *B. anthracis* PUNAJAN 1 na produção de hidrogênio, no entanto, a aplicação dessa cepa indígena PUNAJAN 1 em processos fermentativos, possibilitou também a produção de hidrogênio a partir de substratos complexos como o POME (Mishra et al., 2017).

Vários substratos orgânicos, como mono, di e polissacarídeos podem ser utilizados como fonte de carbono em processos fermentativos, incluindo a biomassa lignocelulósica (Majidian et al., 2018). Neste sentido, a biomassa sólida agrícola tem sido amplamente reconhecida como importante fonte de energia renovável, reduzindo o custo de produção do combustível a partir de substratos economicamente viáveis e acessíveis (Gustavsson et al., 2016).

Cerca de 1,3 bilhões de toneladas/ano de alimentos produzidos mundialmente são desperdiçados. De acordo com FAO (2011), a banana é a fruta mais produzida mundialmente, com 144 milhões de toneladas. No Brasil, a banana é a segunda fruta mais produzida (6,8 milhões de toneladas colhidas) correspondente a 16,7% do volume total das frutas (Andrade, 2017). De acordo com Fernandes et al. (2013) para cada tonelada de bananas colhidas, 100 kg de frutas são descartadas e cerca de 4 toneladas de resíduos lignocelulósicos são gerados. Em termos gerais, sabe-se que a banana (*Musa* sp.) contém elevado material orgânico, que engloba amido, açúcares residuais, frações de minerais e compostos orgânicos intermediários formados em rotas metabólicas durante a fermentação natural do fruto. De acordo com Matheri et al. (2018) resíduos de frutas e vegetais tem alto teor de umidade e conteúdo de sólidos totais e voláteis demonstrando que essa biomassa é facilmente biodegradável, sendo viável sua utilização em processos fermentativos para produzir energia em termos de biogás. Neste sentido, biorrefinaria de biocombustíveis e bioquímicos à base de biomassa utilizando micro-organismos é uma alternativa competitiva das refinarias tradicionais de petróleo (Wang et al., 2018).

Além disso, o estudo dos aspectos microbiológicos na produção de bio-hidrogênio a partir de resíduos frutícolas como a banana é pouco explorado, o que torna esse resíduo atrativo e foco de pesquisas futuras com objetivo de aproveitar o máximo possível da biomassa vegetal excedente. Deste modo, o isolamento e a aplicação da cepa *Bacillus* sp. RM1 na produção de bio-hidrogênio em sistema em batelada foi avaliado e discutido, com enfoque para as vias metabólicas de sistemas acidogênicos utilizando resíduo lignocelulósico (resíduo de banana) como única fonte de carbono.

Material e Métodos

Substrato e isolamento

Para realização dos ensaios, foram utilizados resíduos de banana (RB) provenientes de supermercado localizado na cidade de São Carlos/SP. Os RB (casca e polpa) foram triturados em liquidificador industrial e posteriormente peneirados em malha de 2 mm. Para garantir a homogeneidade do substrato, este foi agitado e misturado utilizando agitador mecânico com perfil de escoamento contendo chicanas e posteriormente, o substrato foi armazenado em reservatórios plásticos (volumes de 1 L) e congelados a -20ºC.

O meio nutriente utilizado para isolamento, enriquecimento e cultivo de linhagens produtoras de H_2 foi preparado da seguinte forma: 10,0 $g.L^{-1}$ de glicose, 10,0 $g.L^{-1}$ de triptona e 5,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura. Os valores iniciais de pH do meio foram ajustados para 7,0 com NaOH a 50% (m/v) ou HCl. O consórcio de bactérias obtido a partir da fermentação natural do RB (37ºC, pH inicial ~5,9) foi utilizado como fonte de inóculo. Para isolamento da bactéria, o consórcio de bactérias foi submetido a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-15}). A cultura referente à diluição 10^{-15} foi semeada (10 µL) em triplicata em placas de Petri contendo meio nutriente acrescido de ágar 2% e incubado por 24 h em Jarra Gas-pack 3,5 L. Colônias individuais morfologicamente distintas obtidas nas placas de Petri foram repicadas por mais de três vezes para garantir a pureza das cepas. As colônias purificadas foram coletadas com agulha de platina estéril e suspensas em frascos Duran® de 100 mL (volume reacional 50 mL) contendo meio nutriente esterilizado por sistema de membrana filtrante 0,22 Millipore®. Em seguida, os frascos foram submetidos à atmosfera de N_2 (100%) durante 10 minutos para a troca gasosa no volume do *headspace*, e posteriormente, fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados em condição mesófila (37ºC) por 24 h, sem agitação, para promover o crescimento celular. O crescimento celular foi quantificado pela turbidez do meio (OD600) (APHA, 2005). O frasco contendo a colônia com alta atividade de produção de hidrogênio foi selecionada e reativado no meio nutriente sucessivas vezes até obtenção de 1 L de volume, e posteriormente, submetida à análise microscópica e sequenciamento de DNA de Sanger. A linhagem bacteriana isolada foi criopreservada em meio nutriente suplementado em 20% de glicerol e armazenada a -85ºC para a manutenção de suas características genéticas.

Análise filogenética

O DNA genômico da cultura bacteriana isolada foi extraído utilizando o Kit PurilinkTM Microbiome DNA Purification (Invitrogen). A concentração e pureza do DNA foram determinados em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, EUA) e electroforese em gel de agarose 0,8%. O fragmento do gene RNAr 16S foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores 27F-1492R e GoTaq® Master Mixes (Promega). O produto de PCR foi confirmado por electroforese em gel em agarose a 1,2% e purificado utilizando *kit* de purificação Illustra GFX PCR DNA. O fragmento do DNA do gene RNAr 16S foi sequenciado usando o método de Sanger utilizando o ABI 3130 DNA Analyser, sistema de análise de DNA de 16 capilares da Life Technologies – Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas foram feitas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas via software Sequencing Analysis 5.3.1. A sequências dos nucleotídeos obtidas foram processadas por meio do programa SeqMan do software DNASTAR (Lasergene sequence analysis). As sequências do RNAr 16S foram comparadas com o Banco de Dados Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), para aproximação da identidade filogenética. A similaridade e cobertura em nível do gênero com a sequência do isolado foi de 100%. A árvore filogenética foi construída por meio do método Neighbor-Joining usando programa MEGA versão 7, com análise de *bootstrap* de 1000 repetições (Kumar et al., 2016), como grupo externo foi usado o *Clostridium perfringens* (GU447318.1). A sequência do gene 16S rDNA foi depositada em Genbank sob o número de acesso MH779470, com o banco genético público no https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH779470.

Ensaios para produção de hidrogênio

A produção de H_2 utilizando resíduo de banana como substrato foi avaliada adicionando-se 5,0 $g.L^{-1}$ de substrato (RB) acrescido de meio de cultivo PCS (1,0 $g.L^{-1}$ extrato de levedura; 5,0 $g.L^{-1}$ $CaCO_3$; 5,0 $g.L^{-1}$ peptona e 5,0 $g.L^{-1}$ NaCl) (Haruta et al., 2002). Para manter as condições assépticas, o meio de cultura PCS foi esterilizado usando um sistema de membrana filtrante de 0,22 Millipore®. O valor inicial do pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH a 50% (m/v) ou HCl (P.A). Os testes foram conduzidos em garrafas Duran® (volume total de 250 mL, reacional de 150 mL e 100 mL de *headspace*) e inoculados ($O.D_{600\ nm}$ igual a 0,4) com *Bacillus* sp. RM1 isolado de resíduos de banana. Os frascos foram submetidos a atmosfera de N_2 (100%) durante 10 minutos para manter as condições anaeróbias requeridas e depois fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubadas a 37°C (sem agitação) até atingir a estabilidade da produção de hidrogênio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados com o valor da média.

Análises físico-químicas e cromatográficas

O pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV) e crescimento celular, com base na densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) foram realizados seguindo o protocolo descrito por APHA (2005). A determinação dos carboidratos totais foi realizada por espectrofotometria segundo Dubois et al. (1956). A composição do biogás no *headspace* foi determinada por cromatografia (GC 2010, Shimadzu®) equipado com detector de condutividade térmica, usando argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram 30°C, 200°C e 300°C, respectivamente. Os ácidos orgânicos e etanol foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu®), com detector com arranjo de diodos ultravioleta (SPD-M10Avp), detector com índice de rarefação (RID-10A), coluna Aminex® HPX-87H (300mm x 7,8mm; Bio-Rad), forno CTO-20ª, bomba LC-10ADvp e controle SCL 10 Avp. O eluente foi uma solução de H_2SO_4 0,005M, a um fluxo de 0,5 mL min^{-1}, temperatura do forno de 43ºC e injeção de 100 uL (Penteado et al, 2013).

Modelo cinético

Os dados experimentais da produção acumulada de H_2 no *headspace* foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado (Eq. 1) (Zwietering et al., 1990) utilizando o *software* OriginPro 9.1.

$$P_{ac} = P \times exp\left\{-exp\left[\frac{Rm \times e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad \text{Eq. 1.}$$

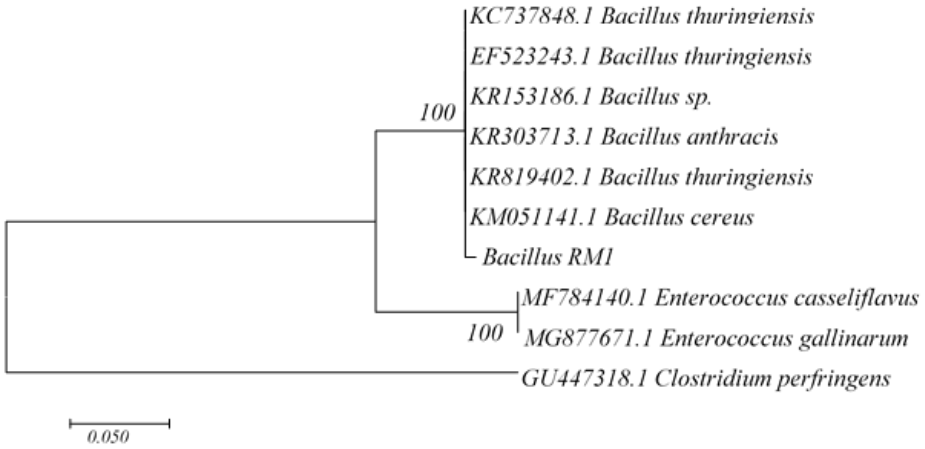
Sendo: *Pac*= Produção acumulada de H_2 (mL); *P*= Potencial máximo de produção de H_2 (mL); *Rm*= Velocidade máxima de produção de H_2 (mL h^{-1}); *e= 2,718281828* e λ= Tempo de início da fermentação (h).

Resultados e Discussão

Isolamento e Caracterização

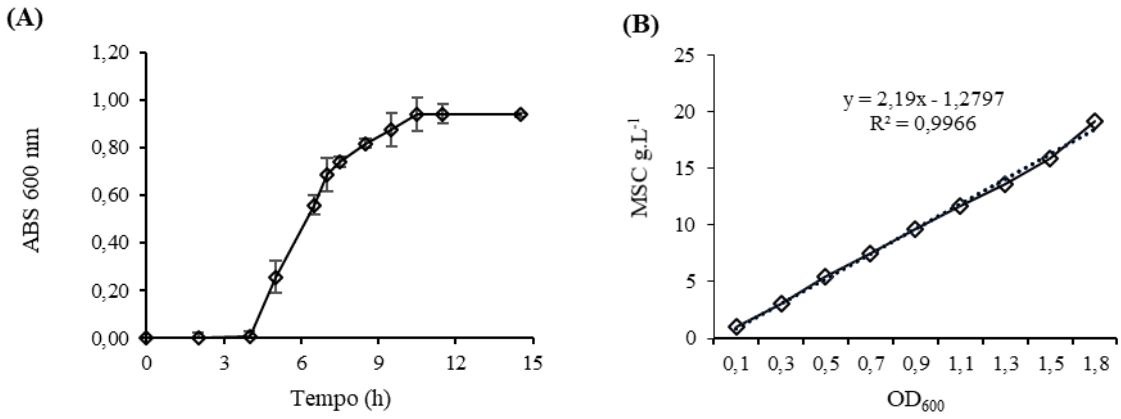
A colônia isolada do resíduo de banana era em formato circular, opaca e lisa na superfície e bordas. As células em forma de bacilos estavam dispostas isoladas ou, em duplas e/ou trios. Obteve-se para a cepa isolada alto grau de similaridade (100%) com o gênero *Bacillus*, principalmente com as cepas *KC737848.1 Bacillus thuringiensis, EF523243.1 Bacillus thuringiensis, KR153186.1 Bacillus* sp., *KR303713.1 Bacillus anthracis, KR819402.1 Bacillus thuringiensis e KM051141.1 Bacillus cereus (Figura 1).* Esta cepa foi nomeada como *Bacillus* sp. RM1.

Figura 1. Árvore filogenética construída com N-J method (Outgroup: *Clostridium* perfringens) a partir da sequência RNAr 16S da cepa isolada.



A cepa de *Bacillus* sp. RM1 foi isolada em glicose, sendo obtido tempo de geração (Tg) e velocidade de crescimento de 0,43 h e 1,60 h^{-1}, respectivamente, a partir da curva de crescimento apresentada na Figura 2 (A).

Figura 2. Curva de crescimento (A) e Concentração de massa seca celular (B).



A massa seca celular (MSC $g.L^{-1}$) da cultura de *Bacillus* sp. RM1 nas condições de isolamento foi proporcional à absorbância a 600 nm (A_{600}) e pôde ser calculada com a seguinte relação: $MSC_{Bacillus\ sp.\ RM1} = 2{,}19\ A_{600}$ (Figura 2 (B)). A velocidade de crescimento e concentração celular (MSC) de 1,60 h^{-1} e 12,65 $g.L^{-1}$, respectivamente, obtida neste estudo em 48 h foi maior quando comparada a velocidade de crescimento (0,16 h^{-1}) e concentração celular (8,5 $g.L^{-1}$) obtida por Sakthiselvan e Madhumathi (2018) utilizando *Bacillus safensis* EBT1 como inóculo na fermentação de bagaço de cana e glicose, a 33ºC e pH 7,0. Patel et al. (2011) avaliaram o crescimento celular de cepas de *Bacillus* variando a porcentagem de glicose (0,5, 1 e 2%) em pH inicial 7,0 e temperatura de incubação de 37ºC. O aumento da glicose para 2% favoreceu o crescimento celular obtendo-se concentrações máximas de MSC de 1,12 e 1,19 $g.L^{-1}$ para *Bacillus cereus* EGU43 e *Bacillus thuringiensis* EGU45, respectivamente.

Fermentação de resíduo de banana na produção de hidrogênio

O uso de matéria-prima rica em amido, que é prontamente hidrolisada em carboidratos simples, é particularmente conveniente para produção de hidrogênio. Sendo assim, o melhor substrato orgânico a ser utilizado deve conter alto conteúdo de carboidratos prontamente

disponíveis. Neste sentido, foi avaliado o potencial de *Bacillus* sp. RM1 na produção de hidrogênio utilizando resíduo de banana como substrato.

Observou-se que o aumento da produção de H_2 ocorreu simultaneamente ao crescimento de *Bacillus* sp. RM1 (Figura 3). A produtividade máxima de hidrogênio (71 mL), foi obtida para velocidade de produção (*Rm*) igual a 6,0 mL $H_2.h^{-1}$. Do mesmo modo, Saidi et al. (2018) obtiveram produção total de H_2 de 139 $mmol.L^{-1}$ utilizando resíduos de frutas e vegetais como fonte de carbono e energia, produção esta 4,38 vezes superior à obtida neste estudo (31,7 $mmol.L^{-1}$). Os autores relataram também que o uso de resíduo de frutas e vegetais pode substituir componentes ($CaCl_2$, $MgCl_2$, extrato de levedura, KH_2PO_4 e K_2HPO_4) presentes em meios de cultivo. A alta produção de H_2 obtida pelos autores pode ser decorrente da utilização de variedade de frutas e vegetais misturados (tomate, batata, cenoura, maçã, pera e ameixa) aumentando a variedade de açúcares disponíveis.

O perfil de crescimento celular seguiu a mesma tendência da produção de H_2, cujos valores máximos foram obtidos após 20 horas de fermentação. O tempo reduzido de início da fermentação (λH_2) de 3,9 h pode ser devido à utilização de biomassa proveniente do próprio resíduo, propiciando a rápida adaptação da biomassa ao substrato (RB). De acordo com Lin et al. (2017) bactérias autóctones tem maior capacidade de adaptação ao usar sua própria biomassa vegetal para seu crescimento e metabolismo, quando comparado a aplicação em outros tipos de substrato.

Neste estudo, o rendimento de hidrogênio (mL g^{-1} carboidrato adicionado) foi calculado baseando-se na concentração de carboidratos totais iniciais contidos no RB em relação à produção acumulada de hidrogênio. O YH_2 máximo foi de 94,66 mL H_2 g^{-1} carboidratos adicionados, demonstrando o potencial da cepa isolada na conversão de resíduo frutícola em biogás (H_2). Comparando-se o rendimento de H_2 desta pesquisa aos reportados na literatura utilizando diferentes resíduos vegetais (Tabela 1), verificou-se que Feng et al. (2010) e Keskin et al. (2018) obtiveram rendimentos de 101,08 mL H_2 g^{-1} ST e 76 mL H_2 g^{-1} SV, respectivamente, na fermentação de resíduos de maçã e resíduos de frutas e vegetais em reatores em batelada, pH inicial 7,0 e consórcio de bactérias como inóculo. Do mesmo modo, Kanchanasuta et al. (2017) e Mishra et al. (2017) obtiveram rendimentos superiores de 362 mL H_2 g^{-1} SV e 236 mL H_2 g^{-1} DQO, respectivamente, utilizando como substrato resíduos de alimentos e resíduo de palma a partir de *Clostridium butyricum* e *Bacillus anthracis*, respectivamente, em condições experimentais de pH entre 6-6,5 e temperatura 35-37ºC.

Tabela 1. Rendimento de hidrogênio em reatores em batelada utilizando diferentes resíduos vegetais como fonte de carbono.

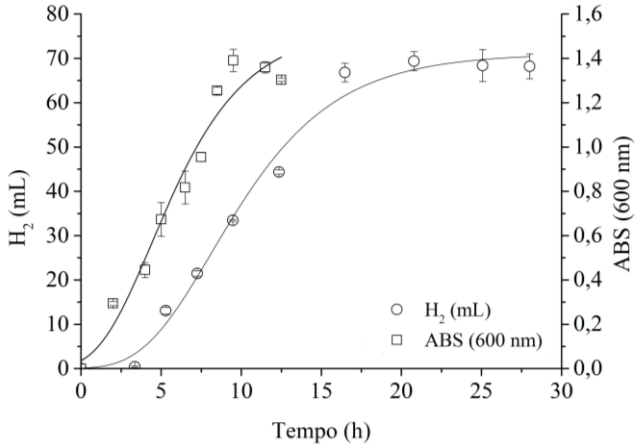
Substrato	**pH**	**Temperatura**	**Inóculo**	**Rendimento H_2**	**Referência**
Maçã	7,0	37ºC	consórcio de bactérias	101,08 mL g^{-1} ST	Feng et al. (2010)
Resíduo de alimentos	6,0	37ºC	Co-cultura	362 mL H_2 g^{-1} VS	Kanchanasuta et al. (2017)
Resíduo de palma	6,5	35ºC	*Bacillus anthracis*	236 mL H_2 g^{-1} DQO	Mishra et al. (2017)
Resíduos de frutas e vegetais	7,0	55ºC	consórcio de bactérias	76 mL H_2 g^{-1} VS	Keskin et al. (2018)
Resíduo de banana	7,0	37ºC	*Bacillus* sp.	94,66 mL H_2 g^{-1} CT	Presente pesquisa

A temperatura está intimamente relacionada ao metabolismo microbiano, afetando as vias metabólicas relacionadas à taxa de crescimento do microrganismo, hidrólise do substrato e taxa de produção de hidrogênio (Elsharnouby et al., 2013). Assim como, na presente pesquisa, os autores citados evidenciaram que condições mesofílicas são ideais para produção

de H_2 utilizando resíduos vegetais como fonte de carbono. Além disso, a utilização de cepas isoladas ao invés de consórcio de bactérias tem contribuído com rendimentos de H_2 superiores, evitando os desvios de rotas metabólicas, competição por substrato e consumo de H_2. Antonopoulou et al. (2007) estudaram o papel das culturas puras e mistas na produção de hidrogênio a partir de extrato de sorgo e relataram maior rendimento de hidrogênio utilizando *Ruminococcus albus* do que utilizando consórcio de bactérias.

No presente estudo verificou-se que após 20 h de fermentação ocorreu estabilização da produção de hidrogênio e do crescimento celular, além de diminuição gradual em função do tempo (Figura 3). Esta diminuição na produção pode ser devido à acumulação de metabólitos que reduziram a atividade metabólica da biomassa.

Figura 3. Curva de crescimento e produção de hidrogênio a partir de *Bacillus sp*. RM1 utilizando resíduo de banana em reator em batelada.



Verificou-se maior concentração de ácidos carboxílicos e etanol após 6 h de fermentação, correspondendo à fase exponencial de crescimento celular e produção de H_2 (Tabela 2). A maior concentração de HAc (0,48 $g.L^{-1}$) e HBu (0,53 $g.L^{-1}$) foi obtida em 24 e 10 h de fermentação, respectivamente, indicando o predomínio desta rota e sua importância com a produção de H_2, pressupondo que a principal via de produção de H_2 foi a Clostridial. Tal reação é mediada pela enzima FeFe-hidrogenase que catalisa a oxidação de ferredoxina seguida da redução de prótons a hidrogênio gasoso. Diferentemente da via Clostridial, a produção de H_2 via Enterobacterial ocorre através da clivagem de formiato que é formado concomitantemente a partir da conversão de piruvato a acetil-CoA, catalisada pela enzima NiFe-hidrogenase. De acordo com Sikora et al. (2013), espécies de *Bacillus* são reportadas para ambas as vias produtoras de hidrogênio.

Tabela 2. Distribuição dos principais produtos de fermentação observados durante a operação de reatores anaeróbios em batelada alimentados com resíduos de banana (5 $g\ L^{-1}$) inoculados com *Bacillus* sp. RM1.

Metabólitos ($g.L^{-1}$)	Tempo			
	4h	6h	10h	24 h
Etanol	0,06	0,24	0,08	0,03
HAc	0,34	0,46	0,35	0,48
HBu	0,22	0,40	0,53	0,39
HCa	0,07	0,77	0,84	0,81

Além disso, nas primeiras 6 h de fermentação verificou-se aumento de etanol e depois diminuição gradual até o final da fermentação. Choonut et al (2014) também relataram a produção de etanol a partir de casca de abacaxi hidrolisado, sugerindo esse tipo de resíduo

como fonte de carbono para produção deste solvente. Provavelmente, o etanol foi convertido em ácido acético e H_2 através da acetogênese e/ou pode ter sido utilizado como doador de elétrons para produção de ácido butírico e ácido capróico. Sob tais condições, observou-se aumento da concentração de metabólitos, quando houve diminuição da concentração de etanol com o tempo de fermentação. Houve aumento gradativo da produção de ácido capróico durante a fermentação de resíduo de banana, obtendo-se concentração máxima de 0,84 $g.L^{-1}$. Como a produção de HCa está intimamente relacionada com o consumo de ácido acético, o aumento da concentração do HCa de 0,77 para 0,84 $g.L^{-1}$ em 10 h de fermentação justifica a redução de HAc de 0,46 para 0,35 $g.L^{-1}$ no mesmo período.

Corroborando com esta pesquisa, Feng et al. (2010) também relataram a produção de H_2 acoplada a produção de ácido acético, propiônico, butírico e etanol ao final da fermentação utilizando bagaço de maçã (BM) como substrato. Nathoa et al. (2014) observaram que o principal produto da fermentação a partir de casca de banana foi o ácido acético, embora etanol e ácido propiônico também tenham sidos observados em pequenas concentrações durante a rota de produção de H_2. Alibardi e Cossu (2016) relataram a predominância da via butírica/acética em substratos com alto teor de carboidratos quando comparada aos substratos com baixos teores, reforçando que a utilização de resíduo de frutas em processos fermentativos é ótima alternativa para obtenção de subprodutos de interesse biotecnológico.

Utilizando a mesma concentração de substrato inicial (5 $g.L^{-1}$), Pattra et al. (2008) obtiveram produção 11 vezes menor que a obtida neste estudo a partir da fermentação de bagaço de cana de açúcar hidrolisado por *Clostridium butyricum*, em reator em batelada, 37ºC, pH 5,5 e 150 rpm. Maintinguer et al. (2017) obtiveram produção inferior ao presente estudo de 2,8 vezes a partir de *Enterobacter* sp. utilizando xilose (10 g L^{-1}) como substrato orgânico, 37ºC, pH 7,0. Contudo, a substituição de fontes puras de carbono por resíduos vegetais é alternativa viável e econômica para produção sustentável de hidrogênio a partir de *Bacillus* sp. RM1.

Conclusões

Bactéria anaeróbia facultativa e mesófila foi isolada de resíduos de banana (RB) e identificada como *Bacilllus* sp. Esta estirpe foi utilizada como inóculo na fermentação de RB obtendo-se produção e rendimento máximo de H_2 de 71 mL e 94,66 mL H_2 g^{-1} de carboidratos adicionados, respectivamente, em pH 7,0 e 37ºC. Os principais metabólitos solúveis observados foram o ácido acético, butírico, capróico e etanol, estabelecendo que a principal via de produção de H_2 foi a acético/butírico (Clostridial).

Referências Bibliográficas

Alibardi, L. and Cossu, R., 2016. Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic 817 waste on hydrogen production and fermentation products. Waste Management. 47, 69–77.

Andrade, P.F.S., 2017. Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/17. Fruticultura. Acesso em: http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=32 (20/08/2018).

Antonopoulou, G., Ntaikou, I., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K., Lyberatos, G., 2007. Biohydrogen production from sweet sorghum biomass using mixed acidogenic cultures and pure cultures of Ruminococcus albus. Global NEST Journal. 9, 144–151.

APHA., 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Am. Public Health Assoc., Washington D.C.

Cai, G., Jin, B., Monis, P., Saint, C., 2011. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. Biotechnology Advances. 29, 375-387.

Choonut, A., Saejong, M., Sangkharak, K., 2014. The Production of Ethanol and Hydrogen from Pineapple Peel by Saccharomyces cerevisiae and Enterobacter aerogenes. Energy Procedia, 52, 242-249.

Dubois, S.M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. Analytical. Chemistry. 228, 13–21.

Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., El Naggar, M.H., 2013. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. International journal of hydrogen energy. 38, 4945-4966.

FAO., 2011. Food Loss Reduction Strategy. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Feng, X., Wang, H., Wang, Y., Wang, X., Huang, J., 2010. Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge. International Journal of Hydrogen Energy. 35, 3058–3064.

Fernandes, E.R.K., Marangoni, C., SOUZA, O., Sellin, N., 2013. Thermochemical characterization of banana leaves as a potential energy source. Energy Conversion and Management. 75, 603–608.

Gustavsson, M., Lee, S.Y., 2016. Prospects of microbial cell factories developed through systems metabolic engineering. Microbial Biotechnology. 9, 610–7.

Haruta, S., Cui, Z., Huang, Z., Li, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. Applied Microbiology and Biotechnology. 59, 529–534.

Kanchanasuta, S., Prommeenate, P., Boonapatcharone, N., Pisutpaisal, N., 2017. Stability of Clostridium butyricum in biohydrogen production from non-sterile food waste. International Journal of hydrogen energy. 42, 3454-3465.

Keskin, T., Arslan, K., Abubackar, H.N., Vural, C., Eroglu, D., Karaalp, D., Yanik, J., Ozdemir, G., Azbar, N., 2018. Determining the effect of trace elements on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes. International Journal of hydrogen energy. 43, 10666-10677.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution. 33, 1870-1874.

Lee, D.J., Show, K.Y., Su, A., 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure cultures. Bioresource Technology. 102, 18393-8402.

Lin, C.Y., Lay, C.H., Sung, I.Y., Sen, B., Chen, C.C., 2017. Anaerobic hydrogen production from unhydrolyzed mushroom farm waste by indigenous microbiota. Journal of Bioscience and Bioengineering. 124, 425-429.

Liu, H., Chen, G., Wang, G., 2015. Characteristics for production of hydrogen and bioflocculant by Bacillus sp. XF-56 from marine intertidal sludge. International J. of hydrogen energy. 40, 1414-1419.

Lukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyka, P., Przyjaznyc, A., Kamiński, M., 2018 Hydrogen production from biomass using dark fermentation. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 91, 665–694.

Maintinguer, S.I., Lazaro, C.Z., Pachiega, R., Varesche, M.B.A., Sequinel, R., Oliveira, J.E., 2017. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. International J. of hydrogen energy. 42, 152-160.

Majidian, P., Tabatabaei, M., Zeinolabedinia, M., Naghshbandic, M.P, Chisti, Y., 2018. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 82, 3863–3885.

Matheri, A.N., Ntuli, F., Ngila, J.C., Seodigeng, T., Zvinowanda, C., Njenga, C.K., 2018. Quantitative characterization of carbonaceous and lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 92, 9–16.

Mishra, P., Thakur, S., Singh, L., Krishnan, S., Sakinah, M., Wahid, Z.A.B., 2017. Fermentative hydrogen production from indigenous mesophilic strain Bacillus anthracis PUNAJAN 1 newly isolated from palm oil mill effluent. International Journal of hydrogen energy. 42, 16054-16063.

Mohapatra, M. S., Dash, H. R., Das S., Pattnaik, S., Rathd, C. C., Samantaray, D., 2017. Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. Biochemistry and Biophysics Reports. 12, 206–213.

Nathoa, C., Sirisukpocab, U., Pisutpaisal, N., 2014. Production of Hydrogen and Methane from Banana Peel by Two Phase Anaerobic Fermentation. Energy Procedia. 50, 702–710.

Patel, S.K.S., Singh, M., Kalia, V.C., 2011. Hydrogen and Polyhydroxybutyrate Producing Abilities of *Bacillus* spp. From Glucose in Two Stage System. Indian Journal of Microbiology. 51, 418–423.

Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Reungsang, A., 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. International Journal of Hydrogen Energy. 33, 5256–5265.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrogen Energy. 38, 6137–6145.

Saidi, R., Liebgott, P.P., Gannoun, H., Gaida, L. B., Miladi, B., Hamdi, M., Bouallagui, H., Auria, R., 2018. Biohydrogen production from hyperthermophilic anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes in seawater: Simplification of the culture medium of Thermotoga maritima. Waste Management. 71, 474-484.

Sakthiselvan, P., Madhumathi, R., 2018. Kinetic evaluation on cell growth and biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus safensis* EBT1 from sugarcane bagasse. Engineering in Agriculture, Environment and Food. 17, 145-152.

Sikora, A., Blaszczyk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U., 2013. Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence?, in: Kong, M. (Ed), R & D for Food, Health and Livestock Purposes. pp. 488-514.

Wang, X., He, Q., Yang, Y., Wang, J., Haning, K., Hua, Y., Wu, B., He, M., Zhang, Y., Bao, J., Contreras, L. M., Yang, S., 2018. Advances and prospects in metabolic engineering of Zymomonas mobilis. Metabolic Engineering. 50, 57-73.

Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., et al., 2011. Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol. Nature Chemical Biology. 7, 445–452.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van‘t Riet, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 56,1875–1881.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA NO ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO

Fabricio Motteran [1], Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic [2]

[1] Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Este projeto de pesquisa visa o desenvolvimento de métodos analíticos cromatográficos em cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) para o monitoramento da degradação do corante azo Direct Black 22 e identificação dos metabólitos gerados em reatores biológicos em batelada e em sistema de fluxo continuo sequencial de reatores, operados sob condição anaeróbia e aeróbia. A identificação dos principais grupos microbianos envolvidos nos processos de remoção do composto tóxico recalcitrante complementa os objetivos, tornando possível mapear possíveis rotas metabólicas de degradação do corante azo Direct Black 22. Os resultados esperados para pesquisa pretendem melhorar e adaptar técnicas analíticas, identificar os principais subprodutos gerados nos processos anaeróbios e aeróbios envolvidos, bem como preencher as lacunas sobre a microbiota envolvida no processo de degradação, visando contribuir para proposição de sistemas de tratamento de águas e efluentes contaminados com esse corante têxtil.*

Introdução

A descarga de efluentes da indústria têxtil, além de ser um problema estético, também pode limitar a fotossíntese em plantas aquáticas pela obstrução da passagem da luz solar, alterando a autodepuração dos corpos d'água devido à estabilidade química e fotolítica dos corantes principalmente do tipo azo, o que os tornam altamente recalcitrantes em ambientes naturais (Cervantes e Santos, 2011). A composição do efluente têxtil é complexa, rica em sais inorgânicos, com elevada carga orgânica, e de alto teor de corantes, podendo interferir no desempenho de sistemas de tratamento.

Atualmente, existem várias tecnologias para o tratamento dos efluentes têxteis, destacando-se os processos físico-químicos, como a coagulação/floculação, a oxidação e a adsorção. Esse tipo de processo remove eficientemente matéria orgânica e cor, entretanto gera resíduos tóxicos, de difícil disposição e altos custos de implementação, operação e manutenção (Isik e Sponza, 2004). Dessa forma, uma opção plausível é o emprego de processos biológicos para a remoção destes compostos em efluentes contaminados, uma vez que possibilitam sua conversão em produtos inócuos.

O tratamento biológico é uma alternativa economicamente viável, que apresenta o potencial de remoção de cor e matéria orgânica. Considerando a importância do conhecimento das propriedades dos corantes sintéticos, relacionados ao seu impacto nos processos industriais, a saúde humana e ao meio ambiente, esta pesquisa visa estudar a degradação corante azo *Direct Black* 22, sob condições anaeróbia e aeróbia sequenciais, acompanhando a formação de metabólitos em reatores com alimentação em batelada. Para isso a determinação, monitoramento e identificação do corante azo e de seus metabólitos (ácido sulfanilico e aminas aromáticas) serão realizados por cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas (LC-MS e GC-MS). Análises e caracterização genômica dos microrganismos envolvidos no processo de degradação, a fim de mapear os grupos microbianos com maior relevância na decomposição do *Direct Black* 22, serão realizadas para complementar o conhecimento sobre o tema.

O corante tetra-azo *Direct Black* 22, cuja fórmula molecular é $C_{44}H_{32}N_{13}Na_3O_{11}S_3$, possui o peso molecular de 1083,97 g/mol, e pode ser classificado como um corante *direto* e reativo, sendo amplamente utilizado nas indústrias têxteis e presente nos efluentes das lavanderias comerciais (Figura 1).

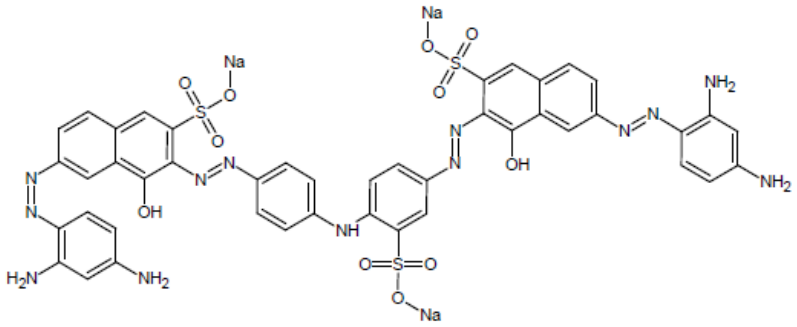


Figura 1: Estrutura química do corante *Direct Black* 22

Efluentes contendo corantes podem ser degradados por meio de processos anaeróbios e aeróbios combinados, o primeiro acarretando a quebra da ligação azo, com a remoção de cor e o segundo possibilitando a mineralização (Braúna et al., 2009; Santos et al., 2005). Doadores de elétrons são necessários para que os processos anaeróbios de conversão de corantes ocorram, quer em temperaturas mesofílicas e termofílicas. A adaptação do consórcio microbiano aos diferentes tipos de substrato fornecidos ao sistema, contribuem para aumentar os caminhos de degradação dos compostos complexos e recalcitrantes (Gonçalves et al., 2009). A redução de uma ligação azo –N=N– gera as aminas aromáticas, incolores e nocivas à saúde humana e ao meio ambiente, que demandam processo de degradação (van der Zee e Villaverde 2005), mais facilmente observado em ambientes aeróbios

Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para a determinação de corantes em matrizes complexas como águas residuárias, esgotos sanitários e em corpos hídricos de maneira geral. Métodos que envolvem cromatografia (Prado et al., 2006), espectrometria de massas (Harada et al., 1991), voltametria (Dominguez et al., 1990), eletroforese capilar (Prado et al., 2006) e espectrofotometria (Llamas et al., 2009) têm tido alta repercussão na determinação de corantes azo, principalmente.

A espectrometria de massas pode ser utilizada acoplada tanto à cromatografia líquida quanto à cromatografia gasosa para se observar e identificar os corantes na matriz, e auxiliar na quantificação destes compostos alvos e obter de maneira rápida e prática tanto concentração do corante, quanto os possíveis produtos de degradação dos corantes como as aminas aromáticas e os ácidos sulfônicos (Santos et al., 2010).

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para identificar e/ou quantificar as aminas aromáticas (subprodutos de transformação dos corantes azo), sendo as mais empregadas as técnicas de injeção em fluxo acoplada a voltametria com reação de bromação e diazotação (Fogg et al., 1982) técnicas em HPLC (Narang et al., 1982), LC-MS (Sakai et al., 2002) e GC-MS (Moldovan e Bayona, 2000), epectofotometria e eletroforese capilar (Asthana et al., 2000; Cavallaro et al., 1995).

Portanto, a implementação de técnicas analíticas mais apuradas para o monitoramento tanto do composto alvo (corante azo *Direct Black* 22) e de seus subprodutos de degradação em processos biológicos de tratamento aeróbio e anaeróbio auxiliará o grupo de pesquisa do LPB na elucidação de diversas lacunas que diz respeito a remoção destes compostos nas águas residuárias de indústria de tingimento de tecidos, consideradas matrizes complexas.

Muitos estudos têm focado em encontrar espécies microbianas capazes de degradar corantes de maneira geral e, principalmente, os com características azo. Dentre estes estudos, destaca-se o estudo de Saha et al. (2017) que isolaram bactérias de efluentes têxteis responsáveis pela redução de cor, tendo microrganismos da espécie *Alcaligenes faecalis* como a mais significativa. Estes autores reportam também que a atividades de descoloração é dependente da temperatura, pH, concentração inicial do corante e quantidade de co-substrato presente no meio, que atua como doador de elétrons para quebra da ligação azo, importante passo para degradação do corante. Coughlin et al. (1997) encontraram bactérias anaeróbias pertencentes ao gênero *Sphingomonas* com metabolismo aeróbio capazes de degrada corantes azo, e classificaram este microrganismo como sendo "azo dye-degrading bacterium". Arora et al. (2007), Asad et al. (2007) e Tony et al. (2009) isolaram e identificaram microrganismos como *Bacillus firmus*, *B. vallismortis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *Halomonas* sp, que são bactérias aeróbias com potenciais na degradação de corantes azo. Bactérias descolorantes, como *Pseudomonas aeruginosa* (Bhatt et al., 2005) e *Comamonas* sp. foram isolados de locais contaminados por resíduos têxteis (Jadhav et al., 2008) e espécies pertencentes aos gêneros *Eubacterium*, *Butyrivibrio* e *Bacteroides* foram identificados como capazes de degradar corantes em águas residuárias.

Material e Métodos

Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP). As atividades foram programadas para duração de dois anos (24 meses), com atividades independentes no primeiro ano, permitindo gerar resultados importantes. A primeira fase (Fase I) será dedicada ao desenvolvimento de métodos analíticos cromatográficos em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Nessa fase também serão operados reatores em batelada, sob condições anaeróbias e aeróbias, que serão monitorados com respeito aos compostos alvos (corante azo *Direct Black* 22 e às aminas aromáticas, nos frascos reatores anaeróbios e aeróbios, e à formação de metabólitos secundários provenientes dos processos de degradação em estudo. Na segunda fase experimental (Fase II), já com os métodos analíticos definidos e avaliação do comportamento do corante sob condições anaeróbias e aeróbias em batelada, o corante azo *Direct Black* 22 será aplicado em uma água residuária sintética ao sistema de reatores anaeróbio, seguido de aeróbio, ambos com biomassa imobilizada, em escala de bancada e fluxo contínuo. Na Fase III, os inóculos anaeróbio e aeróbio serão colocados em um mesmo reator, submetido à aeração intermitente para avaliação do processo de degradação do corante DB 22. Com os dados obtidos será possível conhecer a cinética de degradação, formação de metabólitos, processo de adsorção em ambas as condições, anaeróbia e aeróbia, bem como comparar os desempenhos das configurações propostas.

Referências Bibliográficas

Altınöz, S., Toptan, S., 2002. Determination of Tartrazine and Ponceau-4R in Various Food Samples by Vierordt's Method and Ratio Spectra First-Order Derivative UV Spectrophotometry. J. Food Compos. Anal. 15, 667–683.

Arora, S., Saini, H.S., Singh, K., 2007. Decolorisation optimisation of a monoazo disperse dye with Bacillus firmus. Identification of a degradation product. Color.

Technol. 123, 184–190. doi:10.1111/j.1478-4408.2007.00083.x

Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Sarbolouki, M.N., Dastgheib, S.M.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. Bioresour. Technol. 98, 2082–2088.

Asthana, A., Bose, D., Durgbanshi, A., Sanghi, S.., Kok, W.T., 2000. Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection. J. Chromatogr. A 895, 197–203. doi:10.1016/S0021-9673(00)00522-7

Bhatt, N., Patel, K.C., Keharia, H., Madamwar, D., 2005. Decolorization of diazo-dye Reactive Blue 172 byPseudomonas aeruginosa NBAR12. J. Basic Microbiol. 45, 407–418.

Braúna, C.H. da C., Mota, S., Santos, A.B. dos, 2009. Descoloração redutiva do corante azo RR2 na ausência e presença de mediador redox e aceptor de elétrons nitrato. Eng. Sanit. e Ambient. 14, 275–284. doi:10.1590/S1413-41522009000200015

Cavallaro, A., Piangerelli, V., Nerini, F., Cavalli, S., Reschiotto, C., 1995. Selective determination of aromatic amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction. J. Chromatogr. A 709, 361–366.

Cervantes, F.J., Santos, A.B. dos, 2011. Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: microbiological and biochemical aspects. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 10, 125–137.

Coughlin, M.F., Kinkle, B.K., Tepper, A., Bishop, P.L., 1997. Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. Water Sci. Technol. 36, 215–220.

Dominguez, F.B., Diego, F.G., Mendez, J.H., 1990. Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography. Talanta 37, 655–8.

dos Santos, A.B., Traverse, J., Cervantes, F.J., van Lier, J.B., 2005. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. Biotechnol. Bioeng. 89, 42–52.

Fogg, A.G., Bsebsu, N.K., Abdalla, M.A., 1982. Indirect flow injection voltammetric determination of aromatic amines by monitoring at a glassy carbon electrode the excess of nitrite remaining after their diazotisation. Analyst 107, 1462.

Gonçalves, I.C., Lopes, L., Pinheiro, H.M., Ferra, M.I.A., 2009. Behaviour of different anaerobic populations on the biodegradation of textile chemicals. J. Hazard. Mater. 172, 1236–1243.

Harada, K.-I., Masuda, K., Suzuki, M., Oka, H., 1991. Separation and identification of food dyes by thin-layer chromatography/liquid secondary ion mass spectrometry. Biol. Mass Spectrom. 20, 522–528.

Isik, M., Sponza, D., 2004. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. J. Hazard. Mater. 114, 29–39.

Jadhav, U.U., Dawkar, V. V., Ghodake, G.S., Govindwar, S.P., 2008. Biodegradation of Direct Red 5B, a textile dye by newly isolated Comamonas sp. UVS. J. Hazard. Mater. 158, 507–516.

Llamas, N.E., Garrido, M., Nezio, M.S. Di, Band, B.S.F., 2009. Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV–vis and multivariate curve resolution-alternating least squares. Anal. Chim. Acta 655, 38–42.

Moldovan, Z., Bayona, J.M., 2000. Determination of novel aromatic amines in environmental samples by gas chromatography/mass spectrometry. Rapid

Commun. Mass Spectrom. 14, 379–389.
Narang, A.S., Choudhury, D.R., Richards, A., 1982. Separation of Aromatic Amines by Thin-Layer and High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Sci. 20, 235–237.
Pérez-Urquiza, M., Beltrán, J.L., 2000. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A 898, 271–5.
Prado, M.A., Boas, L.F.V., Bronze, M.R., Godoy, H.T., 2006. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A 1136, 231–236.
Saha, A.K., Sultana, N., Mohanta, M.K., Mandal, A., Haque, M.F., 2017. Identification and Characterization of Azo Dye Decolourizing Bacterial Strains, Alcaligenes faecalis E5.Cd and A. faecalis Fal.3 Isolated from Textile Effluents. Am. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci. 31, 163–175.
Sakai, T., Morita, Y., Kim, Y., Tao, Y., 2002. LC–MS determination of urinary toluenediamine in workers exposed to toluenediisocyanate. Toxicol. Lett. 134, 259–264.
Santos, M.E. dos, Demiate, I.M., Nagata, N., 2010. Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada. Ciência e Tecnol. Aliment. 30, 903–909.
Tony, B.D., Goyal, D., Khanna, S., 2009. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. Int. Biodeterior. Biodegradation 63, 462–469.
van der Zee, F.P., Villaverde, S., 2005. Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—A short review of bioreactor studies. Water Res. 39, 1425–1440.
Vidotti, E.C., Rollemberg, M. do C.E., 2006. Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. Quim. Nova 29, 230–233.

ROTAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA REMOÇÃO DE ALQUILBENZENO LINEAR SULFONADO (LAS) EMPREGANDO ÁLCOOL ETOXILADO DE CADEIA LINEAR E ETANOL COMO COSSUBSTRATOS EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO EM ESCALA AUMENTADA

Fabricio Motteran [1]; Bianca Marques Nadai [2]; Juliana Kawanishi Braga [1]; Edson Luiz Silva [3]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [4]

[1] Pós Doutorando de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Aluno de Iniciação Científica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química do DEQ/UFSCar.
[4] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A caracterização da comunidade microbiana e a identificação da via metabólica envolvidas na degradação do surfactante linear alquilbenzeno sulfonado (LAS) a partir de efluentes comerciais de lavanderia reator de leito fluidizado (RLF) em escala aumentada foram realizadas utilizando a plataforma Illumina MiSeq. Etanol e o surfactante não iônico (LAE) foram utilizados como cossubstrato. O RLF foi operado em cinco fases operacionais: (I) inoculação; (II) 7,9±4,7 mgLAS.L^{-1} e 11,7±6,9 mgLAE.L^{-1}; (III) 19,4±12,9 mgLAS.L^{-1}, 19,6±9,2 mgLAE.L^{-1} e 205 mg.L^{-1} de etanol; (IV) 25,9±11 mgLAS.L^{-1}, 19,5±9,1 mgLAE.L^{-1} e 205 mg.L^{-1} etanol e (V) 43,9±18 mgLAS.L^{-1}, 25±9,8 mgLAE.L^{-1} e 205 mg.L^{-1} etanol. A remoção de matéria orgânica variou entre 40,4% a 85,1% e a remoção de LAS variou entre 24,7% a 56%. As bactérias redutoras de sulfato foram identificadas no biofilme do RLF em todas as fases operacionais. Embora o LAS tenha promovido um efeito tóxico na microbiota, esse efeito foi reduzido pela utilização de co-substratos biodegradáveis, como o etanol e o LAE, o que foi observado na Fase IV. Nesta fase, houve maior diversidade microbiana (índice de Shannon) e maior riqueza de microrganismos (índice de Chao 1), tanto para o Domínio Bacteria, quanto para o Domínio Archaea.*

Introdução

O surfactante aniônico linear alquilbenzeno sulfonato (LAS) é derivado do petróleo e utilizado mundialmente na fabricação de produtos de limpeza (Lara-Martín et al., 2010). O LAS é formado por uma cadeia alquílica linear cujo comprimento varia de 10 a 14 carbonos (C_{10} a C_{14}). Cada homólogo contém um anel aromático ligado à cadeia alquilica e um grupo sulfonato na posição *para* (Henau et al., 1986). O grupo fenil (anel aromático) do LAS pode ser ligado a quase todos os átomos de carbono da cadeia alquílica, exceto na posição do carbono 1 (grupo carbono-metila primário), e pode formar até 26 moléculas diferentes (De Wolf and Feijtel, 1998).

A remoção do LAS pode ocorrer de várias formas, como precipitação, adsorção ou degradação (HERA, 2009). Berna et al., (2007) consideram que entre esses mecanismos a biodegradação é de maior importância para a remoção de compostos químicos presentes em ambientes aquáticos. Scott e Jones, (2000) concluíram que as bactérias podem usar o LAS como uma fonte e energia e carbono ou até mesmo co-metabolizá-lo por meio de reações microbianas bioquímicas. Macedo et al., (2015) observaram que a biodegradação de compostos recalcitrantes pode aumentar com a adição de fontes de carbono prontamente degradáveis, como o etanol e a sacarose, dependendo da comunidade microbiana envolvida na degradação do LAS.

Embora a degradação aeróbica do LAS seja bem conhecida, as vias de degradação anaeróbica deste surfactante são pouco estabelecidas, pois são limitadas a poucos estudos (Zhang and Bennett, 2005). León et al., (2006) verificaram a degradação do LAS em sedimentos marinhos sob condições anóxicas e anaeróbicas. Estes autores mencionam a

influência de bactérias redutoras de sulfato na degradação deste surfactante em ambientes reduzidos, em que a cadeia alquílica é encurtada por meio de β-oxidação com a ajuda de fumarato como co-substrato.

Cossubstratos tais como álcoois alifáticos, aldeídos e ácidos carboxílicos como o acetato e o lactato são mecanismos importantes de reativação da atividade microbiana, uma vez que as bactérias podem sofrer pela toxicidade do LAS e assim perder a capacidade de oxidá-lo (Cruz et al., 2017; Schörberl, 1989). Os surfactantes não-iônicos, assim como o aniônico (LAS), estão sendo usados em quantidades crescentes como componentes de agentes de limpeza (HERA, 2009). O álcool etoxilato de cadeia linear (LAE) é um surfactante não iônico derivado do óleo de coco, consistindo de uma mistura de cadeias alquílicas de 12 a 14 carbonos, com uma média de 10 unidades etoxi.

A biodegradabilidade do LAE em processos anaeróbios já foi estudada por Motteran et al., (2014), em reator de leito fluidificado. Esses autores obtiveram remoção de 97% para 107,4±47,3 $mg.L^{-1}$ afluente. Desta forma, o LAE pode desempenhar o papel de co-substrato para a degradação de compostos com maior recalcitrância presente em águas residuais de lavanderia comercial. Segundo Brandt et al., (2003), a adição de fontes de carbono facilmente degradáveis pode aumentar a biodegradação de compostos químicos recalcitrantes pelo co-metabolismo, dependendo dos substratos específicos e das espécies microbianas envolvidas. Assim, os produtos metabólicos de um determinado microrganismo podem ser utilizados ou degradados por outros microrganismos, favorecendo o processo de biodegradação.

A degradação de compostos sulfonados, como LAS, pode ser complexa, uma vez que o estado de oxidação deste elemento pode variar de -2 (completamente reduzido) a +6 (completamente oxidado) e pode ser transformado, tanto quimicamente como biologicamente. O ciclo do enxofre pode estar relacionado a outros ciclos bioquímicos, como carbono e nitrogênio Muyzer e Stams, (2008). Desta forma, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) desempenham papel extremamente importante na remoção de compostos orgânicos de águas residuais contendo sulfato.

O uso de tecnologia de reator de leito fluidificado (RLF) para tratamento de efluentes tem sido empregado, tanto em escala de bancada quanto em escala piloto. A RLF tem sido utilizada com sucesso na remoção de surfactantes, como alquilbenzeno sulfonato linear, principalmente em efluentes comerciais de lavanderia comercial (Braga et al., 2015; Macedo et al., 2017, 2015; Oliveira et al., 2013), que possui alta concentração deste composto, atingindo concentrações de até 1024 $mg.L^{-1}$ (Braga e Varesche, 2014).

A água residuária de lavanderia comercial contém sólidos suspensos, sais, nutrientes, matéria orgânica e patógenos (Howard et al., 2005). No entanto, os surfactantes são os químicos orgânicos mais abundantes nas águas residuais municipais e na lavanderia comercial (Abu-Zreig et al., 2003). Desta forma, o desenvolvimento de tecnologias eficientes que possam ser aplicadas para a remoção destes xenobióticos é necessário para melhorar a qualidade ambiental.

A análise metagenômica é uma abordagem inovadora que auxilia na caracterização das populações microbianas. Rosso et al., (2017), as ferramentas para sequenciamento metagenômico são importantes para a compreensão e identificação dos microrganismos encontrados nas estações de tratamento de efluentes. A eficiência do processo de degradação da matéria orgânica e dos compostos tóxicos está diretamente relacionada ao desenvolvimento da população microbiana envolvida no processo, na qual o crescimento ou desenvolvimento de um grupo microbiano em detrimento de outro direcionará rotas metabólicas específicas e, assim, influenciará a remoção de eficiência global do composto desejado. Assim, por meio do metagenoma, podemos obter informações sobre os principais microrganismos envolvidos no processo de remoção do LAS de águas residuárias de lavanderia comercial, bem como quais microrganismos podem utilizar etanol e LAE como cossubstrato.

Neste estudo realizou-se a caracterização e identificação de vias metabólicas dos microrganismos envolvidos na degradação do linear alquilbenzeno sulfonato em água

residuária de lavanderia comercial em reator de leito fluidificado em escala ampliada. Destacando também a importância do etanol como co-substrato, bem como o uso do surfactante não iônico LAE como fonte de carbono facilmente degradável para favorecer a degradação de compostos recalcitrantes em processos anaeróbios.

Material e Métodos

Neste estudo, foi utilizado um reator de leito fluidificado (RLF) construído em acrílico (18,8 L), com altura de 2,98 m e diâmetro de 10 cm. Na extremidade superior, havia um dispositivo para separar as fases sólida, líquida e gasosa, e na porção inferior havia um distribuidor de fluxo. A RLF foi preenchido com 2 kg de argila expandida (1,4-1,7 mm de diâmetro) como material de suporte e inoculado com lodo anaeróbio de 1,2 L do reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) utilizado no tratamento de efluentes de matadouro de aves (Tietê, São Paulo, Brasil). Durante a operação, o reator foi mantido em condição mesofílica (24,8±2,6ºC) com tempo de retenção hidráulica (TDH) de 16,7±2 horas.

O RLF foi operado em cinco fases operacionais (Tabela 1), diferenciadas pela concentração de LAS, adição de etanol e LAE, como cossubstrato. As concentrações de cossubstrato foram estabelecidas de acordo com estudos de Macedo et al., (2015); Okada et al., (2013a) e Silva et al., (2017) para etanol e Motteran et al., (2014) para LAE. A RLF foi submetido a uma fase de inoculação, fixação e adaptação da biomassa no material de suporte (Fase I), nesta fase, não houve adição de surfactante e cossubstrato. Para as demais fases operacionais, a fonte de LAS e LAE eram águas residuais de lavanderia comercial. A alimentação do RLF foi mantida sob refrigeração (4°C) e consistiu de extrato de levedura (300 $mg.L^{-1}$), bicarbonato de sódio (300 $mg.L^{-1}$) e solução salina (1 $mL.L^{-1}$) contendo NaCl (50 $g.L^{-1}$), $MgCl_2.6H_2O$ (1,4 $g.L^{-1}$) e $CaCl_2.2H_2O$ (0,9 $g.L^{-1}$). Devido à alta variação do surfactante não iônico nas águas residuais de lavanderia comercial, foi necessário adicionar uma fonte externa deste composto. O álcool etoxilato de cadeia linear - LAE (Genapol® C-100 da Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) foi suplementado na alimentação do reator para amenizar a flutuação da concentração deste surfactante na água residuária de lavanderia comercial. Assim, a fonte de sulfato neste estudo veio do surfactante aniônico (LAS).

Tabela 1: Distribuição das fases operacionais no reator de leito fluidificado em escala aumentada

Fases Operacionais	Duração (Dias)	Afluente ($mg.L^{-1}$)			
		DQO	LAS	LAE	Etanol
I	111	796.3±283.8	-	-	-
II	133	508.1±157.6	7.9±4.7	11.7±6.9	-
III	142	847.2±275.8	19.4±12.9	19.6±9.2	205
IV	106	1028.5±194.1	25.9±11	19.5±9.1	205
V	56	842.7±178	43.9±18	25±9.8	205

DQO – Demanda química de oxigêmio; LAS – Linear alquilbenzeno sulfonado; LAE – Álcool etoxilado de cadeia linear.

As análises de pH, sólidos, matéria orgânica (APHA/AWWA/WEF, 2012) e alcalinidade (Dilallo e Albertson, 1961; Ripley et al., 1986) do afluente e efluente da RLF foram realizadas duas vezes por semana. Análises de surfactantes afluentes (a partir de água residuária de lavanderia comercial) foram realizadas em cada alimentação do reator, a fim de padronizar a concentração de afluente do LAS e LAE. O monitoramento do surfactante foi realizado por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa (LC-MS/MS). Isso foi feito usando a cromatografia líquida de alta eficiência Agilent Technologies® 1260 Infinity com coluna analítica Agilent Technologies® POROSHELL 120 EC-C18 (50 mm x 3,0 mm x 2,7 µm). A análise espectrométrica de massa foi realizada no espectrômetro de massas

ABSciex QTRAP® 5500 equipado com fonte de íons TurboV™, operado por electrospray em modo de ionização negativa (ESI-) para LAS e em modo de ion positivo (ESI+) para LAE. Os parâmetros da fonte de íons foram otimizados usando sistema de injeção de fluxo, com cortina de gás a 10 V, colisão de gás em nível médio, temperatura de fonte de 650°C, tensão de vapor iônico de 4500 V e pressão de gás na fonte GS1 de 45 psi e GS2 de 45 psi (Motteran et al., 2017).

A extração do DNA para sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizada usando o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Griffiths et al., (2000) modificado. A qualidade do DNA foi verificada pela proporção de 260/280 nm> 1,8, medida por um espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE) e eletroforese em gel de agarose.

A diversidade filogenéticas das amostras da biomassa aderida ao material de suporte RLF (argila expandida) das Fases II, III, IV e V, foram analisada utilizando a plataforma de sequenciamento de próxima geração (NGS) Illumina MiSeq (Si et al., 2015). Os primers utilizados foram 515F (5′-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGG-3′) e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') para aplificar a região V4 do RNA ribosomal 16S pelo sistema GeneAmp PCR (ABI company, USA). O sequenciamento foi realizado utilizando o software online MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EUA), seguindo as instruções do fabricante MiSeq. O processamento de dados de sequenciamento foi realizado usando o pipeline MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EUA).

As unidades taxonômicas operacionais (OTU) classificadas como quimeras foram removidas. Os clusters foram definidos com 97% de similaridade. A OTU final foi taxonomicamente classificada usando o *Ribosomal Database Project* (RDP) *Classifier* e o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://rdp.cme.msu.edu, www.ncbi.nlm.nih.gov).

As sequências identificadas pelo MiSeq Illumina foram submetidas ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/) sob os números de acesso SRR 6485641 (run), SRS 2845377 (sample) SRX 6575490 (experiment), cujo número de acesso ao projeto é PRJNA 430815.

Resultados e Discussão

Na Fase I do RLF, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 61,4% para 796,3±283,8 $mg.L^{-1}$ afluente. Na Fase II foi encontrada a menor eficiência (40,4%) para 508,1±157,6 $mg.L^{-1}$ de matéria orgânica afluente. Este declínio da eficiência de remoção de matéria orgânica deveu-se ao aumento de LAS na água residuária de lavanderia comercial. No entanto, o aumentando da concentração do surfactante e a adição de etanol nas Fases III, IV e V observou-se o aumento na concentração de matéria orgânica afluente para 847,2±275,8 $mg.L^{-1}$, 1.028,5±194,1 $mg.L^{-1}$ e 842,7±178 $mg.L^{-1}$ e aumento da eficiência de remoção para 68,5%, 79,4% e 85,1%, respectivamente (Tabela 2). Por outro lado, a adição de LAE não alterou consideravelmente os valores de matéria orgânica afluente, uma vez que este surfactante foi adicionado nas Fases II, III e IV e as mudanças significativas nesses valores foram observadas apenas nas fases operacionais com adição de etanol (205 $mg.L^{-1}$).

Os valores de afluente, efluente e eficiência de remoção de ambos os surfactantes LAS e LAE estão descritos ao longo do texto. Para valores afluentes de LAS de 7,8±4,7 $mg.L^{-1}$; 19,4±12,9 $mg.L^{-1}$; 25,9±11 $mg.L^{-1}$ e 43,8±17,95 $mg.L^{-1}$, foram encontrados valores de eficiência de remoção de 43,8%, 24,5%, 50,1% e 56% para as fases II, III, IV e V, respectivamente. Os maiores valores de eficiência de remoção de LAE foram 76,7%, 88,7%, 98,9% e 97,2% observados para concentrações afluentes de 11,6±6,9 $mg.L^{-1}$, 19,6±9,2 $mg.L^{-1}$, 19,5±9,1 $mg.L^{-1}$ e 25±9,8 $mg.L^{-1}$ para as Fases II, III, IV e V, respectivamente.

Tabela 2: Valores de matéria orgânica (DQO) nas fases operacionais do reator de leito fluidificado em escala aumentada

Fases Operacionais	Matéria Orgânica		
	Afluente ($mg.L^{-1}$)	Efluente ($mg.L^{-1}$)	Eficiência (%)
I	796,3±28,.8	307,2±167,5	61,4
II	508,1±157,6	303±113	40,4
III	847,2±275,8	266,5±151,1	68,5
IV	1.028,5±194,1	212,2±84,4	79,4
V	842,7±178	125,8±50,5	85,1

O aumento na concentração de LAS no meio pode influenciar a atividade microbiana, principalmente no que diz respeito às bactérias acidogênicas, acetogênicas e archaeas metanogênicas, fato comprovado em estudos de Garcia-Morales et al., (2001); Garcia et al., (2006); García et al., (2005); Silva et al., (2017). Neste estudo, o uso do etanol como co-substrato permitiu aumentar a concentração de LAS sem afetar a remoção de surfactante e matéria orgânica.

A eficiência de remoção de LAE foi superior a 75% em todas as fases operacionais, ou seja, 98,9% na Fase IV (19,5±9,1 $mg.L^{-1}$). Segundo Huber et al. (2000), o primeiro passo para a degradação do LAE ocorre por meio da oxidação da porção final da molécula e subsequente encurtamento da cadeia polietoxilada, ou seja, por meio dos grupos etoxi terminais (EO), liberando dois carbono (C2), gerando acetaldeídos até atingir a porção hidrofílica da molécula. Este encurtamento do LAE por meio da clivagem dos grupos EO também pode gerar ácidos dodecanóicos e ácido acético. A presença de LAE, com sua posterior transformação em etilenoglicóis e etanol, pode ter sido utilizada como cossubstrato por micro-organismos presentes no RLF, favorecendo a degradação do LAS.

A remoção de LAS em ambiente anaeróbico requer fontes adicionais de carbono de fácil degradação como sacarose, etanol, fumarato, como evidenciado por Abboud et al., (2007); Carosia et al., (2014); Khleifat, (2006); Lara-Martín et al., (2010); Macedo et al., (2015) e Okada et al., (2013b). Neste estudo, também foi comprovado que a adição de etanol e LAE como cossubstrato na alimentação do RLF auxiliou no LAS e na degradação da matéria orgânica e LAS em ága residuária de lavanderia comercial.

Um total de 364 gêneros microbianos diferentes foram identificados em amostras da biomassa aderida ao material de suporte do FBR (argila expandida), 252 na Fase II (246.514 sequências); 269 na Fase III (205.085 sequências), 287 na Fase IV (218.472 sequências) e 194 na Fase V (182.387 sequências). A maior diversidade bacteriana foi observada como resultado do aumento da concentração de LAS e LAE e adição de etanol da Fase II (7,9±4,7 mg $LAS.L^{-1}$ e 11,7±6,9 mg $LAE.L^{-1}$) para a Fase IV (25,9±11 mg$LAS.L^{-1}$ e 19,5±9,1 mg $LAE.L^{-1}$ e 205 $mg.L^{-1}$ de etanol), além dos demais compostos comerciais de águas residuárias de lavanderia. No entanto, houve uma diminuição no número de espécies identificadas na fase V (43,9± 18 mg $LAS.L^{-1}$, 25±9,8 mg $LAE.L^{-1}$ e 205 $mg.L^{-1}$ de etanol), possivelmente causada pelo aumento da concentração do influente LAS.

Os gêneros com maior abundância relativa na Fase II foram *Ignavibacterium* spp. (32,6%) *Aminivibrio pyruvatiphilus* (15,3%), *Synergistes* spp. (5,9%), *Clostridium* spp. (5,6%), *Azovibrio* spp. (5,6%), *Desulfovibrio desulfuricans* (5,4%), *Cetobacterium* spp. (4,3%), *Bacteroides* spp. (2,6%), *Aminobacterium* spp. (2,2%), *Pannonibacter* sp. (2,1%), Cloacibacillus spp. (1,6%), *Soehngenia* sp. (1,5%), *Petrimonas* spp. (1,1%), *Parabacteroides* spp. (1%) e *Phyllobacterium trifolii* (1%). Para os demais gêneros, a abundância relativa obtida foi inferior a 1%. O emprego do LAE como co-substrato ao RLF pode ter favorecido a elevada abundância relativa de *Azovibrio* na Fase II, uma vez que esse surfactante não iônico é decomposto em moléculas de polietilenoglicol e, por sua vez, em etanol, que pode ser usado por esses microrganismos em como outros como as BRS (Huber et al., 2000).

Na amostra referente à Fase III, foram identificados com maior abundância relativa os os gêneros *Synergistes* spp. (51,6%), *Aminivibrio pyruvatiphilus* (12,2%), *Cetobacterium* spp. (5,1%), *Desulfovibrio* spp. (4,1%), *Flexistipes* spp. (3,5%), *Desulfovibrio alcoholovorans* (3,4%), *Desulfovibrio desulfuricans* (2,4%), *Levilinea* spp. (2,3%), *Bellilinea* spp. (1,4%), *Rhizobium* sp. (1,2%), *Pleomorphomonas* spp. (1,2%), *Acetobacterium* sp. (1%) e *Clostridium* spp. (1%). Para os demais gêneros, a abundância relativa obtida foi inferior a 1%.

Além de alguns gêneros identificados com prevalência na Fase II, bactérias redutoras de sulfato (BRS), como *Desulfovibrio* spp., *Desulfovibrio alcoholovorans* e *Desulfovibrio desulfuricans* também foram identificadas na Fase III. Nesta fase, a adição de etanol à alimentação do reator favoreceu esses grupos microbianos, uma vez que eles podem usar o etanol como fonte de carbono, que é convertida em ácido acético (Nagpal et al., 2000), que são utilizados por archaeas metanogênicas, como *Methanobacterium formicicum* (26,1%), *Methanobacterium* sp. (28,4%) e *Methanosaeta* sp. (15,2%) também identificados nesta fase.

Os gêneros com maior abundância relativa na amostra da Fase IV foram *Synergistes* spp. (25,1%), *Aminivibrio pyruvatiphilus* (9,5%), *Clostridium* spp. (5,3%), *Phyllobacterium trifolii* (4,9%), *Desulfovibrio desulfuricans* (4,3%), *Pelobacter propionicus* (3,9%), *Leptospira* spp. (3,7%), *Cloacibacillus* spp. (3,4%), *Syntrophobacter* spp. (3,1%), *Anaerophaga* spp. (3%), *Geobacter* spp. (2,8%), *Desulfovibrio* spp. (2,7%), *Desulfovibrio alcoholovorans* (2,7%), *Ignavibacterium* spp. (2,5%), *Soehngenia* sp. (1,9%), *Aminobacterium* spp. (1,8%), *Desulfovibrio fairfieldensis* (1,4%), *Syntrophorhabdus* spp. (1,4%), *Syntrophobacter wolinii* (1%) e *Aminiphilus circumscriptus* (1%). Para os demais gêneros, a abundância relativa observada foi inferior a 1%.

Embora na Fase IV tenha sido utilizada uma maior concentração de LAE (19,5±9,1 $mg.L^{-1}$), houve menor abundância para *Synergistes* spp. (25,1%) quando comparda a fase anterior (51,6%). Segundo Ganesh Kumar et al., (2008), esta categoria de surfactante pode influenciar o crescimento dos representantes deste gênero. A alta concentração de LAS também pode ter influenciado para diminuir a abundância relativa deste grupo, evidenciando outros micro-organismos como *Desulfobulbus* sp. (0,001% na Fase III e 0,09% na Fase IV), *Desulfomicrobium* sp. (0,02% na Fase III e 0,22% na Fase IV), *Desulforegula* spp. (0,12% na Fase III e 0,4% na Fase IV), *Desulfovibrio fairfieldensis* (0,01% na Fase III e 1,4% na Fase IV), *Desulfovibrio desulfuricans* (2,4% na Fase III e 4,3% na Fase IV), que usam etanol como substrato.

Representantes semelhantes ao gênero *Syntrophorhabdus* também estão relacionados à degradação de compostos aromáticos simples, que podem ser usados como doadores de elétrons sob condições anaeróbicas, sendo convertidos em ácido acético (Kuever, 2014). Este grupo microbiano realiza sintrofias com archaeas metanogênica hidrogenotróficas, como *Methanobacterium* spp. (78%), *Methanospirillum* spp. (0,02%) e *Methanobrevibacter* spp. (12,9%), também observado nesta fase (Kuever, 2014).

Na Fase V, foi observada a predominância de *Clostridium* spp. (14,8%), *Desulfovibrio desulfuricans* (12,7%), *Synergistes* spp. (11,1%), *Aminivibrio pyruvatiphilus* (9,5%), *Clostridium methylpentosum* (8,3%), *Bacteroides* spp. (7,2%), *Ignavibacterium* spp. (4,5%), *Chitinophaga* spp. (3,8%), *Aminobacterium* spp. (3,4%), *Petrimonas* spp. (2,5%), *Parabacteroides* spp. (2,5%), *Soehginia* sp. (2,4%), *Phyllobacterium trifolii* (1,7%), *Cloacibacillus* spp. (1,7%), *Flexistipes* spp. (1,6%) e *Desulfovibrio* spp. (1,3%). A abundância relativa dos outros gêneros identificados foi inferior a 1%.

A predominância de *Clostridium* spp. e *Desulfovibrio* sp. na Fase V é explicada uma vez que ambos os grupos são capazes de degradar compostos nitroaromáticos xenobióticos (Esteve-Nunez et al., 2001) presentes em águas residuais de lavanderia comercial. Bactérias redutoras de sulfato, como *Desulfovibrio desulfuricans* (8,3%) são estritamente anaeróbicas, e capazes de usar uma ampla gama de compostos inorgânicos como receptores de elétrons (Lobo et al., 2007).

Segundo Lobo et al., (2007), as BRS também pode ser encontrado em ambientes

óxidos e, especialmente, as espécies de *Desulfovibrio* podem sobreviver à exposição prolongada ao O_2 devido à ação de enzimas como a redutase de oxigênio. Assim, esses microrganismos podem ter permanecido na RLF mesmo que este tenha o potencial redox maior em sua porção superior. Este grupo pode ter usado tanto o grupo sulfonato da molécula LAS como um aceptor final de elétrons e sua cadeia alquílica como uma fonte de carbono. Na Figura 1 são mostrados as principais gêneros (abundancia relativa superior a 1%) nas diferentes fases operacionais do RLF a dinâmica populacional de cada microrganismo.

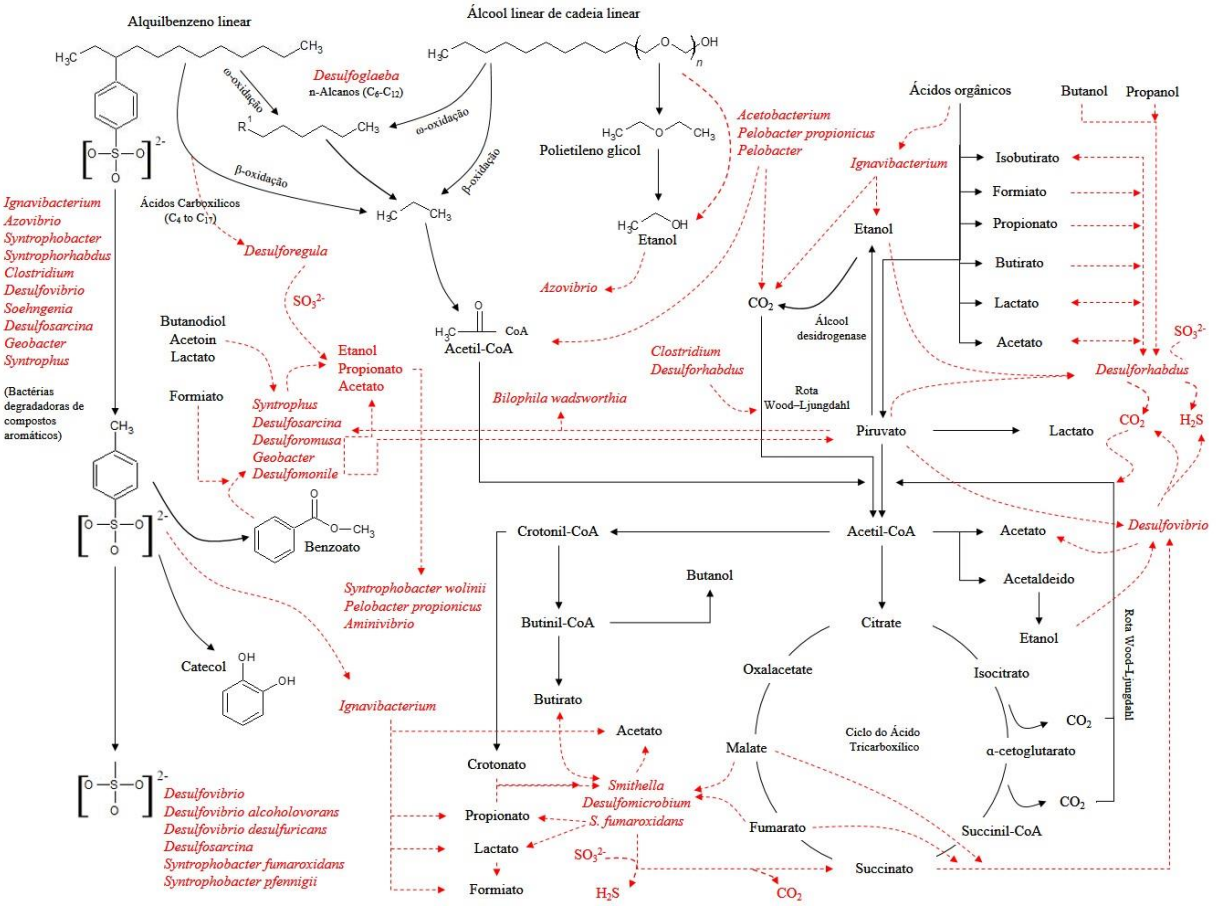


Figura 1: Rotas metabólicas dos microrganimos identificados no reator de leito fluidificado em escala aumentada envolvidas na degradação do LAS utilizando o LAE e Etanol como cosubstratos

O inóculo utilizado neste estudo, assim como as características do RLF (elevada taxa de recirculação e separador de fases), bem como a utilização de cossubstrato favoreceram a diversidade microbiana neste processo, contribuindo para a manutenção microbiana e a riqueza de espécies no reator para a remoção e degradação de compostos orgânicos da água residuária da lavanderia comercial.

Conclusões

A remoção de matéria orgânica e LAS no reator de leito fluidificado em escala ampliada foi adequada com o desenvolvimento de um consórcio microbiano diversificado e interdependência metabólica para a degradação de surfactantes e outros compostos xenobióticos presentes em água residuária de lavanderia comercial. Essa dependência bioquímica entre os grupos microbianos refere-se ao fato de que os subprodutos da degradação de moléculas mais complexas são utilizados por outros grupos de microrganismos. Grupos microbianos como *Acetobacterium* e *Pelobacter* estão diretamente relacionados à degradação da LAE, convertendo esta molécula em etanol que é usada pelas

BRS. A decomposição da molécula LAS forneceu o grupo sulfonato $(SO_3)^{2-}$ para BRS que são metabolicamente versáteis e desenvolvidos em todas as fases operacionais do RLF, e tiveram maior predominância na presença dos cossubstrato etanol e LAE.

Apesar de ser um surfactante não-iônico característico de águas residuárias de lavanderia comercial, o LAE foi utilizado como co-substrato neste estudo. No qual as BRS podem ter usado as cadeias de carbono deste surfactante quanto o etanol como fonte de carbono e energia. *Ignavibacterium*, *Aminivibrio*, *Synergistes*, *Clostridium*, *Cetobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanosaeta* foram os grupos mais abundantes microbianas identificadas no material de suporte do RLF, que desempenham um papel chave na degradação de compostos tóxicos, tais como LAS e a formação de subprodutos assimiláveis por archaea metanogênica. BRS com a maior abundância relativa identificada no RLF foram *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio fairfieldensis*, *Desulfovibrio alcoholovorans*, *Desulfovibrio*, *Pelobacter propionicus*, *Geobacter* e *Syntrophobacter*. O LAS, apesar de exercer efeito tóxico na comunidade microbiana, teve sua toxicidade reduzida quando cossubstrato de fácil degradação foram utilizados, como etanol e LAE, sendo possível aumentar a concentração do surfactante aniônico sem afetar sua eficiência de remoção.

Referências Bibliográficas

Abboud, M.M., Khleifat, K.M., Batarseh, M., Tarawneh, K. a., Al-Mustafa, A., Al-Madadhah, M., 2007. Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzosulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of Acinetobacter calcoaceticus and Pantoea agglomerans. Enzyme Microb. Technol. 41, 432–439.

Abu-Zreig, M., Rudra, R.P., Dickinson, W.T., 2003. Effect of Application of Surfactants on Hydraulic Properties of Soils. Biosyst. Eng. 84, 363–372. APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541.

Berna, J.L., Cassani, G., Hager, C.-D., Rehman, N., López, I., Schowanek, D., Steber, J., Taeger, K., Wind, T., 2007. Anaerobic Biodegradation of Surfactants – Scientific Review. Tenside Surfactants Deterg. 44, 312–347. doi:10.3139/113.100351

Braga, J.K., Motteran, F., Macedo, T.Z., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Okada, D.Y., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2015. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in commercial laundry wastewater by an anaerobic fluidized bed reactor. J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 50, 946–57.

Braga, J.K., Varesche, M.B. a, 2014. Commercial Laundry Water Characterisation. Am. J. Anal. Chem. 2014, 8–16.

Brandt, B.W., van Leeuwen, I.M.M., Kooijman, S.A.L.M., 2003. A general model for multiple substrate biodegradation. Application to co-metabolism of structurally non-analogous compounds. Water Res. 37, 4843–54. doi:10.1016/j.watres.2003.08.006

Carosia, M.F., Okada, D.Y., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2014. Microbial characterization and degradation of linear alkylbenzene sulfonate in an anaerobic reactor treating wastewater containing soap powder. Bioresour. Technol. 167, 316–323.

Cruz, A., Cavaleiro, A.J., Paulo, A.M.S., Louvado, A., Alves, M.M., Almeida, A., Cunha, A., 2017. Marine Pollution and Microbial Remediation. Springer Singapore, Singapore.

De Wolf, W., Feijtel, T., 1998. Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. Chemosphere 36, 1319–1343. Dilallo, R., Albertson, O.E., 1961. Volatile Acids by Direct Titration. J. Water Pollut. Control Fed. 33, 356–365.

Esteve-Nunez, A., Caballero, A., Ramos, J.L., 2001. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 335–352.

Ganesh Kumar, A., Venkatesan, R., Kirubagaran, R., Prabhakar, T.G., Sekaran, G., 2008.

Effects of nonionic surfactant on hydrolysis and fermentation of protein rich tannery solid waste. Biodegradation 19, 739–748.

Garcia-Morales, J.L., Nebot, E., Romero, L.I., Sales, D., 2001. Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzene-sulfonate (LAS). Chem. Biochem. Eng. Q. 15, 13–19.

García, M.T., Campos, E., Ribosa, I., Latorre, a, Sánchez-Leal, J., 2005. Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: biodegradation kinetics and metabolite analysis. Chemosphere 60, 1636–43.

Garcia, M.T., Campos, E., S??nchez-Leal, J., Ribosa, I., 2006. Effect of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on the anaerobic digestion of sewage sludge. Water Res. 40, 2958–2964.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., Anthony, G., Donnell, O., Bailey, M.J., Donnell, A.G.O., 2000. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and 1–5.

Henau, H. De, Mathijs, E., Hopping, W.D., 1986. Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in Sewage Sludges, Soils and Sediments: Analytical Determination and Environmental Safety Considerations. Int. J. Environ. Anal. Chem. 26, 279–293.

HERA, 2009. Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products 1–81.

Howard, E., Misra, R., Loch, R., Le-Minh, N., 2005. Laundry grey water potential impact on Toowoomba soils. Toowoomba.

Huber, M., Meyer, U., Rys, P., 2000. Biodegradation Mechanisms of Linear Alcohol Ethoxylates under Anaerobic Conditions. Environ. Sci. Technol. 34, 1737–1741.

Khleifat, K.M., 2006. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. Enzyme Microb. Technol. 39, 1030–1035.

Kuever, J., 2014. The Family Syntrophorhabdaceae, in: The Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 301–303.

Lara-Martín, P.A., Gómez-Parra, A., Sanz, J.L., González-Mazo, E., 2010. Anaerobic degradation pathway of linear Alkylbenzene sulfonates (LAS) in sulfate-reducing marine sediments. Environ. Sci. Technol. 44, 1670–6.

León, V.M., López, C., Lara-Martín, P.A., Prats, D., Varó, P., González-Mazo, E., 2006. Removal of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates at low temperatures during activated sludge treatment. Chemosphere 64, 1157–1166.

Lobo, S.A.L., Melo, A.M.P., Carita, J.N., Teixeira, M., Saraiva, L.M., 2007. The anaerobe Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. FEBS Lett. 581, 433–436.

Macedo, T.Z., Delforno, T.P., Braga, J.K., Okada, D.Y., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2017. Robustness and Microbial Diversity of a Fluidized Bed Reactor Employed for the Removal and Degradation of an Anionic Surfactant from Laundry Wastewater. J. Environ. Eng. 143, 4017062.

Macedo, T.Z., Okada, D.Y., Delforno, T.P., Braga, J.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2015. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. Bioprocess Biosyst. Eng.

Motteran, F., Braga, J.K., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2014. Degradation of high concentrations of nonionic surfactant (linear alcohol ethoxylate) in an anaerobic fluidized bed reactor. Sci. Total Environ. 481, 121–8.

Motteran, F., Lima Gomes, P.C.F., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2017. Simultaneous determination of anionic and nonionic surfactants in commercial laundry wastewater and anaerobic fluidized bed reactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Sci. Total Environ. 580, 1120–1128.

Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 6, 441–54. doi:10.1038/nrmicro1892

Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A., Peeva, L., 2000. Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. Biotechnol. Bioeng. 70, 533–43.

Okada, D.Y., Delforno, T.P., Esteves, A.S., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2013a. Bioresource Technology Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS , hydraulic retention time and specific organic load rate. Bioresour. Technol. 128, 125–133.

Okada, D.Y., Esteves, A.S., Delforno, T.P., Hirasawa, J.S., Duarte, I.C.S., Varesche, M.B.A., 2013b. Influence of co-substrates in the anaerobic degradation of an anionic surfactant. Brazilian J. Chem. Eng. 30, 499–506.

Oliveira, L.L., Costa, R.B., Sakamoto, I.K., Duarte, I.C.S., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2013. Las degradation in a fluidized bed reactor and phylogenetic characterization of the biofilm. Brazilian J. Chem. Eng. 30, 521–529.

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. J. Water Pollut. Control Fed. 58, 406–411.

Schörberl, M.P., 1989. Basic principles of LAS. Tenside Surfact 26, 86–94.

Scott, M.J., Jones, M.N., 2000. The biodegradation of surfactants in the environment. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1508, 235–251.

Si, B., Li, J., Li, B., Zhu, Z., Shen, R., Zhang, Y., Liu, Z., 2015. The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). Int. J. Hydrogen Energy 40, 11414–11421.

Silva, L.G., Silva, D.C., Oliveira, L.M., Florencio, L., Gavazza, S., Kato, M.T., 2017. Degradação dos homólogos do alquilbenzeno linear sulfonato em lodo anaeróbio disperso. Eng. Sanit. e Ambient. 22, 391–401.

Zhang, M.C., Bennett, G.N., 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria 600–618.

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES E ANÁLISE FILOGENETICA DA BIOMASSA DE REATORES EM BATELADA OPERADOS SOB CONDIÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA

Fabricio Motteran[1]; Maria Bernadete Amâncio Varesche[2]; Pablo Antonio Lara-Martin[3]

1 Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
2 Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.
3 Professor do Departamento de Físico Química da faculdade de Ciências Ambientais e do Mar da Universidade de Cadiz (UCA)

Resumo. *A diferença do inoculo e das condições de operação dos reatores biológicos podem interferir na dinâmica populacional microbiana e na degradação de compostos orgânicos recalcitrantes. Neste estudo verificou-se que a diversidade microbiana de dois inóculos diferentes bem como a condição operacional de reatores em batelada na remoção de poluentes emergentes como surfactantes aniônicos, edulcorantes e fármacos. Foi verificado que os surfactantes aniônicos são removidos sob condições aeróbias, já compostos com peso molecular menores como os edulcorantes e fármacos são removidos sob condições anaeróbias, e a diversidade microbiana é um fator excencial para que ocorra a redução destes compostos no meio líquido*.

Introdução

Nas últimas décadas, tem sido relatado o aumento de novos compostos que são amplamente encontrados no meio aquático e em estações de tratamento de efluentes, principalmente devido à descarga municipal e efluentes industriais sem tratamento prévio. Estas substâncias são caracterizadas como poluentes emergentes e incluem uma ampla variedade de compostos diferentes, bem como metabólitos e produtos de biotransformação (Thomaidis et al., 2012). Farmacêuticos, produtos para cuidados pessoais, desreguladores endócrinos e adoçantes são considerados contaminantes emergentes e são continuamente ou inconscientemente despejados em fontes de água devido à falta de regulamentações específicas, especialmente em países em desenvolvimento (Tijani et al., 2013).

Esses compostos e seus metabólitos podem ser encontrados e detectados em níveis de partes por trilhão (ppt ou $ng.L^{-1}$), mesmo em matrizes ambientais mais complexas, como lodo de reator ou sistemas de tratamento esgotos domésticos e industriais (Thomaidis et al., 2012). Os compostos emergentes são organizados em várias classes como fármacos, drogas ilícitas e produtos para cuidados pessoais (Petrie et al., 2015).

O impacto ambiental desses compostos emergentes ainda é pouco conhecido ou pouco estudado, sendo uma das razões associadas às baixas concentrações encontradas no meio ambiente. No entanto, a presença destes compostos é motivo de preocupação devido ao possível impacto ecológico que pode causar danos ambientais e à saúde humana e outros animais e quando submetidos a exposição prolongada, alguns desses compostos podem atuar como disruptores endócrinos em animais superiores (Tijani et

al., 2013) e, no momento, muitos dos efeitos desses contaminantes ainda são pouco conhecidos.

Atualmente, há algum conhecimento sobre a degradação desses contaminantes emergentes em processos aeróbicos, mas ainda poucos estudos comparando com a degradação no ambiente anaeróbico (Ghattas et al., 2017) bem como a microbiologia envolvida no processo de degradação destes compostos emergentes. Alguns sistemas de tratamento de efluentes são capazes de remover esses compostos xenobióticos (Oulton et al., 2010), no entanto, quando o tratamento é realizado de forma ineficiente, pode gerar um grave problema ambiental. Assim, a investigação de compostos emergentes em ambos os sistemas de tratamento e corpos d'água é um tema de crescente interesse na comunidade científica.

Para entender melhor a degradação de compostos emergentes sob condições biológicas em sistemas de tratamento (aeróbico ou anaeróbico) e no ambiente, é necessária uma abordagem padronizada. Os testes de triagem para avaliar a biodegradabilidade anaeróbica de produtos químicos orgânicos, uma diretriz da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), como os protocolos n° 311, n° 307, n° 308 e n° 303, foram aplicados com sucesso para predizer a biodegradabilidade anaeróbia e aeróbia de compostos orgânicos em meio aquoso, solo, sedimentos e lodo pela medição da produção de gases e outros compostos solúveis (OECD, 2006).

O lodo presente em reatores biológicos e decantadores pode atuar como um meio de concentração para alguns compostos químicos durante o processo de tratamento de águas residuais e assim também selecionar os microrganismos mais adaptados para a degradação de compostos tóxicos emergentes. Dependendo da região ou quantidade de efluente a ser tratado, o restante do lodo é descartado, sendo aplicado diretamente em terras agrícolas sem análise de contaminantes, principalmente poluentes emergentes (Petrie et al., 2015).

Muitos destes contaminantes são adsorvidos no lodo de decantadores primários e secundários que são então conduzidos a digestores aeróbicos (lodo ativado) e biorreatores anaeróbios (digestores de lodo, reatores UASB, etc.) dos sistemas de tratamento. Em que eles podem ser biodegradados aerobiamente ou anaerobiamente e até mesmo causar inibição da microbiota, resultando em uma perturbação de todo o processo de remoção de matéria orgânica (Gartiser et al., 2007).

A degradação biológica de compostos tóxicos emergentes é um dos fatores chaves da eficiência dos processos de tratamento e demoção destes compostos. Com o estudo dos microrganismos envolvidos nos processos de biorremediação é possível selecionar a microbiota com maior potencial de degradação destes compostos e também inferir as principais rotas de degradação destes xenebioticos (Wang e Wang, 2018). Como muitos destes compostos são sintetizados artificialmente e não possuem rotas específicas de metanolização a identificação microbiana faz-se necessária para se ter o melhor entendimento dos processos de biodegradação.

Este estudo avaliou a comunidade microbiana de reatores em bateladas operados sob condição aeróbia e anaeróbia inoculados com diferentes lodos utilizados na degradação de 9 compostos emergentes sendo estes 2 surfactantes anaionicos: Linear alquilbenseno sulfonado (LAS) e *Secondary Alkyl Sulfonate* (SAS) e seus respectivos

homólogos, 4 edulcorantes: Acesulfeme, Sucralose, Aspartame e Ciclamato e 3 fármacos: Ibuprofeno, Diclofenaco e Naproxeno utilizando UPLC-MS (TOF).

Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido em reatores em batelada em duplicata com 310 mL de volume total sendo 10 mL de volume reacional e 210 mL de headspace, operados em condições anaeróbias e aeróbias a 30°C seguindo os protocolos da OECD n°311. Dois inóculos foram utilizados como fonte microbiana dos reatores. Cada lodo foi operado sob a presença e ausência de oxigênio. O lodo proveniente do Brasil foi oriundo de reator UASB no tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves (Avícola Dacar, Tietê, SP), já o lodo da Espanha foi proveniente de reatores UASB utilizados no tratamento de água residuária domestica do município de Chiclana de La Frontera da província de Cádiz.

Os reatores foram inoculados com 1 g de lodo (0,01 $g.L^{-1}$). As soluções de sais e de elementos traço foram preparados de acordo com o protocolo da OECD n°311 (Tabela 1 e 2), 1 mL da solução redutora de $NaS.9H_2O$ (1g.100 mL^{-1}) foi adicionado aos reatores anaeróbios a fim de promover a anaerobiose, 100 µL de resazunina foi acidionado em ambos condições reacionais como indicador de potencial redox. Foram adicionados em cada reator a concentração nominal de 1 $mg.L^{-1}$ dos contaminantes emergentes Ibuprofeno, Diclofenaco, Naproxeno, Sacarina, Acesulfeno, Sucralose, Aspartato, Ciclamato e 2 $mg.L^{-1}$ dos surfactantes aniônicos Linear Aquilbenzeno Sulfonado (LAS) e *Secondary Alkyl Sulfonate* (SAS).

Tabela 1: Composição da solução de sais

Formula molecular	Concentração ($g.L^{-1}$)	Composto
KH_2PO_4	0,27	Fosfato monopotássico anidro
$NaHPO_4*12H_2O$	1,12	Hidrogenofosfato dissódico
NH_4Cl	0,53	Cloreto de amônio
$CaCl_2*2H_2O$	0,075	Cloreto de cálcio di-hidratado
$MgCl_2*6H_2O$	0,1	Cloreto de magnésio hexa-hidratado
$FeCl_2*4H_2O$	0,02	Cloreto de ferro II tetrahidratado

Tabela 2: Composição da solução de elementos traço (10 $mL.L^{-1}$)

Formula molecular	Concentração ($g.L^{-1}$)	Composto
$MnCl_2*4H_2O$	0,05	Cloreto de manganês tetrahidratado
H_3BO_3	0,005	Ácido bórico
ZnCl	0,005	Cloreto de zinco
$CuCl_2$	0,003	Cloreto de Cupper
$NaMoO_4*2H_2O$	0,001	Dihidrato de molibdato dissódico
$CoCl_2*6H_2O$	0,1	Cloreto de cobalto hexa-hidratado
$NiCl_2*6H_2O$	0,01	Hexaidrato de cloreto de níquel
$NaSeO_3$	0,005	Selenito dissódico

Os contaminantes emergentes foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (UPLC-Q-ToF-MS). Todos os reagentes utilizados nestas analises foram de grau HPLC. Foram utilizadas mini-colunas de extração em fase líquida (SPE) de cartuchos de adsorção de fase reversa Oasis *Hydrophilic-Lipophilic-Balanced* (HLB) de 500 mg (Waters Corp., Milford, MA), a fim de concentrar os analitos para analises em UPLC-Q-ToF-MS.

As diversidades filogenéticas da biomassa dos reatores em batelada aeróbio e anaeróbios foram analisada utilizando a plataforma de sequenciamento de próxima geração (NGS) Illumina MiSeq (Si et al., 2015). Os primers 515F (5′-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGG-3 and) e 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3 ′) para amplificar as regiões V4 do gene RNA ribossomal 16S por GeneAmp PCR System (ABI company, EUA). Os amplicons foram purificados e em seguida, o produto de PCR foi usado para preparar a biblioteca de DNA do sequenciamento de MiSeq Illumina. O sequenciamento foi realizado utilizando o software online MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EUA), seguindo as instruções do fabricante MiSeq. O processamento de dados foi realizado usando o pipeline de DNA da MR (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EUA). As sequências foram reunidas, removendo os *barcodes*, sequências nores que 150 pares de bases e sequências com bases ambíguas. As unidades taxonômicas operacionais (OTU) classificadas como quimeras foram removidas e os *clusters* foram definidos com 97% de similaridade. As OTU finais foram classificadas taxonomicamente usando o Ribosomal Database Project (RDP) e National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http: // rdp. cme.msu.edu, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Resultados e Discussão

Os reatores em batelada sob condição aeróbia foram operados por 240 horas (10 dias), nesse período foram evidenciadas a degradação de 86,2% do surfactante aniônico LAS para a concentração inicial de 1,2 $mg.L^{-1}$ para o lodo proveniente do Brasil (BRA) e 74,3% de eficiência de remoção para o lodo proveniente da Espanha (ESP) cuja concentração inicial foi de 0,6 $mg.L^{-1}$.

No estudo do LAS foi verificada também a remoção dos homólogos C_{10}, C_{11}, C_{12} e C_{13} com eficiências de 83,2%, 93,4%, 77,2% e 67,2% para o inóculo BRA e 72,8%, 85,4%, 55,2% e 43,3% para o inóculo SPN, respectivamente As concentrações iniciais de de cada homologo foram de 0,4 $mg.L^{-1}$, 0,5 $mg.L^{-1}$, 0,17 $mg.L^{-1}$ e 0,06 $mg.L^{-1}$ para os reatores operados com inoculo BRA e 0,2 $mg.L^{-1}$, 0,2 $mg.L^{-1}$, 0,07 $mg.L^{-1}$ e 0,03 $mg.L^{-1}$ para os reatores com inóculo SPN, respectivamente (Tabela 3).

Para o surfactante SAS foi evidenciada a eficiência de remoção de 88,7% e 78,1% para a concentração inicias de 1,8 $mg.L^{-1}$ e 0,8 $mg.L^{-1}$ nos reatores aeróbios inoculados com lodo BRA e SPN, respectivamente As eficiências de remoção de para os homólogos C_{14}, C_{15}, C_{16} e C_{17} foram de 93,3%, 93,1%, 90,1%, e 16%, respectivamente para o inoculo BRA e 88,1%, 85,3% e 72,4% para os reatores com inóculos SPN, nestes últimos reatores não fi evidenciada a remoção do homologo C14 do SAS. As concentrações iniciais para os homólogos C_{14}, C_{15}, C_{16} e C_{17} foram de 0,9 mg.L-1, 0,6 mg.L-1, 0,2 mg.L-1 e 0,1 mg.L-1 para os reatores BRA e de 0,4 mg.L-1, 0,2 $mg.L^{-1}$, 0,07 $mg.L^{-1}$ e 0,06 $mg.L^{-1}$ para os reatores SPN (Tabela 3).

Os edulcorantes não sofreram degradação pelos processos biológicos aeróbios tano nos reatores inoculados com lodo BRA quanto com lodo SPN. A concentração inicial para estes composto foram de 1,8 $mg.L^{-1}$ e 1,7 $mg.L^{-1}$ para o Acesulfeme, 0,7 $mg.L^{-1}$ e 0,4 $mg.L^{-1}$ para a Sucralose, 0,1 $mg.L^{-1}$ e 0,1 $mg.L^{-1}$ para o Aspartame e 0,08 $mg.L^{-1}$ e 0,09 $mg.L^{-1}$ para o Ciclamato para os reatores BRA e SPN, respectivamente. Foi notado que a concentração final este superior a inicial conforme pode ser verificado na Tabela 3. Este fato se deve ao processo de adsorção destes compostos pode terem grande afinidade com a matéria orgânica (lodo proveniente do inóculo dos reatores).

Da mesmo modo dentro da categoria de fármacos tanto o diclofenaco (0,22 $mg.L^{-1}$ e 0,08 $mg.L^{-1}$) quanto o Naproxeno (0,42 $mg.L^{-1}$ e 0,15 $mg.L^{-1}$) não foram evidencias remoções nos reatores sobre condição aeróbia para os reatores BRA e SPN, respectivamente. Apenas o Ibuprofeno foi evidenciada a remoção de 14,8% e 53,3% de eficiência de remoção cujas concentração iniciais foram de 0,47 $mg.L^{-1}$ e 0,3 $mg.L^{-1}$ (Tabela 3). Nos reatores em bateladas sob condição anaeróbia foram operados por 72 dias, os quais não foram evidenciados a remoção biológica do LAS e SAS bem como seus homólogos, tanto quando inoculados com lodo BRA quanto SPN. Entretanto foram evidenciadas eficiências de remoção para a todos os edulcorantes e fármacos nos reatores inoculados com lodo SPN, demonstrando que neste inóculo havia uma biomassa mais adaptada a estes compostos quando comparado como o inoculo BRA. Foram encontradas eficiências de remoção de 12,3%, 25,7%, 78,9% e 30,8% para o Acesulfame (1,9 $mg.L^{-1}$), Sucralose (1,1 $mg.L^{-1}$), Aspartame (0,5 $mg.L^{-1}$) e Ciclamato (0,1 $mg.L^{-1}$) para os reatores SPN, já para os reatores BRA foram encontrados eficiências de remoção apenas para a Sucralose (18,5% para 1,2 $mg.L^{-1}$) e Aspartame (76,1% para 0,4 $mg.L^{-1}$) (Tabela XXX).

Dentre os fármacos foram encontradas as eficiências de remoção de 30,7% para o Ibuprofeno (0,6 $mg.L^{-1}$), 42,5% para o Diclofenaco (0,3 $mg.L^{-1}$) e 55,5% para o Naproxeno (0,26 $mg.L^{-1}$) nos reatores inoculados com lodo SPN. Nos reatores com lodo BRA foram encontradas eficiências de remoção de 10% para o Diclofenaco (0,33 m/L) e 74% para o Naproxeno (0,4 $mg.L^{-1}$), neste reatores não foi evidenciada a remoção do Ibuprofeno (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração inicial, final e eficiência de remoção dos poluentes emergentes sob as condições aeróbias e anaeróbia dos reatores com diferentes inóculos

Compostos (Poluentes Emergentes)	Reatores Aeróbios					
	Inóculo BRA			Inóculo SPN		
	Inicial ($mg.L^{-1}$)	Final ($mg.L^{-1}$)	Eficência (%)	Inicial ($mg.L^{-1}$)	Final ($mg.L^{-1}$)	Eficiência (%)
LAS_C_{10}	0,441	0,074	83,22	0,25	0,068	72,80
LAS_C_{11}	0,545	0,036	93,39	0,247	0,036	85,43
LAS_C_{12}	0,17	0,038	77,65	0,076	0,034	55,26
LAS_C_{13}	0,061	0,02	67,21	0,03	0,017	43,33
LAS total	1,217	0,168	86,20	0,603	0,155	74,30
SAS_C_{14}	0,9	0,06	93,33	0,462	0,055	88,10
SAS_C_{15}	0,613	0,042	93,15	0,245	0,036	85,31
SAS_C_{16}	0,232	0,023	90,09	0,069	0,019	72,46
SAS_C_{17}	0,1	0,084	16,00	0,06	0,073	-21,67
SAS total	1,845	0,209	88,67	0,836	0,183	78,11

Acesulfeme	1,802	3,62	-100,89	1,731	2,994	-72,96
Sucralose	0,764	1,81	-136,91	0,421	0,731	-73,63
Aspartame	0,108	0,172	-59,26	0,108	0,155	-43,52
Ciclamato	0,085	0,134	-57,65	0,092	0,135	-46,74
Ibuprofeno	0,47	0,4	14,89	0,296	0,138	53,38
Diclofenaco	0,225	0,28	-24,44	0,084	0,109	-29,76
Naproxeno	0,427	0,669	-56,67	0,151	0,213	-41,06

Compostos (Poluentes Emergentes)	Reatores Anaeróbios					
	Inóculo BRA			Inóculo SPN		
	Inicial ($mg.L^{-1}$)	Final ($mg.L^{-1}$)	Eficência (%)	Inicial ($mg.L^{-1}$)	Final ($mg.L^{-1}$)	Eficiência (%)
LAS_C_{10}	0,043	0,224	-420,93	0,454	0,869	-91,41
LAS_C_{11}	0,021	0,253	-1104,76	0,748	2,139	-185,96
LAS_C_{12}	0,105	0,15	-42,86	0,283	1,145	-304,59
LAS_C_{13}	0,023	0,034	-47,83	0,107	0,579	-441,12
LAS total	0,192	0,661	-244,27	1,592	4,732	-197,24
SAS_C_{14}	0,74	1,001	-35,27	0,541	0,756	-39,74
SAS_C_{15}	0,435	0,607	-39,54	0,244	0,454	-86,07
SAS_C_{16}	0,131	0,17	-29,77	0,06	0,144	-140,00
SAS_C_{17}	0,068	0,07	-2,94	0,063	0,078	-23,81
SAS total	1,374	1,848	-34,50	0,908	1,432	-57,71
Acesulfeme	1,706	1,825	-6,98	1,961	1,72	12,29
Sucralose	1,196	0,975	18,48	1,126	0,837	25,67
Aspartame	0,418	0,1	76,08	0,504	0,106	78,97
Ciclamato	0,083	0,085	-2,41	0,107	0,074	30,84
Ibuprofeno	0,56	0,648	-15,71	0,631	0,437	30,74
Diclofenaco	0,337	0,303	10,09	0,28	0,161	42,50
Naproxeno	0,397	0,103	74,06	0,261	0,116	55,56

BRA – Inóculo brasileiro proveniente de reator UASB no tratamento de água residuária do abatedouro de aves. SPN – Inóculo espanhol proveniente de reator UASB no tratamento de esgoto doméstico na cidade de Chicla de la Frontera.

Por meio da analises de sequenciamento genético puderam ser identificados os principais grupos microbianos envolvidos nos processos de degradação biológica dos compostos emergentes, tanto nos reatores operados em batelada aeróbia e anaeróbia, tanto do lodo brasileiro (BRA), quando lodo espanhol (SPN). Foram identificadas 1129 e 1244 espécies para os reatores aeróbios inoculados com SPN e BRA, respectivamente e para os reatores anaeróbios foram identificadas 1053 e 1179 espécies (Tabela 4). No sequenciamento por *metabarcoding* foram cobertos cerca de 94,5±0,3% com leituras médias de 73.528±6,4 bases. O comprimento médio de cada leitura foi de 411±2,5 pares de bases (pb).

Foi verificado maior diversidade microbiana nos reatores inoculados com lodo brasileiro (BRA), quando comparado com os reatores inoculados com lodo espanhol (SPN). Nota-se também que houve uma redução da diversidade quando se compara a biomassa dos reatores com seus respectivos inóculos, como o caso so inoculo SPN que foi de 6,76 passando para 5,88 e 6,2 nos reatores aeróbios e anaeróbios, respectivamente e para o inoculo BRA que foi de 6,5 passou para 5,7 e 5,5 para os reatores aeróbios e anaeróbios, respectivamente. No que se refere ao índice de Simpson nota-se que nos

reatores inoculados com lodo SPN há a dominância de determinados grupos microbianos quando comparados com os reatores BRA, estando em consonância com os dados de maior diversidade e riqueza (Chao 1) do lodo BRA (Tabela 4).

Tabela 4: Índices de diversidade dos inóculos e biomassa dos reatores aeróbios anaeróbios do lodo espanhol (SPN) e brasileiro (BRA).

Amostra	Número de espécies	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Chao1
Inóculo SPN	953	6.76	0.97	978.8
Reatores Aeróbios SPN	1129	5.887	0.908	1250
Reatores Anaeróbios SPN	1053	6.261	0.929	1153.4
Inóculo BRA	1244	6.507	0.946	1381.3
Reatores Aeróbios BRA	1179	5.764	0.878	1327.4
Reatores Anaeróbios SPN	1044	5.561	0.899	1202.7

Os principais gêneros microbianos encontrados nos reatores sob condição aeróbia inoculados com lodo SPN foram: *Proteiniphilum* (17,9%), *Paraclostridium* (3,3%), *Arcobacter* (2,5%), *Proteiniclasticum* (2,5%), *Acinetobacter* (2,09%), *Roseomonas* (1,1%), *Aquamicrobium* (1,08%), *Moheibacter* (1,05%), *Leucobacter* (1%) e *Synergistes* (0,9%). Mesmo os reatores sendo operados em condições aeróbias puderam ser identificados gêneros microbianos aeróbios como é o caso da *Proteiniclasticum, Paraclostridium, Methanosaeta* (23,5%), *Methanobacterium* (1,1%) etc, no qual a maioria deste foram encontrados em reatores UASB, onde o inóculo foi retirado.

Os gêneros pertencentes ao grupo *Paraclostridium* já foram isolados em sedimentos marinhos. Estes microrganismos são capazes de degradar o benzoato e podem ser resistentes a diversos antibióticos como kanamicina, fosfomicina, gentaminica, clorofenicol, penicilina, dentre outros o que pode ter auxiliado a prevalência deste genero aos reatores aeróbios com os compostos emergentes deste estudo (Sasi Jyothsna et al., 2016). O gênero *Acinetobacter* pode ter contribuído para a degradação de compostos aromáticos como benzoatos e fenóis (Mazzoli et al., 2007). Foram encontrados diversos gêneros como metabolismo aeróbio dentre os quais os microrganismos pertencentes aos gêneros *Roseomonas, Aquamicrobium, Moheibacter*, etc demonstrando que as condições de aeração do reator auxiliaram no crescimento destes microrganismos. E de certa forma o metabolismo aeróbio deste microrganismo contribuíram para a remoção dos compostos emergentes, principalmente do LAS e SAS.

Já nos reatores inoculados com o lodo BRA os gêneros identificados como maior abundancia relativa foram *Proteiniclasticum* (33,4%), *Paraclostridium* (6,3%), *Geobacter* (5,01%), *Desulfobulbus* (3,1%), *Microbacter* (2,5%), *Proteiniphilum* (2,1%), *Proteocatella* (1,3%), *Novosphingobium* (0,8%) e *Comamonas* (0,74%). Microrganismos proteolíticos como *Proteiniclasticum*, *Proteocatella* e *Proteiniphilum* também foram encontrados nos reatores SPN, demostrando que mesmo sendo anaeróbios estes microganimos foram favorecidos nos reatores com aeração, possivelmente devido ao produto do metabolismo de outros microrganismos. Outros

microrganismos com metabolismo anaeróbio também foram encontrados como abundancia relativa elevada como as *Microbacter*, *Geobacter, Desulfobulbus*, etc. O fato de se ter elevada quantidade de microrganismos com metabolismo anaeróbio nos reatores aeróbios pode ter influenciado diretamente na eficiência de remoção dos compostos emergentes, sendo assim necessária uma maior adaptação da biomassa nas condições de aeração para assim aumentar a eficiência de degradação principalmente dos fármacos e edulcorantes.

Nos reatores inoculados com lodo SPN, por terem contato com água marinhas foram encontradas elevadas abundancia relativa do *Cianobacteria* (23%) mesmo sob condição anaeróbia. Outros microrganismos identificados nos reatores em batelada operados sob condição anaeróbia foram: *Serratia* (6.8%), *Proteiniclasticum* (3.2%), *Paraclostridium* (3.1%), *Desulfobulbus* (2.8%), *Sulfurovum* (2.06%), *Proteiniphilum* (1.9%), *Geobacter* (1.7%), *Azospirillum* (0.9%), *Delftia* (0.92%) e *Proteocatella* (0.8%). Microganismos do gênero *Serratia*, *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Delftia*, etc são capazes de degradar compostos aromáticos como hicrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHA), surfactantes como o LAS, compostos fenólicos etc, tendo assim grande importância na degradação dos compostos emergentes sob a condição anaeróbia (Alegbeleye et al., 2017; Motteran et al., 2018; Vásquez-Piñeros et al., 2018).

Nos reatores em bateladas operados sob condição anaeróbia inoculados com lodo BRA foram encontrados os gêneros microbianos *Clostridium* (5.2%), *Syntrophobacter* (3.5%), *Paraclostridium* (3.1%), *Draconibacterium* (2.5%), *Proteiniclasticum* (1.5%), *Azospira* (0.88%), *Clostridium* (0.76%) e *Lentimicrobium* (0.62%) como a abundancia relativa mais elevadas. Neste reatores também foram identificadas archaeas metanogênicas como expressiva abundância relativa *Methanosaeta* (28.5%), *Methanolinea* (0.93%), *Methanobacterium* (0.87%), *Methanobacterium* (0.84%), *Methanoregula* (0.74%). Os gêneros como *Clostridium* e *Syntrophobacter* são muito versáteis os quais podem ter auxiliado na degradação dos compostos emergentes e seus subprodutos metabolitos como o acetato, formiato e H_2 podem ter contribuído para a presença significativa das archeas metanogênicas.

Na Figura 1 é possível verificar a árvore filogenética e o *heatmap* com os principais gêneros encontrados em cada reator em batelada destacando os grupos com maior abundancia relativa.

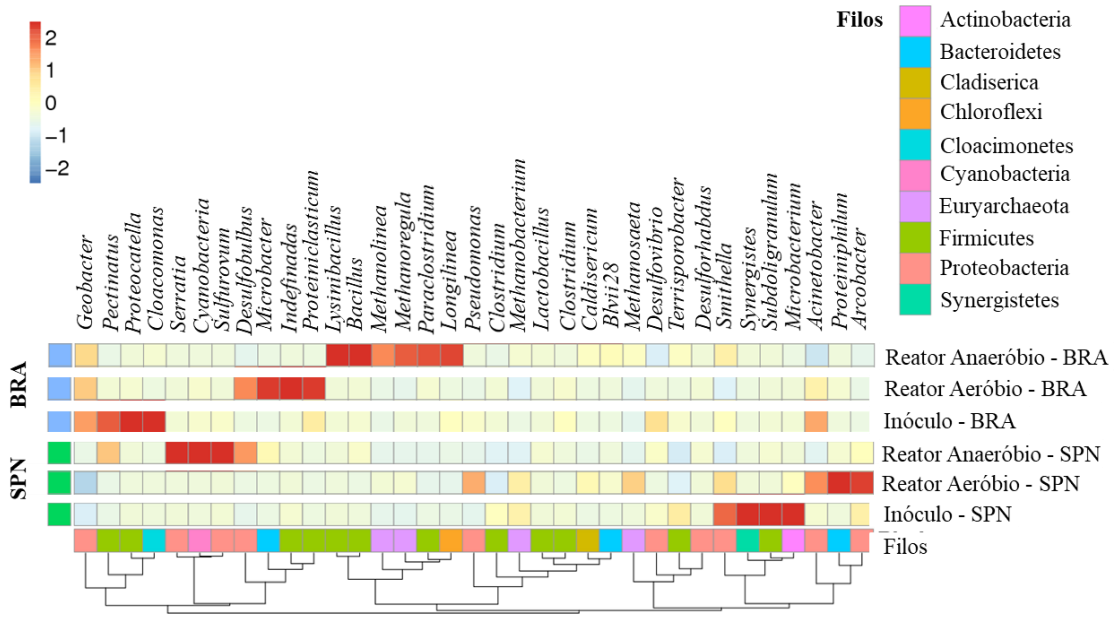


Figura1: Principais gêneros microbianos encontrados nos reatores em batelada com inóculos brasileiro (BRA) e espanhol (SPN), operados sob condição aeróbia e anaeróbia.

Conclusão

Os compostos emergentes possuem diferentes formas de degradação quando submetidos a biomassa distintas e diferentes condições de operação dos reatores em batelada. Não foi evidenciada a degradação dos surfactantes aniônicos LAS e SAS em condição anaeróbia no período de 72 dias, entretanto sob condição aeróbia estes surfactantes tiveram a remoção tanto quando submetidos ao inoculo brasileiro quanto espanhol alcançando remoções de 86,2% e 74,3%. Por outro lado os edulcorantes como o Acesulfeme, Sucralose, Aspartame e Ciclamato não foram removidos na condição aeróbia, já nos reatores anaeróbios foram verificada a diminuição da sua concentração no meio liquido nos reatores com inoculo SPN, o que leva a crer os microrganismos presente neste lodo são mais eficiente para a remoção destes compostos quando comparado com o inoculo BRA. Dentre os fármacos somente o Ibuprofeno obteve remoção na condição aeróbia (inoculo SPN), entretanto nos reatores anaeróbios os fármacos tiveram expressiva remoção principalmente no inoculo SPN, reafirmando assim que o lodo proveniente da Espanha está mais adaptado para a remoção de compostos recalcitrantes em condições anaeróbias. Dentre os principais microrganismos encontrados neste inoculo estão *Proteiniphilum, Paraclostridium, Arcobacter, Proteiniclasticum, Acinetobacter, Roseomonas, Aquamicrobium, Moheibacter, Leucobacter, Synergistes, Cianobacteria, Serratia* e *Desulfobulbus*.

Referências Bibliográficas

Alegbeleye, O.O., Opeolu, B.O., Jackson, V., 2017. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers,

Western Cape, South Africa. Brazilian J. Microbiol. 48, 314–325.
Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R., Kümmerer, K., 2007. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. Chemosphere 66, 1839–1848.
Ghattas, A.-K., Fischer, F., Wick, A., Ternes, T.A., 2017. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. Water Res. 116, 268–295.
Mazzoli, R., Pessione, E., Giuffrida, M.G., Fattori, P., Barello, C., Giunta, C., Lindley, N.D., 2007. Degradation of aromatic compounds by Acinetobacter radioresistens S13: growth characteristics on single substrates and mixtures. Arch. Microbiol. 188, 55–68.
Motteran, F., Nadai, B.M., Braga, J.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Metabolic routes involved in the removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) employing linear alcohol ethoxylated and ethanol as co-substrates in enlarged scale fluidized bed reactor. Sci. Total Environ. 640–641, 1411–1423.
OECD, 2006. Test No. 311: Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge: by Measurement of Gas Production, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. OECD Publishing, PAris.
Oulton, R.L., Kohn, T., Cwiertny, D.M., 2010. Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: A survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. J. Environ. Monit. 12, 1956.
Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. Water Res. 72, 3–27.
Sasi Jyothsna, T.S., Tushar, L., Sasikala, C., Ramana, C. V., 2016. Paraclostridium benzoelyticum gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment and reclassification of Clostridium bifermentans as Paraclostridium bifermentans comb. nov. Proposal of a new genus Paeniclostridium gen. nov. to accommodate Clostridium sord. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 1268–1274.
Thomaidis, N.S., Asimakopoulos, A.G., Blettsou, A.A., 2012. Emerging Contaminants: A Tutorial Mini-Review. Glob. NEST J. 14, 72–79.
Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Petrik, L.F., 2013. A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections. Water, Air, Soil Pollut. 224, 1770.
Vásquez-Piñeros, M.A., Martínez-Lavanchy, P.M., Jehmlich, N., Pieper, D.H., Rincón, C.A., Harms, H., Junca, H., Heipieper, H.J., 2018. Delftia sp. LCW, a strain isolated from a constructed wetland shows novel properties for dimethylphenol isomers degradation. BMC Microbiol. 18, 108. doi:10.1186/s12866-018-1255-z
Wang, S., Wang, J., 2018. Degradation of emerging contaminants by acclimated activated sludge. Environ. Technol. 39, 1985–1993.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA NO ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO

Fabricio Motteran [1]; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic [2]

[1] Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Este projeto de pesquisa visa o desenvolvimento de métodos analíticos cromatográficos em cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) para o monitoramento da degradação do corante azo Direct Black 22 e identificação dos metabólitos gerados em reatores biológicos em batelada e em sistema de fluxo continuo sequencial de reatores, operados sob condição anaeróbia e aeróbia. A identificação dos principais grupos microbianos envolvidos nos processos de remoção do composto tóxico recalcitrante complementa os objetivos, tornando possível mapear possíveis rotas metabólicas de degradação do corante azo Direct Black 22. Os resultados esperados para pesquisa pretendem melhorar e adaptar técnicas analíticas, identificar os principais subprodutos gerados nos processos anaeróbios e aeróbios envolvidos, bem como preencher as lacunas sobre a microbiota envolvida no processo de degradação, visando contribuir para proposição de sistemas de tratamento de águas e efluentes contaminados com esse corante têxtil.*

Introdução

A descarga de efluentes da indústria têxtil, além de ser um problema estético, também pode limitar a fotossíntese em plantas aquáticas pela obstrução da passagem da luz solar, alterando a autodepuração dos corpos d'água devido à estabilidade química e fotolítica dos corantes principalmente do tipo azo, o que os tornam altamente recalcitrantes em ambientes naturais (Cervantes e Santos, 2011). A composição do efluente têxtil é complexa, rica em sais inorgânicos, com elevada carga orgânica, e de alto teor de corantes, podendo interferir no desempenho de sistemas de tratamento.

Atualmente, existem várias tecnologias para o tratamento dos efluentes têxteis, destacando-se os processos físico-químicos, como a coagulação/floculação, a oxidação e a adsorção. Esse tipo de processo remove eficientemente matéria orgânica e cor, entretanto gera resíduos tóxicos, de difícil disposição e altos custos de implementação, operação e manutenção (Isik e Sponza, 2004). Dessa forma, uma opção plausível é o emprego de processos biológicos para a remoção destes compostos em efluentes contaminados, uma vez que possibilitam sua conversão em produtos inócuos.

O tratamento biológico é uma alternativa economicamente viável, que apresenta o potencial de remoção de cor e matéria orgânica. Considerando a importância do conhecimento das propriedades dos corantes sintéticos, relacionados ao seu impacto nos processos industriais, a saúde humana e ao meio ambiente, esta pesquisa visa estudar a degradação corante azo *Direct Black* 22, sob condições anaeróbia e aeróbia sequenciais, acompanhando a formação de metabólitos em reatores com alimentação em batelada. Para isso a determinação, monitoramento e identificação do corante azo e de seus metabólitos (ácido sulfanilico e aminas aromáticas) serão realizados por cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas (LC-MS e GC-MS). Análises e caracterização genômica dos microrganismos envolvidos no processo de degradação, a fim de mapear os grupos microbianos com maior relevância na decomposição do *Direct Black* 22, serão realizadas para complementar o conhecimento sobre o tema.

O corante tetra-azo *Direct Black* 22, cuja fórmula molecular é $C_{44}H_{32}N_{13}Na_3O_{11}S_3$, possui o peso molecular de 1083,97 g/mol, e pode ser classificado como um corante *direto* e reativo, sendo amplamente utilizado nas indústrias têxteis e presente nos efluentes das lavanderias comerciais (Figura 1).

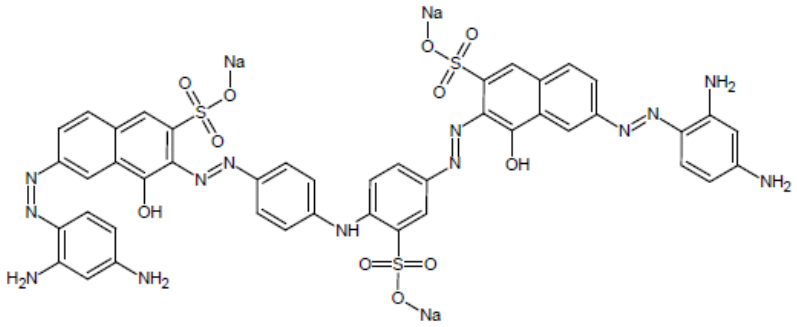


Figura 1: Estrutura química do corante *Direct Black* 22

Efluentes contendo corantes podem ser degradados por meio de processos anaeróbios e aeróbios combinados, o primeiro acarretando a quebra da ligação azo, com a remoção de cor e o segundo possibilitando a mineralização (Braúna et al., 2009; Santos et al., 2005). Doadores de elétrons são necessários para que os processos anaeróbios de conversão de corantes ocorram, quer em temperaturas mesofílicas e termofílicas. A adaptação do consórcio microbiano aos diferentes tipos de substrato fornecidos ao sistema, contribuem para aumentar os caminhos de degradação dos compostos complexos e recalcitrantes (Gonçalves et al., 2009). A redução de uma ligação azo –N=N– gera as aminas aromáticas, incolores e nocivas à saúde humana e ao meio ambiente, que demandam processo de degradação (van der Zee e Villaverde 2005), mais facilmente observado em ambientes aeróbios

Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para a determinação de corantes em matrizes complexas como águas residuárias, esgotos sanitários e em corpos hídricos de maneira geral. Métodos que envolvem cromatografia (Prado et al., 2006), espectrometria de massas (Harada et al., 1991), voltametria (Dominguez et al., 1990), eletroforese capilar (Prado et al., 2006) e espectrofotometria (Llamas et al., 2009) têm tido alta repercussão na determinação de corantes azo, principalmente.

A espectrometria de massas pode ser utilizada acoplada tanto à cromatografia líquida quanto à cromatografia gasosa para se observar e identificar os corantes na matriz, e auxiliar na quantificação destes compostos alvos e obter de maneira rápida e prática tanto concentração do corante, quanto os possíveis produtos de degradação dos corantes como as aminas aromáticas e os ácidos sulfônicos (Santos et al., 2010).

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para identificar e/ou quantificar as aminas aromáticas (subprodutos de transformação dos corantes azo), sendo as mais empregadas as técnicas de injeção em fluxo acoplada a voltametria com reação de bromação e diazotação (Fogg et al., 1982) técnicas em HPLC (Narang et al., 1982), LC-MS (Sakai et al., 2002) e GC-MS (Moldovan e Bayona, 2000), epectofotometria e eletroforese capilar (Asthana et al., 2000; Cavallaro et al., 1995).

Portanto, a implementação de técnicas analíticas mais apuradas para o monitoramento tanto do composto alvo (corante azo *Direct Black* 22) e de seus subprodutos de degradação em processos biológicos de tratamento aeróbio e anaeróbio auxiliará o grupo de pesquisa do LPB na elucidação de diversas lacunas que diz respeito a remoção destes compostos nas águas residuárias de indústria de tingimento de tecidos, consideradas matrizes complexas.

Muitos estudos têm focado em encontrar espécies microbianas capazes de degradar corantes de maneira geral e, principalmente, os com características azo. Dentre estes estudos, destaca-se o estudo de Saha et al. (2017) que isolaram bactérias de efluentes têxteis responsáveis pela redução de cor, tendo microrganismos da espécie *Alcaligenes faecalis* como a mais significativa. Estes autores reportam também que a atividades de descoloração é dependente da temperatura, pH, concentração inicial do corante e quantidade de co-substrato presente no meio, que atua como doador de elétrons para quebra da ligação azo, importante passo para degradação do corante. Coughlin et al. (1997) encontraram bactérias anaeróbias pertencentes ao gênero *Sphingomonas* com metabolismo aeróbio capazes de degrada corantes azo, e classificaram este microrganismo como sendo "azo dye-degrading bacterium". Arora et al. (2007), Asad et al. (2007) e Tony et al. (2009) isolaram e identificaram microrganismos como *Bacillus firmus*, *B. vallismortis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *Halomonas* sp, que são bactérias aeróbias com potenciais na degradação de corantes azo. Bactérias descolorantes, como *Pseudomonas aeruginosa* (Bhatt et al., 2005) e *Comamonas* sp. foram isolados de locais contaminados por resíduos têxteis (Jadhav et al., 2008) e espécies pertencentes aos gêneros *Eubacterium*, *Butyrivibrio* e *Bacteroides* foram identificados como capazes de degradar corantes em águas residuárias.

Material e Métodos

Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP). As atividades foram programadas para duração de dois anos (24 meses), com atividades independentes no primeiro ano, permitindo gerar resultados importantes. A primeira fase (Fase I) será dedicada ao desenvolvimento de métodos analíticos cromatográficos em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Nessa fase também serão operados reatores em batelada, sob condições anaeróbias e aeróbias, que serão monitorados com respeito aos compostos alvos (corante azo *Direct Black* 22 e às aminas aromáticas, nos frascos reatores anaeróbios e aeróbios, e à formação de metabólitos secundários provenientes dos processos de degradação em estudo. Na segunda fase experimental (Fase II), já com os métodos analíticos definidos e avaliação do comportamento do corante sob condições anaeróbias e aeróbias em batelada, o corante azo *Direct Black* 22 será aplicado em uma água residuária sintética ao sistema de reatores anaeróbio, seguido de aeróbio, ambos com biomassa imobilizada, em escala de bancada e fluxo contínuo. Na Fase III, os inóculos anaeróbio e aeróbio serão colocados em um mesmo reator, submetido à aeração intermitente para avaliação do processo de degradação do corante DB 22. Com os dados obtidos será possível conhecer a cinética de degradação, formação de metabólitos, processo de adsorção em ambas as condições, anaeróbia e aeróbia, bem como comparar os desempenhos das configurações propostas.

Referências Bibliográficas

Altınöz, S., Toptan, S., 2002. Determination of Tartrazine and Ponceau-4R in Various Food Samples by Vierordt's Method and Ratio Spectra First-Order Derivative UV Spectrophotometry. J. Food Compos. Anal. 15, 667–683.

Arora, S., Saini, H.S., Singh, K., 2007. Decolorisation optimisation of a monoazo disperse dye with Bacillus firmus. Identification of a degradation product. Color.

Technol. 123, 184–190. doi:10.1111/j.1478-4408.2007.00083.x

Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Sarbolouki, M.N., Dastgheib, S.M.M., 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. Bioresour. Technol. 98, 2082–2088.

Asthana, A., Bose, D., Durgbanshi, A., Sanghi, S.., Kok, W.T., 2000. Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection. J. Chromatogr. A 895, 197–203. doi:10.1016/S0021-9673(00)00522-7

Bhatt, N., Patel, K.C., Keharia, H., Madamwar, D., 2005. Decolorization of diazo-dye Reactive Blue 172 byPseudomonas aeruginosa NBAR12. J. Basic Microbiol. 45, 407–418.

Braúna, C.H. da C., Mota, S., Santos, A.B. dos, 2009. Descoloração redutiva do corante azo RR2 na ausência e presença de mediador redox e aceptor de elétrons nitrato. Eng. Sanit. e Ambient. 14, 275–284. doi:10.1590/S1413-41522009000200015

Cavallaro, A., Piangerelli, V., Nerini, F., Cavalli, S., Reschiotto, C., 1995. Selective determination of aromatic amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction. J. Chromatogr. A 709, 361–366.

Cervantes, F.J., Santos, A.B. dos, 2011. Reduction of azo dyes by anaerobic bacteria: microbiological and biochemical aspects. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 10, 125–137.

Coughlin, M.F., Kinkle, B.K., Tepper, A., Bishop, P.L., 1997. Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. Water Sci. Technol. 36, 215–220.

Dominguez, F.B., Diego, F.G., Mendez, J.H., 1990. Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography. Talanta 37, 655–8.

dos Santos, A.B., Traverse, J., Cervantes, F.J., van Lier, J.B., 2005. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. Biotechnol. Bioeng. 89, 42–52.

Fogg, A.G., Bsebsu, N.K., Abdalla, M.A., 1982. Indirect flow injection voltammetric determination of aromatic amines by monitoring at a glassy carbon electrode the excess of nitrite remaining after their diazotisation. Analyst 107, 1462.

Gonçalves, I.C., Lopes, L., Pinheiro, H.M., Ferra, M.I.A., 2009. Behaviour of different anaerobic populations on the biodegradation of textile chemicals. J. Hazard. Mater. 172, 1236–1243.

Harada, K.-I., Masuda, K., Suzuki, M., Oka, H., 1991. Separation and identification of food dyes by thin-layer chromatography/liquid secondary ion mass spectrometry. Biol. Mass Spectrom. 20, 522–528.

Isik, M., Sponza, D., 2004. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. J. Hazard. Mater. 114, 29–39.

Jadhav, U.U., Dawkar, V. V., Ghodake, G.S., Govindwar, S.P., 2008. Biodegradation of Direct Red 5B, a textile dye by newly isolated Comamonas sp. UVS. J. Hazard. Mater. 158, 507–516.

Llamas, N.E., Garrido, M., Nezio, M.S. Di, Band, B.S.F., 2009. Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV–vis and multivariate curve resolution-alternating least squares. Anal. Chim. Acta 655, 38–42.

Moldovan, Z., Bayona, J.M., 2000. Determination of novel aromatic amines in environmental samples by gas chromatography/mass spectrometry. Rapid

Commun. Mass Spectrom. 14, 379–389.
Narang, A.S., Choudhury, D.R., Richards, A., 1982. Separation of Aromatic Amines by Thin-Layer and High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Sci. 20, 235–237.
Pérez-Urquiza, M., Beltrán, J.L., 2000. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A 898, 271–5.
Prado, M.A., Boas, L.F.V., Bronze, M.R., Godoy, H.T., 2006. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A 1136, 231–236.
Saha, A.K., Sultana, N., Mohanta, M.K., Mandal, A., Haque, M.F., 2017. Identification and Characterization of Azo Dye Decolourizing Bacterial Strains, Alcaligenes faecalis E5.Cd and A. faecalis Fal.3 Isolated from Textile Effluents. Am. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci. 31, 163–175.
Sakai, T., Morita, Y., Kim, Y., Tao, Y., 2002. LC–MS determination of urinary toluenediamine in workers exposed to toluenediisocyanate. Toxicol. Lett. 134, 259–264.
Santos, M.E. dos, Demiate, I.M., Nagata, N., 2010. Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada. Ciência e Tecnol. Aliment. 30, 903–909.
Tony, B.D., Goyal, D., Khanna, S., 2009. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. Int. Biodeterior. Biodegradation 63, 462–469.
van der Zee, F.P., Villaverde, S., 2005. Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—A short review of bioreactor studies. Water Res. 39, 1425–1440.
Vidotti, E.C., Rollemberg, M. do C.E., 2006. Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. Quim. Nova 29, 230–233.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO E NÍQUEL NA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO

Alana G. L. de Moura [1]; Camila A. B. S. Rabelo [2]; Edson L. Silva [3]; Maria B. A. Varesche[4]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar;
[4] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Este estudo consistiu nas seguintes etapas: (1) variação da composição do meio de cultura Reinforced Clostridial Medium com os compostos variando de concentração nula até sua concentração na composição original do meio; (2) variação da concentração de glicose (1,43 - 8,57 g.L^{-1}); (3) variação da concentração de nanopartículas (NPs) (1,72 - 58,28 mg.L^{-1}). Os frascos Duran de 250 mL com 125 mL de volume reacional foram inoculados com Clostridium butyricum e operados a 37°C, sob agitação de 130 rpm e com ajuste inicial do pH a 6,8. Ao longo destas etapas, a máxima produção acumulada de hidrogênio (P) e rendimento máximo (R_m) foram para as condições da etapa (1) de 379 ± 9 mL de H_2 e 143 mL de H_2.g^{-1} de DQO; etapa (2) de 390 ± 24 mL de H_2 e 170 mL de H_2.g^{-1} de DQO e etapa (3) 434 ± 13 mL de H_2 e 190 mL de H_2.g^{-1} de DQO, respectivamente.*

Introdução

A produção de hidrogênio é uma fonte renovável de energia, e pode ser uma alternativa à dependência de combustíveis fósseis. O hidrogênio tem alto conteúdo energético; ou seja, de 122 kJ.g^{-1}, que é 2,75 vezes maior do que aquele dos hidrocarbonetos. Esta densidade energética é o seu principal diferencial quando comparado a outras fontes renováveis de baixa densidade energética, como a energia eólica e solar. Pois, a quantidade de energia produzida em um curto espaço de tempo, para suprir uma indústria por exemplo, é muito elevada e depende da densidade energética da fonte. Ou seja, não consegue ser provida apenas por fonte eólica ou solar, a não ser quando associada ao armazenamento eficiente (baterias de alto custo) (Argun et al., 2008).

A produção biológica de hidrogênio é atrativa por abordar tanto a produção de energia, quanto o tratamento de águas residuárias com elevadas concentrações de carboidratos. A presença dominante de *Clostridium butyricum* no processo fermentativo de produção de hidrogênio é frequentemente reportada na literatura em inóculos de diversas fontes, como por exemplo, em lodo de estação de tratamento de esgoto, em lodo de resíduos da indústria do biodiesel e em consorcio presente em cereais. (Zhang e Shen, 2007; Zhao et al., 2013; Pachapur et al. 2017). A utilização do design de experimentos como ferramenta para otimizar a produção de hidrogênio desta cultura mostrou-se adequada. Pois, com o suporte da segurança estatística, pode-se iniciar a otimização com ensaios para avaliar a composição do meio de cultura, e afunilar para ensaios com a concentração de substratos específicos como variável (Jiang et al., 2016).

Todavia, mesmo com estes recursos, os valores de produção biológica de hidrogênio obtidos na literatura ainda estão muito abaixo do potencial teórico, por não ser a única rota de degradação de compostos possível no processo fermentativo. E um artifício para o direcionamento desta rota, além do fornecimento de parâmetros operacionais ótimos já mencionado acima, é a bioengenharia das enzimas. O qual consiste em otimizar a atividade das enzimas que catalisam a redução do H^+ a H_2, também conhecidas como hidrogenases. A atividade destas enzimas pode ser avaliada por métodos que verificam a quantidade de genes relacionados a elas ativos no meio, como o q-PCR em tempo real (Calusinska et al., 2010).

A atividade de enzimas como as [Fe-Fe] e [Ni-Fe] hidrogenases depende da disponibilidade de íons metálicos no meio, que pode ser mais facilmente estabilizada, quando estes íons são disponibilizados na forma de nanopartículas, se comparado a adição de íons solúveis. Isto ocorre porque, ao serem adicionados na forma de nanopartículas, a concentração ótima de cofatores se mantém ao longo de todo processo fermentativo, pois os íons metálicos são solubilizados de acordo com o seu consumo. Ou seja, devido a sua elevada área superficial, as nanopartículas na forma sólida liberam íons no meio quando imposto pelo equilíbrio, de acordo com a demanda metabólica.

Desta forma, nesta primeira etapa do estudo, o objetivo foi operar reatores em batelada para investigar a condição otimizada de produção acumulada de hidrogênio pela cultura pura de *Clostridium butyricum*. As ferramentas estatísticas de planejamento experimental foram utilizadas variando a composição do meio de cultura, em seguida a disponibilidade de substrato (glicose) no meio e, por fim, a concentração de nanopartículas de ferro e níquel adicionadas ao meio. A atividade da enzima hidrogenase também foi avaliada através da análise q-PCR.

Material e Métodos

Síntese de nanopartículas

As nanopartículas (NPs) de Ferro foram sintetizadas a partir do gotejamento de 100 mL de solução 0,04M de $FeSO_4$. $7H_2O$ em 100 mL de solução 0,2 M de KBH_4. Esse procedimento foi realizado em balão com 3 bocas sob atmosfera de argônio (99%) e temperatura ambiente. A precipitação das NPs ocorreu de acordo com a Equação (I) a seguir, as quais foram, em seguida, lavadas com água destilada.

$$Fe(H_2O)_6^{+2} + 2BH_4^- \rightarrow Fe^0 \downarrow + 2B(OH)_3 + 7H_2 \uparrow \quad (I)$$

As nanopartículas de Níquel foram sintetizadas a partir da precipitação de Níquel ao adicionar 0,18 g de KBH_4 à 20 mL de solução 2.10^{-4} $mol.L^{-1}$ de $NiCl_2.6H_2O$ em etileno glicol (Equação II). Após duas horas sob agitação magnética a 70°C, as nanopartículas foram lavadas em etanol.

$$2Ni^{2+} + BH_4^- + 2H_2O \rightarrow 2Ni^0 \downarrow + 4H^+ + BO_2^- + 2H_2 \uparrow \quad (II)$$

Ensaios em batelada

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

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

A concentração de glicose para obter o máximo rendimento da produção de hidrogênio foi avaliada nas concentrações de 1,43; 2; 5; 8 e 8,57 $g.L^{-1}$. E então os ensaios seguintes para otimizar a produção de hidrogênio com adição de NPs de ferro e níquel foram realizados com o meio RCM otimizado. A concentração de NPs para obter o máximo rendimento da produção de hidrogênio foi obtida por DCCR nas condições variando de 1,72 a 58,28

mg.L^{-1}.Além disso realizou-se a validação experimental da concentração ótima de NPs obtida do modelo estatístico.

Tabela 1: Matriz de variáveis do PB16 para otimização do RCM

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

*concentração escolhida para cada componente do meio após este ensaio, para ser utilizada nos ensaios seguintes.

Análises de Monitoramento

Os gases resultantes da fermentação foram determinados por cromatografia gasosa usando um GC 2010 Shimadzu de acordo com Ratti et al., (2013). Para modelar a produção acumulada de hidrogênio ao longo do tempo e obter parâmetros que serviriam de resposta na análise estatística, utilizou-se a equação de Gompertz. O planejamento experimental e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Protimiza (https://experimental-design.protimiza.com.br).

q-PCR

A extração de DNA foi realizada, tanto nas amostras de biomassa dos reatores em batelada, quanto nas amostras do biofilme dos reatores de fluxo contínuo por meio de kit comercial de extração por membrana filtrante "Power Soil DNA Isolation Kit" da MO BIO®. O PCR em tempo real foi realizado nas amostras dos reatores em batelada, a fim de verificar a presença da enzima hidrogenase. Foram usados os seguintes iniciadores moleculares para enzima hidrogenase: HydA-F (5′-TCACCACAACAAATATTTGGT-3′, Tm = 52,8°C) e HydA-R (5′-GCTGCTTCCATAACTCC-3′, Tm = 53,3°C) (Fang et al., 2006). A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada em termociclador. As condições de ciclo tiveram início a 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 30 segundos cada, de desnaturação a 95°C, anelamento a 52°C e extensão a 72°C. É importante ressaltar que uma curva de calibração do equipamento com amostras padrão também foi realizada.

Resultados e Discussão

Ensaios em batelada

Ao analisar as condições desta etapa do estudo (Tabela 3), é possível observar que a condição 12 foi a que resultou em maior produção acumulada de hidrogênio (*P*), a qual foi de 267 ± 4 mL e resultou em rendimento (R_m) de 110 mL de H_2.g^{-1} de DQO. Para as condições 9 e 7 observou-se 245 ± 6 e 225 ± 8 mL de H_2, para *P* e de 76 e 87 mL de H_2.g^{-1} de DQO para R_m, respectivamente. Estas 3 condições têm em comum na composição: 5 g.L^{-1} de glicose e 1 g.L^{-1} de amido, além de ter pelo menos duas das três possíveis fontes de outros substratos orgânicos (extrato de carne, extrato de levedura e peptona). Em relação as condições

nutricionais dos ensaios 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 e 13 observou-se produção acumulada de hidrogênio e rendimento inferiores a 100 mL e 55 mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO. Nos ensaios 1, 2, 8, 10 e 13 não foi adicionado glicose, o que explica a baixa produção de H_2. Enquanto nos ensaios 4, 5 e 6 adicionou-se 5 $g.L^{-1}$ de glicose e pelo menos duas das três fontes adicionais de substrato (peptona, extrato de levedura ou extrato de carne). Todavia, amido não foi adicionado em nenhuma destas condições, por conseguinte observou-se valores inferiores de produção de hidrogênio, evidenciando a influência de sua ausência no processo fermentativo de *C. butyricum*. Para as condições 11, 14, 15 e 16 não foi observado hidrogênio. Estes 4 ensaios tinham em comum a ausência de outros substratos (extrato de levedura, extrato de carne e peptona), evidenciando a importância da presença destes componentes para o processo fermentativo (Tabela 3).

Jiang et al. (2016) também realizaram ensaio PB para otimizar a produção de hidrogênio por *C. butyricum* em meio com glicose (15-25 $g.L^{-1}$) como substrato, extrato de levedura (3,5-6,5 $g.L^{-1}$) e triptona (3-5 $g.L^{-1}$), além de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) (2-4 $g.L^{-1}$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (2-4 $g.L^{-1}$), L-Cisteína (0,05-0,15 $g.L^{-1}$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (0-0,1 $g.L^{-1}$) e sulfato de ferro ($FeSO_4$) (0,2-0,4 $g.L^{-1}$). Os autores obtiveram rendimento máximo da produção de hidrogênio de 174 mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO em ensaio PB12. Além disso, retiraram os componentes L-cisteína e K_2HPO_4 do meio. Na etapa 2 deste estudo, o rendimento máximo da produção de hidrogênio foi de 110 mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO. Os componentes L-cisteína, acetato de sódio e cloreto de sódio foram retirados do meio para realização dos ensaios posteriores por terem efeito negativo e a concentração dos substratos alternativos (extrato de carne, peptona e extrato de levedura) foram mantidas em metade da concentração da composição original. Por ter sido o componente estatisticamente mais significativo, o amido foi mantido na concentração máxima (1 $g.L^{-1}$)

Tabela 3: Parâmetros de Gompertz obtidos dos ensaios de Plackett-Burman na avaliação da composição do Reinforced Clostridial Medium

Condição	P (mL)	xc (mL.h^{-1})	FIPH (h)	R^2	R_m (mL de H_2.g^{-1} de DQO)
1	27 ± 0	10 ± 0	5 ± 1	0,999	17
2	28 ± 0	5 ± 0	3 ± 0	0,999	12
3	119 ± 1	27 ± 1	3 ± 0	0,998	47
4	71 ± 2	16 ± 2	3 ± 0	0,983	23
5	89 ± 3	27 ± 5	12 ± 0	0,985	36
6	59 ± 2	20 ± 4	6 ± 0	0,976	26
7	225 ± 8	24 ± 3	6 ± 0	0,991	87
8	84 ± 2	21 ± 3	4 ± 0	0,987	48
9	245 ± 6	171 ± 110	8 ± 0	0,992	76
10	99 ± 1	34 ± 5	4 ± 0	0,996	52
11	0 ± 0	0 ± 0	-*	0,950	0
12	267 ± 4	48 ± 3	3 ± 0	0,996	110
13	16 ± 0	0 ± 0	-*	0,956	9
14	0 ± 0	0 ± 0	-**	-**	0
15	0 ± 0	0 ± 0	-**	-**	0
16	0 ± 0	0 ± 0	-**	-**	0
PC1	155 ± 2	17 ± 1	3 ± 0	0,998	84
PC2	148 ± 3	83 ± 14	5 ± 0	0,983	80
PC3	120 ± 3	28 ± 4	6 ± 0	0,987	65

PC = Ponto Central; P = produção máximo de H_2; xc = velocidade de produção de H_2; FIPH = Fase Inicial para Produção de H_2; R_m = Rendimento da produção de H_2.

A partir dos ensaios em que a influência da variação da concentração de glicose de 1,43 a 8,57 g.L^{-1} na produção de hidrogênio foi avaliada, foi possível inferir que a duração da fase inicial de produção de hidrogênio (FIPH) foi similar (2 ± 0 a 4 ± 0 h) em todas as condições deste ensaio. As velocidades de produção de hidrogênio também foram similares e variaram de 42 ± 4 a 55 ± 5 mL.h^{-1}, com exceção da condição em que 8,57 g.L^{-1} de glicose foi adicionada, cuja velocidade foi de 73 ± 4 mL.h^{-1}. Além disso, as condições com menor concentração de glicose no meio de 1,43 g.L^{-1} e 2 g.L^{-1} foram as que menor produção máxima acumulada de hidrogênio foi observada, de 190 ± 2 e 244 ± 5 mL, respectivamente. No entanto, ligeira inibição por excesso de substrato também foi observada para 8,57 g.L^{-1} resultou em produção e rendimento de 312 ± 3 mL de H_2 e 115 mL de H_2.g^{-1} de DQO, respectivamente. Enquanto, para as condições do ensaio com 8 g de glicose.L^{-1} foi observada produção acumulada e rendimento de 379 ± 9 mL de H_2 e 143 mL de H_2.g^{-1} de DQO, respectivamente (Tabela 4).

Na condição do ponto central (5 g.L^{-1} de glicose) obteve-se menor produção acumulada de H_2 (322 ± 4 mL), no entanto, esta condição resultou em mesmo rendimento do ponto de concentração otimizada (8 g de glicose.L^{-1}) de 143 mL de H_2.g^{-1} de DQO (Tabela 4). Ou seja, ao considerar a eficiência do processo na conversão de substrato em H_2, e não apenas a produção acumulada obtida, 5 g de glicose.L^{-1} deve ser considerada e será utilizada nos ensaios com NPs

Tabela 4: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio para diferentes concentrações de glicose e respectivos parâmetros de Gompertz

Glicose($g.L^{-1}$)	P (mL)	Xc ($mL.h^{-1}$)	FIPH (h)	R^2	R_m (mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO)
1,43	190 ± 2	45 ± 4	2 ± 0	0,990	107
2	244 ± 5	42 ± 4	2 ± 0	0,986	132
5	317 ± 6	55 ± 5	2 ± 0	0,983	141
5	322 ± 4	38 ± 2	4 ± 0	0,995	143
5	315 ± 4	46 ± 3	4 ± 0	0,994	140
8	379 ± 9	44 ± 4	4 ± 0	0,988	143
8,57	312 ± 3	73 ± 4	3 ± 0	0,995	115

P = produção máximo de H_2; xc = velocidade de produção de H_2; FIPH = Fase Inicial para Produção de H_2; R_m = Rendimento da produção de H_2.

Nos ensaios realizados para avaliação da concentração de NPs, a máxima produção acumulada de H_2 foi de 390 ± 4 mL na condição com 30 $mgFe^0.L^{-1}$ e 30 $mgNi^0.L^{-1}$. No ensaio com 58,28 $mgFe^0.L^{-1}$ e 30 $mgNi^0.L^{-1}$ a produção acumulada de H_2 foi similar e de 370 ± 14 mL. Produção de hidrogênio inferior (< 100 mL de H_2) foi observada nos ensaios com valores de nanopartículas de níquel acima de 50 $mg.L^{-1}$. Desta forma, sob tais condições pode-se afirmar que ocorreu inibição da produção de H_2 (<100 mL), a qual foi inferior aquela observada para o ensaio controle (sem NPs), cuja produção máxima acumulada foi de 285 ± 10 mL. É possível observar o menor ajuste ao modelo, nos ensaios em que a inibição ocorreu (concentração de NPs de níquel > 50 $mg.L^{-1}$). Nestes casos, a FIPH não foi superada. Em todos os outros ensaios a duração da FIPH foi similar e variou de 7 ± 0 a 9 ± 0 h (Tabela 5).

Tabela 5: Condições dos reatores nos ensaios de otimização da produção acumulada de hidrogênio com variação da concentração de NPs e respectivos parâmetros de Gompertz

Fe^0 ($mg.L^{-1}$)	Ni^0 ($mg.L^{-1}$)	P (mL)	xc ($mL.h^{-1}$)	FIPH (h)	R^2	R_m (mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO)
10	10	341 ± 12	39 ± 4	7 ± 0	0,987	149
10	50	25 ± 1	4 ± 1	-*	0,987	11
50	10	343 ± 11	39 ± 4	7 ± 0	0,990	150
50	50	31 ± 1	7 ± 1	-*	0,977	14
30	1,72	325 ± 8	48 ± 5	7 ± 0	0,990	142
30	58,28	72 ± 2	10 ± 2	-*	0,976	31
1,72	30	349 ± 23	25 ± 2	7 ± 1	0,987	153
58,28	30	370 ± 14	37 ± 4	8 ± 0	0,990	162
30	30	390 ± 24	32 ± 3	8 ± 1	0,986	170
-	-	285 ± 10	49 ± 8	9 ± 0	0,983	125

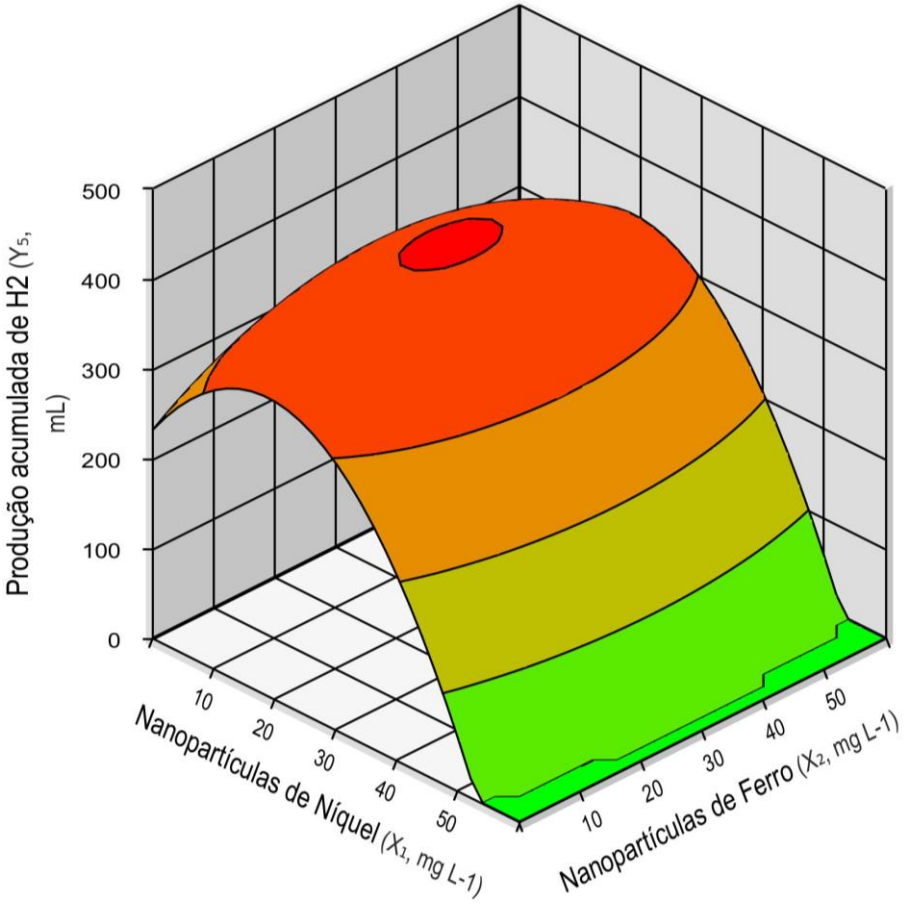
P = produção máximo de H_2; xc = velocidade de produção de H_2; FIPH = Fase Inicial para Produção de H_2; R_m = Rendimento da produção de H_2; *ensaio não saiu da FIPH.

Validação experimental

A concentração de nanopartículas influenciou de forma estatisticamente significativa na produção de hidrogênio e seu máximo foi obtido para 30 $mgFe^0.L^{-1}$ e 20 $mgNi^0.L^{-1}$ com a

produção de 404 ± 34 mL de H_2 que corresponderia ao rendimento de 177 mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO, 42% maior do que aquele obtido no ensaio controle (sem NPs) (Figura 1).

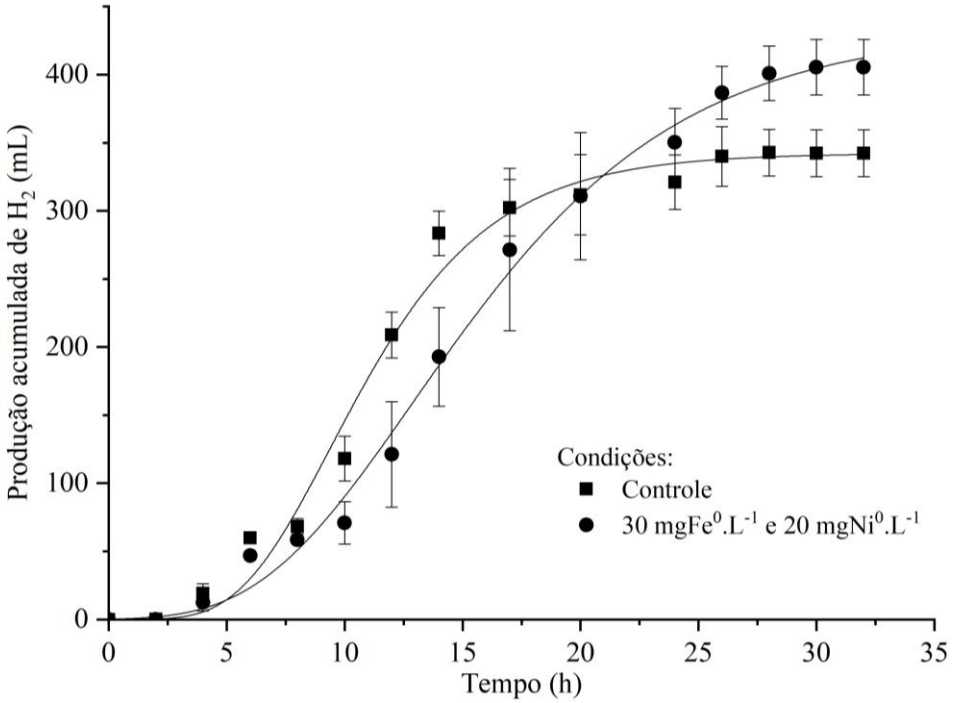
Figura 1: Superfície de resposta do modelo estatístico com variação da concentração de NPs de ferro e níquel para otimizar a produção de H_2 por *Clostridium butyricum*



A validação experimental do modelo ilustrado na Figura 1 foi realizada e a otimização da produção acumulada de hidrogênio com 30 $mgFe^0.L^{-1}$ e 20 $mgNi^0.L^{-1}$ resultou em aumento de 27%, ou seja, de 342 ± 8 para 434 ± 13 mL de H_2 (Figura 2). A produção acumulada de hidrogênio obtida com a adição de nanopartículas foi ainda maior do que a prevista pelo modelo ANOVA (404 ± 34 mL).

Taherdanak et al. (2015) também otimizaram a produção de hidrogênio ao adicionar NPs de Ferro e Níquel em reatores em batelada alimentados com amido e inoculados com lodo anaeróbio de ETE. Os autores operaram os reatores a 37°C e reportaram as concentrações de 37,5 $mgNi^0.L^{-1}$ e 37,5 $mgFe^0.L^{-1}$ como adequadas à produção otimizada de H_2. O rendimento obtido nesta condição foi de 142 mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO e foi 97% maior em relação obtido no ensaio controle (72 mL de $H_2.g^{-1}$ de DQO). Os autores observaram que a adição de nanopartículas ao meio de fermentação pode: diminuir a viabilidade de O_2 indesejado, levando assim a melhor desempenho das hidrogenases sensíveis ao oxigênio.

Figura 2: Produção acumulada de hidrogênio nos ensaios de validação experimental da otimização da concentração de nanopartículas



q-PCR

A atividade da hidrogenase também foi avaliada durante o ensaio, por meio do q-PCR. Quanto menor o número de ciclos necessários para obter a curva Threshold, maior a quantidade de genes relacionados a enzima hidrogenase presentes na amostra. Sendo assim, ao comparar o ensaio com nanopartículas em relação ao controle verificou-se que os genes da hidrogenase estavam presentes em maior quantidade apenas na fase exponencial de produção de H_2 (após 7h de ensaio). Ou seja, 10,7 ciclos foram necessários para obter a curva Threshold na amostra do reator com nanopartículas, enquanto para a amostra controle foram necessários 11,4 número de ciclos (Tabela 6). Desta forma, a maior atividade da enzima hidrogenase na fase exponencial foi crucial para maior produção de hidrogênio no processo fermentativo, e é nesta fase que a presença de íons fornecidos pelas nanopartículas foram diferenciais. Em todas as outras amostras do processo fermentativo, o número de ciclos necessário para obter a curva, ao comparar o reator controle com o que NPs foram adicionadas, foi estatisticamente o mesmo (teste de Tukey).

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

Tabela 6: Médias de ciclos necessária para obter a curva Threshold no q-PCR

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

Conclusões

A ferramenta estatística de planejamento experimental foi adequada para otimizar a composição do meio de cultura RCM, com a retirada de 3 dos seus componentes (acetato de sódio, cloreto de sódio e L-cisteína) e os componentes restantes foram mantidos na metade da concentração da composição original (extrato de carne, extrato de levedura e peptona), com exceção dos substratos principais, que foram mantidos na concentração original (amido e glicose). Esta ferramenta também foi útil na otimização da produção de hidrogênio por adição de NPs de ferro e níquel ao meio, com aumento de 27% em relação ao reator controle (sem adição de NPs). A atividade da enzima hidrogenase só foi superior a do reator controle, na etapa exponencial do processo fermentativo, o que já foi suficiente para resultar em maior produção de hidrogênio.

Referências Bibliográficas

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K., Oztekin, R., 2008. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. Int. J. Hydrogen Energy 33, 1813–1819;

Calusinska, M., Happe, T., Joris, B., Wilmotte, A., 2010. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. Microbiol. 156, 1575-1588;

Fang, H.H., Zhang, T., Li, C., 2006. Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. J. Biotechnol. 126, 357-364;

Jiang, D., Fang, Z., Chin, S.X., Tian, X.F., Su, T.C., 2016. Biohydrogen production from hydrolysates of selected tropical biomass wastes with *Clostridium butyricum*. Sci. Rep. 6, 27205;

Pachapur, V.L., Sarma, S.J., Brar, S.K., Bihan, Y.L., Buelna, G., Verma, M., 2017. Hydrogen production from biodiesel industry waste by using a co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. Biofuels 8, 651-662;

Ratti, R.P., Botta, L.S., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2013. Microbial diversity of hydrogenproducing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. Int. J. Hydrogen Energy 36, 9707-9717;

Taherdanak, M., Zilouei, H., Karimi, K., 2015. Investigating the effects of iron and nickel nanoparticles on dark hydrogen fermentation from starch using central composite design. Int. J. Hydrogen Energy 40, 12956-12963;

Wang, J., Wan, W., 2008. Influence of Ni^{2+} concentration on biohydrogen production. Bioresour. Technol. 99, 8864–8868;

Zhang, Y., Shen, J., 2007. Enhancement effect of gold nanoparticles on biohydrogen production from artificial wastewater. Int. J. Hydrogen Energy 32, 17–23;

Zhao, W., Zhang, Y., Du, B., Wei, D., Wei, Q., Zhao, Y., 2013. Enhancement effect of silver nanoparticles on fermentative biohydrogen production using mixed bacteria. Bioresour. Technol. 142, 240-245.

SIMULTANEOUS BIOLOGICAL TREATMENT AND REY (RARE EARTH ELEMENTS AND YTTRIUM) REMOVAL FROM AN ACID MINE DRAINAGE

Elis Watanabe Nogueira [1]; Leandro Augusto Gouvêa de Godoi [1]; Gunther Brucha [2]; Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic [1]

[1]Biological Processes Laboratory (LPB), São Carlos School of Engineering (EESC), University of São Paulo (USP), Av. João Dagnone, 1100, Santa Angelina, São Carlos, São Paulo, 13563-120, Brazil,
[2]Universidade Federal de Alfenas, Rodovia José Aurélio Vilela, 11999 (BR 267 Km 533) Cidade Universitária Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil.

Abstract. *An acid mine drainage (AMD) containing high concentration of sulfate (~1000 mg.l^{-1}), dissolved metals, rare earth elements and yttrium (REY) was treated using down-flow fixed-structured bed biological reactor. The reactor was operated as a continuous flow for 175 days and temperature maintained to 30°C. Sugarcane vinasse was used as electron donor and influent pH of the reactor varied from 4.7 to 6.9. REY elements and transition metals was removed from the real AMD and precipitated in the down-flow fixed-structured bed reactor (DFSBR). Sulfate reduction achieved 67± 22% in Phase II and COD removal was superior to 56% in Phases I and II. Removal of La, Ce, Pr, Nd, Sm and Y was higher than 70% in both Phases II and III while Fe, Al, Si and Mn were removed with efficiencies of 79, 67, 48 and 25%, respectively. The results highlighted the robustness of this bioreactor configuration and opened perspectives for simultaneous sulfate-reduction and metal and REY recovery in a single-unity.*

Introduction

Rare earth elements and yttrium (REY) has a high economic value due the various technological applicability and the extensive use of these elements. Their uses include lamp phosphors, rechargeable batteries, liquid crystals, catalysts, etc. The presence of REY is abundant in acid mine drainage (AMD) and coal mine drainage (CMD) and is considered one of the most important new source of REY. Studies suggest that the lowest pH of AMD, the highest is the concentration of REY and other metals such as Al, Mn, Cu and Zn released in the water (Cravotta, 2008; Stewart et al., 2017).

Acid mine drainage (AMD) is a serious environmental problem that affects aquatic and terrestrial ecosystems, as well as the human health. AMD is characterized as a low pH wastewater with high concentrations of sulfate and several metals. The flow rate of AMD generation in the city of Caldas - MG - Brazil can reach 160 m3.h- 1 in the rainy season. The problems associated with its inadequate disposal and the lack of treatment and recovery of metals represent an environmental challenge that can be aggravated by extensive disasters, such as occurred in Mariana-MG, Brazil (Hatje et al., 2017).

First described by Miekeley et al. (1992), due to the low pH around 3.3, the AMD used in this work are characterized with a high concentration of dissolved metals including high concentrations of REY, and may range from 0.5 to 71 mg.L^{-1}. Based on the results found in the literature for the passive treatment of AMD, the objective of this work was to remove metals Al, Fe, Mn, Si and REY from actual AMD using sulfidogenic bioreactor to precipitate metals due the generation of sulfide and alkalinity in sulfate reduction process, as well as the AMD neutralization.

Material and Methods

Bioreactor configuration

The DFSBR (Godoi et al., 2017a) was operated at 30 ºC with HRT varying between 16 and 18.5 h (total volume of 1.9 L). The reactor was operated during 175 days distributed in four operational phases.

Mine waters

The actual mine water was collected from an uranium mine deactivated in 1998 named BNF (BF4) located in Caldas, South Minas Gerais state, Brazil and operated by Indústrias Nucleares do Brasil (INB). It has been characterized with high concentration of dissolved transition metals and the highest concentration of REY in AMD described (Cravotta, 2008). The pH of the mine water was around 3 and the concentration of main elements are described in Table 1.

Table 1: Characterization of the actual mine water used for biological treatment.

Element	Conc. ($mg.L^{-1}$)	REY	Conc. ($mg.L^{-1}$)
Al	131.5 ± 6.6	La	40.1
Mn	75.6 ± 9.6	Ce	24.9
Fe	1.2 ± 0.1	Pr	3.6
Zn	10.9 ± 0.7	Nd	9.55
Mg	6.1 ± 0.4	U	4.15 ± 0.2
Si	17.2 ± 5.6	Y	4.10 ± 0.4
SO_4	890±80		

Wastewater and carbon source

The sugarcane vinasse, a waste material from ethanol production, was used as a carbon source to sulfate reduction and its composition is described (Table 2).

Table 2: Characterization of the sugarcane vinasse used as a carbon source.

Analyte	Conc. ($mg.L^{-1}$)	Analyte	Conc. ($mg.L^{-1}$)
Al	5.84	Cu	0.366
Mn	23.28	Ti	0.228
Fe	134.1	Ni	0.204
Zn	1.48	P	147.4
Mg	1907	S	2418
Si	53.5	Ca	1614
SO_4	2400	COD	15.10^4

Operational parameters

During the Phase I the bioreactor was fed with a mixture of sugarcane vinasse and a synthetic wastewater with high concentration of sulfate in order to adapt the sulfate-reducing biomass. During Phases II, III and IV the synthetic wastewater was gradually replaced by a real AMD until reach 20 % (Phase II), 50% (Phase III) and 75% (Phase IV) of the treated volume and the COD:Sulfate ratio applied ranged from 1.5 ± 0.4 to 1.8 ± 0.5. The influent pH in the start-up phase (treating synthetic sulfate-rich wastewater) was 6.9 ±0.6, whereas after the application of the real AMD, the influent pH was adjusted with NaOH and varied between 4.6 and 5.4 (Table 3). The solid precipitated were collected three times between the operational phases and sulfate and metal analyses conducted.

Table 3**:** Mean values of pH and influent of sulfate, COD and metals in DFSBR.

Phases		**I (41 d)**	**II (18 d)**	**III (71 d)**	**IV (64 d)**
Sulfate ($mg.L^{-1}$)		980±180	1150±71	1020±70	985±144
COD ($mg.L^{-1}$)		1530±556	2000±111	1980±519	1770±450
COD:Sulfate ratio		1.5±0.4	1.7±0.2	2.1±0.7	1.8±0.5
Influent pH		6.9±0.6	5.4±0.2	5.1±0.1	4.6±0.2
Influent ($mg.L^{-1}$) of:	Al	-	25±11	71±27	96±18
	Fe	-	8±4	11±8	6±2
	Mn	-	15±2	31±2	62±5
	Si	-	8±3	12±5	11±2
	La	-	8±4	18±6	29±10
	Ce	-	6±3	14±6	18±6
	Pr	-	0.4±0.3	1±0.4	3±0.4
	Nd	-	2±1	5±2	7±3
	Sm	-	0.2±0.1	0.6±0.3	0.8±0.3
	Y	-	0.8±0.5	2±0.7	3.2±0.4
	U	-	1±0.6	3.7±2	3.2±1.4

Analytical methods

The concentration of COD, sulfide and alkalinity were determined according to Standard Methods (APHA, 2005) and pH of the unfiltered samples was measured immediately after collection. Filtered samples were acidified with HNO_3 for the analysis of sulfate and major elements by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES).

Results and Discussion

COD and sulfate removal

The COD oxidation was achieved more efficiently in the first operational phase with 62 ± 14% when the synthetic water was treated. During the Phase II, with 20% of real AMD, sulfate reduction and COD removal reached 67 ± 22% and 56 ± 6%, respectively (Figure 1). Although the low concentration of AMD didn't affected the performance at the beginning, in the middle of Phase III the COD removal was around 30% and very instable. The higher concentration of dissolved metals and the low pH (around 5) in Phase III and IV (50% and 75% of AMD) could be affected the sulfidogenesis and both COD removal and sulfate reduction efficiencies dropped to 20% and 10 ± 10%, respectively.

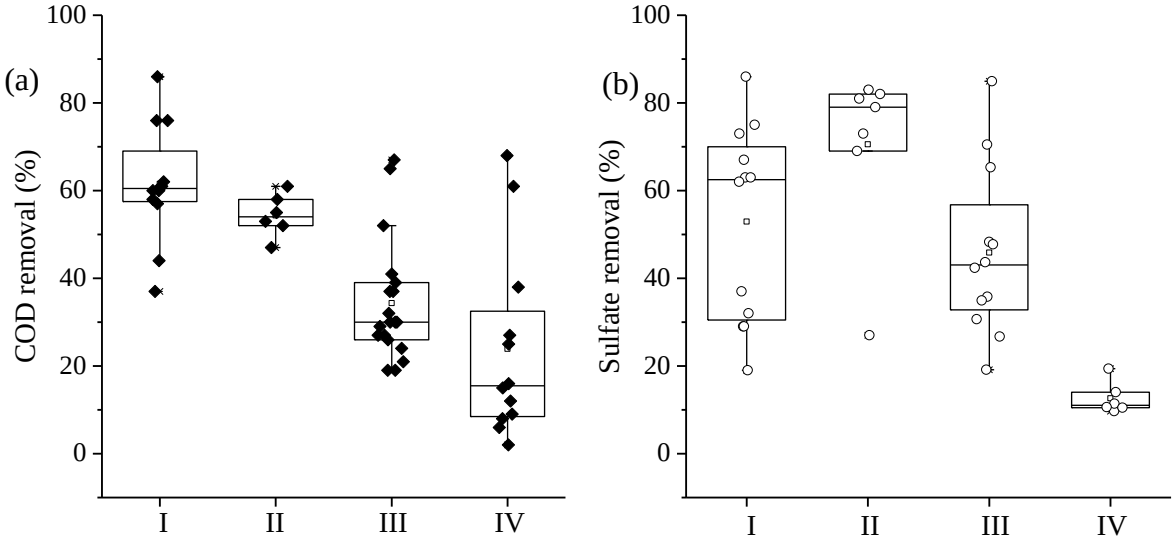


Figure 1- Boxplot analysis of COD removal (a) and sulfate removal (b) at different phases.

In the Phase I the sulfidogenesis was established in the system and sulfate reduction average was 53 ± 22%, reaching 87% in the last few days and produced 129± 12 mg.L^{-1} of dissolved sulfide. Sulfide concentration also decreased from 210 mg.L^{-1} in Phase II to 117 mg.L^{-1} in Phase III. Due low sulfate reduction, less than 40 mg.L^{-1} of sulfide was generated in the system in Phase IV, when the sulfidogenesis was several affected and the sulfate concentration outflow remained instable.

The alkalinity produced due to sulfate reduction increased pH from 7 to 7.5 in Phase I, 5.4 to 7.4 in Phase II, from 5 to 6.4 in Phase III and from 4.7 to 5.2 in Phase IV (Figure 3.a). In Phase I (absence of dissolved metals) 1456 ± 190 mg $CaCO^3$.L^{-1} was produced and although the addition of AMD did not affected sulfate reduction in Phase II, the alkalinity decreased to 1331 ± 96 mg CaCO3.L^{-1}. It is probably related with release of protons caused by the metal sulfide precipitation and the HS- consumption due metals sulfide precipitation form (Godoi et al., 2017b). During the Phase III, with an increasing in concentration of metals and the decreased efficiency of sulfate reduction, the alkalinity production dropped to 629 ± 287 mg CaCO3.L^{-1} The IA/PA ratio (intermediary alkalinity / partial alkalinity) increased from 0.4 ± 0.1 (Phase I and II) to 0.7 ± 0.4 in Phase III, demonstrating the instability of the anaerobic digestion.

REY and metals removal from actual mine water

The treatment of 75% of actual AMD with high content of metals dissolved was possible due the establishment of sulfidogenesis in the first phase. The removal of transition metals and REY are presented in Figure 2 and Figure 3, respectively, and such results are probably due the increasing of internal pH in the system, making possible the metals precipitation in the DFSBR.

Although Mn precipitate around pH 9 (Ayora et al., 2016), during the Phase II and III the treatment was capable to remove an avarage amount of 35 and 20%, respectively, when outflow pH was higher than 6, but in the Phase IV when the pH drop to less than 6, Mn release in dissolved fraction. The incipient removal of Mn is probably due to higher solubility product (Ksp) of MnS compared to other sulfides and the complexity of the interactions governing Mn solubility (Bekmezci et al., 2011). The element Al and Fe, widely associated with AMD (Sun et al., 2012; Ayora et al., 2016; Kefeni et al., 2017), presented similar behavior with efficiency removal around 70% in phases II and III but dropped in the last phase to less than 40%. According to Aluminium pKa, pH between 1.5 and 6 the Al speciation in AMD is presented as sulfate complexes and above it, it is present as hydroxide complexes (Sánchez-Espanã 2007) and Falagán et al., 2017 found the Al in a hydroxysulfate form and other forms under pH 5. The high concentration of dissolved sulfide generated in the medium probably favored the formation of metal sulfide, precipitating partially with transition metals.

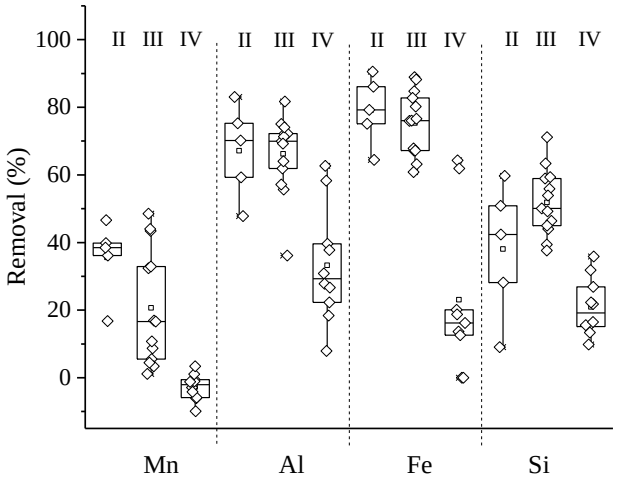


Figure 2: Boxplot analysis of transition metals removal in Phases II, III and IV.

Regarding REY, La, Ce, Nd and Y were removed with average value superior to 70% and Pr and Sm superior to 80% in Phase II (Figure 3). Comparing to another AMD and coal mine drainage (CMD) with REY compositions, the DFSBR was able to treat the highest concentration of REY ever described (Miekeley et al., 1992; Zhao et al., 2007; Sun et al., 2012 and Stewart et al., 2017). The obtained removal of REY suggests that they could be coprecipitated with aluminum or ferric iron (Stewart et al., 2017) or directly as RE(OH)3 (Ziemkiewicz et al., 2016). The uranium behavior differs to the other elements and its efficiency removal increased throughout the treatment. Although great results were achieved in Phases II and III, with 75% of actual mine water the efficiency started to decline until the bioreactor collapsed. This collapse can be related with both: inflow pH drop and high concentration of metals.

REY and other metals were efficiently removed and after analysis, it was possible to confirm that they accumulated in the solid precipitates throughout the operation.

According to Zhao et al., 2007, the speciation modeling for the AMD samples indicated that the rare earth elements (REE) sulfate complexes are the main form of dissolved REE concentration in mine waters, representing more than 60% of total amount, followed by free metal species form. The high concentration of REY and sulfate and low pH of actual AMD treated in the present study suggest that the main formation of dissolved REY was probably represented by sulfate-form due its stable form. Once the sulfidogenesis was established and the internal pH increased, it made possible the precipitation of REY elements.

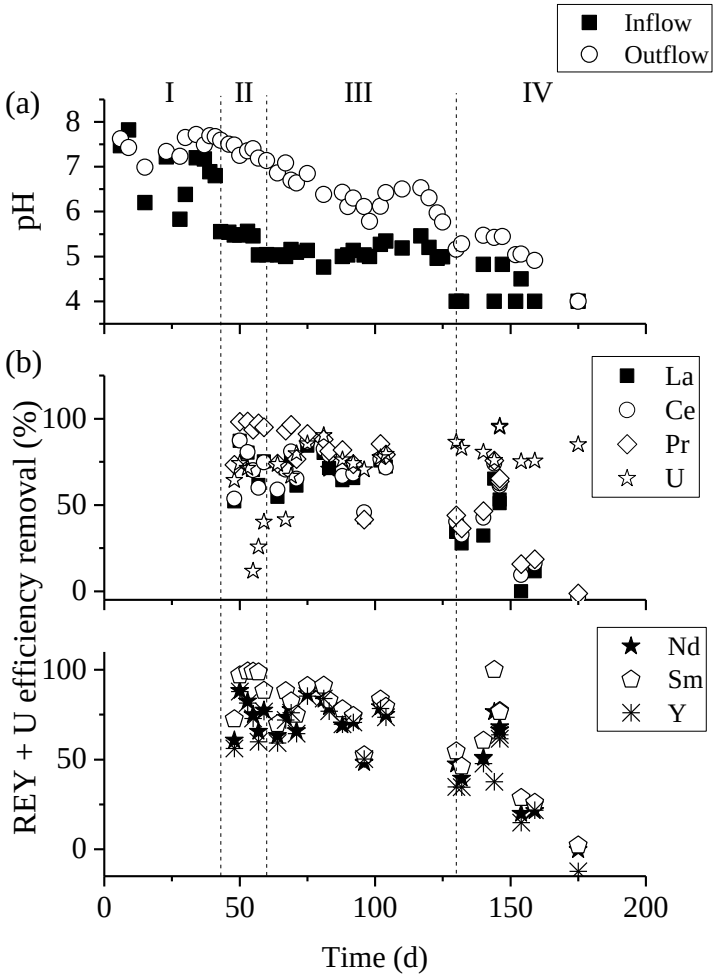


Figure 3: Inflow and outflow pH (a), REY and U removal from the dissolved fraction (b).

Based on the concentration of REY elements in the currently mine water (Table 1) and estimating that with anaerobic treatment 50% of total REY can precipitate in the bioreactor, to each 100 m^3 of AMD treated 4, 1, 0.5, 0.2 kg of La, Ce, Nd and Y, respectively, could be recovery. The price of Lanthanum oxide, Cerium oxide, Neodymium oxide and Yttrium oxide in 2018 was around 2, 2, 51 and 3 US$.kg^{-1}, respectively (U.S. Geological Survey, 2018). The price of REY can achieve more than 500 times the price of iron ore, for example and yttrium is the most valuable REY element analyzed in this study. More than 2400 m^3 of AMD is generated per day at BF4 and this volume is higher during the running seasons. Currently, the company has been spending more than 200 thousands of dollar with chemicals to increase the pH of the mine water in order to comply the environmental laws. In addition to the environmental advantage, the biological treatment has economic benefits as well and looks promising to recovery valuable elements from AMD.

Conclusion

The wastewater vinasse used as a carbon source for the biological treatment of actual AMD enabled the sulfidogenesis in the bioreactor. The alkalinity generated by sulfidogenesis was capable to increase the pH and remove the metals Al, Fe, Mn, Si, U and REY elements from dissolved phase. The chemical elements precipitated and accumulated in the bottom conical part of the bioreactor. It's conical shape in the bottom facilitated the discharge of biomass and metals accumulated after each phase.

This is the first study described using a sulfidogenic bioreactor to treat actual vinasse and actual AMD rich in REY and uranium, two wastewater, that was capable to remove efficiently valuable chemical elements.

The results highlighted the robustness of this bioreactor configuration and opened perspectives for simultaneous sulfate-reduction and metal and REY recovery in a single-unity.

References

APHA. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed. DC, Washington.

Ayora, C., Macías, F., Torres, E., Lozano, A., Carrero, S., José-Miguel Nieto, Pérez-López, R., Fernández-Martínez, A and Castillo-Michel, H. 2016. Recovery of Rare Earth Elements and Yttrium from Passive- Remediation Systems of Acid Mine Drainage. Environ. Sci. Technol. 50, 8255−8262.

Bekmezci, O.K., Ucar, D., Kaksonen, A. H., Sahinkaya, E. 2011. Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. J. Hazard.Mater.189, 670–676.

Cravotta, C. A. 2008. Dissolved metals and associated constituents in abandoned coalmine discharges, Pensylvania, USA. Part I: Constituents quantities and correlations. Appl. Geochem. 23, 166−202.

Falagán, C., Yusta, I., Sánchez-españa, J., Johnson, D. B. 2017. Biologically-induced precipitation of aluminium in synthetic acid mine water. Miner. Eng. 106, 79–85.

Godoi, L.A.G.; Foresti, E.; Damianovic, M.H.R.Z. 2017a. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. J. Environ. Manage.,197, 597–604.

Godoi, L.A.G.; Dos Santos, C. E. D., Foresti, E.; Damianovic, M.H.R.Z. 2017b. Evaluating and refining alkalinity calculations due to sulfide and bicarbonate accessed by titration in anaerobic sulfate-reducing bioreactors. Water Air Soil Pollut. 228, 322.

Hatje, V., Pedreira, R.M.A, Rezende, C. E., Schettini, C.A.F, Souza, G.C, Marin, D.C, Hackspacher, P.C. 2017. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. Sci. Rep. 7: 10706.

Kefeni, K. K., Msagati, T. A. M., Mamba, B. B. 2017. Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. J. Clean. Prod. 151, 475–493.

Miekeley, N., Couthino de Jesus, H., Porto da Silveira, C.L. 1992. Rare earth elements in groundwater from the Osamu Utsumi mine and Morro do Ferro analogue study sites, Poços de Caldas, Brazil. J. Geochem.Explor. 45, 365–387.

Sánchez-España, J. 2007. The Behavior of Iron and Aluminum in Acid Mine Drainage, December 2007.

Stewart, B.W., Capo, R.C., Hedin, B.C., Hedin, R.S. 2017. Rare earth element resources in coal mine drainage and treatment precipitates in the Appalachian Basin, USA, Int. J. Coal Geol. 169, 28–39.

Sun, H., Zhao, F., Zhang, M. and Lin, P. 2012. Behavior of rare earth elements in acid coal mine drainage in Shanxi Province, China. Environ. Earth Sci. 67, 205–213.

US Geological Survey. Mineral Commodity Summaries, 2019. http://dx.doi.org/10.3133/70180197

Zhao, F., Cong, Z., Sun, H. and Ren, D. 2007. The geochemistry of rare earth elements (REE) in acid mine drainage from the Sitai coal mine, Shanxi Province, North China. Int. J. CoalGeol. 70, 184–192.

Ziemkiewicz, P., He, T., Noble, A. and Liu, X. 2016. Recovery of rare earth elements (REEs) from coal mine drainage. Proc. 37th W. Virginia Surface mine Drainage Task Force Symposium :pp. 43–50. https://wvmdtaskforce.com/past-symposium-papers/2016-symposium-papers/.

SISTEMA COMBINADO ANAERÓBIO AERÓBIO/ANÓXICO PARA REMOÇÃO DE MATÉRIA CARBONÁCEA E NITROGENADA DE ESGOTO SANITÁRIO SALINO

Carolina T. Paula [1]; Márcia H. R. Z. Damianovic [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A salinização de aquíferos subterrâneos tem se intensificado em regiões de clima árido e semiárido e, juntamente à escassez hídrica, tem despertado interesse em todo o mundo. A demanda crescente por água para abastecimento público e industrial, que retorna na forma de águas residuárias para recarga dos aquíferos, tem contribuído para esse processo. Vários estudos aplicados ao tratamento biológico de efluentes salinos relatam que elevadas concentrações de sais em águas residuárias podem afetar negativamente o metabolismo microbiano. Entretanto, a maioria deles limita-se apenas à interferência do NaCl sobre os processos microbiológicos de tratamento. Uma alternativa de configuração de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), amplamente utilizada no Brasil nas últimas décadas, consiste na associação de processos de tratamento anaeróbio e aeróbio para remoção de matérias carbonácea e nitrogenada. Entretanto, ainda são escassos estudos que permitam a associação da influência dos sais presentes no esgoto à eficiência dos processos de conversão de matéria orgânica e nitrogenada em sistemas que combinam processos anaeróbios e aeróbios/anóxicos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de um sistema de tratamento de esgoto sanitário salino, composto por reatores de leito fixo estruturado anaeróbio e aeróbio/anóxico sequenciais, submetidos a diferentes níveis de salinidade.*

Introdução

A salinização de aquíferos subterrâneos tem sido observada de forma intensa em regiões de clima árido e semiárido, como relatado em estudos realizados em regiões áridas de vários países do mundo, como China, África do Sul, México e Brasil (Adams et al., 2001; Mahlknecht et al., 2004; Jiang, 2009). Além dos fatores naturais que colaboram para esse fenômeno, como baixo índice pluviométrico e elevada taxa de evaporação (concentração dos sais), e até a própria formação geológica dessas regiões, a demanda crescente por água para abastecimento público e industrial, que retorna na forma de esgoto para recarga dos aquíferos, também tem contribuído para esse processo (Sun et al., 2016).

No Brasil, o estresse hídrico está presente principalmente em estados do Nordeste e em parte do estado de Minas Gerais, resultando na salinização da água subterrânea que abastece os semiáridos e sertões dessas regiões (Cavalcante et al., 2017). O uso dessas águas para abastecimento tem como consequência a produção de esgoto sanitário salino, contribuindo para o processo de salinização com a ciclagem da água no ambiente. Os esgotos gerados a partir de águas de abastecimento salinas apresentam elevadas dureza, alcalinidade e concentrações de diversos elementos inorgânicos, como Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Cl^- e SO_4^{2-}, que podem trazer prejuízos à atividade microbiana de sistemas de tratamento biológicos de esgoto sanitário (Chen et al., 2008).

O efeito da presença de sais sobre os sistemas biológicos de tratamento de efluentes tem sido investigado recentemente. Estudos realizados em sistemas anaeróbios (Ismail et al., 2010; Sudmalis et al., 2018) e aeróbios (Wang et al., 2017; Macêdo et al., 2019) de tratamento contribuem para a verificação dos efeitos adversos desses sais. Entretanto, investigações que permitam associar os sais presentes nos esgotos sanitários, isoladamente ou combinados, à

eficiência dos processos de conversão de matéria orgânica e nitrogenada ainda são escassos e geralmente limitados à interferência do NaCl.

Uma alternativa de configuração de Estações de Tratamento de Esgoto que tem sido muito empregada atualmente consiste na associação de processos de tratamento anaeróbio e aeróbio para remoção de matérias carbonácea e nitrogenada. A aplicação de processo anaeróbio antecedendo o reator aeróbio possibilita a degradação de parte do material orgânico do esgoto bruto no reator anaeróbio, o que promove uma redução da demanda de oxigênio dissolvido (OD), e consequentemente dos custos com aeração, bem como da massa de lodo produzida no sistema aeróbio (Sousa; Foresti, 1996).

Para a remoção biológica de nitrogênio, utilizam-se, em grande medida, sistemas com processos de nitrificação e desnitrificação, os quais ocorrem, respectivamente, em reatores aeróbio e anóxico sequenciais, com recirculação interna. Entretanto, a consideração desses dois processos em uma câmara única – nitrificação e desnitrificação simultâneas (NDS) – tem sido estudada e reconhecida como uma alternativa promissora para alcançar uma remoção eficiente de nitrogênio no tratamento de efluentes (Do Canto et al., 2008; Moura et al., 2012; Santos et al., 2016). No processo NDS, os gradientes de concentração de oxigênio decorrentes da limitação da difusão de oxigênio levam à formação de microambiente anóxico nas partes internas do biofilme. Assim, as bactérias desnitrificantes heterotróficas podem se tornar dominantes no interior dos biofilmes, enquanto as bactérias nitrificantes (aeróbias) são ativas na superfície dos biofilmes, de modo que a nitrificação e desnitrificação podem ocorrer de forma simultânea no mesmo reator (Pochana; Keller, 1999).

Vários estudos afirmam que a salinidade nos esgotos, devida a sais específicos avaliados isoladamente, apresenta efeito tóxico sobre as comunidades microbianas anaeróbias (Ismail et al., 2010; Sudmalis et al., 2018) e aeróbias/anóxicas (lodo misto) (Wang et al., 2017; Macêdo et al., 2019), em processos biológicos de tratamento. Mas a associação desses dois tipos de tratamento com aplicação de efluente sanitário salino, em fluxo contínuo, ainda precisa ser avaliada.

Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir no preenchimento da lacuna sobre a utilização de processos anaeróbio e aeróbio combinados, visando à remoção de matérias carbonácea e nitrogenada de esgoto sanitário salino, contemplando aspectos relacionados à interferência de diferentes sais no desenvolvimento dos processos.

Material e Métodos

O experimento será dividido em três etapas (Etapas I, II e III). Na Etapa I, serão realizados ensaios em batelada com lodo não halofílico, para determinar as concentrações limites de sais suportadas pela biomassa de inóculo para os processos de metanogênese, nitrificação e desnitrificação. Nas Etapas II e III, serão operados dois reatores de leito fixo estruturado, um anaeróbio e outro aeróbio/anóxico, alimentados com efluente sanitário salino sintético, com salinidade definida a partir dos resultados obtidos na Etapa I.

Etapa I – Ensaios em batelada

A Etapa I terá caráter exploratório e o objetivo de avaliar as concentrações limites de sais suportadas pelos lodos anaeróbio e aeróbio não halofílicos, a serem utilizados como inóculos dos reatores de leito estruturado. Os inóculos serão provenientes de sistemas de tratamento de águas residuárias não halofílicas, com potencial metanogênico e nitrificante, respectivamente, para testes anaeróbios e aeróbios/anóxicos. Será avaliada a atividade da biomassa (não halofílica) em meio salino nos processos anaeróbios via metanogênese (ensaio IA), aeróbios para a nitrificação (ensaio IB) e anóxicos para desnitrificação (ensaio IC). Cada ensaio (IA, IB, e IC) será realizado para diferentes concentrações de sais e os níveis de salinidade aplicados serão baseados nos resultados de Macêdo et al. (2019), que consideraram

a concentração de sais dos mananciais subterrâneos destinados ao abastecimento doméstico de 18 municípios do sertão do estado de Alagoas (região semiárida do país) (Tabela 1).

Tabela 1: Condições a serem aplicadas para cada ensaio (IA, IB e IC).

Condição	NaCl ($g.L^{-1}$)	$MgCl_2$ ($g.L^{-1}$)	$CaCl_2$ ($g.L^{-1}$)
1	1,87	0,78	0,24
2	6,22	2,62	0,80
3	11,20	4,71	1,44

Fonte: adaptado de Macêdo et al. (2019).

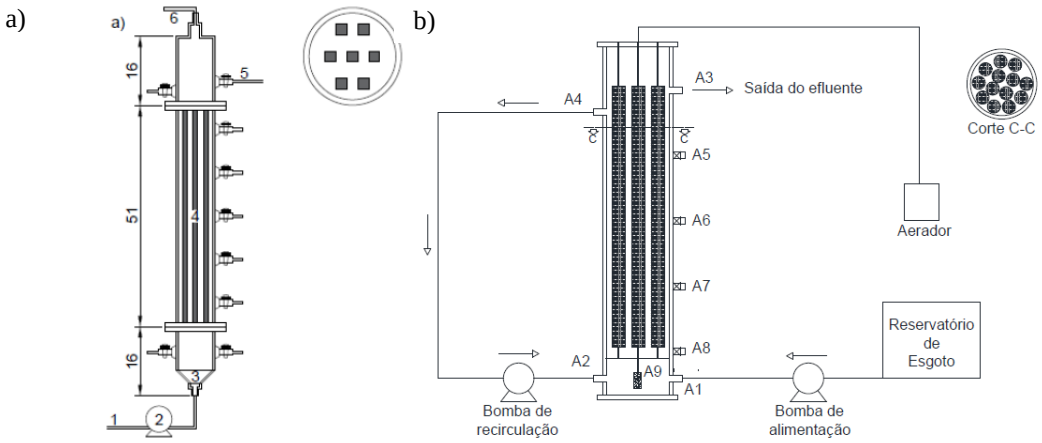
Água residuária

A alimentação dos reatores será realizada com água residuária salina sintética, composta por DQO de 900 $mg.L^{-1}$ e concentração de nitrogênio amoniacal de 60 $mg.L^{-1}$, sendo caracterizado como esgoto sanitário concentrado. As concentrações de sais (NaCl, $CaCl_2$ e $MgCl_2$) utilizadas serão definidas com base nos resultados obtidos na Etapa I.

Etapas II e III – Ensaios em reatores biológicos contínuos

Serão operados, em fluxo contínuo, e monitorados reatores de leito fixo estruturado anaeróbio (R1) (baseado em Florêncio, 2018) e aeróbio/anóxico (R2) (baseado em Moura, 2014 e Macêdo et al., 2019), ambos com suporte composto por espuma de poliuretano, alimentados por efluente sanitário salino sintético (Figura 1).

Figura 1 – Configuração dos reatores a serem utilizados na pesquisa: a) Reator anaeróbio, R1; b) Reator aeróbio/anóxico, R2.



Fonte: a) Florêncio (2018); b) Moura (2014).

Durante a Etapa II, os reatores serão operados em fluxo contínuo e de forma independente, sendo a salinidade no afluente gradualmente elevada, para adaptação da biomassa à condição salina. Além da solução de eletrólitos mistos, o reator anaeróbio será alimentado pelo efluente sanitário salino sintético proposto (900 $mgDQO.L^{-1}$ e 60 $mgN\text{-}NH_4^+.L^{-1}$) e o reator aeróbio/anóxico será alimentado por um efluente sintético simulando o efluente do reator anaeróbio. Essa forma de operação possibilita a verificação da capacidade de cada unidade na função para a qual será projetada. Na Etapa III do experimento, os reatores serão associados, com operação em série, de modo que o reator aeróbio/anóxico receberá o efluente diretamente do reator anaeróbio.

Uma vez atingido o estado estacionário pelo sistema, ao final de cada etapa, serão realizados ensaios em batelada, conforme item 4.1.2, para caracterização cinética da biomassa desenvolvida em ambos os reatores nas condições estudadas.

Inóculo

Para a inoculação dos reatores, serão utilizadas composições de lodos com atividade metanogênica, nitrificante e desnitrificante associados a lodo bentônico coletado em ambiente estuarino. Os sedimentos bentônicos serão coletados em um complexo estuarino de Santos/SP e incorporados aos inóculos dos reatores com o objetivo de inserir microrganismos resistentes à salinidade. Esse procedimento será adotado para acelerar a adaptação da comunidade microbiana à condição salina, conforme Macêdo et al. (2019).

O reator anaeróbio R1 será inoculado a partir de composição, na proporção de 50% em concentração, da maceração dos grânulos do lodo de reator UASB proveniente do tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (Tietê/SP) e do sedimento estuarino coletado em Santos/SP. Já o reator R2 será inoculado com a seguinte composição: lodo proveniente de reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuárias da Avícola Dacar (Tietê/SP) (25%), com capacidade desnitrificante; lodo proveniente de sistema de lodos ativados com atividade nitrificante, da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP) (50%), e sedimento estuarino coletado em Santos/SP (25%) (Macêdo et al., 2019).

Análises físico-químicas

O sistema será monitorado por meio de análises físico-químicas, sendo avaliados os parâmetros de Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, série de sólidos suspensos, Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, sulfato e sulfeto conforme APHA et al. (2012), além de alcalinidade (Ripley et al., 1986) e da composição do biogás (Adorno et al., 2014). O oxigênio dissolvido no meio líquido do reator será monitorado com sonda de medidor por luminescência Hach, modelo LDO HQ10, e o potencial de óxido-redução (pOR) será medido em sensor Intellical ORP-Redox MTC 101 (Hach).

Análises biomoleculares

As análises biomoleculares serão realizadas com o objetivo de verificar a diversidade microbiana existentes nos sistemas por meio da técnica de PCR/DGGE, a qual consiste em três principais etapas: a) Extração do DNA seguindo Griffiths et al. (2000); b) amplificação por reação em cadeia polimerase, usando *primers* 968 F GC e 1392 R (Nielsen et al., 1999); c) separação do fragmento alvo pela desnaturação parcial da dupla hélice, pela técnica de DGGE. As amostras serão analisadas por microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência.

Referências Bibliográficas

Adams, S.; Titus, R.; Pietersen, K.; Tredoux, G.; Harris, C., 2001. Hydrochemical characteristics of aquifers near Sutherland in the Western Karoo, South Africa. Journal of Hydrology, 241(1-2), 91-103.

Adorno, M.; Hirasawa, J.; Varesche, M., 2014. Development and validation of two methods to quantify acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). American Journal of Analytical Chemistry, 5, 406-414.

APHA; AWWA; WEF. 2012. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 22nd ed.; APHA: Washington D.C.; AWWA: Denver, Colorado; WEF: Alexandria, Virginia.

Cavalcante, K. L.; Deon, M. D.; Silva, H. K. P., 2017. Estudo das características restritivas dos efluentes das estações de tratamento de esgoto de Petrolina-PE para uso na agricultura irrigada. Revista Brasileira de Agricultura Irrigada, 11(2), 1331-1338.

Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S., 2008 Inhibition of anaerobic digestion process: a review. Bioresource Technology, 99, 4044-4064.

Do Canto C. S. A.; Rodrigues, J. A. D.; Ratusznei, S. M.; Zaiat, M.; Foresti, E., 2008. Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. Bioresource Technology, 99(3), 644-654.

Florêncio, T. M., 2018. Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado com corante azo Direct Black 22 na presença de íons sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com fluxo ascendente. Universidade de São Paulo.

Griffiths, R. I.; Whiteley, A. S.; O'donnell, A. G.; Bailey, M. J., 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and RNA-based microbial community composition. Applied and Environmental Microbiology, 66(12), 5488-5491.

Ismail, S. B.; La Parra, C. J.; Temmink, H.; Van Lier, J. B., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. Water Research, 44(6), 1909-1917.

Jiang, Y., 2009. China's water scarcity. Journal of Environmental Management, 90(11), 3185-3196.

Macêdo, W. V., Santos, C. E. D., Guerrero, R. B. S., Sakamoto, I. K., Amorim, E. L. C., Azevedo, E. C., Damianovic, M. H. R. Z., 2019. Establishing simultaneous nitrification and denitrification under continuous aeration for the treatment of multi-electrolytes saline wastewater. Bioresource Technology, 288.

Mahlknecht, J.; Schneider, J. F.; Merkel, B. J.; Leon, I. N.; Bernasconi, S. M., 2004. Groundwater recharge in a sedimentary basin in semi-arid Mexico. Hydrogeology Journal, 12(5), 511-530.

Moura, R. B.; Damianovic, M. H. R. Z.; Foresti, E., 2012. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. Journal of Environmental Management, 98, 63-167.

Moura, R. B., 2014. Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação do efluente. Universidade de São Paulo.

Nielsen, T. A.; Liu W. T.; Filipe C.; Grady L.; Molin S.; Stahl D. A., 1999. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. Applied and Environmental Microbiology, 65(3), 1251-1258.

Pochana, K.; Keller, J., 1999. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). Water Science and Techonology, 39(6), 61-68.

Ripley, L. E.; Boyle, W. C.; Converse, J. C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. Journal of the Water Pollution Control Federation. 58(5), 406-411.

Santos, C. E. D.; Moura, R. B.; Damianovic, M. H. R. Z; Foresti, E., 2016. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). Journal of Environmental Management, 166, 519-524.

Sousa, J. T.; Foresti, E., 1996. Domestic sewage treatment in an upflow anaerobic sludge blanket – sequencing batch reactor system. Water Science & Technology, 33(3), 73-84.

Sudmalis, D.; Gagliano, M. C.; Pei, R.; Grolle, K.; Plugge, C. M.; Rijnaarts, H. H. M.; Zeeman, G.; Temmink, H., 2018. Fast anaerobic sludge granulation at elevated salinity. Water Research, 128, 293-303.

Sun, Z.; Ma, R.; Wang, Y.; Hu, Y.; Sun, L., 2016. Hydrogeological and hydrogeochemical control of groundwater salinity in an arid inland basin: Dunhuang Basin, northwestern China. Hydrological Processes, 30(12), 1884-1902.

Wang, Z.; Van Loosdrecht, M. C. M.; Saikaly, P. E., 2017. Gradual adaptation to salt and dissolved oxygen: Strategies to minimize adverse effect of salinity on aerobic granular sludge. Water Research, 124, 702-712.

PRODUÇÃO DE CÉLULAS RICAS EM PROTEÍNAS A PARTIR DO CULTIVO DE BIOMASSA MICROBIANA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO A VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Rafaela Carvalho Paula [1]; Marcelo Zaiat [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A constante busca por biocombustíveis, incluindo etanol e biodiesel, tem sido impulsionada para garantir a segurança energética, reduzir gases de efeito estufa e desenvolvimento econômico rural. Durante o processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol ocorre a geração de expressivos volumes de vinhaça, a qual comumente é tratado via fertirrigação, no entanto, pode ser um potencial poluidor se descartado em dosagens excessivas no solo. Ao mesmo tempo a pecuária se destaca como a maior usuária de terras mundial, com pastagens e terras destinadas a produção de ração. A integração cana-pecuária possui potencial para reduzir os impactos da disposição da vinhaça e ainda a redução da necessidade de outras culturas para produção de proteína, diminuição do custo da ração e redução da necessidade da área de pastagem. O objetivo principal do projeto compreende em avaliar a aplicabilidade do uso da vinhaça como substrato para produção de células ricas em proteínas por meio da produção de leveduras e bactérias aeróbias. Pretende-se avaliar a produção de células microbianas utilizando diferentes inóculos e, ainda, indicar um modo de alimentação (bateladas ou batelada alimentada, ambas sequenciais) em um reator de mistura para obtenção de matriz proteica.*

Introdução

A demanda mundial por etanol, oriundo de fontes renováveis, e as condições climáticas favoráveis tornam o país promissor na capacidade de crescimento e produtividade da cana-de-açúcar. A produção de etanol total do país na última safra (2016/2017) foi de aproximadamente 26 milhões de metros cúbicos, sendo que o estado de São Paulo se destaca concentrando 51% da produção (Unica, 2017).

É notável a contribuição do setor sucroenergético na economia brasileira, no entanto, o processamento da cana-de-açúcar para produção de seus derivados provoca impactos ambientais e sociais relevantes. O principal resíduo gerado na produção de etanol é a vinhaça, sendo obtido em uma faixa de 9 a 15 L de água residuária por litro de etanol obtido (Ferraz Júnior et al., 2014; Wheatley, 1990).

A expansão do uso de terras para produção de biocombustíveis com base na produção de alimentos pode comprometer o uso da terra para produção de alimentos e rações e, consequentemente, aumentar o preço dos alimentos.

A pecuária se destaca como a maior usuária mundial de recursos terrestres, devido as pastagens e terras agrícolas destinadas à produção de ração as quais representam quase 80 % de toda a terra agrícola utilizada.

Neste contexto, a integração cana-pecuária ocasiona benefícios uma vez que ao associar estes dois sistemas agrícolas é possível obter proteína para ser suplementada em ração animal e biocombustíveis sustentáveis.

A vinhaça que, comumente tratada por fertirrigação, prática em que o efluente é dispensado diretamente no solo, atuando como fertilizante na própria cultura de cana-de-açúcar (Silva; Griebeler; Borges, 2007) pode ser utilizada como substrato para obter produção de proteína. Nitayavardhana et al. (2013) estudaram o crescimento de biomassa fúngica (*Rhizopus oligosporus*) em fermentador *Airlift* e obtiveram crescimento de biomassa igual a (8,04 ± 0,80) $g_{biomassa\ gerada}/\ g_{biomassa\ inicial}$, com teor de proteína cru de aproximadamente 50%. Pires et al.

(2016) avaliaram o crescimento de culturas mistas de levedura, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, em um fermentador BIOSTAT® e obtiveram rendimento em biomassa igual a 5,86 g L^{-1} dia^{-1} e, análises da biomassa indicaram 53,31% em proteína.

Desta forma, a relevância deste projeto reside no fato de propor novas alternativas para utilização da vinhaça de cana-de-açúcar, efluente o qual é tido como um potencial poluidor e, neste trabalho, será utilizado como substrato para produção de células ricas em proteínas para posterior uso em suplementação de ração animal, tendo assim retorno econômico, ambiental e social.

Material e Métodos

O projeto visa estudar o cultivo de células ricas em proteínas a partir de dois inóculos diferentes, levedura e bactérias aeróbias. Desta forma, as etapas descritas a seguir serão realizadas, primeiramente, para obtenção de leveduras ricas em proteínas para posteriormente iniciar novamente todo o ciclo para obtenção de bactérias aeróbias ricas em proteínas.

Microrganismos

Para produção de leveduras será utilizado *Saccharomyces cerevisiae* comercial, provinda do produto comercial Fermento Biológico Fresco Massa Doce Itaiquara®. A cultura será crescida em meio YPD com 0,6% extrato de levedura, 0,6% peptona e 1,2% glicose (w/v) até a população atingir 10^7 UFC mL^{-1}. Após crescimento a cultura será preservada em glicerol (20% v/v) a -80 ºC.

Para cultivo de bactérias aeróbias o inóculo a ser utilizado será coletado de uma planta de lodos ativados proveniente da estação de tratamento de águas residuárias da Fábrica de Motores da Volkswagen (São Carlos/SP), o qual será conservado em geladeira a 4 ºC, para preservar as culturas microbianas até sua utilização.

No início dos experimentos, serão determinados a concentração de sólidos voláteis totais e suspensos para ambos os inóculos. Para leveduras, será determinada a viabilidade celular por contagem de células em câmara de Neubauer utilizando corante azul de metileno.

Água residuária

O afluente será a vinhaça da cana-de-açúcar *in natura*, a qual será obtida em uma indústria sucroalcooleira, Usina São Martinho (Pradópolis - São Paulo). A coleta da vinhaça será realizada imediatamente após a destilação do vinho e será congelada a -15 ºC até o uso.

As características físico-químicas da vinhaça a serem determinadas serão: pH, demanda química de oxigênio total (DQO_t) e solúvel (DQO_s), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), carbono orgânico total (COT), nitrogênio total Kjendal (NTK), fósforo, potássio, sulfato, sólidos totais (ST), voláteis (SVT) e fixos (SFT) (APHA; AWWA; WEF, 2012).

Delineamento Experimental Composto Central Rotacional (DCCR)

Com objetivo de identificar como as variáveis pH, temperatura e concentração de inóculo interferem no processo de obtenção de células ricas em proteínas um DCCR será implementado. Desta forma, no DCCR serão estudados 3 variáveis com 6 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios.

O DCCR será realizado para ambos os inóculos a serem avaliados: levedura e inóculo aeróbio. Os valores reais para os níveis serão definidos especificamente para cada inóculo, como expresso na Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente para levedura e bactérias aeróbias.

Os ensaios serão conduzidos em triplicata em frascos Erlenmeyers com volume de 1000 mL e volume útil de 400 mL e submetidos a uma mesa agitadora tipo shaker com alta rotação (170 rpm) e aerados por meio de compressor de ar e difusor de pedra porosa. A vazão de ar será regulada de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido (OD) mínima de 2 $mg.L^{-1}$. Nesta etapa a vinhaça será esterilizada em autoclave a 120 ºC durante 20 minutos.

Tabela 1: Valores reais para os níveis no DCCR utilizando leveduras.

Variáveis	***Níveis***				
	-1,6818	**-1**	**0**	**1**	**1,6818**
Temperatura (ºC)	24,09	27,5	32,5	37,5	40,91
pH	2,82	3,5	4,5	5,5	6,18
Levedura (g SSV.L^{-1})	0,51	1,40	2,7	4,0	4,89

Tabela 2: Valores reais para os níveis no DCCR utilizando bactérias aeróbias.

Variáveis	***Níveis***				
	-1,6818	**-1**	**0**	**1**	**1,6818**
Temperatura (ºC)	25,27	28,0	32,0	36,0	38,73
pH	4,82	5,5	6,5	7,5	8,18
Bactéria (g SSV.L^{-1})	0,51	1,40	2,7	4,0	4,89

O monitoramento dos reatores por meio das análises físico-químicas será realizado em intervalos de 6 horas, até verificar a estabilidade nos dados coletados. A resposta analisada no delineamento experimental será o teor de proteína na célula. A ordem de realização dos ensaios será definida aleatoriamente a fim de evitar quaisquer interferências no experimento.

Cinética Microbiana

Por meio do método das velocidades iniciais, pretende-se obter o modelo cinético que melhor represente o consumo de substrato para os inóculos a serem estudados.

Os ensaios serão conduzidos em triplicatas em frascos de Erlenmeyer com volume de 1000 mL e volume útil de 400 mL, mantidos em um shaker com rotação de 170 rpm e aerados por meio de compressor de ar e difusor de pedra porosa, mantendo a concentração de OD mínima de 2 mg.L^{-1}. As análises de monitoramento serão realizadas em intervalos de 1 hora. A faixa de concentração de substrato a ser estudada será de 2,5 g DQO.L^{-1} até 30 g DQO.L^{-1} (vinhaça bruta), com incremento de 2,5 g DQO.L^{-1}.

Biorreator

O cultivo das células ricas em proteínas será realizado em um reator de tanque agitado operado, em tempos distintos, em duas modalidades diferentes: batelada e batelada alimentada, ambas sequenciais. A Figura 1 ilustra o modelo do reator a ser operado.

Testes de transferência de oxigênio do ar para o meio líquido serão realizados antes do início da operação do reator com intuito de estimar a velocidade de consumo de oxigênio por massa de células microbianas (Q_{O2}) e o coeficiente volumétrico global de transferência de massa (K_La). Estes parâmetros serão obtidos pelo método dinâmico, conforme descrito por Fazolo (2003).

O reator possui volume total de 5 L, com volume útil de 3 L, agitação mecânica por eixo central e impelidor tipo pá plana. A agitação será mantida em 60 rpm. O reator possui camisa térmica para controle de temperatura, a qual será mantida temperatura ótima obtida no delineamento experimental central composto rotacional.

O reator será aerado por meio de compressor de ar e difusor de pedra porosa. A vazão de ar será regulada para manter concentração de oxigênio desejada. As taxas de fluxo de ar a serem estudas serão de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vvm. O tempo de ciclo e a concentração de microrganismos a ser inoculada no reator serão definidos após a análise cinética.

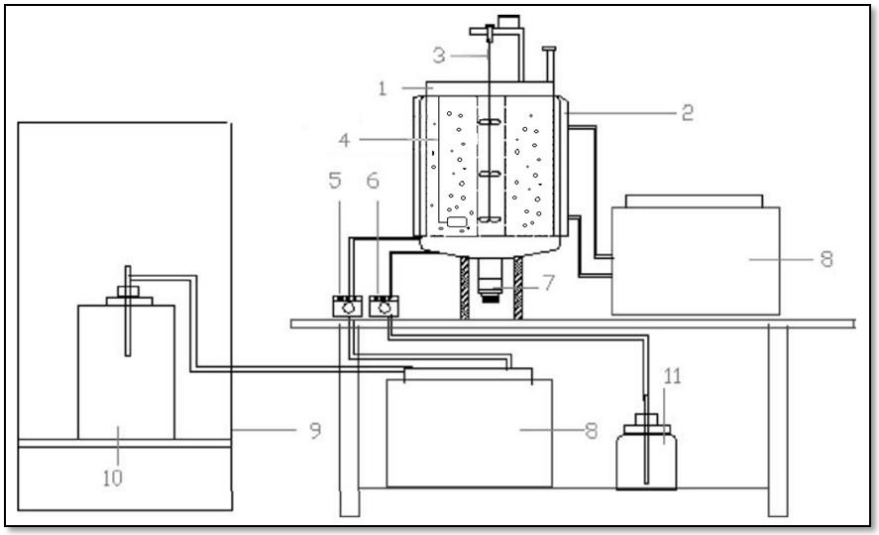


Figura 1: Esquema do reator de tanque agitado. 1-Tanque de reação; 2- Camisa térmica; 3- Agitador mecânico; 4- Borbulhador de gás; 5- Bomba de alimentação; 6- Bomba de descarte; 7- Descarte de lodo; 8- Banho térmico; 9- Refrigerador; 10- reservatório da vinhaça; 11- Coletor do efluente.
Fonte: Adaptado de Cubas et al. (2004).

Métodos Analíticos

As análises de monitoramento dos reatores serão pH, demanda química de oxigênio total (DQO_t) e solúvel (DQO_s), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos e voláteis (SSF e SSV) (APHA et al., 2012), carboidratos totais (CH) (DuBois et al., 1956), glicose, sacarose e açúcar total (Nelson, 1944), ácidos orgânicos voláteis e álcoois (Lazaro et al., 2008), glicerol (Greenhill, 2004) e ácido láctico (Taylor, 1996). A viabilidade celular será determinada por câmara de Neubauer empregando a técnica de coloração com azul de metileno. A concentração de oxigênio dissolvido será monitorada por meio de um medidor multiparâmetros da marca Hach (HQ40D), equipado com sonda de luminescência para oxigênio dissolvido (LDO101).

As biomassas obtidas serão analisadas com intuito de obter o teor de nitrogênio, o qual será determinado pelo método Kjeldahl (Apha et al., 2012), para então estimar o teor de proteína cru utilizando o fator de conversão de 6,25 (N x 6,25). A composição de amino ácidos totais também será determinada de acordo com a metodologia descrita por Pires et al. (2016).

Análise Estatística

Os experimentos e análises serão conduzidos em triplicatas e os resultados obtidos serão analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e testes de Turkey pelo programa SAS (Statistical Analysis System, Version 9.1).

Resultados Esperados e Forma de Análise

Por meio do DCCR será avaliado os principais fatores que influenciam no crescimento microbiano e consumo de substrato, desta forma espera-se obter as condições ótimas (temperatura, pH e concentração de inóculo) para produção de células ricas em proteína. Com intuito de estimar os parâmetros do modelo de regressão, os quais correlaciona as variáveis analisadas e fornece também o coeficiente de correlação (r^2) será aplicada a análise de regressão múltipla. O ajuste dos dados experimentais será analisado ao nível de significância de 95%.

O ensaio cinético será conduzido na condição ótima obtida no DCCR e, por meio deste, determinará a velocidade inicial de reação de consumo de substrato e crescimento celular. Desta forma, será determinado os parâmetros cinéticos como a constante de velocidade (k). Os dados

cinéticos serão essenciais para determinar se há inibição, o tempo de ciclo de operação do reator e o tempo de geração celular.

Os resultados experimentais obtidos serão analisados por meio de modelos cinéticos descritos na literatura com intuito de estimar os parâmetros cinéticos por meio de regressões não lineares e verificar, principalmente, o rendimento celular e a simulação de reatores em maior escala.

A operação do biorreator será avaliada perante ao modo de alimentação – batelada convencional ou alimentada, assim como ao fluxo de ar e inóculo que apresentam maior eficiência para obtenção da matriz proteica.

Referências Bibliográficas

APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Edição: 22nd Revised ed. ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Cubas, S.A., Foresti, E., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., 2004. Influence of liquid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. Biochem. Eng. J. 17, 99–105.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Fazolo, A., 2003. Determinação de parâmetros cinéticos e de transferência de massa em reator radial aeróbio-anóxico alimentado com esgoto sanitário tratado em reator anaeróbio (text). Universidade de São Paulo.

Ferraz Júnior, A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrog. Energy 39, 16852–16862.

Greenhill, S., 2004. Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. US20040137546A1.

Lazaro, C.Z., HIRASAWA, J.S., Varesche, M.B.A., Adorno, M.A.T., 2008. Development of an hpl method for the analysis of eleven short chain organic acids in bioproduction of hydrogen. Presented at the XII COLACRO, Florianópolis, SC, Brazil.

Nelson, N., 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153, 375–380.

Nitayavardhana, S., Issarapayup, K., Pavasant, P., Khanal, S.K., 2013. Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate. Bioresour. Technol. 133, 301–306.

Pires, J.F., Ferreira, G.M.R., Reis, K.C., Schwan, R.F., Silva, C.F., 2016. Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution. J. Environ. Manage. 182, 455–463.

Silva, M.A.S. da, Griebeler, N.P., Borges, L.C., 2007. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. Rev. Bras. Eng. Agríc. E Ambient. 11, 108–114.

Taylor, K.A.C.C., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochem. Biotechnol. 56, 49–58.

UNICA, 2017. União da indústria de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=95>. Acesso em: 7 nov. 2017.

Wheatley, A. (Ed.), 1990. Anaerobic digestion: a waste treatment technology, Critical reports on applied chemistry. Elsevier Applied Science ; Sole distributor in the USA, Elsevier Science Pub. Co, London ; New York : New York, NY, USA.

EVALUATION OF CONCENTRATION TECHNOLOGIES IN THE DESIGN OF BIOREFINERIES FOR THE RECOVERY OF RESOURCES FROM VINASSE

Fernanda S. Peiter [1], Nicholas P. Hankins [2], Eduardo Cleto Pires [3]

[1] Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Ciências da Engenharia da Universidade de Oxford;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Abstract. *This research evaluated five designs of vinasse biorefineries by exergy analysis. The design incorporated anaerobic bioreactors followed by concentration technologies: evaporation, reverse osmosis and forward osmosis. Draw solution regeneration methods were also analyzed. The results indicated that the combination of anaerobic digestion and reverse osmosis had the highest exergy efficiency (62%) while evaporators were the most feasible in terms of costs. Both alternatives are interesting and the final choice depends on the technology available and local economy. The treatment of 491.76 m^3/h of vinasse (exergy rate of 60513.8 kW) to recover 70% of water could reduce external water requirement by 66% and generate 28% additional electricity for the sugarcane plant.*

Introduction

The most common methods analyzed on the advance of technologies to recover resources from vinasse are anaerobic digestion and concentration. Anaerobic digestion produce methane-rich biogas and a nutrient-rich supernatant, while concentration using evaporators and membrane processes produces water to reuse and a concentrated liquid. The incorporation of such technologies into a biorefinery requires an evaluation of various configurations to determine the one with the highest overall resource recovery. Exergy analysis measures the sustainability of a system, encompassing not only the quantity but also the quality of the input and output streams of the processes (Dincer and Rosen, 2013).

Evaporation has been employed as a method to decrease the volume of vinasse and, hence, expenditure pertaining to its transport. However, it is one of the operational units that consumes the most energy in industrial plants (Carvalho and Silva, 2011).

Recent studies have addressed the use of membrane processes such as reverse osmosis and forward osmosis for concentrating vinasse. In reverse osmosis, hydraulic pressure is used as the driving force, whereas forward osmosis is an osmotically driven process. The high amount of electricity required for separation limits the application of reverse osmosis. The challenges in forward osmosis are the determination of suitable draw solutions to drive the transmembrane flux and the draw solution regeneration step required (Johnson et al., 2018).

Several regeneration processes as evaporation, reverse osmosis, and membrane distillation, which is an emerging process based on a temperature gradient created across a microporous hydrophobic membrane, can be applied (Ali et al., 2016).

Membrane filtration technologies usually require less energy and smaller footprint than evaporators. However, a common problem in this process is fouling when significant levels of solids and organic matter are present in the liquid feed (Park et al., 2015).

Therefore, evaporators, membrane processes, and anaerobic bioreactors were the technologies considered in this research. In general, they can solve fertigation-related problems and also provide advantages such as improvement in the sustainability of the sugarcane industry, promotion of water recycling, and energy production.

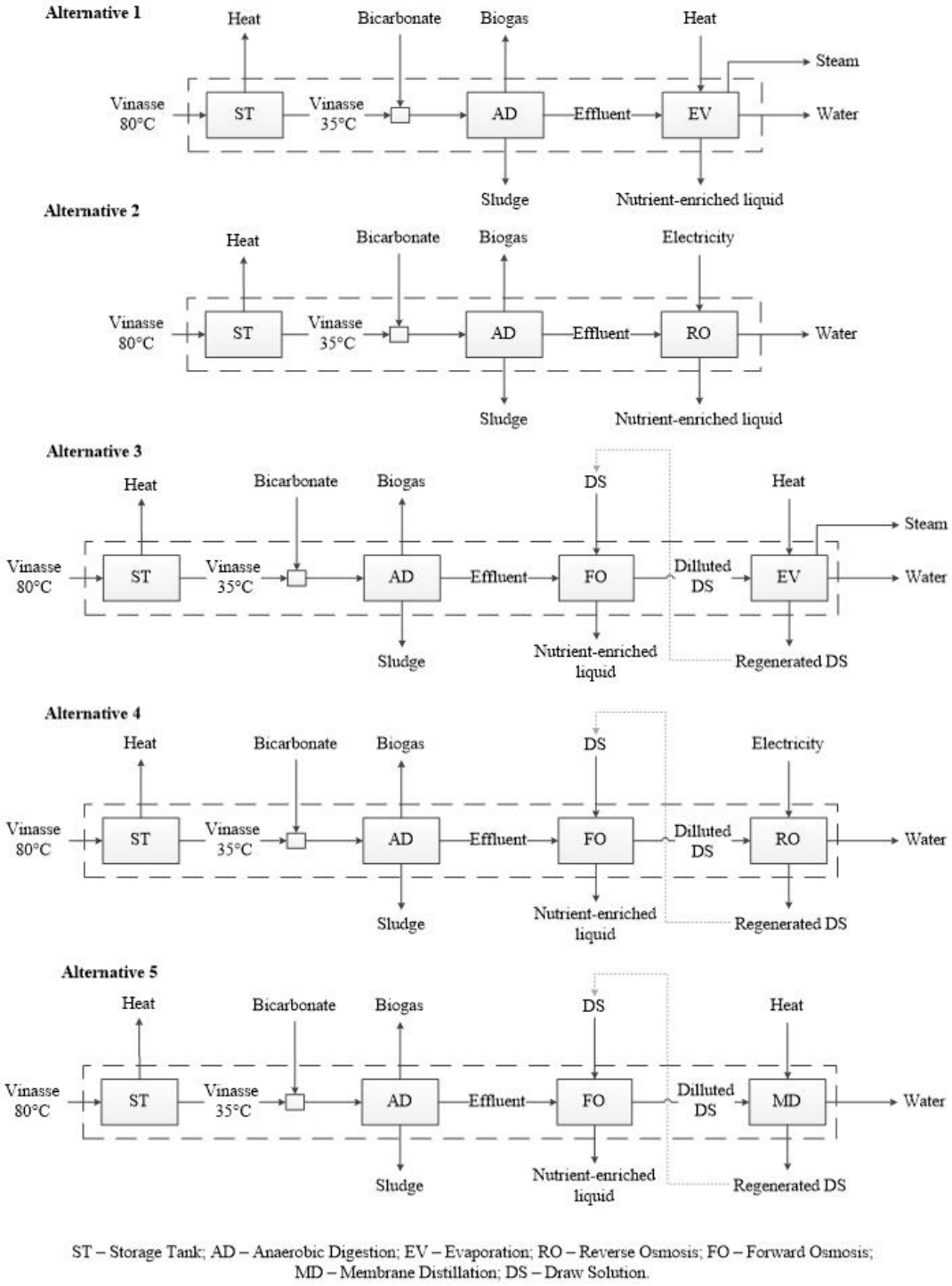
Materials and Methods

Five different configurations were considered for the design of a vinasse biorefinery:

- Alternative 1 (A1): anaerobic digestion + evaporation
- Alternative 2 (A2): anaerobic digestion + reverse osmosis
- Alternative 3 (A3): anaerobic digestion + forward osmosis + evaporation
- Alternative 4 (A4): anaerobic digestion + forward osmosis + reverse osmosis
- Alternative 5 (A5): anaerobic digestion + forward osmosis + membrane distillation

Mass and energy balances

A scheme of balances is presented in Figure 1.



ST – Storage Tank; AD – Anaerobic Digestion; EV – Evaporation; RO – Reverse Osmosis; FO – Forward Osmosis; MD – Membrane Distillation; DS – Draw Solution.

Figure 1: Scheme of the material and energy balances.

a) Anaerobic digestion

A storage tank for cooling vinasse from 80 °C to 35 °C was considered to bring the vinasse to a temperature within the recommended range for anaerobic digestion (Chernicharo, 2007). The calculations for methanogenic nutritional requirement, sludge production, and generation of biogas in the anaerobic bioreactor were based on the methodology presented by Chernicharo (2007). Mathematical simulations were conducted by considering that the biogas was composed of methane, CO_2, H_2S and water vapor. A spark-ignition engine with electrical and thermal efficiencies of 41% and 46% was considered for the conversion of the chemical energy of biogas into electrical energy. After balances for the anaerobic digestion unit, the osmotic pressure of the anaerobic digestion effluent was estimated by the van't Hoff equation (Atkins and Paula, 2010).

b) Evaporators

The study considered the traditional design of a multi-effect evaporator with five effects. The temperature of the first effect was 115 °C and pressure was $1.69 \cdot 10^5$ Pa. The balances included analyses of the vapor and liquid streams. The calculation for a multi-effect evaporator was based on the methodology proposed by Foust et al., (1960) and McCabe et al., (1985). The Brix index (1 g-solute/100 g-solution) was used to express the total solid concentration in the liquid (Kimball, 1991).

c) Membrane filtration

The water transmembrane flux in the reverse osmosis unit was calculated using Equation 1, where *Jw* is the transmembrane water flux (m/s), *A* is the water permeability constant (m² s/kg), ΔP is the pressure gradient (Pa), and $\Delta \Pi$ is the osmotic pressure gradient (Pa) (Baker, 2012).

$$Jw = A \cdot (\Delta P - \Delta \Pi) \quad (1)$$

The alternatives A3, A4, and A5 were designed using a process of forward osmosis combined with a method for regeneration of the draw solution. NaCl was regarded as a draw solution in the calculation phase since it is a well-studied solution widely applied in the development of transmembrane flux models for forward osmosis. In the balances for the forward osmosis unit, the reverse flux in the membrane was considered as described in the model developed by Suh and Lee (2013):

$$Js = B \cdot \left\{ \left[(C_{DS} + Jsw) / \left(exp(Js \cdot K / Jsw) \cdot exp\left(Js/(Jsw \cdot k)\right) \right) \right] - \left[(C_0 + Jsw) \cdot exp(Js/Jsw) \right] \right\} \quad (2)$$

where *Js* is the reverse flux (mol/m^{2}s), *B* is the solute permeability (m/s), C_{DS} is the concentration of the draw solution (mol/m^3), *K* is the solute resistivity for diffusion within the support layer (s/m), *k* is the mass transfer coefficient (m/s), C_0 is the concentration of the feed (mol/m^3), and *Jsw* refers to the ratio of the reverse draw solute flux to the water flux (mol/m^3).

No external energy is consumed in forward osmosis. The flow is governed by the potential chemical difference between the draw solution and the feed.

The draw solution regeneration methods analyzed in this work were evaporation (alternative A3), reverse osmosis (A4), and membrane distillation (A5) for a recovery rate of 50%. Membrane distillation was considered only as a method of regeneration of the draw solution. The set of equations to evaluate the process of membrane distillation was presented by Jantaporn et al. (2017), who derived the model to calculate the specific energy consumption of the process.

Exergy analysis

The exergy analysis was used to compare the technological configurations on the basis of overall efficiency. The ambient conditions followed that established by Szargut (1989). The exergy contents of the streams were calculated using the equations presented by Ptasinski (2016) and Tai et al. (1986) (Table 1). A simplified cost analysis was performed based on NPV, IRR and payback metrics.

Table 1: Equations used in the exergy analysis.

Classification	Equation	Variables
Matter	$\dot{E}x_{ph} = \dot{m}_{stream}[(h - h_0) - T_0(s - s_0)]$	$\dot{E}x_{ph}$ → physical exergy of a stream of matter (kW) $\dot{m}_{stream}$ → mass flow rate (kg/s) h → specific enthalpy at given conditions (kJ/kg) h_0 → specific enthalpy at reference conditions (kJ/kg) s → specific entropy at given conditions (kJ/kg) s_0 → specific entropy at reference conditions (kJ/kg) T_0 → reference state temperature assumed to be 298.15 K
	$\dot{E}x_{ch} = \dot{n}_{stream}\left(\sum_i y_i\xi_i + \bar{R}T_0\sum_i y_i ln(y_i)\right)$	$\dot{E}x_{ch}$ → chemical exergy rate of the stream (kW) $\dot{n}_{stream}$ → molar flow rate (mol/s) y_i → molar fraction ξ_i → standard chemical exergy (kJ/mol) $\bar{R}$ → universal gas constant (kJ/mol K)
	$\dot{E}x_{org.mat} = \dot{m}_{stream}(13.6 \cdot 10^3 \cdot C_{vin})$	$\dot{E}x_{org.mat}$ → exergy of organic matter of the stream (kW) C_{vin} → COD content of the vinasse (kg-COD/kg-vinasse)
	$\dot{E}x_{mat} = \dot{E}x_{ph} + \dot{E}x_{ch} + \dot{E}x_{org.mat}$	$\dot{E}x_{mat}$ → Total exergy rate of matter streams (kW)
Heat	$\dot{E}x_{heat} = \dot{Q}_{stream}(1 - T_0/T)$	$\dot{E}x_{heat}$ → exergy rate of a heat transfer between a system and the surroundings (kW) $\dot{Q}_{stream}$ → heat flowrate (kW) T → temperature at a given condition (K)
Work	$\dot{E}x_{work} = \dot{W}_{stream}$	$\dot{E}x_{work}$ → exergy rate associated with a work transfer between a system and the surroundings (kW) $\dot{W}_{stream}$ → work transfer rate (kW)
Efficiency	$\eta = \sum \Delta\dot{E}x_{out} / \sum \Delta\dot{E}x_{in}$	η → exergy efficiency of the process $\dot{E}x_{in}$ → exergy rate of process inputs (kW) $\dot{E}x_{out}$ → exergy rate of process outputs (kW)

Results and discussion

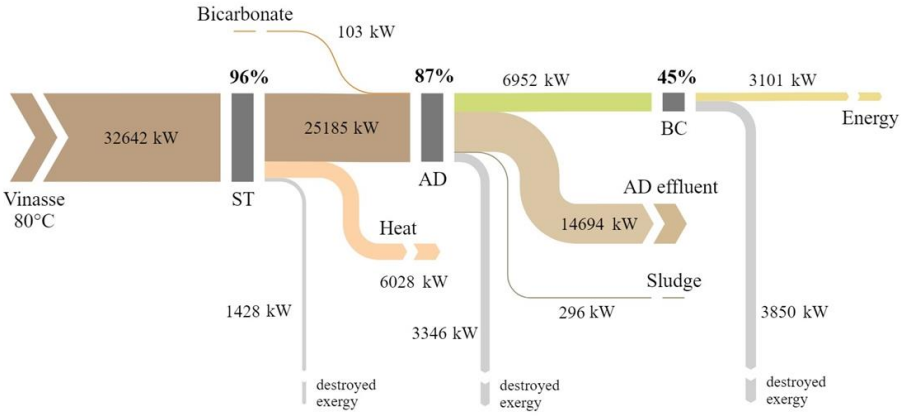
Analysis of the methane production pathway

The following results were analyzed based on a scenario with operational conditions as follows: 1.2 °Bx vinasse, 70 kg-vinasse/s, and 70% organic removal.

According to the diagram in Figure 2 for the methane production pathway, the rate of exergy destroyed in this step was 1428 kW (4%).

The anaerobic digestion effluent was the stream of higher exergy content, i.e., 61% (exergy rate of 14694 kW) of the total. The exergy efficiency of the anaerobic bioreactor was 87%. A total of 13% (exergy rate of 3346 kW) of the exergy destruction is related to irreversibility of the process. The biogas conversion unit accounted for 45% of exergy efficiency. 12% (exergy rate of 3101 kW) of the exergy exits the system as energy, 53% in the form of heat (heat flowrate of 1639.8 kW), and 47% in the form of electricity (work transfer rate of 1461.6 kW).

The estimated exergy efficiency of the overall methane production pathway was 74%. The efficiency of this stage can be enhanced by the use of heat from the storage tank and improvements in the technologies employed for conversion of biogas into energy.



ST - Storage Tank; AD - Anaerobic Digestion; BC - Biogas Conversion

Figure 2: Sankey diagram for the methane production pathway

Comparison of the alternatives

The alternatives A2 (reverse osmosis) and A4 (forward osmosis + reverse osmosis) showed higher exergy efficiencies (62% and 58%, respectively) and A5 (forward osmosis + membrane distillation) showed the least (32%). Figure 3 shows the exergy efficiencies of the different alternatives (including the methane production pathway and concentration method) in a scenario of 70 kg/s of vinasse and 70% organic matter removal.

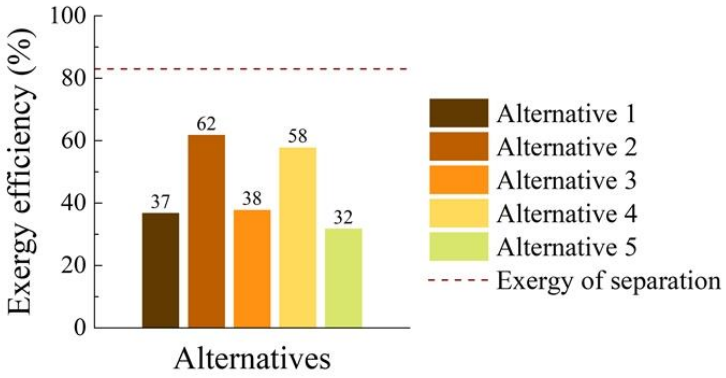


Figure 3: Exergy efficiency of the alternatives.

Figure 4 displays the relationship between total exergy efficiency and water recovery. Alternatives A2 (reverse osmosis) and A4 (forward osmosis + reverse osmosis) showed similar exergy efficiencies. To achieve water recovery of 70%, the exergy efficiency of separation was 83%, i.e., a minimum total exergy rate of 5491.40 kW was required for a partial separation of the components of vinasse.

Although the forward osmosis unit is thermodynamically more favorable than other concentration technologies, the regeneration of the draw solution makes the system less efficient. Such a statement was emphasized by McGovern and Lienhard (2014), who affirmed that reverse osmosis is significantly more energy efficient than forward osmosis due to the latter's theoretical and actual energy requirements for draw solution regeneration.

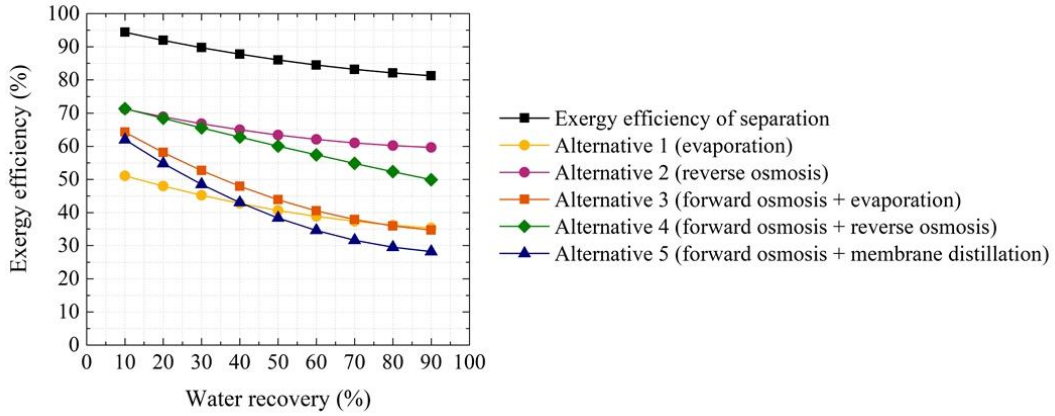


Figure 4: Exergy efficiency x water recovery.

The appropriate operation of the process of forward osmosis depends on the choice of draw solution, which must present high values of osmotic pressure. In this study, NaCl (e.g., seawater) was considered because it is a widely applied solution, provides high osmotic pressure, and entails low costs. However, the cost of transporting seawater to sugarcane plants may hamper its use. Sucrose should also be considered as a draw solution since it is an abundant organic substance in the sugarcane industry.

The results indicate that among the concentration technologies investigated, membrane distillation showed the highest exergy destruction whereas forward osmosis was the most exergy efficient. However, a general analysis revealed that the alternatives A2 and A4 were the most interesting to recover water in terms of exergy efficiency. In this case, reverse osmosis appears to be the most suitable method of concentration. It is a well-known technology that can be coupled with biological processes to provide an interesting design for biorefineries. If applied to the sugarcane industry, it would use the surplus electricity generated from the combustion of bagasse or the burning of methane from anaerobic digestion.

Brief study of scenarios

Two scenarios were studied to simulate the implementation of a vinasse biorefinery (comprising anaerobic bioreactor and reverse osmosis units) in different types of sugarcane plants.

- Scenario 1 – The vinasse biorefinery is annexed to an ethanol plant (designed by Palacios-Bereche et al. (2013)).
- Scenario 2 – The vinasse biorefinery is annexed to a sugar and alcohol plant (presented by Ensinas et al. (2009)).

In Scenario 1, if 70% (344. 23 m³/h) of water is recovered by reverse osmosis, the external water demand would decline by 66%. The biogas produced in the anaerobic bioreactor would generate 6052 kW of electricity, which represents a 28% increase in the energy available to the plant. The energy requirement of the reverse osmosis unit would represent 1.57% of the surplus power obtained from the combustion of bagasse and biogas.

In Scenario 2, the sugar and ethanol plant studied by Ensinas et al. (2009) produced less alcohol than did the alcohol factory evaluated by Palacios-Bereche et al. (2013). Consequently, less vinasse was generated and the amount of water available for recovery was also lower. In this case, the water from vinasse would reduce requirement from external sources by 22% (114.41 m³/h of reclaimed water), and the electricity generated by methane conversion would represent 12% of the surplus energy generated in the plant by burning bagasse. The energy requirement of the reverse osmosis unit corresponded to 1.54% of the surplus energy.

Table 2: Exergy of flowrates in sugarcane plants.

Scenario 1 - Alcohol plant			Scenario 2 - Sugar and alcohol plant		
Flow	Exergy rate (kW)	Reference	Flow	Exergy rate (kW)	Reference
Sugarcane	800341.8	Palacios-Bereche et al. (2013)	Sugarcane	735712	Ensinas et al. (2009)
Water withdrawal	7165	Palacios-Bereche et al. (2013)	Water withdrawal	6945	Ensinas et al. (2009)
Surplus energy	21151.7	Palacios-Bereche et al. (2013)	Surplus energy	8222	Ensinas et al. (2009)
Alcohol production	279632.5	Palacios-Bereche et al. (2013)	Alcohol production	134068	Ensinas et al. (2009)
Vinasse	60513.8	Palacios-Bereche et al. (2013)	Vinasse	20112	Ensinas et al. (2009)
Energy consumed by RO	427.27	Calculated	Energy consumed by RO	142.00	Calculated
Water reclaimed	4841.5	Calculated	Water reclaimed	1609.3	Calculated
Electricity from biogas	6052.2	Calculated	Electricity from biogas	947.9	Calculated

Table 3 presents the investment costs for each alternative. For the scenario 1, alternatives 1, 2 and 3 are feasible from the economic point of view. Alternative 1, employing evaporators as concentration technology, has the most economic feasibility, given the higher NPV, IRR and smaller payback period. In this case, the water recovery could represent an economy of 8,490,435.76 USD/year for the Brazilian distillery studied in scenario 1.

Table 3: Investments costs of the evaluated alternatives.

	Alternative 1	Alternative 2	Alternative 3	Alternative 4	Alternative 5
			Scenario 1		
Annualized investment in USD/year	620,934.48	653,941.66	1,010,645.69	991,016.30	1,400,783.28
Annualized O&M costs in USD/year	1,380,154.97	1,360,189.96	1,429,448.95	1,409,483.95	1,611,349.90
Annualized total cost in USD/year	2,001,089.45	2,014,131.62	2,440,094.64	2,400,500.25	3,012,133.18
NPV	11,481,074.77	9,013,018.12	6,818,965.63	1,041,283.81	713,709.57
IRR	19%	19%	6.80%	-4%	-2%
Payback (years)	5.1	6.3	9.5	24.6	18.4
			Scenario 2		
Annualized investment in USD/year	171,841.98	190,946.29	301,372.79	302,567.90	438,714.61
Annualized O&M costs in USD/year	450,552.01	450,179.71	466,936.31	466,564.01	533,662.50
Annualized total cost in USD/year	622,393.99	641,126.00	768,309.10	769,131.91	972,377.11
NPV	-1,751,495.33	-2,732,083.97	-3,301,072.01	6,069,198.06	-5,490,760.62
IRR	-	-	-	-	-
Payback (years)	-	-	-	-	-

For the scenario 2, with lower vinasse flowrate, no scenario would be feasible since the incomes by the sale of electricity from the conversion of biogas would not be enough to cover the investments. However, the implantation of a biorefinery of vinasse with the system of recovery of water would bring a saving of 2,821,946.65 USD/year. In this case, the use of evaporators (Alternative 1) would have the lowest cost.

Conclusions

Although forward osmosis can potentially be a more energy efficient method, its implementation in the sugarcane industry is hampered by the choice of an efficient method for regeneration of draw solution. If the regeneration step is neglected, the forward osmosis process has an exergy efficiency of 77%.

Among the options evaluated, the processes involving reverse osmosis, in which the energy for water separation is in the form of electricity, are more exergy efficient, i.e., the resources are better utilized with less exergy destruction. However, cost estimate shows that evaporators would be more feasible as concentration method because of the reuse of residual heat streams from sugar and alcohol processes and smaller investment cost.

Both evaporators and reverse osmosis membranes are interesting for the concept of a biorefinery. The choice of the method will depend on the characteristics of the enterprise and the region in which it will be implemented. In the case of Brazil, the evaporators would be more attractive since reverse osmosis, despite being a promising technology, is still very expensive.

The alternatives considered in this study are feasible for industrial application; however, the potential of biorefineries in the sugarcane industry must be further studied. In any case, vinasse biorefinery designs can reduce the polluting load of the materials disposed in the soil, recycle water, and produce biogas, taking advantage of the energy potential of the sugar-alcohol sector. They offer advantages in the economic sphere by promoting the reuse of materials and reducing the demand of external feedstocks, and on the environmental front by providing alternative sources of materials and energy.

References

Ali, A., Quist-Jensen, C.A., Macedonio, F., Drioli, E., 2016. Optimization of module length for continuous direct contact membrane distillation process. Chem. Eng. Process. Process Intensif. 110, 188–200. doi:10.1016/j.cep.2016.10.014

Atkins, P., Paula, J. de, 2010. Physical Chemistry, Ninth. ed. W. H. Freeman and Company, Oxford, UK.

Baker, R.W., 2012. Membrane Technology and Applications, 3rd ed. ed. John Wiley & Sons, Ltd., Newark, California.

Carvalho, T.C. De, Silva, C.L. da, 2011. Reduction of vinasse volume by the evaporation process, in: Brazilian Congress of Mechanical Engineering.

Chernicharo, C.A. de L., 2007. Anaerobic Reactors. IWA Publishing.

Dincer, I., Rosen, M.A., 2013. Exergy. Energy, Environment And Sustainable Development, Second. ed. Elsevier Ltd., Oxford, UK.

Ensinas, A. V., Modesto, M., Nebra, S.A., Serra, L., 2009. Reduction of irreversibility generation in sugar and ethanol production from sugarcane. Energy 34, 680–688. doi:10.1016/j.energy.2008.06.001

Foust, A.S., Wenzel, L.A., Clump, C.W., Maus, L., Andersen, L.B., 1960. Principles of unit operations. John Wiley & Sons, Inc., Bethlehem, Pennsylvania.

Jantaporn, W., Ali, A., Aimar, P., 2017. Specific energy requirement of direct contact membrane distillation. Chem. Eng. Res. Des. 128, 15–26. doi:10.1016/j.cherd.2017.09.031

Johnson, D.J., Suwaileh, W.A., Mohammed, A.W., Hilal, N., 2018. Osmotic's potential: An overview of draw solutes for forward osmosis. Desalination 434, 100–120. doi:10.1016/j.desal.2017.09.017

Kimball, D., 1991. Brix and Soluble Solids BT - Citrus Processing: Quality Control and Technology, in: Kimball, D. (Ed.), . Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 7–33. doi:10.1007/978-94-011-3700-3_2

McCabe, W.L., Smith, J.C., Harriot, P., 1985. Unit operations of chemical engineering, 4th ed. McGraw-Hill.

McGovern, R.K., Lienhard V, J.H., 2014. On the potential of forward osmosis to energetically outperform reverse osmosis desalination. J. Memb. Sci. 469, 245–250. doi:10.1016/j.memsci.2014.05.061

Palacios-Bereche, R., Mosqueira-Salazar, K.J., Modesto, M., Ensinas, A. V., Nebra, S.A., Serra, L.M., Lozano, M.A., 2013. Exergetic analysis of the integrated first- and second-generation ethanol production from sugarcane. Energy 62, 46–61. doi:10.1016/j.energy.2013.05.010

Park, H.-D., Chang, I.-S., Lee, K.-J., 2015. Principles of Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment. CRC Press, Boca Raton, USA.

Ptasinski, K.J., 2016. Efficiency of Biomass Energy. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/9781119118169.ch8

Suh, C., Lee, S., 2013. Modeling reverse draw solute flux in forward osmosis with external concentration polarization in both sides of the draw and feed solution. J. Memb. Sci. 427, 365–374. doi:10.1016/j.memsci.2012.08.033

Szargut, J., 1989. Chemical exergies of the elements. Appl. Energy 32, 269–286. doi:10.1016/0306-2619(89)90016-0

Tai, S., Matsushige, K., Goda, T., 1986. Chemical exergy of organic matter in wastewater. Int. J. Environ. Stud. 27, 301–315. doi:10.1080/00207238608710299

DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITROSO EM REATORES CONTÍNUOS CONTENDO BIOMASSA GRANULAR ANAMMOX

Tiago Duarte Santos Pereira[1], Renan Haddad Spindola[2], Natália Carolina da Silveira[1], Guilherme Lelis Giglio[1], Eduardo Cleto Pires[3.], Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic[3.]

[1] Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento EESC/USP;
[2] Aluno de Iniciação Científica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.
[3.]Professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *O óxido nitroso (N_2O), poderoso gás do efeito estufa, é potencialmente produzido pela biomassa anammox enriquecida em que bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias desnitrificantes heterotróficas (HET) coexistem. O objetivo deste trabalho foi avaliar a emissão de N_2O em dois reatores contínuos de fluxo ascendente contendo lodo granular anammox, submetidos a variadas relações N-nitrito/N-amoniacal e matéria orgânica. Ambos os reatores, R1 e R2, foram operados com TDH de 3,0 h, com R1 submetido à taxa de recirculação de 5x. Os resultados demonstraram que houve aumento na emissão de N_2O em ambos os reatores quando foi observado um acúmulo final de nitrito como consequência do aumento da relação de $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NH_4^+$ de 1,0 para 1,5. Durante a fase 3, a adição de matéria orgânica conduziu a um aumento nas emissões de N_2O no reator operado sem recirculação interna (R2). Entretanto, a recirculação promovida no reator R1 contribuiu para a diminuição da produção de óxido nitroso, quando o processo anammox ocorreu na presença de matéria orgânica.*

Introdução

A substituição de processos convencionais por processos inovadores é uma tendência em estações de tratamento de efluentes (ETEs) que preconizam a sustentabilidade em seus sistemas. Esta substituição muitas vezes é encorajada pela possibilidade de redução de custos operacionais, mantendo a qualidade do tratamento. Nesse sentido, o recente processo oxidação anaeróbica da amônia (anammox) além de ser financeiramente atraente, pode impulsionar a eficiência da remoção do nitrogênio presente em águas residuárias de elevada concentração de compostos nitrogenados, amenizando a eutrofização em corpos hídricos.

Em ETEs convencionais, a remoção de nitrogênio é fundamentada no processo nitrificação/desnitrificação. Na etapa de nitrificação, o íon amônio (NH_4^+) é oxidado a nitrito (NO_2^-) e a nitrato (NO_3^-) sob condições aeróbias, o que requer o consumo de energia elétrica no funcionamento de equipamentos aeradores. Na desnitrificação, a conversão de NO_3^- a nitrogênio gasoso (N_2) ocorre na presença de doadores de elétrons, que podem ser desviados do fluxo para a produção de metano, diminuindo a eficiência energética global da ETE. No processo anammox, por outro lado, a oxidação de NH_4^+ em N_2, utiliza NO_2^- como aceptor de elétrons, sob condições anaeróbias. Isto significa que as bactérias anammox dispensam o uso de matéria orgânica como doadores de elétrons e não requerem aeração para oxidação de todo nitrogênio amoniacal a NO_2^- ou NO_3^- (Van de Graaf et al., 1996; Strous et al., 1998), promovendo uma economia de até 60% de oxigênio (Ali e Okabe, 2015) e 90% menos lodo (Strous et al., 1999). Diante deste cenário, pode-se dizer que o processo nitritação/anammox é vantajoso se comparado ao processo nitrificação/desnitrificação.

Apesar dos benefícios do processo anammox, a presença de matéria orgânica no efluente a ser tratado ainda é pouco investigada sob o potencial de favorecimento da emissão de óxido nitroso (N_2O). Diferentemente de N_2, o N_2O é um gás altamente prejudicial ao meio

ambiente, podendo ser 300 vezes mais poluidor do que o dióxido de carbono, sendo assim classificado como um poderoso intensificador do efeito estufa (IPCC, 2013).

Segundo Ni et al. (2012), Speth et al. (2016), Sobotka et al. (2017), a presença de BOAs em conjunto com as HET, coexistindo com bactérias anammox em grânulos ou biofilme, pode provocar o aumento na emissão de N_2O. As BOAs podem produzir o N_2O pela oxidação parcial da amônia via hidroxilamina, em baixas concentrações de OD. No processo de desnitrificação autotrófica, a emissão deste gás origina-se a partir de NO_2^-. Além disso, as HET podem realizar a desnitrificação parcial do NO_3^- ou NO_2^- à N_2O, utilizando matéria orgânica como fonte doadora de elétrons, quando as relações C/N são baixas (Li et al., 2018).

Apesar do elevado risco associado à produção de N_2O nos diversos processos de tratamentos de águas residuárias, as vias de produção e possíveis controles de emissão de N_2O ainda não foram documentadas de forma robusta, o que dificulta o estabelecimento de estratégias para reduzir a emissão do gás. As rotas bioquímicas de produção de N_2O parecem ser altamente dinâmicas e dependentes da operação e das propriedades dos incontáveis efluentes, o que pode explicar grande variabilidade dos valores de emissão de N_2O reportados na literatura (Law *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2017; Massara *et al.*, 2017). Diante destas particularidades, a presente pesquisa teve como principal objetivo avaliar a dinâmica da emissão de N_2O em reatores biológicos de fluxo ascendente contendo lodo granular anammox enriquecido sob diferentes condições operacionais e nutricionais.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em dois reatores biológicos, R1 e R2, construídos em acrílico, com dimensões iguais (48,0 cm de altura útil, 6,7 cm de diâmetro e 3.5 cm de headspace). Os reatores foram acondicionados em câmara climática (Nova Ética, Brasil) à temperatura de 37,0 ± 0,3ºC. Duas grades com orifícios de 3.0 mm de diâmetro foram fixadas acima e abaixo do volume reacional (1,7 L) de cada reator para reter a biomassa. Os reatores foram operados com tempo de retenção hidráulica (TDH) de 3,0 h e fluxo ascendente, e R1 foi submetido à recirculação de 5x. Os reatores foram alimentados a partir do meio sintético adaptado de Van de Graaf et al. (1996) mantido em reservatório de polietileno de 1.0 m^3 a temperatura ambiente. Bombas dosadoras (Grundfos, Dinamarca, modelo DDC) eram utilizadas na alimentação de ambos os reatores e na recirculação somente em R1. A fração gasosa era conduzida do septo butil ao selo hídrico e posteriormente ao medidor de gás (Ritter, Alemanha, modelo MCG).

O inóculo de lodo granular de anammox (depositado no banco de microrganismos da Embrapa BRMSA 0323) foi coletado na Embrapa Suínos e Aves de Capoeira, Concórdia, em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. Este lodo foi enriquecido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP), segundo metodologia proposta por Schierholt Neto et al. (2006). A biomassa enriquecida foi inoculada com 4,250 $gVSS.L^{-1}$ e 0,340 L de lodo (20% do volume útil dos reatores).

Esta pesquisa teve duração de 337 dias. Durante este período, subdivido em três fases, os reatores foram operados conforme as condições explicitadas na Tabela 1.

As análises físico-químicas foram baseadas em métodos padronizados (APHA, 2005). As análises de $N\text{-}NH_4^+$, $N\text{-}NO_2^-$ e $N\text{-}NO_3^-$ foram realizadas por métodos colorimétricos. A interferência do NO_2^- nas análises de NO_3^- e DQO foi atenuada utilizando-se 95,0 mg de solução de ácido sulfâmico em 1,0 L de água destilada. Cada 1,0 mL de solução mostrou-se eficiente para a remoção de até 0,014 mg de $N\text{-}NO_2^-$.

A composição gasosa foi analisada em cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu®) com detector de condutividade térmica (DCT) e coluna HP-PLOT / Q (3,0 mx 0,53 mm x 40,0 μm) e o gás carreador utilizado foi hidrogênio (nível cromatográfico). As temperaturas de injeção e detector foram de 160 e 190° C, respectivamente. A temperatura da coluna variou

de 35 °C (3 min) a 62,0 °C (0 min), a taxa de aquecimento do forno, 25°C.min^{-1}; a 170 (1 min) e 60°C.min^{-1} (6'53 "). A razão de separação foi definida como 5, a taxa linear foi 38,40 cm.s^{-1} e os fluxos na coluna e no total foram 4 mL.min^{-1} e 27 mL.min^{-1}, respectivamente. O tempo total de experimento foi estabelecido em 6'53 " e o tempo de amostragem foi de 1,0 min. Em cada amostragem, 500 μL da amostra de gás do headspace dos reatores foram retirados usando uma seringa e injetada no GC.

Tabela 1: Condições experimentais de cada fase.

Fases	Reator	Tempo de operação (d)	TDH (h)	Razão de Recir-culação	N-NH_4^+ (mgN.L^{-1})	N-NO_2^- (mgN.L^{-1})	Relação N-NH_4^+/ N-NO_2^-	DQO (mg.L^{-1})
I	R1	180	3,0	5x	100	100	1,0	-
	R2	227	3,0	-	100	100	1,0	-
II	R1	92	3,0	5x	100	150	1,5	-
	R2	92	3,0	-	100	150	1,5	-
III	R1	18	3,0	5x	100	150	1,5	100
	R2	18	3,0	-	100	150	1,5	100

Resultados e Discussão

A carga nitrogenada volumétrica (CNV) removida para ambos os reatores manteve-se elevada durante as três fases experimentais (Figura 1). As alterações bruscas de eficiência da remoção de CNV no 100° e 130° dias de operação em R1 e R2, respectivamente, e as alterações bruscas de CNV aplicada e CNV removida no 240° dia de operação em R2, ocorreram devido a um problema técnico nas bombas de alimentação, alterando a vazão pré-estabelecida. Ao nível de significância de 5%, o teste F comprovou a inexistência de diferença estatística entre as médias dos valores de CNV removida e da eficiência de remoção de N-total. Segundo o teste ANOVA, não houve diferença estatística significativa entre as médias ao nível de 5% de significância. Portanto, o aumento da relação N-NO_2^-/N-NH_4^+ da Fase I para Fase II, e a adição de matéria orgânica, durante a Fase III não comprometeram a eficiência do sistema.

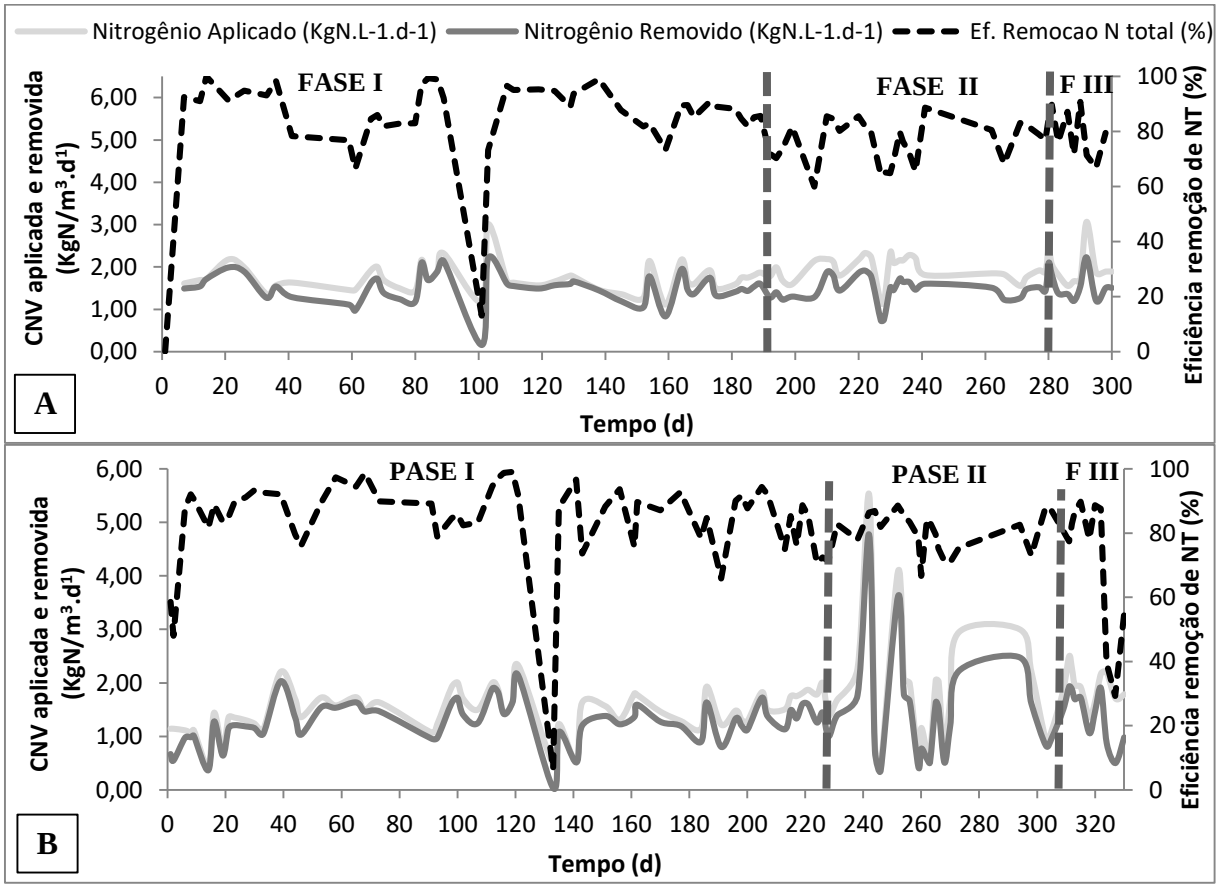
Durante a Fase III, a recirculação interna mostrou-se uma estratégia eficiente para atenuar o impacto da presença de matéria orgânica na remoção total de nitrogênio pelo processo anammox. Comparando o reator R1 (com recirculação) com o reator R2 (sem recirculação), nota-se que, apesar da diminuição da eficiência em ambos os reatores, a recirculação garantiu menor variabilidade dos níveis de remoção N-total quando a matéria orgânica estava presente. A recirculação provavelmente diluiu a concentração inicial de matéria orgânica, reduzindo os efeitos inibitórios do processo de anammox. Como já se sabe, a matéria orgânica pode inibir completa ou parcialmente a atividade da anammox (Jin et al., 2012; Ni et al., 2012).

Na Fase I, conforme descrito na Tabela 1, os reatores foram operados sob relação N-NO_2^-/N-NH_4^+ igual a 1,0. Com base na relação estequiométrica da reação anammox (1,32 N-NO_2^-/N-NH_4^+), era esperado que não houvesse acúmulo de nitrito, o que foi confirmado durante a Fase I. A emissão de N_2O foi insignificante durante toda a Fase I, exceto no 103º e 135º dias de operação dos reatores R1 e R2, respectivamente (Figura 2). O pico de N-NO_2^- detectado no meio sintético afluente durante esses dias, provavelmente, pode ter influenciado a emissão de N_2O.

Quando a relação N-NO_2^-/N-NH_4^+ foi aumentada para 1,5 (Fase II), o N_2O foi detectado durante 92 dias de operação, como mostrado na Figura 2. Em média, a presença do óxido nitroso foi observada em concentrações de 1,22 ± 0,73 mgN.L^{-1} e 1,70 ± 1,21 mgN.L^{-1}

em R1 e R2, respectivamente. Estes resultados evidenciam a influência positiva do acúmulo de nitrito em meio líquido com a emissão de N_2O. A presença de N_2O pode estar associada ao uso de compostos internos de armazenamento ou ao decaimento de produtos celulares como fonte doadora de elétrons utilizados pelas bactérias desnitrificantes heterotróficas para redução do nitrito a óxido nitroso, como relatado por Liu et al. (2016).

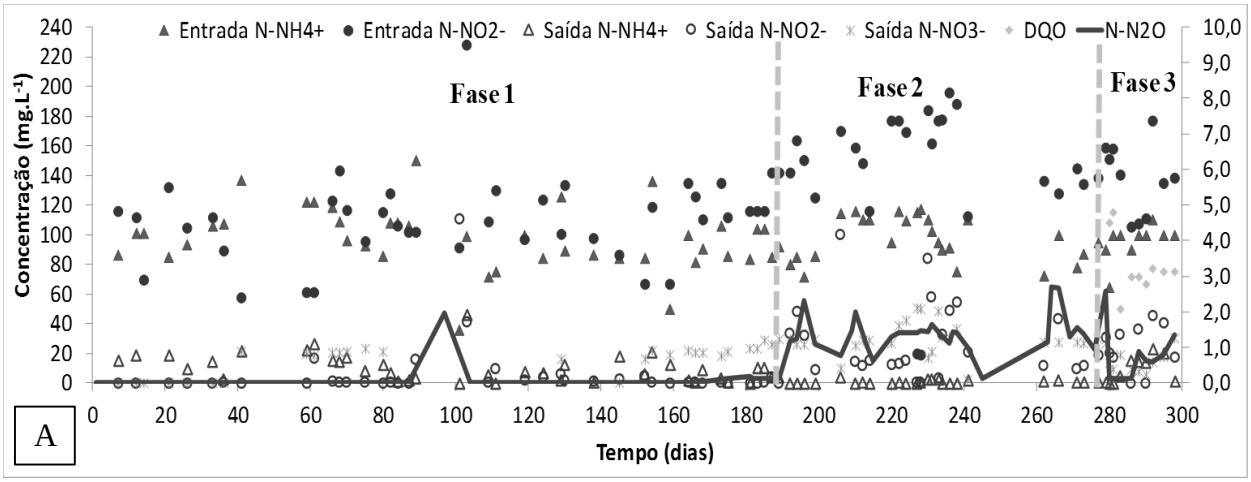
Figura 11: Variação das cargas nitrogenadas aplicadas e removidas e eficiência de remoção de nitrogênio nas Fases I, II e III para o reator R1 operado com taxa de recirculação de 5x (A) e R2 sem recirculação (B).

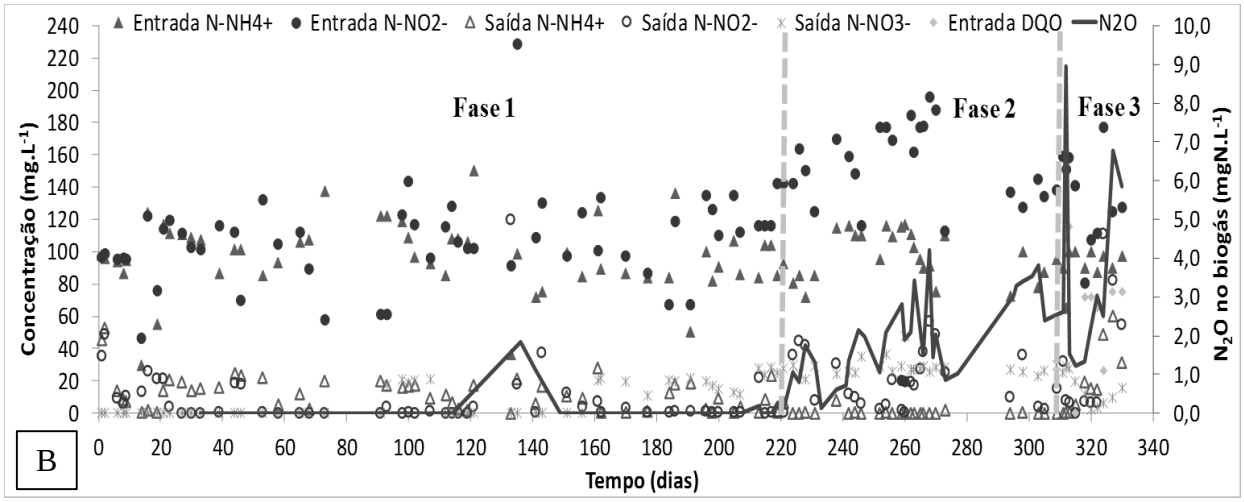


Durante a Fase II, foi observado ainda que, mesmo sob altas concentrações afluentes de nitrito, por vezes próximas a 200 $mgN.L^{-1}$, os reatores não tiveram a eficiência de remoção de nitrogênio afetada, ao contrário do que foi descrito por Jin et al. (2012).

A adição de matéria orgânica sob a forma de acetato (100 mg $DQO.L^{-1}$) no meio de alimentação dos reatores (Fase III) resultou na redução drástica na eficiência de remoção de nitrogênio, de 87,6% para 29,6% no 15º dia e aumento da emissão de N_2O no reator R2 (sem recirculação interna e operado sob relação $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NH_4^+$ de 1,5). O resultado pode estar associado à inibição parcial da atividade da anammox pela presença de matéria orgânica, como já apresentado por Ni et al. (2012). Por outro lado, a maior disponibilidade de elétrons para realizar desnitrificação de nitrito a óxido nitroso, pode ser a razão para o aumento das emissões de N_2O. A eficiência de remoção de nitrogênio não foi afetada pela adição de matéria orgânica ao reator R1 e não foi observada diferença significativa entre as emissões de N_2O. Isto pode ter ocorrido devido à diluição inicial da concentração durante a recirculação. Os elétrons disponíveis podem ter sido usados apenas para reduzir o nitrito em óxido nítrico (NO). Resultado semelhante também foi observado por Domingo-Félez et al. (2017). Portanto, a recirculação mostrou-se eficiente no controle das emissões de N_2O e manutenção da eficiência de remoção de nitrogênio total em condições inibidoras do processo anammox, neste caso, adição de matéria orgânica.

Figura 2: Concentração de N_2O, DQO e das espécies nitrogenadas afluente e efluente durante a operação dos reatores conítunos: R1, operado com TDH de 3,0 h e taxa de recirculação de 5x (A); e R2, com TDH de 3,0 h sem recirculação interna (B).





Conclusões

O aumento da relação $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NH_4^+$ de 1,0 para 1,5 na água residuária de alimentação dos reatores, mesmo na ausência de matéria orgânica, resultou na produção de N_2O no sistema com e sem recirculação. A presença de matéria orgânica (100 mg $DQO.L^{-1}$), no entanto, aumentou ainda mais a emissão de N_2O no reator operado sem recirculação interna. No entanto, a recirculação interna do efluente na razão de 5x contribuiu para a diminuição das emissões de N_2O e manutenção da alta eficiência de remoção nitrogênio total.

Referências Bibliográficas

Ali, M., Rathnayake, R. M., Zhang, L., Ishii, S., Kindaichi, T., Satoh, H., Toyoda, S., Yoshida, N., & Okabe, S. 2016 Source identification of nitrous oxide emission pathways from a single-stage nitritation-anammox granular reactor. Water research 102, 147-157.

Ali, M. & Okabe, S. 2015 Anammox-based technologies for nitrogen removal: advances in process start-up and remaining issues. Chemosphere 141, 144-153.

APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2005 21sd edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Daelman, M. R. J., van Voorthuizen, E. M., van Dongen, L. G. J. M., Volcke, E. I. P., & van Loosdrecht, M. C. M. 2013 Methane and nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment–results from a long-term study. Water Science & Technology 67 (10), 2350-2355.

Domingo-Félez, C., Pellicer-Nàcher, C., Petersen, M.S., Jensen, M.M., Plósz, B.G., Smets, B.F., 2017. Heterotrophs are key contributors to nitrous oxide production in activated sludge under low C-to-N ratios during nitrification—Batch experiments and modeling. Biotechnol. Bioeng. 114, 132–140.

Harris, E.; Joss, A.; Emmenegger, L.; Kipf, M.; Wolf, B.; Mohn, J.; Wunderlin, P. 2015 Isotopic evidence for nitrous oxide production pathways in a partial nitritation-anammox reactor. Water Research, 83, 258–270

IPCC (2013) Summary for policymakers. In:Climate Change 2013: The Physical ScienceBasis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovern-mental Panel on Climate Change(eds Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M,Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM), pp. 3–29. CambridgeUniversity Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

Jin, R. C., Yang, G. F., Yu, J. J., & Zheng, P. 2012 The inhibition of the Anammox process: a review. Chemical Engineering Journal 197, 67-79.

Law, Y., Ye, L., Pan, Y., & Yuan, Z. 2012 Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 367 (1593), 1265-1277.

Li, N., Zeng, W., Wang, B., Li, S., Guo, Y., & Peng, Y. 2019 Nitritation, nitrous oxide emission pathways and in situ microbial community in a modified University of Cape Town process. Bioresource technology 271, 289-297.

Li, J., Li, J., Gao, R., Wang, M., Yang, L., Wang, X., Zhang, L., & Peng, Y. 2018. A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater: optimization strategies based on key functional microorganisms. Bioresource technology 265, 498-505.

Liu, Y., Sun, J., Peng, L., Wang, D., Dai, X., & Ni, B. J. 2016 Assessment of heterotrophic growth supported by soluble microbial products in anammox biofilm using multidimensional modeling. Scientific Reports 6, 27576.

Ma, C., Jensen, M. M., Smets, B. F., & Thamdrup, B. 2017 Pathways and controls of N_2O production in nitritation–anammox biomass. Environmental science & technology 51 (16), 8981-8991.

Massara, T. M., Malamis, S., Guisasola, A., Baeza, J. A., Noutsopoulos, C., & Katsou, E. 2017 A review on nitrous oxide (N_2O) emissions during biological nutrient removal from municipal wastewater and sludge reject water. Science of the Total Environment 596, 106-123.

Ni, S. Q., Ni, J. Y., Hu, D. L., & Sung, S. 2012 Effect of organic matter on the performance of granular anammox process. Bioresource technology 110, 701-705.

Schierholt Neto, G. F. S., Kunz, A., Vanotti, M. B., Moreira Soares, H., & Martini Mattei, R. 2006 Aclimatação e acompanhamento da atividade de lodos de efluentes de suinocultura para remoção de nitrogênio pelo processo de oxidação anaeróbia de amônia (Anammox) (Acclimatization and monitoring of swine effluent sludge activity for the nitrogen removal by anaerobic ammonia oxidation (Anammox). 30th Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (Inter-American Congress of Sanitary and Environmental Engineering), 1-8.

Sobotka, D., Tuszynska, A., Kowal, P., Ciesielski, S., Czerwionka, K., & Makinia, J. 2017 Long-term performance and microbial characteristics of the anammox-enriched granular

sludge cultivated in a bench-scale sequencing batch reactor. Biochemical engineering journal 120, 125-135.

Speth, D. R., Guerrero-Cruz, S., Dutilh, B. E., & Jetten, M. S. 2016 Genome-based microbial ecology of anammox granules in a full-scale wastewater treatment system. Nature communications 7, 11172.

Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. M. 1998 The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. Applied microbiology and biotechnology 50 (5), 589-596.

Strous, M., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. 1999 Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. Applied and environmental microbiology 65 (7), 3248-3250.

Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S., & Kuenen, J. G. 1996 Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. Microbiology, 142 (8), 2187-2196.

Viancelli, A., Kunz, A., Esteves, P. A., Bauerman, F., Fujii, T., Furukawa, K. & Antonio, R. V. 2011. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. Brazilian Archives of Biology and Technology 54, 1035–1041.

DINÂMICA DA REDUÇÃO DE SULFATO NA FERMENTAÇÃO TERMOFÍLICA DA VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Michael Antonio Piffer [1]; Marcelo Zaiat [2]; Lucas Tadeu Fuess [3]

[1] Aluno de Iniciação Científica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Pós-doutorando do Departamento de Engenharia Química da EP/USP.

Resumo. *O presente estudo procurou avaliar a dinâmica da redução de sulfato na fermentação termofílica (55ºC) da vinhaça de cana-de-açúcar, apresentando a espuma de poliuretano (PU) como uma opção de material suporte aos reatores de leito fixo estruturado. Um reator em escala de bancada foi operado por 186 dias com diferentes tempos de detenção hidráulica (24, 12 e 6h). Os resultados indicaram uma dependência direta do estabelecimento de condições sulfetogênicas com o pH da fermentação, sendo o sistema estritamente acidogênico para valores de pH<6,0. Embora a espuma de PU naturalmente favoreça o estabelecimento de populações sulfetogênicas, características da vinhaça, sobretudo no início da safra, possivelmente foram preponderantes para o estabelecimento da redução de sulfato.*

Introdução

No que concerne a fermentação da vinhaça, sabe-se que a mesma, principal água residuária do processo de produção do etanol, possui composição complexa rica em compostos orgânicos e nutrientes como nitrogênio e potássio (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015). Não obstante a isso, características atribuídas a vinhaça como elevada DQO e baixo pH (Wilkie, Riedesel e Owens, 2000) fazem com que a vinhaça seja um bom substrato para a produção de hidrogênio por meio de processo de fermentação (Lazaro et al., 2014), ao qual por se originar de um processo biológico pode ser denominado biohidrogênio (bioH_2).

Trabalhos recentes têm explorado o potencial de produção de hidrogênio a partir da fermentação da vinhaça empregando-se diferentes configurações de reator. Como é o caso de Santos et al. (2014) que utilizaram reator de leito fluidizado além de Ferraz Jr. et al. (2014) e Ferraz Jr., Etchebehere e Zaiat (2015a e 2015b) com reator de leito fixo empacotado. Tem-se que o H_2 representa uma opção interessante para a geração de energia, visto que possui um elevado poder calorífico (aproximadamente 2,75 vezes maior do que o de hidrocarbonetos) e sua combustão gera água como único "resíduo" (Chen e Lin, 2001). Por isso, o H_2 é considerado um candidato promissor como uma fonte de energia limpa.

Algumas considerações fazem-se importantes quando consideramos sistemas acidogênicos. Destaca-se, dessa forma, a versatilidade da biomassa que compõem esses sistemas. Por isso, uma grande gama de substratos já foram submetidos a tratamento anaeróbio como águas residuais de álcool (Intanoo et al., 2012), e soro do processamento de queijo (Azbar, Dokgoz e Keskin, 2009; Rosa et al. 2014). Há ainda de se destacar a aplicação reatores biológicos para a remoção de sulfato de águas residuárias assim como feito por Damianovic e Foresti (2009), processo esse importante uma vez que em altas concentrações no meio o sulfato pode causar um desequilíbrio no ciclo natural do enxofre (Vela, Zaiat e Foresti, 2002).

A literatura apresenta informações sobre a concomitância de sulfetogênese e metanogênese em um mesmo sistema. Kiyuna et al. (2017) mostraram que a atividade metanogênica pode ser negativamente impactada pela sulfetogênese. É esperado em sistemas convencionais que as arqueias metanogênicas (AM) compitam com as bactérias redutoras de sulfato (BRS) por substratos comuns, no caso CO_2 e H_2 (Damianovic e Foresti, 2009). Entretanto, não há nada na literatura sobre sistemas sulfetogênicos-acidogênicos, o que torna esse trabalho pioneiro e possível propulsor para maior desenvolvimento e aprofundamento do tema. O presente trabalho também motiva um maior interesse para exploração da aplicação de

reatores metanogênicos associados a reatores sulfetogêncos-acidogênicos além de outros pontos a serem explorados.

Logo, para a promoção de sistemas sulfetogênicos-metânogênicos faz-se necessária a eliminação da competição entre as AM e as BRS. Isso pode ser feito de acordo com as condições operacionais e características do reator biológico empregadas. O que pode vir a acarretar um aumento da recuperação de bioenergia na etapa metanogênica, eventualmente incrementando a mesma a níveis de superar-se a produção de bioH_2. Enquanto sistemas sulfetogênicos-acidogênicos ainda não possuem detalhamentos suficientes que indiquem entraves, como já dito anteriormente.

O que já foi corroborado na literatura é o favorecimento do processo de sulfetogênese atrelada a utilização de espuma de poliuretano (PU) como meio suporte em reatores anaeróbios a fim de imobilizar a biomassa (Cadavid, Zaiat e Foresti, 1999; Vela, Zaiat e Foresti, 2002; Silva et al., 2002 e Silva et al.,2006). Nesse contexto, o presente projeto busca responder questões associadas à ausência de dados sobre a dinâmica da redução de sulfato na fermentação termofílica da vinhaça da cana-de-açúcar em sistemas sulfetogênicos-acidogênicos bem como todos os seus fatores influenciadores como a aplicação de espuma de PU como meio suporte e a variação composicional da vinhaça, visando assim, endossar a literatura. E não obstante a isso, promover a espuma de PU como alternativa ao polietileno de baixa densidade (PEBD), majoritariamente usado em sistemas sistemas sobretudo acidogênicos independente da alimentação do reator.

Material e Métodos

Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar

Amostras de vinhaça de cana-de-açúcar foram coletadas regularmente em uma usina de açúcar e álcool localizada no Município de Pradópolis, SP. A amostragem foi conduzida entre os meses de maio e novembro de 2018, acompanhando o andamento da safra de cana-de-açúcar, de modo a totalizar três coletas (C1–C3). Características físico-químicas básicas da vinhaça incluíram: DQO total (DQOt) = 36,1–19,9 $g.L^{-1}$, DQO solúvel (DQOs) = 18,9–17,0 $g.L^{-1}$, DBO = 14,9–8,6 $g.L^{-1}$, sulfato (SO_4^{2-}) = 1,7–1,3 $g.L^{-1}$, SSV = 5,6–2,1 $g.L^{-1}$ e pH = 5,33–4,14.

Aparato experimental e condições operacionais

A produção de bioH_2 a partir da vinhaça foi avaliada em um AnSTBR em escala de bancada (1.9 L) continuamente operado por 186 dias. O leito fixo foi estruturado a partir da disposição paralela de tiras de espuma de poliuretano (PU). O pH da vinhaça afluente ao reator foi ajustado entre 6,5±0,01 utilizando-se NaOH (solução 50% m/V) e na última fase operacional contou com a adição de $NaHCO_3$ (0,1 g-$NaHCO_3$.g^{-1}DQOt).

A inoculação do AnSTBR foi conduzida a partir da fermentação natural da vinhaça sob condições termofílicas de temperatura (55ºC), seguindo-se protocolo utilizado em trabalhos anteriores (Ferraz Jr. et al., 2014; Fuess et al., 2016). Posteriormente, o reator foi mantido em condições controladas de temperatura (55ºC), sendo a operação do sistema baseada na aplicação de valores decrescentes de tempo de detenção hidráulica (TDH), i.e., 24, 12 e 6 h, perfazendo valores crescentes de COVa (20–90 kg-COD.m^{-3}.d^{-1}).

Estabeleceu-se uma segregação para o monitoramento em cinco fases operacionais (Ia, Ib, II, IIIa e IIIb) distintas. Essencialmente, foram-se fixadas três fases preponderantes segundo o TDH aplicado de 24 h, 12 h e 6 h respectivamente (Ia, II e IIIa). Posteriormente, na primeira e terceira fases fixaram-se dois desdobramentos (Ib e IIIb) para as mesmas. A fase Ia caracteriza-se pela condição estrita do pH<6 e a queda quase que contínua do mesmo. Enquanto a fase IIIb caracteriza-se pela adição de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) no afluente.

Detalhes das condições operacionais são apresentados na Tabela 1. O escalonamento da COVa teve por objetivo a identificação de condições operacionais ótimas para produção de bioH_2.

Tabela 1: Condições operacionais aplicadas no AnSTBR.

Fase operacional	TDH^t (h)	Período (d)	Vinhaça (coleta)	$COVa^t$ ($kg\text{-}DQO.m^{-3}.d^{-1}$)	Adição de $NaHCO_3$
Ia	24	1-66	C1	25	Não
Ib	24	67-105	C2	20	Não
II	12	106-161	C2 e C3	45	Não
IIIa	6	162-179	C3	90	Não
IIIb	6	180-186	C3	70	Sim

Notas: [t]Valores teóricos.

Monitoramento, métodos analíticos e avaliação do desempenho

O monitoramento do reator foi baseado na determinação dos seguintes parâmetros: pH, DQOt, DQOs, carboidratos totais (CH), glicerol (GLY), ácido lático (HLa), sólidos suspensos voláteis (SSV), sulfato (SO_4^{2-}) para a fase líquida; e, vazão e composição do biogás para a fase gasosa. As análises de pH, DQOt, DQOs, SSV e SO_4^{2-} foram baseadas em protocolos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA e WEF , 2012). As determinações de CH, GLY e HLa foram baseadas em Dubois et al. (1956), Greenhill (2003) e Taylor (1996), respectivamente. Previamente às análises de DQOs, CH, GLY, HLa e SO_4^{2-} as amostras foram filtradas em 0,45 μm. Com relação à fase gasosa, a vazão de biogás foi monitorada acoplando-se um gasômetro (modelo MGC-1 V30; Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GMBH & CO. KG, Bochum, Alemanha) diretamente ao *headspace* do reator. Por sua vez, a composição do biogás (H_2, CO_2 e CH_4) foi obtida via cromatografia gasosa (GC/TCD), conforme detalhado em Perna et al. (2013).

A dinâmica da redução de sulfato foi avaliada primordialmente por meio das variáveis-resposta: pH efluente e conversão de sulfato (EC_{SO4}^{2-}; %). Por meio da oscilação dos valores das mesmas foi possível identificar-se quando passava a ocorrer o processo de sulfetogênese dentro do reator. Ademais também se acompanhou o desempenho do reator quanto a outras variáveis da fase líquida, no caso: conversão de carboidratos totais (EC_{CH}; %), conversão de glicerol (EC_{GLY}; %), conversão de ácido lático (EC_{HLa}; %).

Resultados e Discussão

Em detrimento das diferentes fases operacionais aplicadas e variações notadas frente ao acompanhamento contínuo do AnSTBR chegou-se a significativos resultados inerentes a dinâmica do sulfato tendo-se a vinhaça como substrato. As variáveis de resposta da fase líquida as quais permitiram um maior vislumbramento do ocorrido foram o pH efluente do reator bem como a eficiência de remoção de sulfato ($ER\text{-}SO_4^{2-}$). É interessante apontar que ambas variáveis estão diretamente relacionadas, uma vez que, se há redução de sulfato dentro do reator a mesma impactará no valor do pH.

E isso ficou evidenciado já no início da operação, pois o pH efluente na fase Ia apresentou valores estritamente entre 6 e 7 (Figura 1). Essa faixa de pH efluente sinalizou uma possível rota metabólica da sulfetogênese dentro do reator. Foi possível confirmar a presença da sulfetogênese no sistema por meio da análise da presença de sulfato efluente. Os resultados apontaram no período compreendido para a fase Ia que a eficiência de remoção de sulfato apresentou grande eficácia oscilando entre valores de 60% a 80% (Figura 2).

De acordo com as condições operacionais implicadas para um reator acidogênico não se esperava inicialmente que a sulfetogênese ocorresse. Contudo a mesma pode ser explicada devido ao fato de no início do período de incubação, a liberação de H_2 por bactérias fermentativas durante a acidificação da matéria orgânica prontamente disponível possivelmente estimulou a redução do sulfato por bactérias redutoras de sulfato (BRS) hidrogenotróficas.

Por conseguinte, além da disponibilidade de H_2 no meio a utilização da espuma PU favoreceu o crescimento das BRS imobilizadas no material suporte, como era esperado. Estes fatores foram capazes de propiciar na fase Ia o favorecimento da rota metabólica da sulfetogênese. A versatilidade das BRS faz com que elas tenham vantagem na maioria das competições por substrato.

Constatou-se que a rota metabólica da sulfetogênese manteve-se ativa na fase Ib perdurando até o final da mesma. Todavia houve uma queda significativa na eficiência da redução de sulfato, abrangendo valores entre 0% a 40% (Figura 2). O ocorrido se deve pela utilização de uma nova coleta de vinhaça para alimentação do reator. A diferença composicional e da concentração da vinhaça fez com que a COVa caísse (Tabela 1) desestimulando a sulfetogênese.

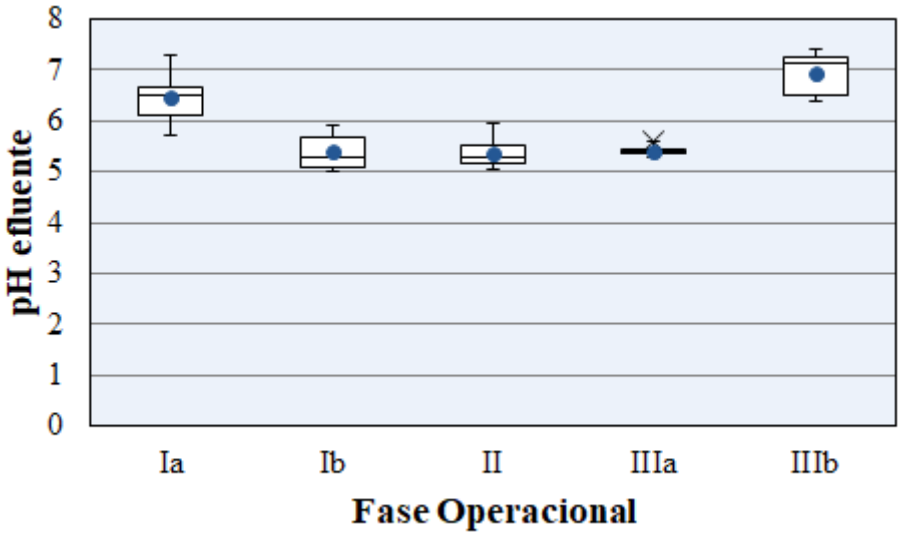


Figura 1: Valores obtidos para o pH efluente nas diferentes fases operacionais.

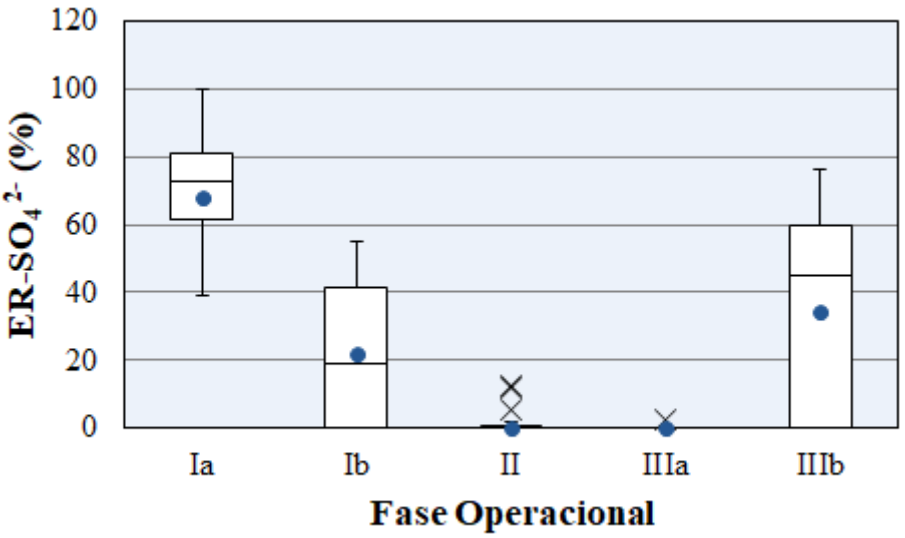


Figura 2: Valores obtidos para a eficiência de remoção de sulfato nas diferentes fases operacionais.

Já na fase II há uma mudança na rota preferida dentro do reator. Notou-se a acidificação do meio através das análises do pH efluente (Figura 1). Nessa fase os valores de pH se

mantiveram essencialmente a valores inferiores a 6,0 apresentando um comportamento declinante quase que constante ao longo dos dias de operação da dada fase. Além disso não houve atividade redutora de sulfato dentro do reator, uma vez que as análises de eficiência apontaram valores de 0% (Figura 2). A alteração da coleta utilizada na alimentação reator, substancialmente correlacionada ao aumento na COVa associada ainda às condições operacionais impostas fizeram com que a acidogênese prevalecesse.

Posteriormente, quando alterou-se novamente o TDH na fase IIIa, desta vez para 6h, não houve mudanças significativas na fase líquida do reator, sinalizando uma estabilização da acidogênese e decorrente continuidade da produção de bioH_2. Esse análise é reflexo da quase que absoluta constância dos valores apresentados de pH efluente (Figura 1) e ER-SO_4^{2-} (Figura 2) comparada a fase II.

É importante perceber-se que na fase II houve uma transição entre as coletas utilizadas na alimentação do reator. No decorrer da operação ao findar do estoque da coleta C2 passou-se a utilizar C3 (Tabela 1). E na fase IIIa manteve-se a utilização de C3. Mesmo utilizando coletas diferentes as variáveis resposta utilizadas no monitoramento do reator apresentaram comportamento muito semelhante. Este fato mostra que as coletas C2 e C3 apresentaram composições mais similares do que comparadas a C1.

Para a última fase operacional, IIIb, decidiu-se por adicionar $NaHCO_3$ ao afluente do reator de forma a obter um panorama mais completo no que diz respeito da dinâmica da redução de sulfato na fermentação termofílica da vinhaça da cana-de açúcar. O reator respondeu rapidamente a adição de $NaHCO_3$ o que fez com que houvesse a retomada da sulfetogênese. Isso se deve pelo fato do $NaHCO_3$ ser um agente tamponador capaz de manter a alcalinidade do meio através de seu efeito tampão para com os ácidos orgânicos oriundos da etapa de acidogênese da fermentação. Sendo assim, essa manutenção da alcalinidade do meio foi capaz de favorecer a atividade das BRS na redução de sulfato.

Por fim, através do conjunto de resultados obtidos constatou-se que as BRS conseguiram se estabelecer mesmo em condições desfavoráveis para sua atividade metabólica. E a utilização da espuma de PU obteve eficácia na imobilização da biomassa permitindo com que ela atuasse na redução de sulfato. Há também a corroboração da composição da coleta C1 utilizada na fase Ia da operação no favorecimento da sulfetogênese. Contudo, ainda há muito o que se explorar sobre o assunto da questão da sulfetogênse-acidogênese a partir da vinhaça da cana-de-açúcar. Salienta-se também que é interessante averiguar-se o comportamento de um reator metanogênico associado a um reator sulfetogênico-acidogênico para um maior aprofundamento do tema e da obtenção de informações de relevância sobre o mesmo.

Conclusões

A partir dos resultados elencados no dado trabalho foi possível concluir que tanto a utilização de espuma PU como material suporte em reator AnSTBR tendo a vinhaça da cana-de-açúcar como substrato como a troca de utilização das coletas de vinhaça para alimentação (variação composicional) ou ainda a associação desses dois fatores foram capazes de favorecer a sulfetogênese dentro do reator. Em um sistema submetido a condições operacionais de temperatura, pH e COVa que favoreçam a acidogênese, na prática não deveriam possibilitar a sulfetogênese. Este argumento reforça ainda mais o favorecimento propiciado pela espuma PU e pela variação composicional da vinhaça da cana-de-açúcar.

Referências Bibliográficas

APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. APHA, Washington DC.

Azbar, N., Dokgoz, F.T.C., Keskin, T., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. Int. J. Hydrogen Energy 34, 7441e7.

Cadavid DL, Zaiat M, Foresti E., 1999. Performance of horizontal—flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate subjected to decreasing COD to sulfate ratios. Water Sci. Technol. 39(10–11), 99–106.

Chen, C.C., Lin, C.Y., 2001. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. Advances in Environmental Research 7 695–699.

Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2009. Dynamics of sulfidogenesis associated to methanogenesis in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. Proc. Biochem. 44, 1050–1054.

Dubois, S.M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric methods for determination of sugar and related substance. Anal. Chem. 228, 13–21.

Ferraz Jr., A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy 39, 16852–16862.

Ferraz Jr., A.D.N., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2015a. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. Bioresour. Technol. 186, 81–88.

Ferraz Jr., A.D.N., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2015b. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. Anaerobe 34, 94–105.

Rosa, P.R.F., Santos, S.C., Silva, E.L., 2014. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. Int. J. Hydrogen Energy 39, 1288e96.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Garcia, M.L., Zaiat. M., 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in continuous acidogenic packed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 41, 8132–8145.

Greenhill, S., 2003. Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. U.S. Patent Application WO2004059315A1.

Intanoo, P., Rangsunvigit, P., Namprohm, W., Thamprajamchit, B., Chavadej, J., Chavadej, S., 2012. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. nt. J. Hydrogen Energy 37, 11104e12.

Kiyuna, L.S.M., Fuess, L.T, Zaiat, M., 2017. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. Bioresour. Technol. 232, 103–112.

Lazaro, C.Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesche, M.B.A., 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. Int. J. Hydrogen Energy 39, 6407–6418.

Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renew. Sust. Energy Reviews v. 44, p. 888–903, 2015.

Perna V., Castelló, E, Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energ. 38, 54–62.

Santos, S.C., Rosa, P.R.F., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. Int. J. Hydrogen Energy 39, 9599–9610.

Silva A.J., Varesche M.B., Foresti, E., Zaiat, M., 2002. Sulfate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. Process. Biochem. 37(9), 927–35.

Silva A.J., Harisawa, J.S., Varesche M.B., Foresti, E., Zaiat, M., 2006. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. Anaerobe 12, 93–98.

Taylor, K.A.C.C., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochem. Biotechnol. 56(1), 49–58.

Vela, F.J., Zaiat, M., Foresti, E., 2002 Influence of the COD to sulphate ratio on the anaerobic organic matter degradation kinetics. Water SA 28, 213–216.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass and Bioenergy 19, 63–102

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DESNITRIFICANTE DO INÓCULO DE LODOS ATIVADOS EM REATORES DE BATELADA NA PRESENÇA DE DICLOFENACO

Luciana de Melo Pirete [1]; Edson Luiz Silva[2]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [3].

[1]Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2]Professor do Departamento de Engenharia Química da PPGEQ-UFSCar;
[3]Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Neste estudo foi avaliada a redução do nitrato nas condições desnitrificantes em reatores bateladas com o inóculo de lodos ativados. Os reatores foram operados com meio sintético e inóculo da biomassa de efluente industrial. A influência da adição do nitrato como receptor de elétrons e do etanol como fonte de substrato para a desnitrificação foi investigada. Os experimentos foram divididos em ensaios preliminares que garantiram a seleção das melhores condições para a ocorrência da desnitrificação. Na sequência, realizaram-se ensaios em bateladas na presença do tóxico diclofenaco a partir das variações de concentrações do etanol, nitrato e do fármaco definidas pelo planejamento experimental com delineamento do composto central rotacional. A adição do etanol e do nitrato influenciou notadamente a desnitrificação, mesmo na presença do fármaco. Com isso, pode-se inferir que as condições experimentais favoreceram a manutenção das populações desnitrificantes provenientes do inóculo.*

Introdução

As tecnologias para o tratamento de esgoto sanitário com objetivo da remoção da matéria orgânica são conhecidas e consolidadas no mundo. Entretanto, no Brasil observa-se limitações quanto à remoção de alguns poluentes nos processos adotados nas estações de tratamento de esgoto (ETE) e uma crescente preocupação com os compostos orgânicos emergentes no ciclo de uso da água (Sperling, 2016).

Dentro da complexidade da composição dos efluentes líquidos, os fármacos se destacam em função do seu consumo generalizado e o seu potencial emergente de causar impactos adversos a qualidade da água e saúde pública. Estes são quantificados em baixos níveis (micro a nanogramas) em águas superficiais, águas residuárias e, até mesmo em água potável (Kassotaki et al., 2018). Como exemplares, se destacam os diclofenaco, triclosan, ibuprofeno e o propranolol.

As principais vias de inserções dos fármacos no ambiente iniciam por meio do consumo humano e veterinário. Dentre estes contaminantes, destacam-se os produtos de higiene pessoal, anti-inflamatórios, hormônios sintéticos, antidepressivos e antibióticos cuja produção e consumo tem sido crescente (Li et al., 2014).

Da ocorrência dos fármacos no ambiente, o diclofenaco e ibuprofeno foram quantificados em 0,45 a 1,10 $\mu g.L^{-1}$ em esgoto sanitários (García et al., 2016) e 200 $\mu g.L^{-1}$ em água residuária de indústria farmacêutica (Sim et al., 2011); o β-bloqueador propranolol foi observado a concentrações de 0,12 a 0,61 $\mu g.L^{-1}$ em esgoto sanitário (Rosal et al., 2010); enquanto o triclosan foi quantificado em concentrações consideráveis de 0,01 a 0,43 $\mu g.L^{-1}$ em águas residuárias (Montagner e Jardim., 2014).

A complexidade e onerosa detecção e quantificação dessas substâncias em diferentes matrizes, justifica a ausência de monitoramento frequente, o que dificulta ou atrasa a implementação de legislações vigentes (Aquino et al., 2013). Desta forma, estes compostos são definidos como contaminantes emergentes e podem causar efeitos adversos no ambiente (Rey et al., 2014).

Por serem compostos biologicamente ativos, os fármacos são produzidos com o intuito de provocar alterações biológicas em organismos alvos. No entanto, com a exposição

contínua destes compostos nas águas residuárias, os organismos vivos não alvos podem sofrer efeitos adversos, podendo, assim, alterar o equilíbrio ecossistêmico da fauna aquática (Ghattas et al., 2017). Dentre estes impactos, destaca-se a genotoxidade, perturbação endócrina e fitotoxicidade, o que torna relevante a demanda por tecnologias de remoção e controle.

Em relação a avaliação ecotoxicológica do diclofenaco, foi observado níveis de toxicidade aguda de 11,45 $mg.L^{-1}$ para bactérias *Vibrio fisheri* EC50, e 22,43 $mg.L^{-1}$ para *Daphnia magna* (Cleuvers, 2004). Além disso, foram detectadas alterações citológicas renais e nas brânquias de peixes trutas arco-íris a concentrações de 5,0 $\mu g.L^{-1}$ de diclofenaco por meio de testes histopatológicos e toxicidade crônica em espécies *Ceriodaphnia dúbia* e peixes zebra com 1,0 $mg.L^{-1}$ e 4,0 $mg.L^{-1}$, respectivamente, em um período de 28 dias (Schweiger et al., 2004).

Além disso, Alves (2003) detectou níveis de toxicidade aguda e de imobilização da metade da população de microcrustáceos *Daphnia similis* a concentrações de 97000 $\mu g.L^{-1}$ de ibuprofeno em 30 minutos de exposição. Santos et al (2010) observaram níveis de toxicidade aguda para a espécie *Dunaliella Tertiolecta* a partir de 185,69 $\mu g.L^{-1}$ de triclosan após 96 horas de exposição.

Quanto a biodegradação de fármacos, segundo Fent et al (2006), seus compostos ativos podem ser adsorvidos pela estrutura lipídica das bactérias por meio de interações hidrofóbicas, assim como assimilados nas cargas negativas dos polissacarídeos estruturais dos consórcios bacterianos.

Além disso, a degradação de compostos xenobióticos pelos microrganismos pode ocorrer em condição aeróbia, anaeróbia e anóxica. Através destas vias, oxigênio, sulfato, dióxido de carbono e nitrato, por exemplo, são utilizados como receptores de elétrons, no metabolismo desassimilativo, sendo convertidos às formas mais reduzidas (Gaylarde et al., 2005; Madigan, 2010). As bactérias desnitrificantes, por serem em sua maioria facultativas, utilizam o nitrato na transferência de elétrons dos compostos orgânicos gerando energia para a síntese celular (Wilson e Bouwer, 1997).

A presença de co-subtrato é fundamental para o desenvolvimento microbiano, o que resulta na maior degradação de agentes tóxicos. Assim, estudos de processos para tratamento de efluentes são necessários, os quais iniciam-se em escalas menores e laboratoriais, com efluentes sintéticos para viabilizar a aplicação em escala piloto com efluentes reais.

A partir dessas considerações pretende-se nessa pesquisa avaliar a remoção dos fármacos (diclofenaco, triclosan, ibuprofeno e propranolol) em reatores em bateladas sob condições desnitrificantes. Para tanto, neste estudo, foi avaliado o potencial desnitrificante do lodo de inóculo de lodos ativados submetido a diferentes concentrações de nitrato e de etanol nas condições anóxicas.

Trata-se de uma pesquisa inédita, uma vez que posteriormente, a remoção e degradação serão avaliadas em reator de leito fluidificado em escala piloto com esgoto sanitário. Pretende-se no final dessa pesquisa caracterizar as populações de bactérias estabelecidas nos reatores em bateladas e no biofilme da areia (material suporte do reator de leito fluidificado) por meio de técnicas de Biologia molecular.

Material e Métodos

Fluxograma experimental

As etapas de operação e análises experimentais estão detalhadas na Figura 1 e na Tabela 1, respectivamente. Para os ensaios preliminares, o efluente sintético foi inoculado com a biomassa de lodos ativados e submetido a quatro condições: com e sem etanol como co-substrato e com e sem fluxionamento com argônio para delimitar a condição anóxica. Para o ensaio I foi realizado planejamento fatorial com design experimental rotacional com variações das concentrações de etanol, nitrato e do diclofenaco. Em seguida, os demais

ensaios serão realizados conforme o planejamento experimental com variações das concentrações dos respectivos fármacos.

Figura 1: Fluxograma experimental.

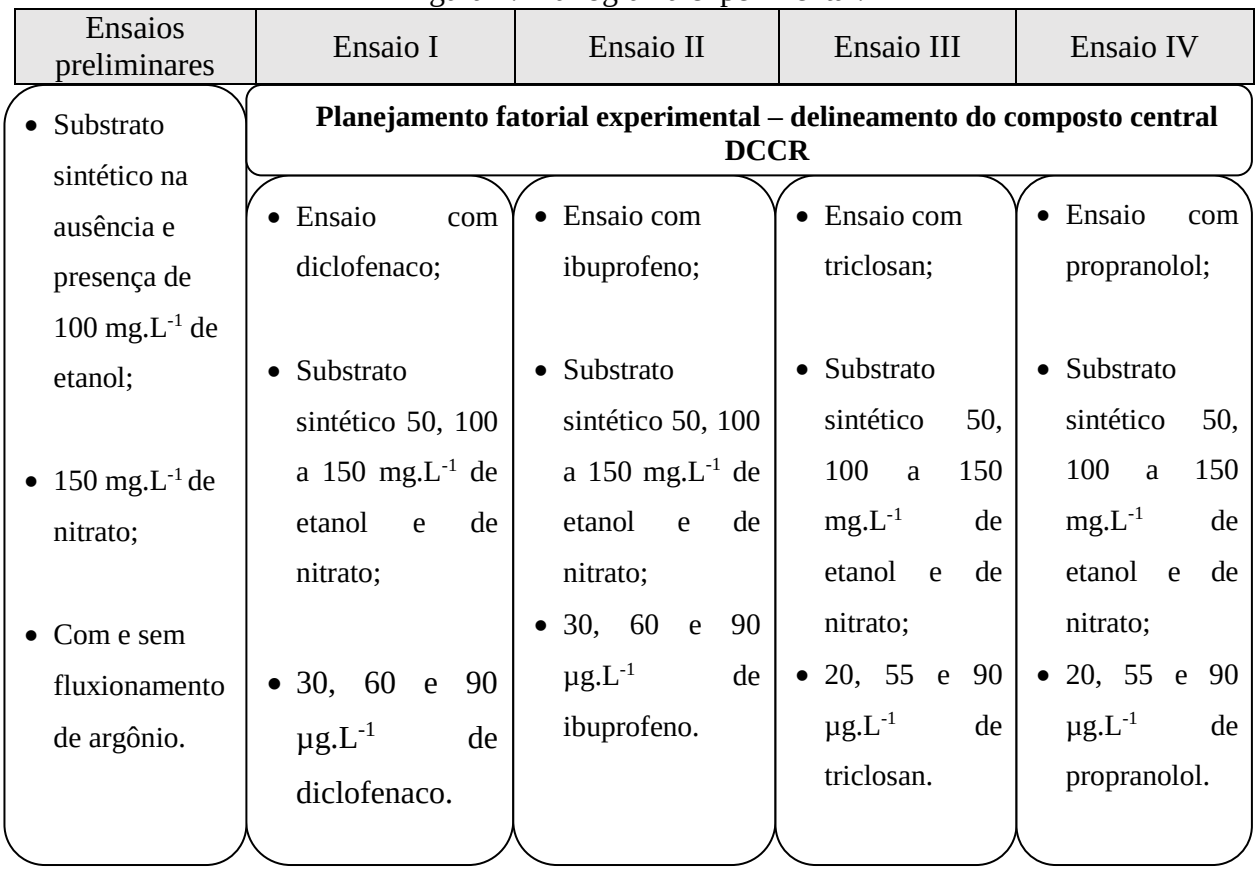


Tabela 1: Análises físico-químicas dos ensaios.

Parâmetros	Método	Referência
Etanol ($mg.L^{-1}$)	Cromatografia (HPLC)	Penteado et al. (2013)
Ácidos orgânicos voláteis ($mg.L^{-1}$)	Cromatografia (HPLC)	Penteado et al. (2013)
Nitrato ($mg.L^{-1}$)	Espectometria UV	Apha (2005)
Fármacos($\mu g.L^{-1}$)	Cromatografia (UHPLC MS/MS)	Souza et al. (2015)
Série sólidos ($g.L^{-1}$)	Gravimétrico	Apha (2005)

Inóculo

O inóculo utilizado nos experimentos de batelada foi proveniente da biomassa de sistema de lodos ativados usado no tratamento de esgoto sanitário da Indústria de Motores Volkswagen de São Carlos/SP. O lodo foi coletado em frasco plástico com capacidade de 10 L, e após a coleta foi armazenado a 4°C em câmara fria.

A seleção deste inóculo foi feita por este apresentar uma diversidade microbiana com características mistas ressaltando as bactérias aeróbias, nitrificantes e desnitrificantes (Santos, 2014; Moura, 2014).

Avaliação do potencial desnitrificante do inóculo

Foram realizados ensaios em reatores em batelada para avaliar o potencial desnitrificante do inóculo de lodos ativados. Para isso, nos ensaios preliminares foi adicionado 150 $mg.L^{-1}$ de nitrato, na forma de nitrato de sódio, e testado nas condições de

ausência e presença de 100 mg.L^{-1} de etanol; com e sem fluxionamento com argônio por 10 minutos.

Enquanto no ensaio I, a curva de redução do nitrato foi analisada na condição desnitrificante sob variações das concentrações de etanol, diclofenaco e nitrato pelo planejamento fatorial design do composto central rotacional. Para ambas fases experimentais, os resultados foram analisados e ajustados com o auxílio do aplicativo computacional OriginPro 9®.

A adição de 100 mg.L^{-1} de etanol resultou em uma DQO na faixa de 250 mg.L^{-1}. O meio de cultivo utilizado no ensaio foi descrito por Dolfing et al. (1990) e solução traço de metais por Zeyer e Kearney (1982) descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Composição do Meio Dolfing

Componentes	Quantidade – q.s.p. 1 L de água ultrapurificada
$MgSO_4.7H_2O$	100 mg
NH_4Cl	110 mg
KH_2PO_4	330 mg
Na_2HPO_4	1200 mg
Solução de micronutrientes	0,1 L

Fonte: Dolfing et al. (1990)

Tabela 1: Composição da solução de micronutrientes

Componentes	Quantidade – q.s.p. 1 L de água ultrapurificada
$FeSO_4.7H_2O$	100 mg
$MnSO_4.H_2O$	100 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	25 mg
$Na_2B_4O_7.10H_2O$	25 mg
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	25 mg
$CuCl_2.2H_2O$	25 mg

Fonte: Zeyer e Kearney (1982)

Os ensaios de batelada foram realizados em frascos de Duran (1L), considerando 330 mL de volume reacional e 1,0 g SSV.L^{-1} de inóculo. Os sistemas foram submetidos sob agitação de 100 rpm e temperatura de 30°C. A operação dos reatores seguiu-se até 16 horas.

Delineamento do composto central rotacional

A metodologia utilizada dos dados obtidos do ensaio I foi o planejamento de delineamento do composto central rotacional (DCCR), no qual foram levados em consideração 3 fatores, 2 níveis em triplicata. O planejamento foi dividido em 3 blocos com os fatores: nitrato (NO_3^-), diclofenaco (DIC) e etanol (EtOH) denotados como X_1, X_2 e X_3 respectivamente para cada ensaio (Tabela 4).

As concentrações dos compostos foram previamente definidas, de acordo com a literatura, em 50, 100 e 150 mg.L^{-1} de nitrato e etanol (Gusmão et al., 2007; Maintiguer et al., 2013) e 30, 60 e 90 µg.L^{-1} de diclofenaco (Souza et al., 2015). Para todos os ensaios preditos, os reatores em batelada foram fluxionados com argônio por 10 minutos.

Tabela 4: Matriz do Planejamento Fatorial

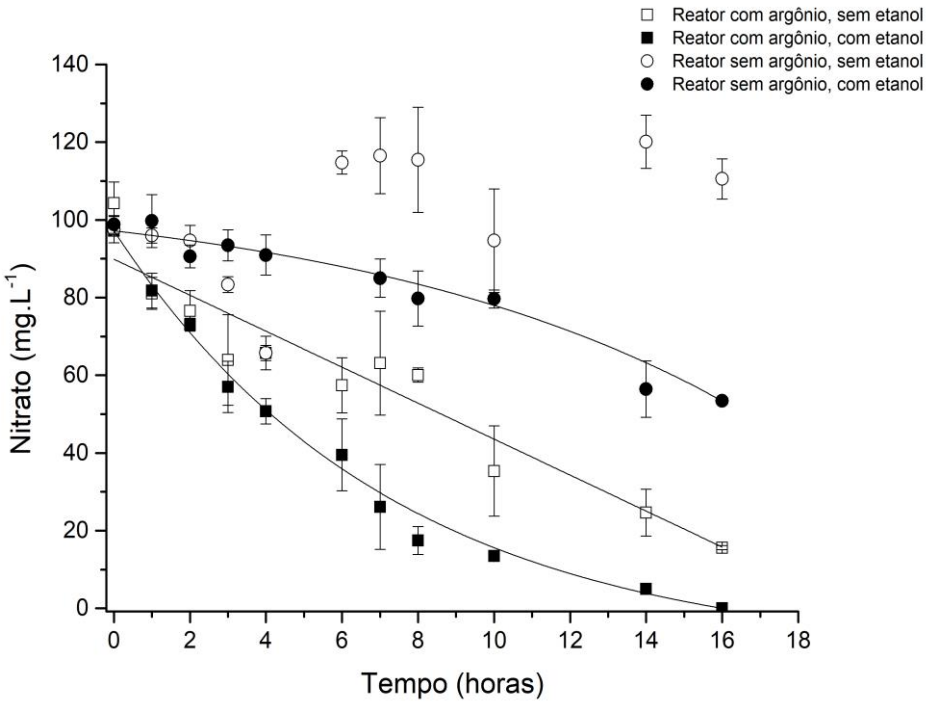
Bloco	Reator	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
		Nitrato (X1)	Diclofenaco (X2)	Etanol (X3)	Nitrato ($mg.L^{-1}$)	Diclofenaco ($\mu g.L^{-1}$)	Etanol ($mg.L^{-1}$)
1	1	-1	-1	-1	50	30	50
	2	-1	1	1	50	90	150
	3	0	0	0	100	60	100
	4	1	-1	1	150	30	150
	5	1	1	-1	150	90	50
2	6	0	0	0	100	60	100
	7	-1	1	-1	50	90	50
	8	1	1	1	150	90	150
	9	-1	-1	1	50	30	150
	10	1	-1	-1	150	30	50
3	11	0	1,68	0	100	110,4	100
	12	1,68	0	0	184	60	100
	13	0	0	-1,68	100	60	16
	14	0	0	1,68	100	60	184
	15	0	-1,68	0	100	9,6	100
	16	0	0	0	100	60	100
	17	-1,68	0	0	16	60	100

Resultados Parciais e Discussão

Ensaios preliminares

A remoção do nitrato pelas bactérias desnitrificantes foi observada em reatores submetidos a quatro condições: com e sem etanol como co-substrato e com e sem fluxionamento com argônio por 10 minutos (Figura 2).

Figura 2: Decaimento do nitrato do ensaio preliminar em reatores em bateladas.



Nas condições apresentadas, apenas o reator não fluxionado com argônio e sem etanol não apresentou remoção de nitrato durante as fases do experimento. O que pode observar a importância da condição anóxica e da presença da fonte de carbono no meio para a manutenção da diversidade desnitrificante heterotrófica. Segundo Andrade (2016), a presença de co-substratos e dos aceptores de elétrons pode alterar a estrutura da comunidade microbiana, pois a oferta de nutrientes e da fonte de carbono suplementar influencia o metabolismo microbiano e auxilia na seleção de organismos e rotas metabólicas predominantes.

Além disso, Ciudad (2005) observou que a eficiência da desnitrificação heterotrófica depende diretamente da disponibilidade de matéria orgânica, tornando necessária a adição de uma fonte externa de carbono em caso de insuficiência de substrato orgânico no afluente. Os estudos realizados pelos autores citados mostraram que a adição da matéria orgânica prontamente biodegradável resultou no aumento da velocidade de desnitrificação, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Desta forma, pode-se inferir que as condições experimentais com nitrato favoreceram a manutenção das populações desnitrificantes provenientes do inóculo de sistema de lodos ativados em condições de substrato sintético contendo 100 $mg.L^{-1}$ de etanol e com o fluxionamento com argônio por 10 minutos.

Destaca-se também que o etanol favoreceu sobremaneira a desnitrificação como observado por Santos et al., (2004) utilizando reatores em batelada com lodo granulado; Gusmão et al., (2007) utilizando reatores de leito fixo com biomassa desnitrificante; e Maintinguer et al., (2013) utilizando reatores em batelada com inóculo de lodos ativados.

Santos et al. (2004) avaliaram a influência de três fontes de carbono (metanol, etanol e metano) para o potencial desnitrificante em ensaios em bateladas. Por base nos parâmetros cinéticos de desnitrificação, eles observaram que a presença de 38,3 $mg.L^{-1}$ de etanol favoreceu a remoção em 99,9% de nitrato (100 $mg.L^{-1}$) durante 1 hora do experimento.

Assim como Gusmão et al (2007) que obtiveram o consumo de 98,9% de nitrato (350 $mg.L^{-1}$) durante 14 horas de operação em reatores de leito fixo. Eles analisaram o decaimento do nitrato nos reatores com a biomassa de lodos ativados em esgoto sanitário a concentrações iniciais 377,0 $mg.L^{-1}$ de etanol como fonte de carbono.

Além disso, o fluxionamento com argônio favoreceu a baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio e contribuiu para maior redução do nitrato (Figura 2). O que também foi observado no trabalho de Bueno (2011) que detectou potenciais inibitórios da alta concentração de OD para o desenvolvimento das desnitrificantes em reatores em bateladas com licor misto e inóculo da biomassa de lodos ativados.

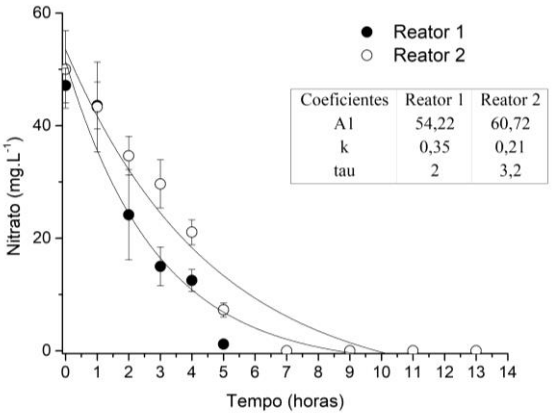
Estudos realizados por Peng (2007) relatam que concentrações de OD superiores a 1,0 $mg.L^{-1}$ podem inibir a desnitrificação. Segundo Pochana e Keller (1999), baixas concentrações de oxigênio dissolvido são essenciais para altas taxas de redução do nitrato, sendo que a eficiência da desnitrificação decresce quando a concentração de OD é superior a 0,2 $mgO_2.L^{-1}$. Considerando esses estudos, a concentração de OD deve ser mantida em um valor baixo, para a redução efetiva de nitrato.

Além disso, a adição de nitrato concomitantemente do etanol e o fluxionamento com argônio favoreceram as bactérias desnitrificantes (Maintiguer et al., 2003; Santos et al., 2004) que são retratadas segundo a literatura com alta habilidade de remoção e biodegradação de compostos tóxicos e recalcitrantes (Wang et al. 2012; Lu et al., 2014, Dorer et al., 2016).

Ensaio I: Planejamento fatorial com diclofenaco

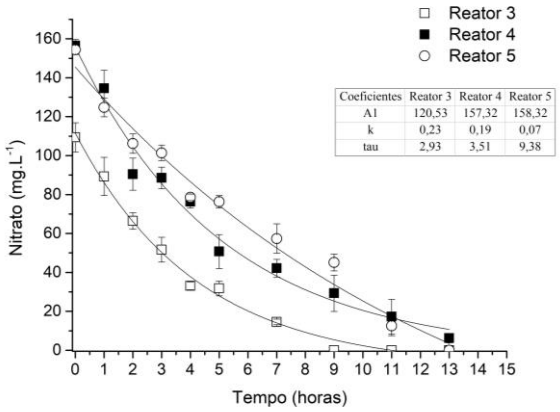
Nos ensaios em reatores em batelada do design de composto central rotacional (DCCR) foram verificadas remoções entre 90 a 99,9% de nitrato (Figura 3).

Figura 3: Redução do nitrato em reatores nas condições representadas pelo DCCR.



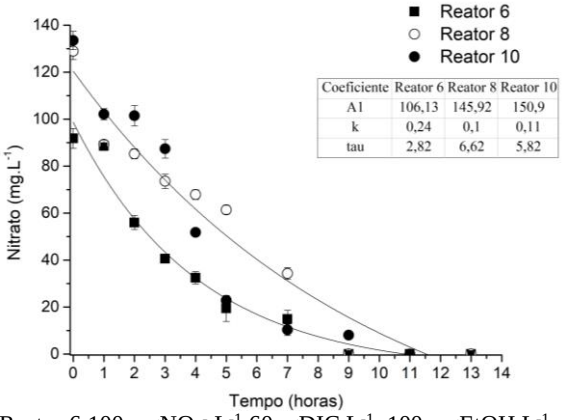
Coeficientes	Reator 1	Reator 2
A1	54,22	60,72
k	0,35	0,21
tau	2	3,2

Reator 1: 50 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 30µgDIC.L^{-1}; 50 mgEtOH.L^{-1}
Reator 2: 50 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 90µgDIC.L^{-1}; 150 mgEtOH.L^{-1}



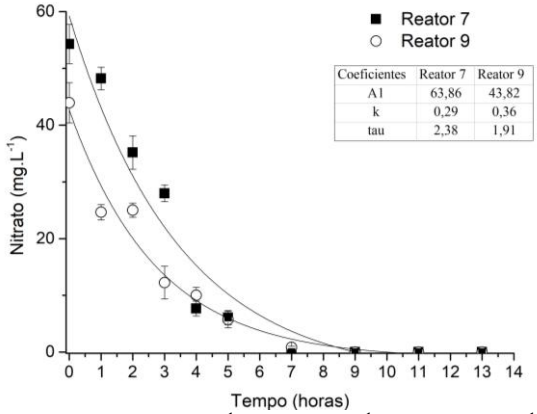
Coeficientes	Reator 3	Reator 4	Reator 5
A1	120,53	157,32	158,32
k	0,23	0,19	0,07
tau	2,93	3,51	9,38

Reator 3: 100 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 60µgDIC.L^{-1}; 100 mgEtOH.L^{-1}
Reator 4: 150 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 30µgDIC.L^{-1}; 150 mgEtOH.L^{-1}
Reator 5: 150 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 90µgDIC.L^{-1}; 50 mgEtOH.L^{-1}



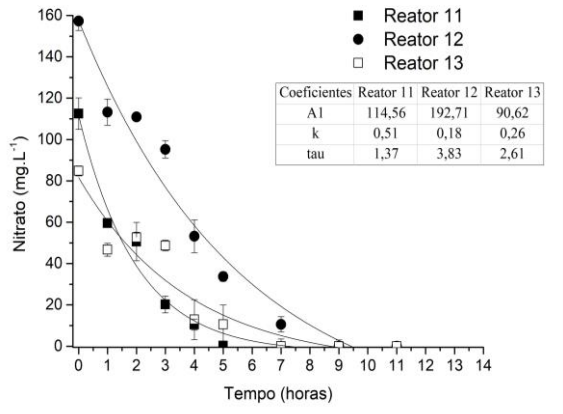
Coeficiente	Reator 6	Reator 8	Reator 10
A1	106,13	145,92	150,9
k	0,24	0,1	0,11
tau	2,82	6,62	5,82

Reator 6:100 $mgNO_3^-.L^{-1}$;60µgDIC.L^{-1}; 100 mgEtOH.L^{-1}
Reator 8: 150 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 90µgDIC.L^{-1}; 150 mgEtOH.L^{-1}
Reator 10: 150 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 30µgDIC.L^{-1}; 50 mgEtOH.L^{-1}



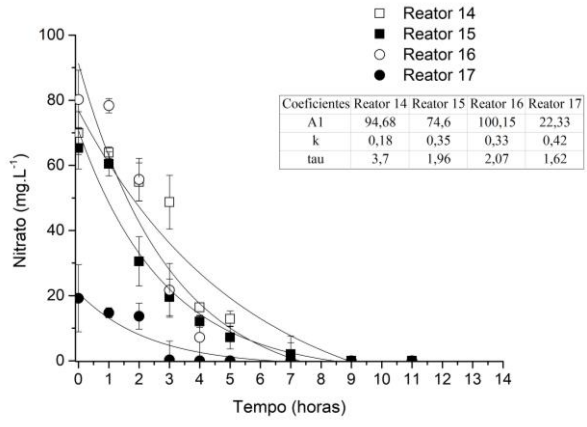
Coeficientes	Reator 7	Reator 9
A1	63,86	43,82
k	0,29	0,36
tau	2,38	1,91

Reator 7: 50 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 90µgDIC.L^{-1}; 50 mgEtOH.L^{-1}
Reator 9: 50 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 30µgDIC.L^{-1}; 150 mgEtOH.L^{-1}



Coeficientes	Reator 11	Reator 12	Reator 13
A1	114,56	192,71	90,62
k	0,51	0,18	0,26
tau	1,37	3,83	2,61

Reator 11:100 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 30µgDIC.L^{-1};50 mgEtOH.L^{-1}
Reator 12:184 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 60µgDIC.L^{-1};100 mgEtOH.L^{-1}
Reator 13: 100 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 60µgDIC.L^{-1}; 16 mgEtOH.L^{-1}



Coeficientes	Reator 14	Reator 15	Reator 16	Reator 17
A1	94,68	74,6	100,15	22,33
k	0,18	0,35	0,33	0,42
tau	3,7	1,96	2,07	1,62

Reator 14: 100 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 60µgDIC.L^{-1}; 184 mgEtOH.L^{-1}
Reator 15: 100 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 9,6µgDIC.L^{-1}; 100 mgEtOH.L^{-1}
Reator 16: 100 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 60µgDIC.L^{-1}; 100 mgEtOH.L^{-1}
Reator 17: 16 $mgNO_3^-.L^{-1}$; 60µgDIC.L^{-1}; 100 mgEtOH.L^{-1}

Foram obtidos altos percentuais de remoção de nitrato na presença de diferentes concentrações de diclofenaco, podendo inferir que a presença do diclofenaco não interferiu na desnitrificação.

Tais observações também foram feitas por Arias et al. (2018) que observaram efetiva redução do nitrato dependendo da disponibilidade do doador de elétrons, para concentrações iniciais de 10 $\mu g.L^{-1}$ de diclofenaco em um sistema combinado de um reator UASB e um tanque de nitrificação e desnitrificação sob escala piloto. Segundo os autores, a taxa de desnitrificação obtida foi de 43±10 $mgN.L^{-1}.d^{-1}$ realizada por um consórcio de bactérias desnitrificantes heterotróficas e de microrganismos anammox. Com isso, os autores obtiveram remoção de 90% do nitrato no tanque de desnitrificação nas condições anóxicas em 6 horas de experimento.

Com relação aos parâmetros cinéticos obtidos no trabalho (Figura 3), os dados foram ajustados à equação de modelagem exponencial de decaimento ExpDec®. A taxa de decaimento do nitrato (k) ou a velocidade específica foi em média de 0,472 h^{-1} para os ensaios em batelada do design do composto central rotacional, enquanto o tempo de meia-vida do composto nitrogenado (tau) foi em média de 3,12 h. Assim, para os ensaios realizados o nitrato reduziu a metade da concentração depois de 3 horas de operação dos reatores.

Ozdemir et al (2015) avaliaram os efeitos agudos e crônicos do diclofenaco para o potencial desnitrificante do inóculo de lodos ativados em reatores em bateladas. Para isso, os autores inocularam os reatores com 140 $mg.L^{-1}$ de nitrato e 100 $mg.L^{-1}$ de metanol como fonte de substrato e variaram a concentração do fármaco de 0 a 200 $\mu g.L^{-1}$ sob condição anóxica para favorecer as bactérias heterotróficas desnitrificantes. Com isso, eles observaram redução da produção de gás N_2 e acúmulo de nitrato em reatores com maiores concentrações do fármaco (200 $\mu g.L^{-1}$), inferindo a ocorrência de efeitos crônicos do diclofenaco sobre a biomassa na desnitrificação para esta concentração. Em contrapartida, para os demais reatores com concentração inicial de diclofenaco inferior a 200 $mg.L^{-1}$, o nitrato foi removido completamente no final das 13 horas da incubação.

Além disso, Ooi et al. (2018) avaliaram a presença do diclofenaco em reatores em batelada para as condições desnitrificantes com concentrações iniciais de nitrato de 55,0 $mg.L^{-1}$. Os autores obtiveram redução completa do nitrato e não observaram toxicidade aguda do fármaco para a comunidade desnitrificante heterotrófica nesta concentração.

Da mesma forma, Suarez et al. (2010) observaram em ensaios em batelada que a comunidade microbiana desnitrificante toleraram faixas de concentrações entre 10 a 40 $\mu g.L^{-1}$ de diclofenaco. De forma similar, observou-se neste trabalho que para as diferentes concentrações de diclofenaco (30 a 90 $\mu g.L^{-1}$) usadas no design do composto central rotacional obtiveram altas remoções de nitrato, implicando assim a não interferência do diclofenaco na desnitrificação.

Conclusão

A adição do etanol e do nitrato foi fundamental para o metabolismo desassimilativo da redução do nitrato responsável pelas bactérias desnitrificantes heterotróficas. Além disso, a redução do oxigênio dissolvido promoveu a efetiva atividade desnitrificante. A partir destas considerações, pode-se inferir que o diclofenaco não alterou a atividade desnitrificante por meio da redução do nitrato nas concentrações e condições estabelecidas pelo DCCR.

Referências Bibliográficas

APHA. 2005. Standard methods for examination of water and wastewater. 21th Ed. Washington: American Public Health Association.

Aquino, S.F. de, Brandt, E.M.F., Chernicharo, C.A. de L., 2013. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. Eng. Sanit. e Ambient. 18, 187–204.

Arias, A., Alvarino, T., Allegue, T., Suárez, S., Garrido, J.M., Omil, F., 2018. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal. J. Hazard. Mater. 359, 113–120.

Bueno, R.F. (2011) Nitrificação e desnitrificação simultânea em reator com biomassa em suspensão e fluxo contínuo de esgoto. Universidade de São Paulo.

Ciudad, G.; Rubilar, O.; Muñoz, P.; Ruiz, G.; Chamy, R.; Vergara, C.; Jeison, D. (2005) Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. Process Biochemistry, 40, 1715-1719

Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 309–315.

Dolfing, J.; Zeyer, P.; Binder-Eicher, P.; Schwarzenbach, R.P., 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Archieves of Microbiology, 154, 336-34.

Fent, K.; Weston, A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology, 76, 122–159.

García-Carnelli, C., Rodríguez, P., Heinzen, H., Menéndez, P., 2016. Influence of Culture Conditions on the Biotransformation of (+)-Limonene by Aspergillus niger. Z. Naturforschung C J. Biosci. 69, 61–67.

Gaylarde, C. C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P., 2005. Biorremediação: aspectos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 34, 36-43.

Ghattas, A.-K., Fischer, F., Wick, A., Ternes, T.A., 2017. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. Water Res. 116, 268–295.

Gusmão, V.; Martins, T. H., Chinalia, F.; Sakamoto, I. K.; Varesche, M. B. A., 2007. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. Process Biochem. 41, 1391-1400.

Kassotaki, E., Pijuan, M., Joss, A., Borrego, C.M., Rodriguez-Roda, I., Buttiglieri, G., 2018. Unraveling the potential of a combined nitritation-anammox biomass towards the biodegradation of pharmaceutically active compounds. Sci. of The Total Environ. 624, 722–731.

Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. Sci. Total Environ. 468, 908–932.

Madigan T., M., Martinko, J.M., Dumlap, P.V., Clark, D.P., 2016. Microbiologia de Brock, 14 ed. Artmed, Porto Alegre.

Maintiguer, S. I.; Adorno, M. A. T.; Sakamoto, I. K.; Varesche, M. B. A. 2013. Evaluation of the microbial diversity of the denitrifying bacteria in batch reactor. Braz. J. Chem. Eng. 30, 457-465.

Montagner, C.C., Jardim, W.F., 2011. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). J. Braz. Chem. Soc. 22, 1452–1462.

Moura, R. B.. 2014. Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e circulação do efluente. Universidade de São Paulo.

Ooi, G.T.H., Tang, K., Chhetri, R.K., Kaarsholm, K.M.S., Sundmark, K., Kragelund, C., Litty, K., Christensen, A., Lindholst, S., Sund, C., Christensson, M., Bester, K., Andersen, H.R., 2018. Biological removal of pharmaceuticals from hospital wastewater in a pilot-scale staged moving bed biofilm reactor (MBBR) utilizing nitrifying and denitrifying processes. Bioresour. Technol. 267, 677–687.

Ozdemir, G., Aydin, E., Topuz, E., Yangin-Gomec, C., Okutman Tas, D., 2015. Acute and chronic responses of denitrifying culture to diclofenac. Bioresour. Technol. 176, 112–120.

Peng, Y.Z., Li, Y.Z., Peng, C.Y., Wang, S.Y., 2004. Nitrogen removal from pharmaceutical manufacturing wastewater with high concentration of ammonia and free ammonia via partial nitrification and denitrification. Water Sci. Technol. 50, 31–36.

Penteado, J. C. P.; EL Seoud, O. A.; Carvalho, L. R. F. 2006. Alquilbenzeno Sulfonato Linear: Uma Abordagem Ambiental e Analítica. Química Nova, 29, 1038-1046.

Pochana, K. e Keller, J. 1999. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). Water Science and Technology, 39, 61-68.

Rey, A.; García-Muñoz, P.; Hernández-Alonso, M. D.; Mena, E.; García-Rodríguez, S.; Beltrán, F. J., 2014 WO3–TiO2 based catalysts for the simulated solar radiation assisted photocatalytic ozonation of emerging contaminants in a municipal wastewater treatment plant effluent. Applied Catalysis B: Environmental, 154, 274–284.

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. Water Research, Emerging Contaminants in water: Occurrence, fate, removal and assessment in the water cycle (from wastewater to drinking water) 44, 578–588.

Santos, C. E. D., 2014. Influência da relação carbono/nitrogênio e da fonte de carbono no processo de nitrificação e desnitrificação simultânea em reator de leito estruturado. Universidade de São Paulo.

Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. J. Hazard. Mater. 175, 45–95.

Santos, S. G.; Varesche, M. B. A.; Zaiat. M.; Foresti. E., 2004. Comparison of Methanol, Ethanol, and Methane as Electron Donors for Denitrification. Environmental Engineering Science 21, 313-320.

Schweiger, J; Ferling, H.; Mallow, U.; Wintermayr, H.; Negele, R. D. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. histopathological alterations 110 and bioaccumulation in rainbow trout. Aquatic Toxicol. 68, 141 – 150.

Sim, W.-J., Lee, J.-W., Lee, E.-S., Shin, S.-K., Hwang, S.-R., Oh, J.-E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. Chemosphere 82, 179–186.

Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Carneiro, R.L., Fadini, P.S., 2015. Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments. J. Sep. Sci. 38, 3454–3460.

Suarez, S., Omil, F., Lema, J.M., 2010. Fate and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in a conventional activated sludge treatment process. Water Pollution, pp. 255–265.

Von Sperling, M., 2016. Urban Wastewater Treatment in Brazil. Inter-American Development Bank. Brasil.

Wilson. L. P.; Bower, E. J., 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18, 116–130.

Zeyer, J.; Kerney, P. C., 1989. Microbial degradation of para- chloroaniline as sole carbon and nitrogen source. Pestic. Biochem. and Physiol. 17, 215-223.

AJUSTE DE MODELOS HIRÁULICOS DE PRIMEIRA ORDEM EM ALAGADOS CONSTRUÍDOS DE FLUXO SUBSUPERFICIAL HORIZONTAL AERADOS INTERMITENTEMENTE

João G. T. Queluz [1]; Isabela P. Silva[2]; Gabriela B. Costa[2]; Marcelo L. Garcia [3]

[1] Pós-Doutorando do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[2] Discente do curso Engenharia Ambiental (IGCE/UNESP);
[3] Professor do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP).

Resumo. *O objetivo deste trabalho foi verificar o ajuste do modelo hidráulico de fluxo em pistão e de suas variações e, assim, identificar o modelo que melhor descreve a cinética de remoção da demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total (NT) em alagados construídos de fluxo subsuperficial horizontal (ACFH) com aeração intermitente. Foram utilizados cinco ACFH aerados intermitentemente e cultivados com Typha latifólia. Cada sistema recebeu 8,6 litros diários de efluente sintético, resultando em 3 dias de tempo de detenção hidráulica (TDH). As concentrações de DQO e NT foram determinadas ao longo dos ACFH e os dados obtidos foram comparados com as estimativas fornecidas pelos modelos hidráulicos utilizando-se o coeficiente de determinação (R^2). A verificação do ajuste dos modelos foi realizada de duas formas: (1) sem e (2) com os efeitos da evapotranspiração (ET). Entre os modelos estudados o modelo de fluxo em pistão apresentou o pior desempenho, enquanto que os modelos de fluxo em pistão modificados (com a inclusão do coeficiente de resistência à degradação e da concentração residual) são os que melhor descreveram a cinética de remoção de DQO e NT nos ACFH. Além disso, a incorporação das perdas de água por ET aumentou o ajuste dos modelos.*

Introdução

O dimensionamento e a estimativa das concentrações de poluentes do efluente em alagados construídos de fluxo subsuperficial horizontal (ACFH) são frequentemente realizados pelo modelo hidráulico de primeira ordem de fluxo em pistão (Reed et al., 1995; Kadlec e Knight, 1996; Rousseau et al., 2004; Brasil, 2005). Esse modelo prevê o decaimento exponencial da concentração de poluentes até atingir assintoticamente o valor zero e a concentração final do efluente está em função do coeficiente de remoção (K) vezes o TDH (Von Sperling e De Paoli, 2013).

Entretanto, embora o modelo de fluxo em pistão tenha elevada probabilidade de causar erros no dimensionamento de ACFH - uma vez que é propenso a estimar valores muito baixos para a concentração do efluente – devido à sua simplicidade, ele continua sendo amplamente empregado (Kadlec, 2000; Kadlec e Wallace, 2008; Langergraber, 2011).

Para reduzir estes erros, Kadlec e Knight (1996) sugeriram a inclusão da concentração residual (C*) de poluente nos modelos hidráulicos de primeira ordem, comumente denominados de modelos K-C*, onde C* é o limite inferior não nulo que o modelo irá atingir assintoticamente. Outra alteração proposta para o modelo de fluxo em pistão é o denominado modelo de Brasil, que inclui o coeficiente de aumento da resistência da matéria orgânica à degradação e redução do TDH (n), sendo que a magnitude de n pode variar em função das características da matéria orgânica remanescente e do grau de dispersão hidráulica do sistema (Brasil et al., 2007).

Na literatura, poucos trabalhos ajustam e/ou utilizam modelos hidráulicos de primeira ordem para descrever a eficiência e a cinética de remoção de poluentes em ACFH aerados (Boog et al., 2014). Além disso, não há na literatura estudos que avaliem o ajuste de modelos hidráulicos e que determinem parâmetros cinéticos que descrevam a remoção de DQO e NT em ACFH aerados intermitentemente para as condições climáticas brasileiras.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o ajuste do modelo hidráulico de fluxo em pistão e de suas variações e, assim, identificar o modelo que melhor descreve a cinética de remoção da DQO e NT em ACFH com aeração intermitente.

Material e Métodos

Características do sistema de tratamento

O experimento foi realizado em ambiente protegido (estufa agrícola) no Centro de Estudos Ambientais (CEA) - UNESP, Rio Claro, SP. O sistema de tratamento foi composto por cinco ACFH em escala piloto (Figura 1). Cada um dos ACs foi composto por uma caixa d'água retangular em polipropileno com capacidade aproximada de 61 litros (31,0 x 35,5 x 55,5 cm) e, como meio suporte, utilizou-se brita #0 (Ø = 2,4 - 9,5 mm) com porosidade de 53%. As caixas d'água foram preenchidas com material suporte até a altura de 30 cm e o nível do efluente foi mantido a 25 cm, resultando em volume saturado aproximado de 26 litros. Os cinco sistemas foram cultivados com *Typha latifólia*.

Figura 1: Leitos de alagados construídos do sistema de tratamento.

Taxas de aplicação de oxigênio

Os ACFH foram avaliados com diferentes taxas de aplicação de oxigênio. Para isso, os sistemas foram ajustados para operar com o mesmo intervalo de aeração: os cinco ACFH eram aerados intermitentemente em 3 períodos com duração de 1 hora (1 h aerando/7 h sem aeração) distribuídos igualmente ao longo do dia. Assim, para avaliar o efeito de diferentes taxas de aplicação de oxigênio na remoção de poluentes os sistemas foram operados com diferentes vazões de aplicação de oxigênio: ACFH 1: sem aeração

(0 $L.min^{-1}$); ACFH 2: 2 $L.min^{-1}$; ACFH 3: 5 $L.min^{-1}$; ACFH 4: 10.L min^{-1}; e ACFH 5: 20 $L.min^{-1}$. As diferentes vazões foram obtidas com o uso de compressores de ar para aquário disponíveis no mercado. O oxigênio foi aplicado nos sistemas utilizando difusor tubular de ar (mangueira porosa para piscicultura) instalados no fundo e ao longo da seção longitudinal das caixas de polipropileno.

Operação do sistema, tempo de detenção e análise de amostras

Diariamente eram aplicados 8,6 litros de efluente sintético com concentração média de DQO de 389 $mg.L^{-1}$. O efluente sintético era preparado utilizando água de abastecimento com a adição de 387 $mg.L^{-1}$ de sacarose, 188 $mg.L^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$, 18 $mg.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 10 $mg.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 10 $mg.L^{-1}$ de $FeSO_4$, e 10 $mg.L^{-1}$ de $CaCl_2$, conforme descrito nos trabalhos de Fan et al. (2016), WU et al. (2015) e WU et al. (2016). Considerando a taxa de aplicação hidráulica (8,6 $L.d^{-1}$) e o volume saturado dos ACFH (26 L), estimou-se o TDH de 3 dias. Ao longo dos ACFH havia pontos de coleta de amostras localizados nas distâncias de 0, 18,5, 37 e 55,5 cm da zona de entrada do afluente. Foi adotado que o TDH de cada do ponto de coleta seria proporcional à sua distância relativa ao início do ACFH e, portanto, os TDH adotados para cada ponto de coleta foram 0, 1, 2 e 3 dias, respectivamente. Em cada ponto de coleta foram retiradas cinco amostras para determinação da concentração de DQO e NT conforme as metodologias descritas no pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2012).

Ajuste dos modelos hidráulicos

Os dados de DQO e NT coletados ao longo dos cinco ACFH foram comparados com as estimativas fornecidas pelos modelos hidráulicos utilizando-se o R2. Foi avaliado o ajuste de quatro modelos hidráulicos: fluxo em pistão (Equação 1), K-C* (Equação 2), modelo de Brasil et al. (2007) (Equação 3) e modelo de Brasil et al. (2007) com C* (Equação 4):

$$\frac{C}{Co} = e^{(-Kt)} \quad (1)$$

$$\frac{(C-C^*)}{(Co-C^*)} = e^{(-Kt)} \quad (2)$$

$$\frac{C}{Co} = e^{(-K.t^n)} \quad (3)$$

$$\frac{(C-C^*)}{(Co-C^*)} = e^{(-K.t^n)} \quad (4)$$

Em que C é a concentração de DQO/NT ao longo do ACFH ($mg.L^{-1}$); Co é concentração de DQO/NT no afluente ($mg.L^{-1}$); C* é a concentração residual de DQO/NT ($mg.L^{-1}$); K é o coeficiente de remoção (d^{-1}); t é o tempo de detenção hidráulica (d); e n é o coeficiente de aumento da resistência da matéria orgânica à degradação e redução do tempo (adimensional).

A verificação do ajuste dos modelos hidráulicos foi realizada de duas formas: (1) com e (2) sem considerar os efeitos da evapotranspiração (ET). A ET é a combinação de dois processos que ocorrem simultaneamente: a perda de água pela superfície do solo por evaporação e a perda de água pelas plantas por transpiração (Allen et al., 1998). Estes processos retiram água do sistema, provocando aumento nas concentrações de

DQO e NT. Portanto, para verificação do ajuste dos modelos hidráulicos considerando a ET os dados de DQO e NT foram corrigidos, conforme Equação 5.

$$CC = \frac{[C.Q]}{[Q + (ETv.ETf)]} \quad (5)$$

Em que CC é a concentração corrigida de DQO/NT ($mg.L^{-1}$); C é a concentração medida de DQO/NT no ponto de coleta ($mg.L^{-1}$); Q é a vazão média ($L.dia^{-1}$); ETv é o volume de água evapotranspirado ($L.dia^{-1}$); e ETf é a fração da evapotranspiração. O volume evapotranspirado foi determinado pela diferença entre as vazões afluente e efluente. Foi adotado que a fração evapotranspirada de cada ponto de coleta seria proporcional à sua distância relativa ao início do ACFH. Por exemplo, as frações adotadas para o primeiro, segundo e terceiro ponto de coleta foram, respectivamente, 0, 66,6% e 100%. Os valores dos parâmetros K e n foram estimados por regressão não linear pelo método de Marquardt no programa estatístico Statgraphics (versão 16. 2. 04). Para os valores de C* foram utilizados os menores valores observados na DQO e no NT efluente.

Resultados e discussão

Desempenho dos modelos hidráulicos de DQO

Na Tabela 1 é mostrada a concentração de DQO em relação ao tempo de detenção hidráulica nos cinco ACFH, sem e com os efeitos da ET.

Tabela 1: Concentração média de DQO em relação ao tempo de detenção hidráulica nos cinco ACFH, sem e com os efeitos da ET.

Efeitos da ET	Alagado construído	Concentração de DQO ($mg.L^{-1}$)			
		Tempo de detenção hidráulica (dias)			
		0	1	2	3
Sem	1	389	119	43	24
	2	389	18	10	10
	3	389	27	6	8
	4	389	22	8	9
	5	389	43	12	6
Com	1	389	104	34	17
	2	389	16	8	7
	3	389	23	5	6
	4	389	18	6	6
	5	389	36	7	4

Observa-se a diminuição das concentrações de DQO com o aumento do TDH. Este fato é corroborado pelos trabalhos de Akratos e Tsihrintzis (2007) e Fountoulakis et al. (2009), ambos mostram que reduções no tempo de detenção, causadas pelo aumento da taxa de aplicação hidráulica, causam diminuição na eficiência de remoção de DQO, ou seja, maiores concentrações finais. Na literatura mundial, diversos trabalhos confirmam a relação entre a remoção de matéria orgânica e o tempo de detenção, por exemplo, resultados práticos obtidos na Turquia mostraram que em ACFH operando com TDH de 2,2, 3,7 e 5,6 dias a eficiência média de remoção de DQO foram, respectivamente, 47,8, 55,5 e 62,6% (Çakir et al., 2015).

Como esperado, a inclusão da ET alterou as concentrações de DQO ao longo dos ACFH, fato que modifica o ajuste dos modelos hidráulicos estudados. Utilizando os dados da Tabela 1 e análise de regressão não linear foram estimados os valores de K e n dos modelos hidráulicos avaliados e, assim, foi determinado o ajuste dos modelos em relação aos dados de DQO coletados. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores estimados para os parâmetros K e n dos modelos hidráulicos de DQO avaliados e seus respectivos R^2, sem e com os efeitos da evapotranspiração.

Modelo hidráulico Parâmetro estimado	**Efeitos da evapotranspiração**									
	Sem					Com				
	Alagado construído					Alagado construído				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Fluxo em pistão										
K (d^{-1})	1,14	3,00	2,61	2,79	2,19	1,28	3,17	2,78	2,99	2,36
R^2 (%)	98,78	99,74	99,79	99,79	99,75	99,24	99,86	99,88	99,89	99,80
K-C*										
K (d^{-1})	1,16	3,19	2,73	2,94	2,27	1,30	3,29	2,86	3,09	2,41
R^2 (%)	98,88	99,91	99,85	99,87	99,79	99,27	99,90	99,90	99,92	99,82
Brasil										
K (d^{-1})	1,19	3,07	2,66	2,86	2,23	1,32	3,22	2,81	3,04	2,38
n (adimensional)	0,833	0,191	0,474	0,311	0,648	0,836	0,236	0,513	0,354	0,687
R^2 (%)	98,93	99,91	99,85	99,91	99,80	99,34	99,95	99,90	99,95	99,83
Brasil com C*										
K (d^{-1})	1,20	3,25	2,76	2,99	2,29	1,33	3,34	2,88	3,14	2,43
n (adimensional)	0,860	0,234	0,629	0,388	0,768	0,856	0,274	0,629	0,378	0,778
R^2 (%)	98.94	99.91	99.86	99.91	99.81	99,34	99,95	99,91	99,95	99,83

K – coeficiente de remoção; n - coeficiente de aumento da resistência da matéria orgânica à degradação e redução do tempo de detenção hidráulica; R^2 – coeficiente de determinação.

Os valores de R^2 obtidos para os modelos de DQO foram maiores que 98%. O menor ajuste foi encontrado no modelo de fluxo em pistão (98,78%), corroborando com os achados da literatura de que, entre os modelos hidráulicos, o de fluxo em pistão tem o pior desempenho (Brasil et al., 2007; Fia, 2009). Apesar de ser relatado na literatura que o modelo de fluxo em pistão pode não descrever de forma adequada a cinética de remoção de DQO em alagados construídos (Brasil et al., 2007; Fia, 2009; Von Sperling e De Paoli, 2013; Queluz et al., 2017), no presente trabalho este modelo apresentou elevado ajuste para os cinco ACFH avaliados. Provavelmente, este fato está associado às características do efluente sintético utilizado, por exemplo, em efluentes reais, à medida que a matéria orgânica é removida a resistência de degradação do material orgânico remanescente aumenta, já no efluente sintético utilizado, à medida que a matéria orgânica é removida o material orgânico remanescente continua sendo a sacarose e, portanto, não ocorre aumento na resistência de degradação. Desta maneira, a matéria orgânica é removida exponencialmente até atingir o valor zero, comportamento similar ao modelo de fluxo em pistão que prevê o decaimento exponencial da concentração de poluentes até atingir assintoticamente o valor zero.

Ressalta-se que a inclusão de C* e dos efeitos da ET melhora o ajuste do modelo de fluxo em pistão em 0,10 e 0,46%, respectivamente, enquanto que a inclusão simultânea destas variáveis melhora o ajuste em 0,49% (98,78 vs 99,27%). Observação semelhante foi descrita por Von Sperling e De Paoli (2013) e Queluz et al. (2017), reforçando a importância da inclusão de variáveis que aproximem o modelo da realidade.

Os modelos de Brasil e de Brasil com C* descreveram satisfatoriamente a cinética de remoção de DQO em todos os ACFH, apresentado R^2 superior a 98%. Entretanto, diferentemente do modelo de fluxo em pistão a inclusão da C* não melhora o ajuste do modelo hidráulico de Brasil para todos os ACFH. Enquanto isso, a inclusão dos efeitos da ET melhora ligeiramente os respectivos ajustes destes modelos para cinco alagados construídos.

Modelos hidráulicos convencionais consideram o valor de K constante, geralmente determinado com dados de entrada e saída do efluente, ou seja, utilizam valor médio para K. Contudo, em condições reais o K sofre variações, diminuindo ao longo do ACFH à medida que a matéria orgânica é removida e a resistência à degradação do material orgânico remanescente aumenta. Por esta razão, o modelo de Brasil representa mais satisfatoriamente a cinética de remoção de DQO em ACFH do que o modelo convencional de fluxo em pistão, uma vez que a inclusão do coeficiente n corrige as limitações do uso de valores médios e fixos de K. Por exemplo, os resultados obtidos por Brasil et al. (2007) mostram 20% de melhoria no ajuste do modelo hidráulico de fluxo em pistão (78 vs 98%) após inclusão do coeficiente n. Similarmente, os resultados obtidos por Fia (2009) também mostram que o modelo de Brasil (R^2 > 99%) descreve de maneira mais adequada a cinética de remoção de DQO do que o modelo convencional de fluxo em pistão ($78{,}96 \leq R^2 \leq 86{,}44\%$).

Na literatura há raros estudos sobre os valores de n para remoção de DQO. Brasil et al. (2007) relataram valores de 0,2037 a 0,2491, Fia (2009) relatou valores de 0,1292 a 0,2141 e Queluz et al. (2017) relataram valores de 0,393 a 0,502. Com estes valores e o do presente trabalho pode-se estabelecer faixa de valores de n de 0,1292 a 0,8600.

As faixas de valores relatadas na literatura para o coeficiente K são amplas. Rousseau et al. (2004) reportam valores de K entre 0,17 e 6,11 dia^{-1} e Stein et al. (2006) entre 0,31 e 2,65 dia^{-1}. Nossos resultados mostram uma faixa de K mais estreita - 1,14 a 3,34 dia^{-1} – porém dentro das faixas descritas. Nota-se que os menores valores de K (1,14 a 1,33 dia^{-1}) apresentados no presente trabalho foram obtidos no alagado construído sem aeração (ACFH 1), indicando que esse sistema remove material orgânico com menor eficiência em comparação aos sistemas com aeração intermitente (valores de K entre 2,19 e 3,34). Esses achados corroboram com trabalhos da literatura, por exemplo, os resultados obtidos por Wu et al. (2016) mostram que alagados construídos de fluxo vertical (ACFV) com aeração intermitente removem DQO mais rápido do que ACFV sem aeração. Adicionalmente, os resultados práticos obtidos por Wu et al. (2015) mostraram que a eficiência na remoção de DQO em alagados construídos com aeração intermitente foi de 13 a 34% superior à eficiência de alagados construídos sem aeração. Segundo Saeed e Sun (2012), em alagados construídos de fluxo subsuperficial a matéria orgânica pode ser degradada tanto por vias aeróbias e quanto por anaeróbias. Ainda segundo estes autores, a aeração intermitente cria condições de oxigenação no interior dos alagados que estimulam as vias de biodegradação aeróbias, mas que também podem estimular a degradação orgânica anaeróbia. Os resultados obtidos por Ong et al. (2010) também mostram que aplicação de oxigênio aumenta a taxa de remoção de DQO, ou seja, a aeração suplementar proporciona maiores valores para o coeficiente K.

Especificamente em relação ao modelo hidráulico de Brasil, obtivemos valores do coeficiente K para remoção de DQO de 1,19 a 3,22 dia^{-1}, enquanto que Brasil et al. (2007) e Fia (2009) relataram, respectivamente, 1,62 a 1,88 dia^{-1} e 1,31 a 1,56 dia^{-1}. Esta discrepância nos valores deve-se às diferentes características do efluente, uma vez que estes autores utilizaram efluentes primários, com elevada carga orgânica, e nós

utilizamos efluente sintético, com elevada disponibilidade de matéria orgânica prontamente biodegradável, resultando em maiores valores de K.

Desempenho dos modelos hidráulicos de NT

Na Tabela 3 é mostrada a concentração de NT em relação ao tempo de detenção hidráulica nos cinco ACFH, sem e com os efeitos da ET.

Tabela 3: Concentração média de NT em relação ao tempo de detenção hidráulica nos cinco ACFH, sem e com os efeitos da ET.

Efeitos da ET	Alagado construído	Concentração de NT ($mg.L^{-1}$)			
		Tempo de detenção hidráulica (dias)			
		0	1	2	3
Sem	1	40,5	33,1	22,8	20,7
	2	40,5	11,2	10,0	7,9
	3	40,5	12,8	10,7	7,8
	4	40,5	11,3	9,6	7,6
	5	40,5	13,5	8,7	6,6
Com	1	40,5	29,0	17,9	14,7
	2	40,5	9,6	7,7	5,4
	3	40,5	11,1	8,3	5,4
	4	40,5	9,6	7,1	5,0
	5	40,5	11,6	6,5	4,3

Como esperado, as concentrações de NT diminuem com o aumento do TDH em todos os alagados construídos. Resultados similares foram relatados por Fia (2009), Wu et al. (2015) e Wu et al. (2016). Segundo Saeed e Sun (2012), maiores tempos de detenção facilitam a remoção de nitrogênio em alagados construídos de fluxo horizontal devido ao maior tempo de contato do efluente com os microrganismos. Entretanto, se a condição predominante do meio for anaeróbia, as taxas de remoção de nitrogênio total podem ser insatisfatórias mesmo com o aumento do TDH (Huang et al., 2010).

A verificação do desempenho de modelos hidráulicos e a determinação de parâmetros cinéticos em alagados construídos são temas raramente estudados (Von Sperling e De Paoli, 2013; Queluz et al., 2017), em especial em relação ao NT, sobretudo em alagados construídos aerados intermitentemente. Desta forma, parte dos resultados de NT apresentados no presente trabalho é única, o que dificulta a discussão e a comparação com dados de literatura.

A Tabela 4 mostra os valores estimados para os parâmetros dos modelos hidráulicos de NT. Os valores de R^2 observados no presente trabalho estão na faixa de 87,68 a 98,67%. Observa-se que para todos os ACFH (com e sem a ET) o pior ajuste foi obtido no modelo de fluxo em pistão enquanto que o melhor foi no modelo de Brasil-C*. Além disso, de maneira similar aos resultados obtidos nos modelos de DQO, a inclusão do C* e dos efeitos da ET melhoram o ajuste de todos os modelos hidráulicos. Porém, salienta-se que todos os modelos hidráulicos avaliados apresentaram desempenho similar para o ACFH 1, sem e com os efeitos da ET.

Tabela 4: Valores estimados para os parâmetros K e n dos modelos hidráulicos de NT avaliados e seus respectivos R^2, sem e com os efeitos da evapotranspiração.

Modelo hidráulico Parâmetro estimado	**Efeitos da evapotranspiração**									
	Sem					Com				
	Alagado construído					Alagado construído				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Fluxo em pistão										
K (d^{-1})	0,23	0,88	0,80	0,90	0,87	0,35	1,10	1,00	1,14	1,06
R^2 (%)	87,68	87,39	90,42	89,48	94,82	91,26	92,91	94,11	93,93	96,70
K-C*										
K (d^{-1})	0,28	1,37	1,18	1,38	1,26	0,40	1,46	1,28	1,50	1,35
R^2 (%)	88,07	93,40	95,11	95,04	98,00	91,53	95,96	96,60	96,64	98,26
Brasil										
K (d^{-1})	0,23	1,25	1,11	1,24	1,09	0,35	1,40	1,25	1,40	1,28
n (adimensional)	1,020	0,198	0,314	0,240	0,463	1,006	0,287	0,385	0,333	0,531
R^2 (%)	87,69	96,45	97,67	97,40	98,52	91,26	97,84	98,22	97,85	98,57
Brasil com C*										
K (d^{-1})	0,26	1,63	1,41	1,61	1,37	0,38	1,66	1,46	1,67	1,44
n (adimensional)	1,072	0,265	0,406	0,326	0,643	1,056	0,360	0,471	0,430	0,692
R^2 (%)	88,18	96,78	97,88	97,69	98,66	91,59	97,98	98,32	91,98	98,67

K – coeficiente de remoção; n - coeficiente de aumento da resistência da matéria orgânica à degradação e redução do tempo de detenção hidráulica; R^2 – coeficiente de determinação.

Os valores de K variaram de 0,23 a 1,67 dia^{-1}, sendo que os menores valores foram obtidos no ACFH 1 (0,23 a 0,38 dia^{-1}). Esse achado indica que esse sistema apresenta menor eficiência na remoção de NT, fato confirmado pelos dados mostrados na Tabela 3. Provavelmente, devido a baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD) e a falta de matéria orgânico a remoção de NT no ACFH 1 é limitada. Os processos de nitrificação e de oxidação aeróbia da matéria orgânica competem pelo OD e, portanto, a nitrificação é o primeiro processo limitante para a remoção de NT, uma vez que as bactérias nitrificantes dependem da disponibilidade de OD (FAN et al., 2013).

Especificamente ao modelo K-C*, obtivemos valores de R^2 e K na faixa de 88,07 a 98,67% e 0,28 a 1,50 dia^{-1}, respectivamente. Wu et al. (2016) avaliaram a eficiência de remoção de NT em ACFV aerados intermitentemente e obtiveram ajuste (R^2) entre 96 e 98% utilizando o modelo hidráulico K-C*. Os mesmos autores relataram valores de entre 0,08 a 0,17 dia^{-1}.

Conclusões

A inclusão da C* melhora o ajuste do modelo hidráulico de fluxo pistão, refinando as estimativas das concentrações médias de DQO e NT ao longo de ACFH fornecidas pelo modelo. Entretanto, este é o modelo que tem o pior desempenho dentre os modelos estudados.

Por outro lado, os modelos hidráulicos que melhor descrevem a cinética de remoção de DQO e NT ao longo de alagados construídos de fluxo subsuperficial aerados intermitentemente são, respectivamente, o de Brasil e de Brasil-C*.

Além disso, a incorporação das perdas de água por ET nos modelos hidráulicos é importante porque aumenta o ajuste de todos os modelos.

Finalmente, sugere-se que no dimensionamento convencional de alagados construídos de fluxo subsuperficial aerados intermitentemente sejam utilizados os modelos de Brasil e Brasil-C* considerando os efeitos da evapotranspiração.

Referências

Akratos, C.S., Tsihrintzis, V.A., 2007. Effect of temperature, HRT, vegetation and porous media on removal efficiency of HSF CWs. Ecol. Eng. 29, 173-191.

Allen, R. G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration – Guidelines for computing crop water requirements. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Rome, 308 pp. (FAO Irrigation and drainage paper 56).

Brasil, M.S., 2005. Desempenho de sistema alagado construído para tratamento de esgoto doméstico. Ph.D. Thesis. Universidade Federal de Viçosa.

Brasil, M.S., Matos, A.T., Silva, C.M., Cecon, P.R., Soares, A.A., 2007. Modeling of pollution removal in constructed wetlands with horizontal subsurface flow. Agrartech. Forsch-Agr. 13 (2), 48-56.

Çakir, R., Gidirislioglu, A., Çebi, U., 2015. A study on the effects of different hydraulic loading rates (HLR) on pollutant removal efficiency of subsurface horizontal-flow constructed wetlands used for treatment of domestic wastewaters. J. Environ. Manage. 164, 121-128.

Fan, J., Zhang, J., Guo, W., Liang, S., Wu, H., 2016. Enhanced long-term organics and nitrogen removal and associated microbial community in intermittently aerated subsurface flow constructed wetlands. Bioresour. Technol. 214, 871–875.

Fan, J.L., Zhang, B., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, F.F., Guo, Y.Y., Wu, H.M., 2013. Intermittent aeration strategy to enhance organics and nitrogen removal in subsurface flow constructed wetlands. Bioresour. Technol. 141, 117–122.

Fia, F.R.L., 2009. Modelos de remoção de matéria orgânica e nutrientes de águas residuárias da suinocultura em sistemas alagados construídos. Ph.D. Thesis. Universidade Federal de Viçosa.

Fountoulakis, M., Terzakis, S., Chatzinotas, A., Brix, H., Kalogerakis, N., Manios, T., 2009. Pilot-scale comparison of constructed wetlands operated under high hydraulic loading rates and attached biofilm reactors for domestic wastewater treatment. Sci. Total Environ. 407 (8), 2996-3003.

Huang, J., Reneau, R.B., Hagedorn, C., 2000. Nitrogen removal in constructed wetlands employed to treat domestic wastewater. Water Res. 34 (9), 2582-2588.

Kadlec, R.H., 2000. The inadequacy of first-order treatment wetland models. Ecol. Eng. 15 (1-2), 105-119.

Kadlec, R.H., Knight, R.L., 1996. Treatment Wetlands. CRC Press, Boca Raton, FL, 893 pp.

Kadlec, R.H., Wallace, S.D., 2008. Treatment Wetlands, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1016 pp.

Langergraber, G., 2011. Numerical modelling: a tool for better constructed wetland design? Water Sci. Technol. 64 (1), 14–21.

Ong, S.A., Uchiyama, K., Inadama, D., Ishida, Y., Yamagiwa, K., 2010. Performance evaluation of laboratory scale up-flow constructed wetlands with different designs and emergent plants. In: Bioresour. Technol. 101, 7239–7244.

Queluz, J.G.T., Drizo, A., Sánchez-Román, R.M., 2017. Performance evaluation of first-order hydraulic models for COD removal in horizontal subsurface-flow constructed wetlands. J. Environ. Eng. 143 (10), 1-4.

Reed, S.C., Crites, R., Middlebrooks, E.J., 1988. Natural Systems for Waste Management and Treatment, 1st ed. McGraw-Hill, New York.

Rousseau, D.P.L., Vanrolleghem, P.A., Pauw, N.D., 2004. Model-based design of horizontal subsurface flow constructed treatment wetlands: a review. Water Res. 38, 1484–1493.

Saeed, T., Sun, G., 2012.A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. J. Environ. Manage. 112, 429–448.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012) 22th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Stein, O.R., Biederman, J.A., Hook, P.B., Allen, W.C., 2006. Plant species and temperature effects on the K–C* first-order model for COD removal in batch-loaded SSF wetlands. Ecol. Eng. 26, 100–112.

Von Sperling, M., De Paoli, A.C., 2013. First-order COD decay coefficients associated with different hydraulic models applied to planted and unplanted horizontal subsurface-flow constructed wetlands. Ecol. Eng. 57, 205-209.

Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., 2015. Decentralized domestic wastewater treatment using intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: impact of influent strengths. Bioresour. Technol. 176, 163–168.

Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Liang, S., Lv, J., Lu, S., Wu, W., Wu, S, 2016. Intensified organics and nitrogen removal in the intermittent-aerated constructed wetland using a novel sludge-ceramsite as substrate. Bioresour. Technol. 210, 101–107.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR PARA QUATIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CELULASES DURANTE A BIOCONVERSÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM H_2 POR *PARACLOSTRIDIUM* SP

Camila Abreu Borges da Silva Rabelo [1]; Cíntia Hiromi Okino [2]; Isabel Kimiko Sakamoto [3]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [4]

[1] Pós doutora do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Analista Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste;
[3] Técnica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[4] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *No presente estudo, avaliou-se a quantificação e a expressão gênica da enzima celulase utilizando as técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e transcrição reversa seguida de qPCR (RT-qPCR) durante a bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) in natura e pré-tratado em hidrogênio (H_2) por cultura de Paraclostridium sp. Constatou-se que a produção de H_2 a partir do BCA pré-tratado hidrotermicamente (92,0 mL) foi superior ao BCA pré-tratado termicamente (62,5 mL) e ao BCA in natura (51,4 mL), e os principais ácidos orgânicos (>83%) formados foram os ácidos isobutírico, acético e lático. A partir das análises de qPCR, o crescimento bacteriano, refletido pelo aumento de número de cópias de DNA, aconteceu durante todas as fases de produção de H_2, inclusive na fase estacionária. Já a expressão do gene da celulase, avaliada por RT-qPCR, só aumentou nas fases exponencial e estacionária de produção de H_2, alcançando 2,2 vezes a mais que a fase inicial. O aumento da expressão gênica durante as fases finais pode favorecer um segundo estágio de hidrólise da biomassa lignocelulósica.*

Introdução

A biomassa lignocelulósica tem sido utilizada como substrato alternativo para a produção sustentável de biocombustíveis (Ahmad et al., 2018). Para a efetiva fermentação destes materiais, são necessárias etapas biológicas sinérgicas de produção de enzimas celulolíticas, hidrólise dos polissacarídeos presentes na biomassa e fermentação de açúcares em hidrogênio (Rabelo et al., 2018), metano (Guo et al., 2014) ou etanol (Rabelo et al., 2011). Neste processo, a eficiência da hidrólise inicial determina a taxa e o rendimento dos produtos finais (Saratale et al., 2008).

A utilização de culturas bacterianas celulolíticas e fermentativas como inóculo é uma das possibilidades para aumentar a produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica. Muitas bactérias anaeróbias hidrolisam substratos lignocelulósicos em unidades de fácil assimilação (açúcares solúveis) para seu metabolismo. Cerca de 80% destas bactérias são gram-positivas e pertencentes ao filo Firmicutes e, mais particularmente, classe Clostridia e possuem enzimas celulolíticas extracelulares que se agrupam em um grande complexo multienzimático denominado celulossoma (Shrestha et al., 2017).

Bactérias presentes na própria biomassa lignocelulósica podem hidrolisar e fermentar estes substratos em hidrogênio. Ratti et al. (2015) e Rabelo et al. (2018) identificaram bactérias celulolíticas autóctones do bagaço de cana-de-açúcar similares a *Clostridium* e *Tepidimicrobia,* e *Clostridium* e *Paenibacillus,* respectivamente. Ambos autores utilizaram esta fonte de bactérias autóctones como inóculo para a bioconversão do próprio bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em hidrogênio e ácidos orgânicos.

Uma abordagem para o estudo deste grupo de bactérias é a identificação e quantificação de genes que codificam as enzimas celulases, pois fornece informações funcionais diretas (Pereyra et al., 2010). Neste sentido, reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é o método de escolha para a quantificação específica e sensível da

sequência de DNA alvo. Quando combinada com a transcrição reversa (RT), a qPCR é o método também para a detecção e quantificação de RNA (Bar et al., 2012).

Na ecologia microbiana, a qPCR já foi usada para medir o número de cópias de um gene de interesse em amostras ambientais (Néo et al., 2016) e também em reatores fermentativos (Pereyra et al., 2010; Salimi e Mahadevan, 2013). A partir da RT-qPCR, Han**,** et al. (2003) estudaram a regulação da expressão de genes celulase sob diferentes condições de cultivo em reatores anaeróbios. Os autores concluíram que substratos mono ou dissacarídeos facilmente metabolizáveis podem exercer algum tipo de repressão catabólica nos genes da celulase. Pereyra et al. (2010) adequaram iniciadores para q-PCR e relataram amplo acesso quantitativo aos genes funcionais de celulases de bactérias degradadoras de celulose, genes hydA de bactérias fermentativas, genes dsrA de bactérias redutoras de sulfato e genes mcrA de archaea metanogênica durante a digestão anaeróbia de amostras de drenagem de mina oriundas de dois reatores bioquímicos redutores de sulfato em escala piloto.

Este presente estudo vai ao encontro destas abordagens diretas para o monitoramento de genes funcionais relacionados com a hidrólise inicial da biomassa lignocelulósica. O estudo visou à quantificação gênica da celulase utilizando as técnicas de qPCR e RT-qPCR durante a bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar em hidrogênio por cultura de *Paraclostridium* sp.

Material e Métodos

Substrato e pré-tratamento do substrato

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) utilizado como substrato nos experimentos de produção de hidrogênio foi cedido pela usina São Martinho (Pradópolis, SP, Brazil).

Três condições de BCA foram analisadas, BCA *in natura*; BCA pré-tratado termicamente (em autoclave, 121°C, 1 atm, por 15 minutos) e BCA pré-tratado hidrotermicamente (em reator hidrotérmico 200°C, 16 bar de pressão e 10 minutos). A fase sólida oriunda do reator foi lavada em água corrente até remoção da coloração escura e foi seca em temperatura ambiente para ser utilizada nos ensaios de produção de hidrogênio.

Inóculo

O inóculo adicionado aos experimentos foi cultura pura de *Paraclostridium* sp. isolada do BCA. A cultura foi preservada em glicerol (50%) a -80°C. Antes de cada ensaio, a cultura (12,5 mL) foi reativada em frascos Duran® com 112,5 mL de meio de cultivo RCM e celulose como substrato (5,0 $g.L^{-1}$). Os reatores foram submetidos à atmosfera de N_2 (100%), durante 15 minutos, fechados com tampa butila e rosca plástica e incubados a 37°C por 48 h.

Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o RCM (*Reinforced clostridial medum*) modificado, com a seguinte composição ($g.L^{-1}$): extrato de levedura (13,0), peptona (10,0), NaCl (5,0), acetato de sódio (3,0), cisteína (0,5) e BCA como fonte de carbono (5,0). O meio de cultivo foi preparado e esterilizado por autoclavação antes de cada ensaio.

Ensaios fermentativos

Os ensaios foram realizados em reatores em batelada utilizando frascos de Duran® de 250 mL. Foram adicionados 125 mL de meio de cultivo e 12,5 mL de cultura de *Paraclostridium* sp. previamente centrifugada (8000 rpm por 6 minutos). Após a inoculação, os reatores foram submetidos à atmosfera de N_2 (100%), durante 15 minutos. Os reatores foram, então, fechados com tampa de butila e rosca plástica, e incubados a 37º C até a estabilização da produção de hidrogênio. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Para acompanhar a produção de gases e ácidos, foram realizadas análises de cromatografia gasosa e líquida, respectivamente (Rabelo et al., 2018). Os dados de produção acumulada de hidrogênio foram ajustados por meio da equação de Gompertz, modificada por Zwietering et al. (1990). A partir da equação de Gompertz modificada (Equação 1) foi possível estimar o Potencial de Produção de hidrogênio (*P*), Velocidade máxima de Produção de hidrogênio (*Rm*) e Tempo para início da produção de hidrogênio (λ). Sendo, *H* produção cumulativa de hidrogênio; *t* tempo de operação (horas) e *e* 2,71.

$$H(t) = P \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_m \cdot e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

Foram também realizadas análise de açúcares totais solúveis (DuBois et al., 1956).

Coleta da amostra e extração de DNA e RNA

As amostras para extração de material genético foram coletadas dos reatores fermentativos com BCA pré-tratado hidrotermicamente. As amostras foram coletadas durante as fases de produção de hidrogênio, no início do experimento (tempo zero), início da produção de hidrogênio (λ, tempo 3h), fase exponencial de produção de hidrogênio, (tempo 6h e 12h) e fase estacionária de produção de hidrogênio (tempo 46h).

As amostras (2,0 mL) para extração de DNA foram coletadas com seringas diretamente dos reatores e armazenadas em microtubos de 2,0 mL em *freezer* -20°C. A extração do DNA foi realizada conforme protocolo modificado de Griffiths et al. (2000).

As amostras (0,5 mL) para extração de RNA foram coletadas com seringas diretamente dos reatores e armazenadas em tubos microtubos de 2,0 mL contendo 1,0 mL do reagente *RNA Protect bacteria* de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Qiagen®) e foram armazenados em freezer -20°C. A extração do RNA foi precedida por uma etapa de lise bacteriana que foi realizada com o uso de Proteinase K e Lisozima de acordo com o protocolo de extração de RNA da Qiagen®. A extração e purificação do RNA foram realizadas com *RNeasy Mini Kit* (Qiagen®).

Transcrição Reversa (RT)

As amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com DNase, utilizando a enzima DNase *RQ1 rnase-free* (Promega®). A fita complementar de DNA (cDNA) foi sintetizada a partir do RNAm da amostra, utilizando-se a enzima GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) e OligodT primers (IDT) de acordo com o fabricante.

Desenho de *primers* específicos para *Paraclostridium* sp.

Os pares de oligonucleotídeos para o gene celulase (*cel*) e para os genes de referência (GyrB, Pfo e RecA) foram desenhados de acordo com sequências gênicas descritas no *Genbank* e auxílio do programa computacional *Primer3* (http://bioinfo.ut.ee/primer3/). A estabilidade dos genes foi analisada com a ferramenta RefFinder (Xie et al., 2012).

PCR em tempo real (qPCR)

Para a reação de amplificação do DNA e cDNA, preparou-se um *mix* de reagentes contendo QuantiNova SYBR® Green PCR kit (7,5 µL), corante normalizador de amostras *Rox Reference Dye* (Invitrogen™) diluído 1:10 $v.v^{-1}$ (0,75 µL), par de primer específico (0,3 µL de cada) e água UltraPure™ (Invitrogen™) (4,15 µL).

As reações foram realizadas em microplacas MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction (Thermofisher), onde acrescentou-se 13 µL do *mix* e 2,0 µL de cada amostra. Os ensaios foram conduzidos em termociclador 7500 Real-time PCR System® (Applied Biosystems).

O perfil do termociclador foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por 5 min., seguindo-se de 40 ciclos de 95°C por 15 min. e 60°C por 30 min. Ao final dos ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados, entre a temperatura de 60°C e 95°C para a

avaliação da Tm (temperatura de *melting*). Todas as amostras foram testadas em duplicata. Após a amplificação, os resultados foram expressos em Ciclos de quantificação (Cq).

Quantificação Absoluta

A quantificação absoluta foi realizada determinando o número de cópias (NC) do gene celulase de acordo com a curva padrão Cq x NC.

A curva padrão foi construída para quantificação do DNA. Para tanto, foi utilizado DNA sintético (GBlock® *Gene fragments*, IDT*)* que foi especificamente para este estudo.

O Gblock® continha 500 ng de nucleotídeos e foi eluído em 100 µL de solução TE. A partir desta concentração, foram realizadas diluições seriadas de razão constante igual a 10. As alíquotas diluídas de 10^{-3} a 10^{-9} foram submetidas às mesmas condições de quantificação por qPCR que as amostras de DNA.

Os valores de Cq obtidos a partir da q-PCR foram usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de cópias do "*template*" (NC) e o valor correspondente de Cq.

A eficiência da reação de qPCR (E) foi calculada de acordo com a Equação 2, e a conversão matemática da E para porcentagem de acordo com a Equação 3 (Pfaffl, 2001).

$$E = 10^{(-1.slope-1)} \quad (2)$$

$$E\ (\%) = (E - 1) * 100 \quad (3)$$

Nas equações supracitadas, E representa a eficiência e *slope* a inclinação da linha derivada da curva de calibração.

Quantificação Relativa

A quantificação relativa da expressão gênica da celulase (RNAm) foi normalizada em relação ao gene Pfo, e calibrada de acordo com as amostras iniciais (tempo zero).

A quantificação foi realizada de acordo com o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001) que calcula a razão de expressão relativa com base na eficiência da qPCR e no desvio do ponto de cruzamento dos transcritos investigados (Equação 4).

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{(Ecel)^{\Delta Cq\ cel\ (controle-amostra)}}{(Epfo)^{\Delta Cq\ pfo\ (controle-amostra)}} \quad (4)$$

Sendo, E_{cel} a eficiência da reação da qPCR com o gene cel, E_{Pfo} a eficiência da reação da qPCR com o gene Pfo e controle é a amostra inicial (tempo zero).

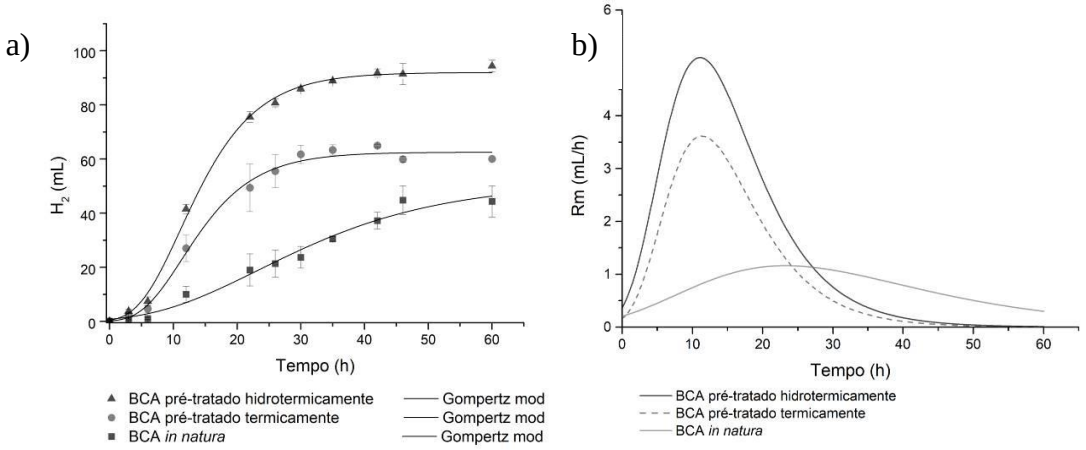
Resultados e Discussão

Bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar por *Paraclostridium* sp.

Assim, visando aumentar a acessibilidade enzimática e a digestibilidade da celulose constituinte do BCA, dois diferentes pré-tratamentos foram testados, o pré-tratamento térmico e o hidrotérmico. Os experimentos com os substratos submetidos aos pré-tratamentos foram comparados com o experimento controle (BCA *in natura*).

De acordo com os resultados de produção de hidrogênio (Figura 1), o BCA, tanto *in natura* quanto pré-tratado, pode ser utilizado por *Paraclostridium* sp. como substrato para produção de hidrogênio.

Figura 1: Produção de hidrogênio (a) e velocidade de produção de hidrogênio (b) a partir do BCA por *Paraclostridium sp.*



Os resultados de produção de hidrogênio a partir dos substratos pré-tratados foram superiores (62,5 e 92,0 mL com BCA pré-tratado termicamente e hidrotermincamente, respectivamente) ao resultado do BCA *in natura* (51,4 mL). De acordo com o teste t de *Student* ($\alpha = 0,05$), o resultado de produção de hidrogênio a partir do BCA pré-tratado hidrotermicamente (92,0 mL) significativamente diferente. A velocidade de produção de hidrogênio com o BCA pré-tratado hidrotermicamente (5,1 $mL.h^{-1}$) também foi superior àquelas obtidas com BCA pré-tratado termicamente (3,6 $mL.h^{-1}$) e com BCA *in natura* (1,2 $mL.h^{-1}$). Os valores de velocidade de produção de hidrogênio com BCA pré-tratado foram estatisticamente diferentes ($\alpha = 0,05$) à velocidade com BCA *in natura.* Desta forma, pode-se afirmar que o pré-tratamento aplicado no BCA favoreceu a hidrólise e fermentação do BCA por *Paraclostridium* sp. com maior produção de hidrogênio evidenciada por maiores valores de *P* e *Rm.*

Com o pré-tratamento hidrotérmico, as estruturas da hemicelulose e da lignina são comprometidas juntamente com a cristalinidade da celulose, permitindo assim que as enzimas celulase acessem essas microesferas. Esta tecnologia para o pré-tratamento do BCA é particularmente interessante porque os substratos são aquecidos em água, o único solvente utilizado, o que elimina o custo de um catalisador e reduz o processo de geração de resíduos (Cruz et al., 2012).

Os açúcares solúveis presentes no meio reacional dos reatores com BCA *in natura*, pré-tratado termicamente e pré-tratado hidrotermicamente foram avaliados ao longo do tempo de incubação. A concentração inicial dos açúcares solúveis foi semelhante nas três condições (2,7, 2,9 e 2,6 $g.L^{-1}$ com BCA *in natura,* BCA pré-tratado termicamente e BCA pré-tratado hidrotermicamente, respectivamente). Mesmo com concentração inicial de açúcares solúveis semelhantes, obteve-se resultados distintos de produção de hidrogênio, atestando que a produção de hidrogênio não foi resultante dos açúcares solúveis presentes e sim da hidrolise e fermentação do BCA. Assim, pode-se afirmar mais uma vez que, o pré-tratamento influenciou positivamente a bioconversão do BCA.

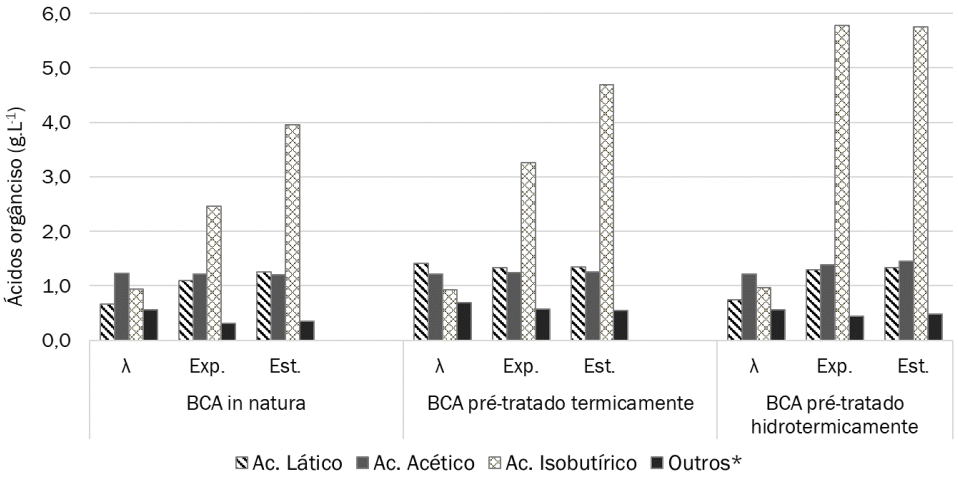
Braga et al. (2018) utilizaram uma combinação de pré-tratamentos hidrotérmico (20 bar de pressão, 200°C por 10 min.) e enzimático (por *Aspergillus niger*) para a hidrólise e fermentação do BCA. Os autores afirmaram que a estratégia utilizada foi adequada para a produção de hidrogênio (18,5 mL) por inóculo fermentativo de *Clostridium, Bacillus, Bacteroides* e *Paenibacillus*, e também para a subsequente produção de metano (15,5 mL) por lodo de tratamento de efluentes industriais como inóculo misto.

Rabelo (2018) também comparou a produção de hidrogênio a partir de BCA *in natura* e pré-tratado hidrotermicamente (20 bar de pressão, 200°C por 10 minutos). A autora relatou baixa produção de hidrogênio tanto com BCA *in natura* (9,7 mL) quanto com o BCA pré-tratado (4,7 mL). A baixa produção de hidrogênio com substrato pré-tratado

hidrotermicamente pode estar relacionada à produção de compostos inibidores da atividade celulolítica e fermentativa liberados durante o pré-tratamento hidrotérmico como furfural e hidroximetilfurfural (Rasmussen et al., 2014). No presente estudo, o BCA pré-tratado foi lavado até completa remoção destes compostos (avaliados por HPLC) e, desta forma, foi possível obter maiores produções de hidrogênio a partir do BCA pré-tratado hidrotermicamente.

Durante as fases de produção de hidrogênio, os principais ácidos orgânicos (> 83%) formados a partir do BCA por *Paraclostridium* sp. foram os ácidos isobutírico, acético e lático. Sendo que o principal ácido formado foi o isobutírico (Figura 2).

Figura 2: Produção de ácidos orgânicos a partir de BCA, durante as fases de produção de hidrogênio. Fase λ: 6 horas; Fase exponencial (Exp.): 22h e Fase estacionária (Est.): 46h. *Outros: ácidos cítrico, valérico, isovalérico, capróico e fórmico



Em todos os ensaios, a produção de ácidos orgânicos foi bem expressiva. A maior produção de ácidos orgânicos (9,0 $g.L^{-1}$) ocorreu nos ensaios com BCA pré-tratado hidrotermicamente, sendo que 64% destes ácidos corresponderam ao ácido isobutírico. Com BCA autoclavado o total de ácidos produzidos foi de 7,8 $g.L^{-1}$ e com BCA *in natura* foi de 6,7 $g.L^{-1}$. No trabalho de Braga et al. (2018), a produção de ácidos orgânicos obtidos a partir de BCA pré-tratado hidrotermicamente e consórcio de bactérias celulolítica/fermentativas como inóculo foi de 10 $g.L^{-1}$. Rabelo et al. (2018) também relataram produção de ácidos orgânicos de 4,5 até 7,1 $g.L^{-1}$ utilizando BCA pré-tratado termicamente como substrato e consórcio de bactérias celulolítica e fermentativas como inóculo.

Assim, além do hidrogênio, pode-se obter ácidos orgânicos, principalmente o ácido isobutírico, a partir da fermentação do BCA por *Paraclostridium* sp. A produção fermentativa de ácidos orgânicos é uma abordagem promissora para a obtenção de produtos químicos versáteis, chamados "blocos de construção", a partir de fontes renováveis de carbono. Estes "blocos de construção" são moléculas com múltiplos grupos funcionais que podem ser precursores de substâncias químicas de importância nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica (Song e Lee, 2006; Sauer et al., 2008).

Além disso, a produção de efluentes ricos em ácidos orgânicos voláteis a partir de substratos renováveis pode ser aplicado em outros sistemas biotecnológicos de produção de energia ou adequação ambiental. Braga et al. (2018), por exemplo, utilizaram os efluentes com altas concentrações de ácidos orgânicos (10 $g.L^{-1}$) para a produção de metano (25,5 mL) com a adição de um inóculo metanogênico. Desta forma, no presente estudo, os efluentes gerados pela fermentação do BCA podem ser utilizados como substrato para produção de metano pela elevada concentração e ácidos orgânicos.

Padronização da técnica do qPCR

Nos ensaios com BCA pré-tratado hidrotermicamente, amostras temporais foram retiradas para a quantificação do gene da celulase (*cel*) por qPCR e também para a quantificação da expressão gênica de *cel* por RT-qPCR.

Desenho dos Genes de Referência e Gene da Celulase

Os *primers* para os genes de referência para *Paraclostridium* sp. foram desenhados e as sequências, assim como o comprimento dos fragmentos amplificados e a temperatura de anelamento, estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos primers desenhados para os genes Cel, GyrB, Pfo e RecA

Gene	Sequência do *primer*	pb	T anelamento
Cel	F: TGCATTTAACCAACTCCTCAACTGT R: TGGTACACTGCAAAATGGGATCT	154	F: 61,16 R: 60,25
GyrB	F: GGCTATAGTGGTGGCTCATGGA R: AGGTTGTATGCTTTGCCTCACA	184	F: 61,61 R: 60,49
Pfo	F: CAGATCGTACATATCCAGGAGCTC R: CAACGGCCCCTGATACATTTGA	180	F: 60,14 R: 60,94
RecA	F: GCTGAGATAGAAGGGGACATGGG R: CCACCTGTTGTAGTTTCTGGGC	179	F: 62,14 R: 61,39

Pb: pares de bases do produto de amplificação; F: *foward*; R: *reverse*

Produtos inespecíficos não foram formados durante as curvas de amplificação. Além disso, durante as curvas de dissociação, apenas um pico de temperatura de *melting* foi formado para cada *primer*, atestando a especificidade analítica da qPCR com os respectivos *primers.*

Gene de Referência

Genes de referência são genes cuja expressão permanece estável em diferentes situações, são aqueles essenciais ao metabolismo celular (Pfaffl, 2001). Desta forma, três genes foram testados para serem genes de referência de *Paraclostridium* sp., GyrB, Pfo e RecA. O gene GyrB codifica a subunidade D da enzima DNA girase (Peeters and Willems, 2011); o gene Pfo codifica a enzima piruvato-ferredoxina oxidorredutase que catalisa a conversão do piruvato a acetil CoA (Salimi e Mahadevan, 2013); e o gene RecA codifica a enzima recombinase A (Liu et al., 2013). Assim os três genes escolhidos são essenciais para o metabolismo de *Paraclostridium* e foram testados quanto à estabilidade de expressão. A estabilidade do gene Pfo foi constatada pelo cálculo dos algoritmos BestKeeper, NormFinder e método Delta CT, e confirmada pela combinação destes algoritmos por RefFinder (Xie et al., 2012). Assim, Pfo foi o gene referência escolhido para a quantificação relativa do gene da celulase.

Curva Padrão para a quantificação gênica da celulase

A Equação 5 foi gerada a partir da curva padrão da quantidade de ciclos de quantificação (Cq) em função do Log do número de cópias (NC) com $R^2 = 0,9942$.

$$NC = -0,2915Cq + 9,9499 \quad \text{Equação 5}$$

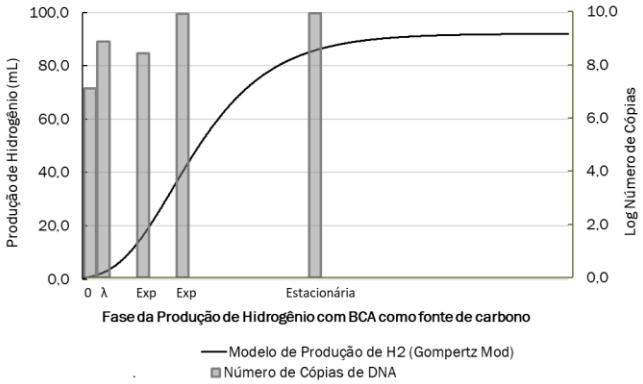
A eficiência da qPCR foi calculada com base no coeficiente angular da reta e foi de 96,40%.

Quantificação Absoluta do gene da celulase

De acordo com a quantificação de DNA, nos reatores com BCA como fonte de carbono, houve crescimento bacteriano durante todas as fases de produção de hidrogênio, inclusive durante a fase estacionária. O número de bactérias foi de $1,3 \times 10^7$ na fase inicial

(tempo zero) até 9,3 x 10^9 na fase estacionária de produção de hidrogênio (46 h). De acordo com a Figura 3, pode-se analisar a relação entre o número de cópias de DNA com a produção acumulada de hidrogênio.

Figura 3: Produção acumulada de H_2 e número de cópias de DNA.



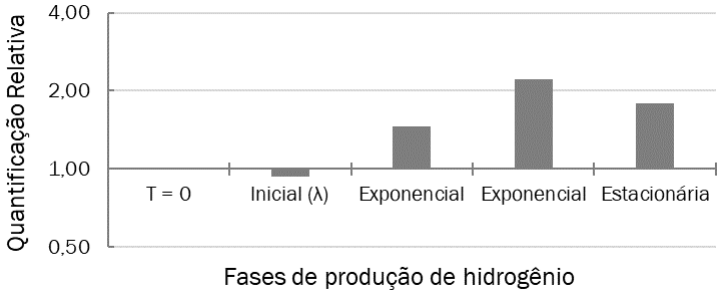
Quantificação Relativa da expressão da celulase

De acordo com quantificação relativa, pode-se determinar as mudanças nos níveis de RNAm de um gene alvo (no caso o gene da celulase) em relação aos níveis de outro RNAm com expressão estável (gene de referência, Pfo) e também normalizada a um grupo controle (tempo zero).

Pode-se observar que, a expressão dos genes da celulase só aumentou nas fases exponencial (6 e 12 h) e estacionária (46 h) de produção de hidrogênio, alcançando 2,2 vezes a mais que a fase inicial (Figura 4).

A concentração inicial de açúcares solúveis presente no meio reacional pode ter influenciado a expressão da celulase, uma vez que os açúcares liberados durante a hidrólise podem inibir o crescimento celular e a produção de celulases (Petitdemange et al., 1992). A concentração inicial de carboidratos solúveis foi 2,6 $g.L^{-1}$ e diminuiu gradativamente para 1,2 $g.L^{-1}$ até final do experimento. Na fase exponencial de produção de hidrogênio (6 e 12h), a concentração de açúcares foi inferior a 1,3 $g.L^{-1}$ e a expressão gênica durante estas fases foi maior que na fase inicial (1,5 e 2,0 vezes maiores nos tempos 6 e 12 h, respectivamente). *Paraclostridium* sp., assim como *Clostridium cellulolyticum* estudado por Peptdemange et al (1992), pode possuir um sistema enzimático celulolítico sujeito à regulação do produto final.

Figura 4: Quantificação Relativa da expressão do gene celulase



Para efetiva produção de hidrogênio a partir de substratos lignocelulósicos, o sucesso da hidrólise é essencial, certificando a conversão de polissacarídeos em açúcares fermentáveis que podem ser facilmente assimiláveis pelas bactérias fermentativas (Saratale et al., 2008). Assim, a expressão da celulase foi crucial para a hidrólise da celulose para posterior produção de hidrogênio por *Paraclostridium* sp.

Com a análise da quantificação relativa, foi possível afirmar que a expressão do gene da celulase aconteceu principalmente nas fases exponencial e estacionária da produção de hidrogênio (Figura 4) quando a concentração de açúcares solúveis diminuiu no meio reacional.

Kuo et al. (2012) observou que a hidrólise do material celulósico foi o fator limitante para a produção fermentativa de hidrogênio e metano em reatores sequenciais de duas fases alimentados com e resíduos de cozinha e capim-elefante. A bioaumentação com *Clostridium* sp. na primeira fase favoreceu a hidrólise do substrato e a produção de hidrogênio. Os autores relataram que *Clostridium* sp. inoculado no reator de primeira fase também foi transferido para o reator de segunda fase de produção de metano e favoreceu a degradação adicional da celulose e a subsequente produção de metano.

A análise quantitativa do presente estudo também indica que a expressão gênica pode favorecer um segundo estágio de hidrólise, o que seria favorável em um reator contínuo ou batelada alimentada onde a inativação catabólica devido ao acúmulo de açúcares e/ou ácidos orgânicos não ocorre.

Conclusões

O pré-tratamento aplicado no BCA favoreceu a hidrólise e fermentação do BCA por *Paraclostridium sp*. com maior produção de hidrogênio evidenciada por maiores valores de *P* e *Rm*. Para a análise de quantificação relativa do gene Cel, a estabilidade do gene Pfo foi maior que GyrB e Rec e, por este motivo, foi selecionado como gene referência para *Paraclostridium* sp. A expressão do gene da celulase aconteceu nas fases exponencial e estacionária da produção de hidrogênio quando a concentração de açúcares solúveis diminuiu no meio reacional.

Referências Bibliográficas

Ahmad, F., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion – A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 98, 108–124.

Bar, T., Kubista, M., Tichopad, A., 2012. Validation of kinetics similarity in qPCR. Nucleic Acids Res. 40, 1395–1406.

Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2018. Bacterial and archaeal community structure involved in biofuels production using hydrothermal and enzymatic pretreated sugarcane bagasse for an improvement in hydrogen and methane production. Sustain. Energy Fuels. 2, 2644-2660.

Cruz, S.H., Dien, B.S., Nichols, N.N., Saha, B.C., Cotta, M.A., 2012. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. J Ind Microbiol Biotechnol. 39, 439–447.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O´Donnel, A.G., 2000. Rapid method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribossomal DNA and rRNA based microbial community composition. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5488–5491.

Guo, Y.C., Dai, Y., Bai, Y.X., Li, Y.H., Fan, Y.T., Hou, H.W., 2014. Co-producing hydrogen and methane from higher-concentration of corn stalk by combining hydrogen fermentation and anaerobic digestion. Int. J. Hydrogen Energy 39, 14204–14211.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 377–391.

Kuo, W.C., Chao, Y.C., Wang, Y.C., Cheng, S.S., 2012. Bioaugmentation strategies to improve cellulolytic and hydrogen producing characteristics in CSTR intermittent fed with vegetable kitchen waste and napiergrass. Energy Procedia 29, 82–91.

Liu, J., Tan, Y., Yang, X., Chen, X., Li, F., 2013. Evaluation of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 reference genes in gene expression studies by qRT-PCR. J. Biosci. Bioeng. 116, 460–464.

Néo, T.A., Giglioti, R., Obregón, D., Bilhassi, T.B., Oliveira, H.N., Machado, R.Z., 2016. bigemina in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Endemic Areas of São Paulo State , Brazil 75–84.

Peeters, K., Willems, A., 2011. ThegyrBgene is a useful phylogeneticmarker forexploring the diversityofFlavobacteriumstrains isolated fromterrestrial and aquatic habitats inAntarctica. FEMS Microbiol. Lett. 321, 130–140.

Pereyra, L.P., Hiibel, S.R., Riquelme, M.V.P., Reardon, K.F., Pruden, A., 2010. Detection and quantification of functional genes of cellulose degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2192–2202.

Petitdemange, E., Tchunden, T., Vallés, S., Pirson, H., Raval, G., Gay, R., 1992. Effect of carbon sources on cellulase production by Clostridium cellulolyticum. Biomass and Bioenergy 3, 393–402.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. Nucleic Acids Res. 29, 16–21.

Rabelo, C.A.B.S., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. J. Environ. Manage. 223, 952–963.

Rabelo, S.C., Carrere, H., Maciel Filho, R., Costa, a. C., 2011. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. Bioresour. Technol. 102, 7887–7895.

Rasmussen, H., Sørensen, H.R., Meyer, A.S., 2014. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. Carbohydr. Res. 385, 45–57.

Ratti, R.P., Delforno, T.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2015. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. Int. J. Hydrogen Energy 40, 6296–6306.

Salimi, F., Mahadevan, R., 2013. Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. BMC Biotechnol 13, 95.

Saratale, G.D., Chen, S. Der, Lo, Y.C., Saratale, R.G., Chang, J.S., 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation - A review. J. Sci. Ind. Res. 67, 962–979.

Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends Biotechnol. 26, 100–108.

Shrestha, S., Fonoll, X., Kumar, S., Raskin, L., 2017. Biological strategies for enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass during anaerobic digestion: Current status and future perspectives. Bioresour. Technol. 245, 1245–1257.

Song, H., Lee, S.Y., 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. Enzyme Microb. Technol. 39, 352–361.

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., 2012. miRDeepFinder : a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant Mol. Biol. 80, 75–84.

Zwietering, M.H., Jongenburger, L., Rombouts, F.M., Van´t, R.K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1875–1881.

AVALIAÇÃO DE REATORES ANAERÓBIOS ACIDOGÊNICOS NO TRATAMENTO DE VINHAÇA E SORO DE QUEIJO SEM ALCALINIZAÇÃO

Jaqueline Cardoso Ribeiro[1]; Marcelo Zaiat [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Em sua primeira etapa, este estudo apresentou produção contínua de H_2 em reatores acidogênicos, operados com sacarose com rendimento máximo para o reator UASB de 3,44 mols $H_2.mol^{-1}_{sacaroseconsumida}$ e para o reator LE de 3,0 mols $H_2.mol^{-1}_{sacaroseconsumida}$. Os sistemas foram operados sem qualquer adição de alcalinizantes para controle de pH e ambos apresentaram um valor médio de pH de 2,7, abrindo um novo campo para pesquisa na produção biológica de hidrogênio por fermentação escura sob condições adversas (pH abaixo de 3,0), levando a uma tecnologia sustentável e viável, com uma possibilidade promissora de ser aplicada em efluentes reais. Na segunda etapa os mesmos reatores sob as mesmas condições de operação foram operados com soro e apesar de não ter havido uma produção significativa de H_2 mesmo com diversas estratégias de operação diferentes, acredita-se que a ausência de adição de alcalinizantes para reatores tratando soro pode ser promissora para a obtenção de ácido láctico, uma vez que ambos os reatores apresentaram valores em torno de 8 $kg.m^{-3}$ (8000 $mg.L^{-1}$) de concentração de ácido láctico para uma COV de 60 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ e um TDH de 24 h, sem a adição de nenhum tipo de nutriente.*

Introdução

A vinhaça e o soro de queijo são efluentes altamente poluentes e de grande volume sendo os principais resíduos do processo de produção de etanol e laticínios com um valor aproximado de 13 L de vinhaça gerada por litro de etanol produzido (de Oliveira et al., 2013; dos Reis et al., 2015; Fuess e Garcia, 2014; Ribeiro et al., 2010) e o soro representando cerca de 80 a 90% do volume do leite (Mockaitis et al., 2006). Tanto a vinhaça quanto o soro de queijo são efluentes complexos que podem ser altamente prejudiciais para o meio ambiente nas áreas em que são descartados, devido ao seu alto conteúdo orgânico e pH baixo, contudo ambos podem ser tratados por meio de digestão anaeróbia e possuem potencial de recuperação de energia como hidrogênio e metano, no entanto é necessária a adição de alcalinizantes para a obtenção de estabilidade em tais processos.

O pH ambiental desempenha um papel crucial nas duas etapas principais do tratamento anaeróbio: acidogênese e metanogênese, enquanto valores baixos de pH devido a ácidos constantes e produção de CO_2 podem quase cessar a produção de H_2, um pH próximo a neutralidade pode favorecer o crescimento de organismos metanogênicos e prejudicar a acidogênese. A adição de agentes alcalinizantes em reatores acidogênicos leva a um aumento dos custos operacionais do sistema, redução da sustentabilidade do processo, além de elevar o risco de sodificação do solo decorrente do uso de efluentes na fertirrigação em que altas doses de alcalinizantes à base de Na compostos como NaOH e $NaHCO_3$ são utilizados em sistemas de biodigestão (Mota et al., 2018).

Contradizendo os dados consolidados da literatura que relatam drástica redução ou cessação da produção de H_2 por fermentação escura a valores de pH abaixo de 4,0, Mota et al. (2018) obtiveram um rendimento contínuo, estável e satisfatório de H_2 a longo prazo em reatores acidogênicos alimentados com água residuária à base de sacarose em um ambiente com pH abaixo de 3,0, portanto o presente estudo tem como objetivo principal avaliar a aplicabilidade de tais resultados no soro e na vinhaça, águas residuárias reais.

Material e Métodos

Foram avaliadas duas configurações de reatores acidogênicos feitos em acrílico (Figura 1), um de leito fixo estruturado (LE) e um reator UASB com volume útil de 1,32 L e 1,46 L, respectivamente, ambos com condições iniciais de carga orgânica volumétrica (COV) de 25 gDQO.L.d^{-1}, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4,6 h e temperatura de 35 °C.

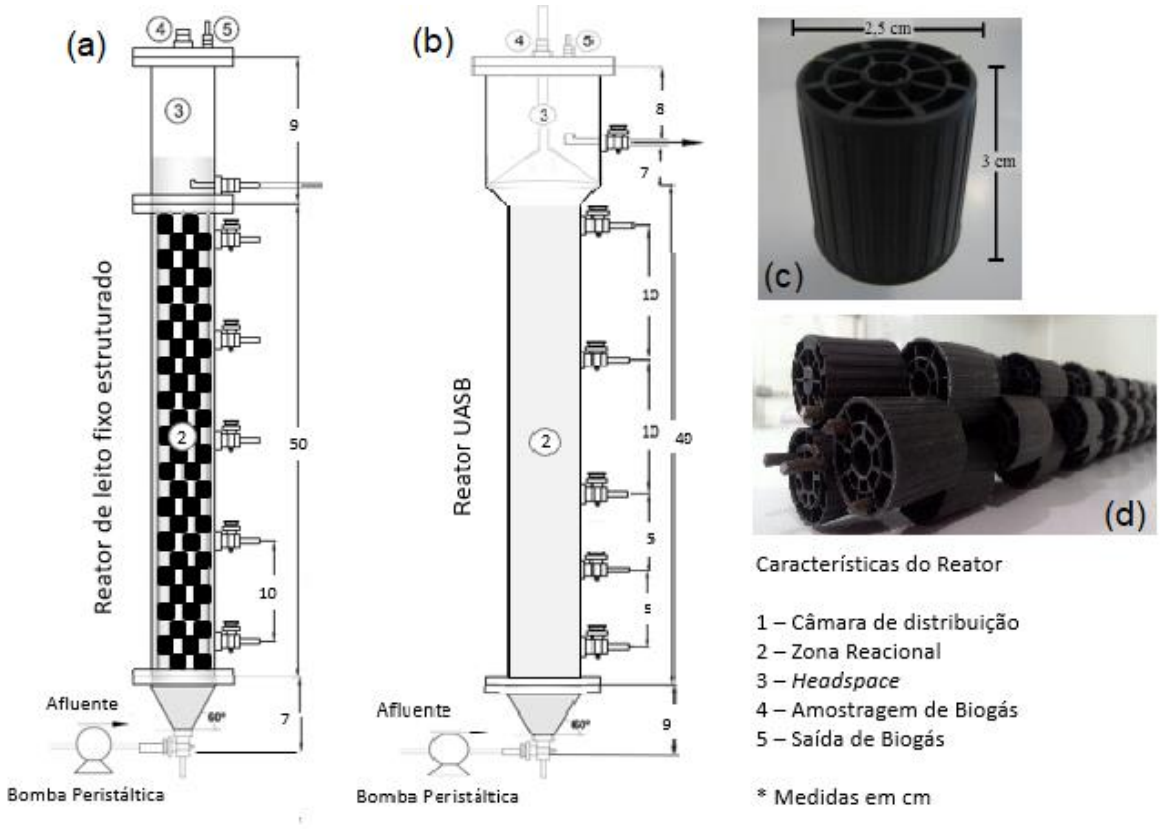


Figura 1: Diagrama esquemático dos reatores acidogênicos: (a) reator UASB, (b) reator LE, (c) material suporte composto de cilindros de polietileno de baixa densidade (CPBD) utilizados no leito fixo e (d) detalhe do arranjo dos CPBD.

Primeiramente foi conduzida uma etapa de operação com o substrato de sacarose composto de 4450 mg L^{-1} de açúcar demerara (Native®) e uma solução de nutrientes (Jeison e van Lier, 2007). Tal etapa teve o intuito de verificar se era possível obter produção contínua e estável de hidrogênio em baixo pH assim como Mota et al. (2018) relatam e se tais resultados não foram exclusivos daquele estudo, portanto, toda a discussão desta etapa de operação é focada na comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados apresentados pelos autores.

A próxima etapa que encontra-se em andamento atualmente é a operação dos mesmos reatores com soro de queijo desidratado reconstituído para o qual a proporção entre o soro de queijo e a quantidade de DQO foi determinada experimentalmente como 1:1 (Damasceno et al., 2007).

A última etapa será realizada com substrato constituído de vinhaça *in natura*, coletada regularmente de uma usina sucroalcooleira, localizada no município de Pradópolis-SP, tais coletas poderão ser realizadas apenas a partir de maio devido ao período de safra da cana-de açúcar.

A inoculação dos reatores em todas as etapas foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Mota et al. (2018)

O fluxo de biogás foi medido com contador de gás Milligas (Ritter®) e a sua composição, em termos de H_2, CH_4 e CO_2, foi analisada usando cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU®. Sacarose (glicose e frutose) e ácidos graxos voláteis (AGV) foram determinados usando cromatografia líquida de alta eficiência SHIMADZU® (*high performance liquid chromatography* - HPLC) e as análises de etanol foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo GC 2010 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA). Condições específicas para determinação podem ser encontradas em Penteado (2012) e Adorno, Hirasawa e Varesche (2014).

Foi estabelecida uma parceria com o professor Gustavo César Dacanal, docente da USP de Pirassununga-SP do Departamento de Engenharia de Alimentos, para a realização de análises que determinaram a distribuição do tamanho de partícula e diâmetro principal dos grânulos da biomassa dos reatores, tais análises foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita por Santana et al. (2016).

Resultados e Discussão

Etapa 1 – Operação com sacarose

Foi observada durante todo o período experimental (60 dias) uma produção volumétrica de hidrogênio (PVH) com valores médios de 76 ± 47 $mLH_2.L^{-1}.h^{-1}$ para o reator UASB e 75 ± 51 $mLH_2.L^{-1}.h^{-1}$ para o reator de LE, mesmo sob condições ambientais adversas (pH baixo com valores médios de 2,7 para ambos os reatores). Apesar destas taxas mais baixas quando comparadas a 175 ± 44 $mLH_2.L^{-1}.h^{-1}$ que é apresentado por Mota et al. (2018) em um reator UASB, também alimentado com água residuária à base de sacarose, neste estudo, foi observada uma tendência de aumento da produção em ambos os reatores (Figura 2) e taxas próximas às reportadas por Mota et al. (2018) foram observados a partir do 51º dia de operação.

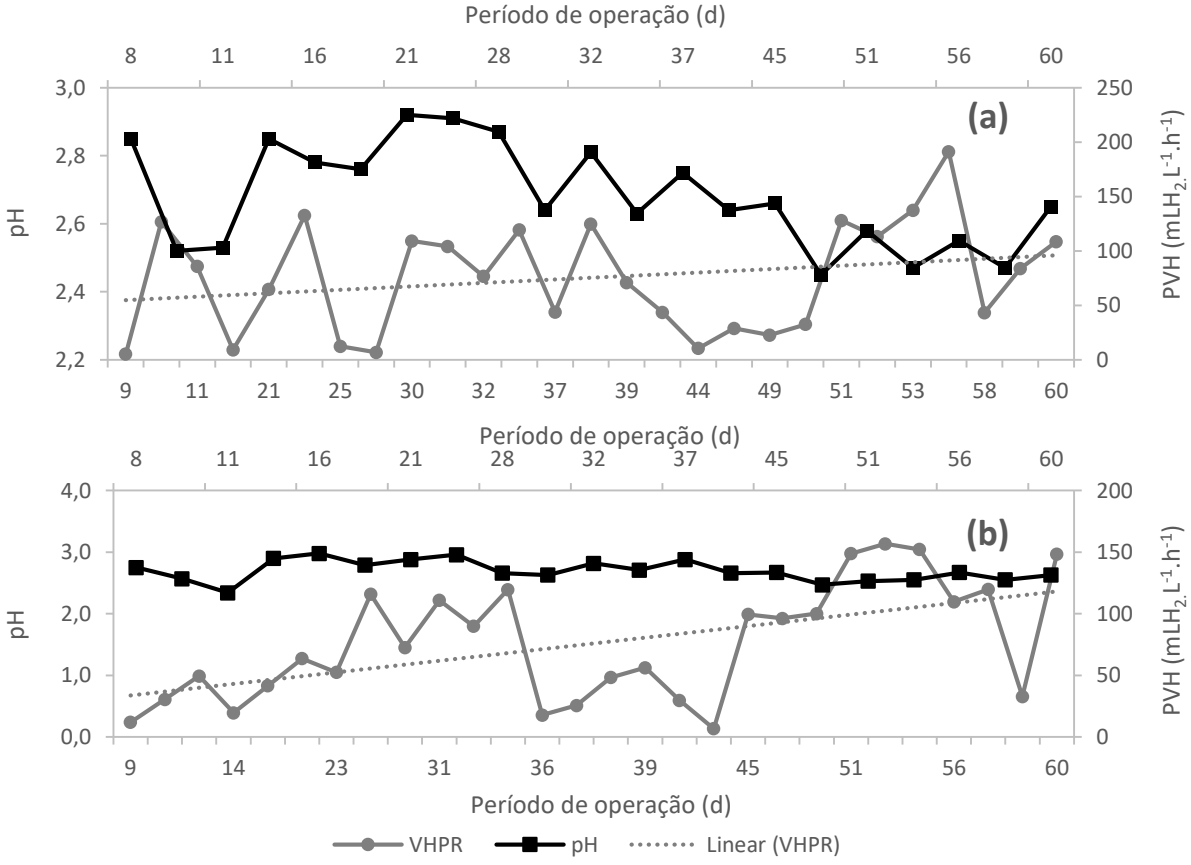


Figura 2: Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e pH nos reatores LE (a) e UASB (b).

Outro fator importante que deve ser levado em consideração são os problemas operacionais que ocorreram ao longo desta etapa que subestimaram ou mesmo impossibilitaram a quantificação do volume de biogás referente a alguns dias de operação, uma vez que a produção de biogás não cessou em nenhum momento conforme foi constatado visualmente no selo hídrico.

O rendimento máximo de H_2 para o reator UASB foi de 3,44 mols $H_2.mol^{-1}_{sacaroseconsumida}$ e para o LE foi de 3,0 mols $H_2.mol^{-1}_{sacaroseconsumida}$ (Figura 3). Tais valores estão próximoa aos valores máximos apresentados por Mota et al. (2018), que estavam na faixa de 3,0 mols $H_2.mol^{-1}_{sascaroseconsumida}$, indicando um potencial para melhores rendimentos, se as condições ótimas de operação do sistema fossem estabelecidas.

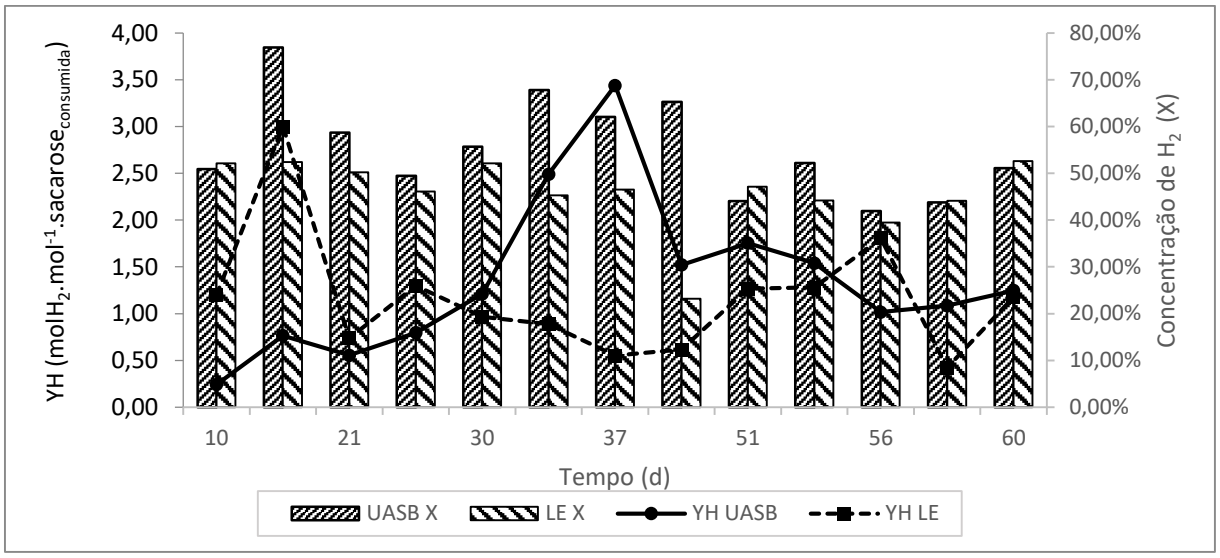


Figura 3: Rendimento de hidrogênio (YH) e percentual de concentração de H_2 (X) no biogás de ambos os reatores.

Flocos de biomassa formados no fundo de ambos os reatores apresentaram um diâmetro de partícula menor do que os da parte superior (Figura 4 e Tabela 1). Provavelmente, os flocos mais grosseiros presentes no topo dos reatores continham maiores frações de biogás, resultando na flutuação das partículas de maior tamanho. Isso pode explicar as notáveis "lavagens" de biomassa observadas por Mota et al. (2018) e também neste estudo no reator UASB no 58º dia de operação. Essas "lavagens" foram essenciais para a autorregulação do sistema promovendo a substituição de grânulos de consórcio misto por bactérias acidogênicas específicas, provavelmente apresentando efeito positivo na produção de H_2, como pode ser inferido por uma tendência de aumento da produção observada em ambos os reatores (Figura 2).

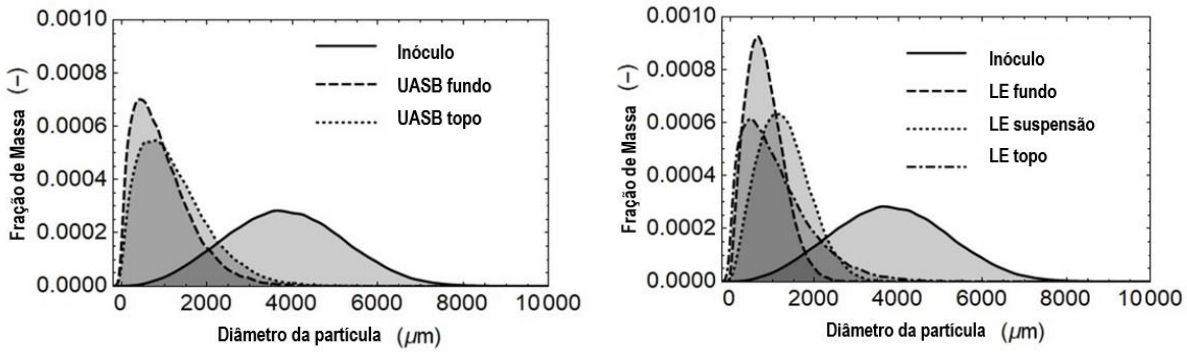


Figura 4: Distribuição de tamanho de partículas para o reator UASB e LE comparado ao inóculo.

Tabela 1: Caracterização de partículas para o inóculo e reatores UASB e LE.

Amostra	**Inóculo**	**LE fundo**	**LE suspensão**	**LE topo**	**UASB fundo**	**UASB topo**
$\bar{d}$ (μm)	4283[a] ±53	927[b] ±5	1450[c] ±7	1197[d] ±33	1051[e] ±19	1363[f] ±17
n (-)	3.1 ±0.2	2.0 ±0.1	2.2 ±0.1	1.3 ±0.1	1.4 ±0.1	1.6 ±0.1
R^2	0.9979	0.9998	0.9999	0.9971	0.9985	0.9992

a, b, c, d, e, f representam o teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov de igualdade de distribuições populacionais e todas as amostras apresentaram distribuição de tamanho com diferença estatística significante a um nível de significância de 5%.

Etapa 2 – Operação com soro

Após a operação com substrato constituído de sacarose a próxima etapa do experimento foi conduzida com soro de queijo desidratado reconstituído e os mesmos reatores que foram operados com sacarose foram higienizados e reinoculados utilizando o mesmo procedimento da etapa anterior e conforme pode ser observado na Tabela 2, várias estratégias, principalmente com relação a COV aplicada foram utilizadas, além da pré-acidificação do substrato de alimentação, uma vez que não houve produção significativa de H_2 nem no reator UASB e nem no LE ao longo de toda a operação.

Tabela 2: Condições operacionais e ambientais aplicadas à etapa 2.

Tempo de operação (d)	COV (gDQO.L.d^{-1})	TDH (h)	Q (mL.h^{-1})	S (g.L^{-1})	Refrigeração na alimentação
3	25	4,6	UASB – 317,4 LE – 286,9	4,8	sim
12					não
15	50			9,6	
26	25			4,8	
45	82,6	17,5	UASB – 83,7 LE – 75,7	60	
47	30	48	UASB – 30,4 LE – 27,5		
64	45	32	UASB – 45,6 LE – 41,2		
80	60	24	UASB – 60,8 LE – 55		
96	75	19,2	UASB – 76 LE – 68,7		
101					sim
116	90	16	UASB – 91,2 LE – 82,5		
131	25	4,6	UASB – 317,4 LE – 286,9	4,8	
142	50			9,6	

As condições iniciais para esta etapa foram as mesmas utilizadas na etapa anterior. A partir do 12º de operação a alimentação deixou de ser mantida refrigerada a 4 ± 3 ºC para que ocorresse acidificação e o pH dos efluentes dos reatores pudessem baixar para menos de 3,0 conforme ocorreu na fase operada com sacarose, no entanto, tal estratégia não surtiu efeito, não foi observada nenhuma mudança significativa no pH do efluente de nenhum dos reatores apesar de ter havido uma leve mudança no pH afluente. Foi feita uma alteração da concentração do substrato (S) afluente aos reatores no 15º dia para dobrar a COV de 25 para 50 gDQO.L.d^{-1}, porém tal alteração não surtiu efeito na produção de H_2. A partir do 47º dia de operação a S foi fixada em 60 g.L^{-1}, pois o efluente industrial apresenta uma DQO média de 50-102 g.L^{-1}; uma vez que a S foi fixada, a COV foi variada de 30 a 90 gDQO.L.d^{-1} e para tanto foram feitas alterações no TDH e consequentemente na vazão (Q), tal estratégia também não foi eficiente no aumento da produção de hidrogênio. No 45º dia a COV foi alterada para 82,6 gDQO.L.d^{-1}

por um erro de cálculo de vazão, no entanto a vazão foi corrigida no dia seguinte e isso não acarretou em prejuízo para os reatores.

Como pode ser observado na Figura 5, no 131º de operação os reatores foram novamente submetidos às condições iniciais de operação e houve um leve aumento da PVH do reator LE. Quando a COV foi dobrada novamente para 50 gDQO.L.d^{-1} no 141º dia foram obtidos os melhores resultados de PVH para ambos os reatores, principalmente para o reator UASB que atingiu uma produção máxima de 98,68 mLH_2.L.h^{-1}, no entanto tal produção durou poucos dias e foi seguida de uma queda que acredita-se que pode ter ocorrido devido ao estabelecimento da homoacetogênese nos reatores e/ou a efeito adverso das bactérias lácticas, pois foram obtidos valores extremamente altos de concentração de ácido láctico em ambos reatores indicando que tais microrganismos podem ter dominado o meio, gerando a inibição da ação de outros microrganismos.

Segundo Noori (2013) microrganismos homoacetogênicos são acetogênicos que alteram seu metabolismo, sob condições de estresse ou após o esgotamento do substrato orgânico reduzido, ao crescimento autotrófico em H_2/CO_2. Na homoacetogênese ocorre o consumo de hidrogênio e produção de ácido acético, conforme a Reação . Os acetogênicos crescem lentamente numa relação sintrófica com os metanogênicos para manter uma baixa pressão parcial de hidrogénio P_{H2} (<10 Pa). Os homoacetogênicos compartilham com os acetogênicos sua capacidade de tolerar uma ampla gama de condições ambientais, contudo os homoacetogênicos crescem em H_2/CO_2 mais rapidamente que os acetogênicos em substrato orgânico. Além disso, os homoacetogênicos não dependem da atividade dos metanogênicos, pois não são inibidos por altos valores de P_{H2}. Tais características conferem vantagens aos homoacetogênicos relativamente aos acetogênicos em condições de estresse.

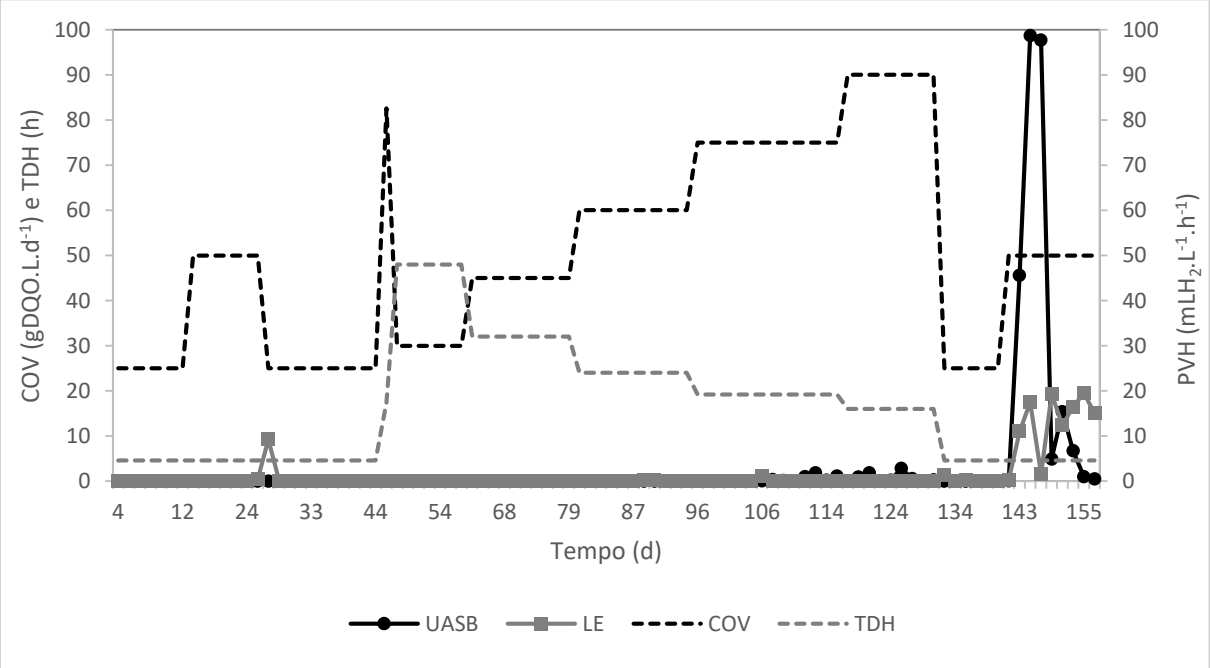


Figura 5: Produção volumétrica de H_2 e COV nos reatores UASB e LE.

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O \qquad \text{Reação 1}$$

Devido a concentração de ácido láctico extremamente elevada que é mostrada na Figura 6, acredita-se que bactérias lácticas podem ter suprimido os microrganismos produtores de hidrogênio, uma vez que tais bactérias podem produzir um efeito negativo em reatores produtores de hidrogênio, pois além de competirem por substrato, produzirem ácido láctico que pode acarretar em uma queda no pH e mudanças nas rotas metabólicas, também são

microrganismos que produzem compostos tóxicos para os demais organismos durante a própria fermentação, as bacteriocinas (Gomes, et al., 2015).

Prazeres, Carvalho e Rivas (2012) realizaram uma revisão sobre a produção de ácido láctico a partir do soro e uma alta produtividade dentro de uma faixa de 11-52 $kg.m^{-3}$ é reportada por diversos autores somente com a suplementação de nutrientes através da adição de um outro tipo de substrato, sem esta suplementação vários autores obtiveram uma baixa produtividade, 3,8-12 $kg.m^{-3}$ com um TDH de 48-56 h e uma temperatura de 23-37 ºC, limitando a aplicação da produção de ácido láctico do soro em escala industrial. No entanto neste estudo foi obtida uma produção máxima para o reator UASB de 8,49 kg m^{-3} (8485,5 mg L^{-1}) no 85º dia de operação com uma COV de 60 $gDQO.L.d^{-1}$ e um TDH de 24 h, e para o reator LE uma produção máxima pontual de 11,12 kg m^{-3} (11118 mg L^{-1}) no 134º dia de operação com uma COV de 25 $gDQO.L.d^{-1}$ e um TDH de 4,6 h, esta produção máxima não se manteve constante, no entanto valores em torno de 8 kg m^{-3} (8000 $mg.L^{-1}$) também foram obtidos para o reator LE com as mesmas condições de operação do reator UASB, COV de 60 $gDQO\ L.d^{-1}$ e um TDH de 24 h. Apesar destes valores estarem um pouco abaixo dos valores reportados referentes a uma alta produtividade (11-52 $kg.m^{-3}$) por Prazeres, Carvalho e Rivas (2012), tais resultados foram obtidos sem a adição de nenhum tipo de nutriente, apenas utilizando o soro como substrato em um TDH de menos da metade do TDH reportado por diversos autores, desta forma acredita-se que apesar da baixa produção de H_2 nesta etapa do estudo, tal estratégia de operação sem a adição de alcalinizantes para reatores tratando soro pode ser promissora para a obtenção de ácido láctico.

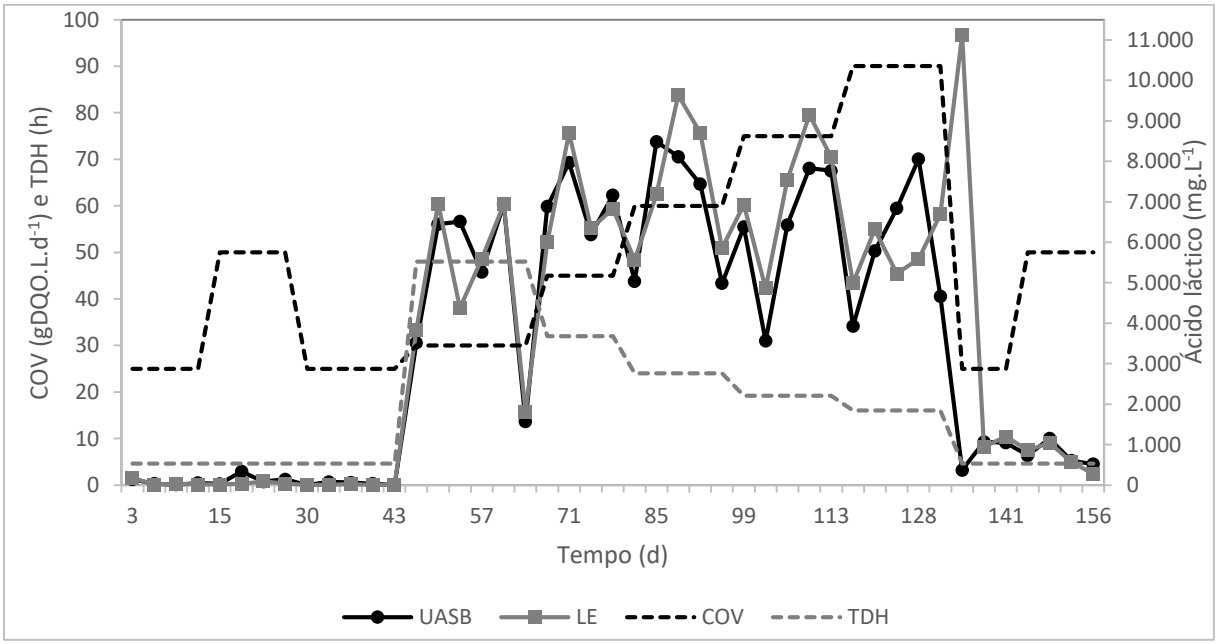


Figura 6: Concentração de ácido láctico determinada no efluente dos reatores UASB e LE.

Com relação a composição do biogás, na Figura 7 é possível observar que o baixo pH não foi suficiente para a inibição da atividade dos microrganismos metanogênicos, uma vez que níveis de metano foram observados no reator UASB até o 47º dia de operação quando a COV foi alterada de 25 para 30 $gDQO.L.d^{-1}$ e a S de 4,79 para 60 $g.L^{-1}$, acredita-se que o principal fator que influenciou na supressão da atividade metanogênica foi o aumento da S, uma vez que a COV já havia sido aumentada para 50 $gDQO.L.d^{-1}$ no 15º dia de operação. No reator LE, as metanogênicas apresentaram atividade até o 96º dia de operação, quando a COV foi aumentada para 75 $gDQO.L.d^{-1}$, no entanto, no 101º, quando o substrato de alimentação dos reatores deixou de ser pré-acidificado voltando a ser mantido sob resfriamento, houve um aumento pontual da atividade metanogênica que logo foi suprimida, acredita-se que a redução da produção de ácidos afluente à entrada do reator pode ter favorecido as metanogênicas, no entanto, como as

condições ambientais e operacionais não eram favoráveis, estas foram logo suprimidas por competição por outros microrganismos, acredita-se que as bactérias lácticas podem ter causado tal supressão, tendo em vista a concentração de ácido láctico extremamente elevada (Figura 6).

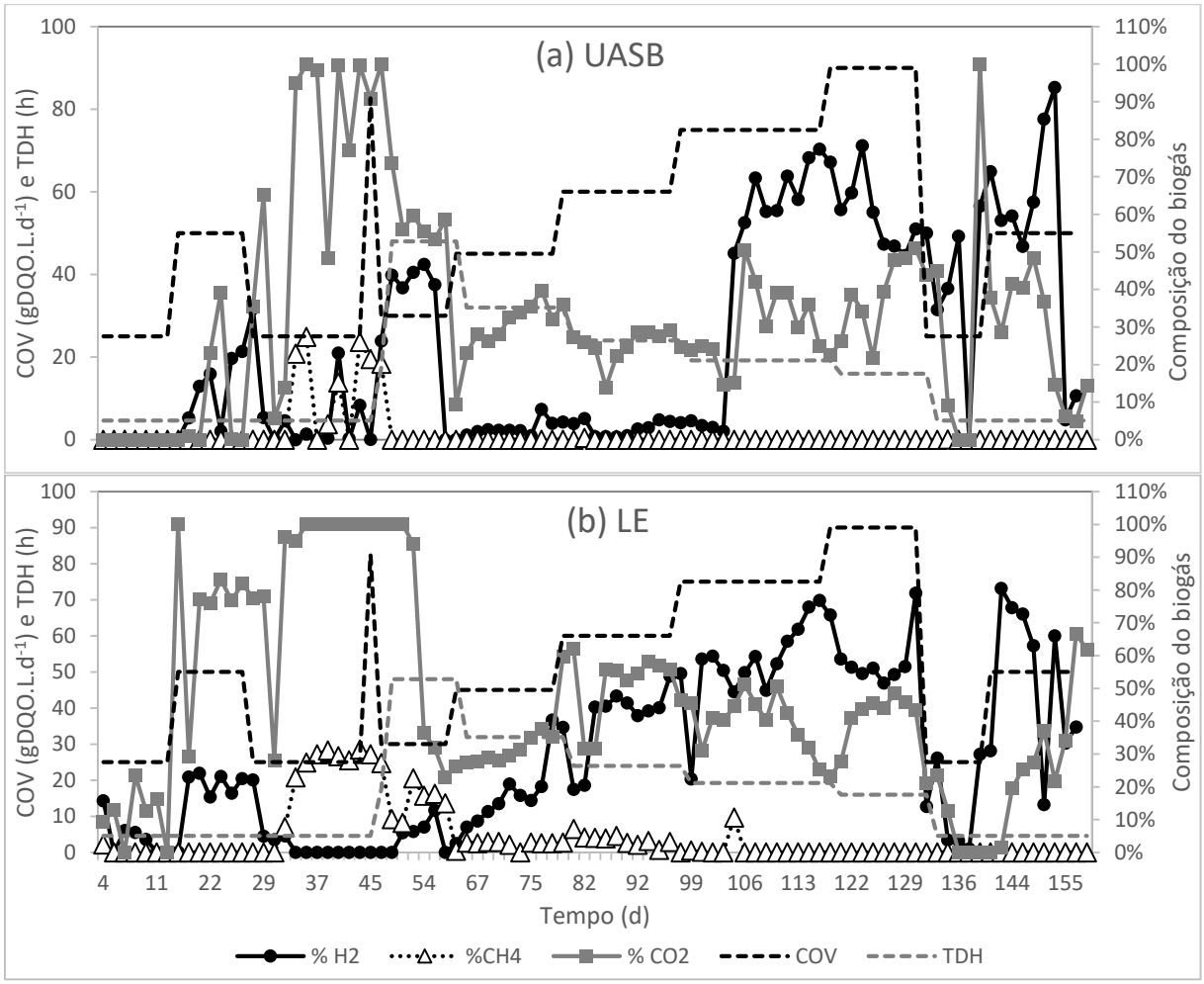


Figura 7: Composição do biogás no reator UASB (a) e LE (b).

Acredita-se que houve produção de metano por um período mais longo de operação no reator LE do que no reator UASB devido ao fato de que nesse tipo de reator o material de suporte é ordenado de modo a permitir a fixação da biomassa, favorecendo as metanogênicas que geralmente são mais sensíveis do que outros microrganismos, a porosidade de leito muito maior diminui o acúmulo de biomassa nos interstícios do leito consequentemente diminuindo o excesso de microrganismos que pode gerar competição por substrato, além de reduzir problemas de colmatação do leito e favorecer a transferência de massa (Camiloti et al., 2014; Anzola-Rojas; Zaiat, 2016; Blanco; Fuess; Zaiat, 2017).

Na Figura 7 também fica claro que o aumento da concentração de H_2 foi diretamente proporcional ao aumento da COV e inversamente proporcional ao aumento do TDH, portanto no 142º dia de operação, onde o TDH era de 4,6h e a COV 50 gDQO.L.d^{-1}, foram obtidos os melhores resultados para a concentração de hidrogênio concomitantes a uma redução na concentração de CO_2, porém assim como a PVH, as concentrações de H_2 não se mantiveram constantes, com queda a partir do 155º dia concomitante a um aumento da concentração de CO_2, tal fato foi observado em ambos os reatores. De acordo com Noori (2013) o controle da concentração de CO_2 durante a fermentação escura pode ser uma potencial estratégia para controlar a homoacetogênese.

Conclusões

Assim como no estudo conduzido por Mota (2018), uma produção continua de H_2 foi observada durante todo o período da fase operada com substrato constituído de sacarose com valores médios de PVH de 76 ± 47 $mLH_2.L^{-1}.h^{-1}$ para o reator UASB e 75 ± 51 $mLH_2.L^{-1}.h^{-1}$ para o reator de LE, mostrando que tal produção sob condições ambientais adversas (pH baixo com valores médios de 2,7 para ambos os reatores) não foi um resultado exclusivo obtido por Mota (2018) e foi possível de ser reproduzido.

Apesar da produção de H_2 na etapa operada com soro ter sido insignificante, resultados promissores com relação a produção de ácido láctico foram obtidos pois ambos os reatores apresentaram valores em torno de 8 $kg.m^{-3}$ (8000 $mg.L^{-1}$) para uma COV de 60 $gDQO.L.d^{-1}$ e um TDH de 24 h sem a adição de nenhum tipo de nutriente, portanto sugere-se que a produção de ácido láctico a partir de reatores operados com soro sem a adição de alcalinizantes fosse melhor investigada.

Referências Bibliográficas

Anzola-Rojas, M. Del P.; Zaiat, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H_2 energy production from wastewater. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 5, 1551–1561. 2016.

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 5, 406–414. https://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049

Blanco, V.M.C., Fuess, L.T., Zaiat, M., 2017. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. Int. J. Hydrogen Energy 42, 12181–12196. https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2017.02.180

Camiloti, P.R., Mockaitis, G., Domingues Rodrigues, J.A., Rissato Zamariolli Damianovic, M.H., Foresti, E., Zaiat, M., 2014. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. J. Chem. Technol. Biotechnol. 89, 1044–1050. https://doi.org/10.1002/jctb.4199

de Oliveira, B.G., Carvalho, J.L.N., Cerri, C.E.P., Cerri, C.C., Feigl, B.J., 2013. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. Geoderma 200–201, 77–84. https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2013.02.005

dos Reis, C.M., Carosia, M.F., Sakamoto, I.K., Amâncio Varesche, M.B., Silva, E.L., 2015. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 40, 8498–8509. https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2015.04.136

Fuess, L.T., Garcia, M.L., 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. J. Environ. Manage. 145, 210–229. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2014.07.003

Gomes, B. C. et al. Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. **I**nternational Journal of Hydrogen Energy 28, 8650–8660. 2015.

Jeison, D., van Lier, J.B., 2007. Thermophilic treatment of acidified and partially acidified wastewater using an anaerobic submerged MBR: Factors affecting long-term operational flux. Water Res. 41, 3868–3879. https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.06.013

Mockaitis, G., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M., Foresti, E., 2006. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): Effects of organic loading and supplemented alkalinity. J. Environ. Manage. 79, 198–206. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.07.001

Mota, V.T., Ferraz Júnior, A.D.N., Trably, E., Zaiat, M., 2018. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? Water Res. 128, 350–361. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060

Mota, V.T.F.V., 2018. Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico).

Noori, M.C.S., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. Int. J. Hydrogen Energy 38, 13172–13191. https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2013.07.122

Penteado, E., 2012. Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios. Esc. Eng. São Carlos.

Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. J. Environ. Manage. 110, 48–68. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2012.05.018

Ribeiro, B.T., Lima, J.M. de, Guilherme, L.R.G., Julião, L.G.F., 2010. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. Sci. Agric. 67, 441–447. https://doi.org/10.1590/S0103-90162010000400011

Santana, R.S. de S., Pretti, A.A., Moreno, J.G., Dacanal, G.C., Tommaso, G., Ribeiro, R., 2016. Effect of biomass configuration on the behavior of pilot-scale anaerobic batch reactors treating dairy wastewater. Int. Biodeterior. Biodegrad. 106, 80–87. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.006

TRATAMENTO DE EFLUENTE DE FÁBRICA DE RAÇÃO ANIMAL EM SISTEMA COMPOSTO POR REATORES DE LEITO ESTRUTURADO E LEITO GRANULAR CONTENDO BIOMASSA ANAMMOX

Natália C. da Silveira [1]; Eugênio Foresti [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A produção de insumos para fabricação de ração animal gera efluente contendo elevadas concentrações de matéria orgânica e de nutrientes que trazem diversos prejuízos ao meio ambiente. A remoção de matéria orgânica por processos biológicos tem sido amplamente empregada com sucesso, enquanto que novos processos têm sido desenvolvidos para a remoção de nitrogênio. O processo de nitrificação parcial seguido do processo Anammox vem sendo considerado alternativa tecnicamente viável e economicamente favorável, especialmente para águas residuárias com altas concentrações de nitrogênio amoniacal ou baixa relação C/N. A manutenção da nitrificação parcial de nitrogênio amoniacal a N-nitrito é a etapa mais crítica do uso dessa tecnologia, pois depende da inibição seletiva das bactérias oxidadoras de nitrito (BON) para que as bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal (BOA) prevaleçam. Essa inibição pode ser conseguida sob condições operacionais bem determinadas, tais como o uso de baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD) no sistema, o controle da idade do lodo, do pH, da temperatura, da concentração de substrato e da carga carga aplicada. Este trabalho visa avaliar o desempenho do processo de nitrificação parcial seguido do processo Anammox (PN/A) a partir do controle de varáveis do processo, utilizando-se dois reatores em série. O sistema de tratamento será alimentado com efluente de reator anaeróbio usado no tratamento de água residuária originária de uma indústria de fabricação de ração animal.*

Introdução

A preservação dos recursos naturais, principalmente em relação à demanda do uso de água, é um tema atual e que evidencia a necessidade de processos efetivos de tratamento de efluentes líquidos. A produção de insumos para fabricação de ração animal gera efluentes com altas concentrações de nutrientes e matéria orgânica e o lançamento deste tipo de água residuária resulta em prejuízos ao meio ambiente e à vida humana, além elevar os custos de tratamento para tais efluentes.

O nitrogênio é um nutriente tido como contaminante dos corpos receptores, pois ele pode chegar sob diferentes formas (nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato). Os efeitos deletérios da emissão de compostos nitrogenados estão associados à toxidade à flora e fauna aquática, diminuição da concentração de oxigênio dissolvido, eutrofização e problemas que afetam a saúde humana. (Zoppas et al., 2016).

O processo convencional de remoção biológica do nitrogênio consiste, basicamente, na união de dois processos: nitrificação e desnitrificação, que se baseiam no ciclo bioquímico do nitrogênio ((Philips, 2008). Na fase da nitrificação, na presença de oxigênio dissolvido, o íon amônio é oxidado a nitrito pelas bactérias oxidadoras de amônia (BOA), e na etapa seguinte, as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) consomem este nitrito, produzindo nitrato. Em condições anóxicas, o nitrato é convertido a nitrogênio gasoso por bactérias heterotróficas (Third et al., 2001).

Os processos convencionais são bem conhecidos e sua eficiência e confiabilidade são incontestáveis. No entanto, têm como desvantagem: a baixa disponibilidade de matéria orgânica para a desnitrificação. A adição de uma fonte externa de carbono orgânico necessária para

baixas relações C/N (abaixo de 5) resulta em aumento nos custos operacionais (Fux et al., 2002). Além disso, a porção da matéria orgânica presente no efluente é desperdiçada pela rota aeróbia e não pode ser usada para produzir biogás via digestão anaeróbia, que seria uma forma de reaproveitamento energético.

O processo nitrificação parcial/Anammox (PN/A) surge como uma alternativa à necessidade de matéria orgânica no processo e para o tratamento de águas residuárias com altas concentrações de amônia. Uma vez que o processo ocorre sob condições autotróficas, o nitrogênio e matéria orgânica podem ser removidos em processos distintos. O processo PN/A ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, a amônia é oxidada a nitrito. Na segunda etapa, ocorre a oxidação anóxica da amônia a nitrogênio gasosos, realizada pelas bactérias Anammox que utilizam o nitrito como aceptor final de elétrons (Kartal et al., 2010; Strous, M., 1998). A remoção autotrófica do nitrogênio pode ser realizada em dois sistemas de reatores, um para nitrificação parcial e outro para o processo Anammox (Dosta et al., 2015). Ou ambas as etapas podem ocorrer em um único reator, desde que concentração de oxigênio dissolvido seja bem controlada (Wang et al., 2017; F. Z. Zhnag et al., 2017).

Neste contexto, o presente projeto de pesquisa visa avaliar o processo de PN/A em dois estágios como uma alternativa ao tratamento convencional de remoção biológica do nitrogênio para uma água residuária real, que apresenta alta concentração de nitrogênio amoniacal e baixas concentrações de matérias orgânica. A configuração estudada consiste em um reator de leito estruturado para a ocorrência da nitrificação parcial, seguida de um reator de fluxo ascendente com biomassa granular para desenvolvimento do processo Anammox.

Material e Métodos

Inóculo

O reator de leito estruturado foi inoculado com lodo aeróbio proveniente do sistema de lodos ativados da Estação de Tratamento de Águas Residuárias da fábrica de motores da Volkswagen, situada em São Carlos, SP. Esse lodo tem apresentado atividade nitrificante significativa, constatada em trabalhos anteriores (Barana *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

O reator Anammox, foi inoculado com lodo granular cultivado em reator de fluxo ascendente e biomassa suspensa em operação no LPB.

Água residuária

A água residuária é originada do efluente do reator UASB proveniente da Estação de Tratamento da indústria Incofap, fabricante de insumos para ração animal, situada no município de Araraquara, SP.

Para início do desenvolvimento do estudo, a água residuária foi diluída até que a concentração de N-amoniacal fosse, em média, de 200 $mg.L^{-1}$ para avaliação inicial do processo, uma vez que as altas concentrações de nitrogênio poderiam inviabilizar o processo. A condição de aeração contínua foi estabelecida no reator de leito estruturado, com manutenção dos níveis de oxigênio dissolvido (OD) em valores entre 0,5 -2,0 $mg.L^{-1}$.

Reatores

Como os processos PN/A irão ocorrer em dois reatores sequenciais, foi mantida baixa oxigenação no reator de leito fixo estruturado. O segundo reator irá operar sob condições anóxicas a partir da injeção de argônio no recipiente de alimentação deste reator, garantindo – se, assim, o crescimento a manutenção das bactérias Anammox. Na Figura 1, é apresentado o esquema do aparato experimental utilizado.

A inoculação do reator de leito estruturado foi realizada através de metodologia já empregada em estudos no LPB, que consistiu em alimentar o reator com uma mistura de ¼ do seu volume útil de lodo aeróbio e os outros ¾ de água residuária. Essa mistura foi deixada em recirculação até a conversão de aproximadamente 80% do nitrogênio amoniacal em N-nitrito. Em seguida, iniciou-se a operação do reator à temperatura média de 35ºC e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 6 horas (Barana et al., 2013), com o objetivo de favorecer o crescimento das bactérias nitritantes em relação às nitratantes. O reator Anammox foi inoculado com lodo granular cultivado em reator de fluxo ascendente e biomassa suspensa que está em operação no LPB por aproximadamente 500 dias e que vem apresentando valores de remoção de $N - NH_4^+$ e $N - NO_2^-$ superiores a 85%.

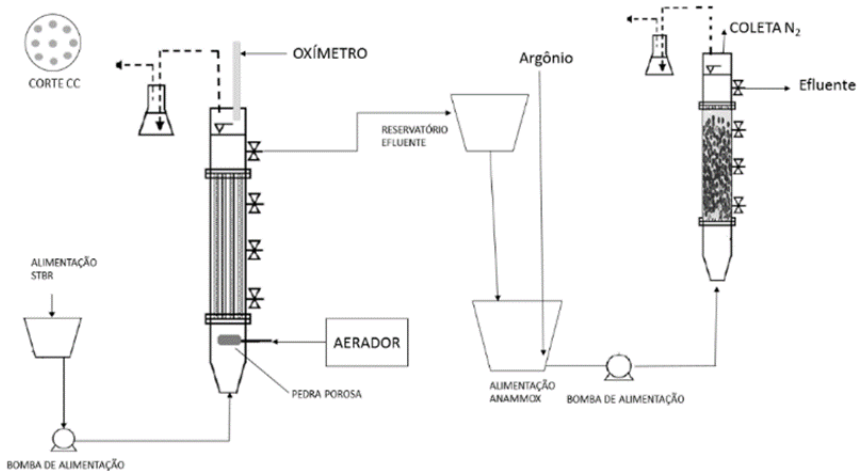


Figura 1: Esquema do aparato experimental.

Análises Físico-químicas

Para evidenciar o estabelecimento do processo PN/A e avaliar o desempenho dos processos, realizou-se o monitoramento dos compostos nitrogenados (NTK, N-amoniacal, N-nitrito e N-nitrato) no afluente e efluente, bem como os valores de OD, pH, DQO e alcalinidade. Todos os parâmetros são apresentados na Tabela 1 e foram realizados de acordo com APHA (2005).

Tabela 1: Parâmetros analisados, frequência e métodos utilizados no experimento.

Parâmetro	**Método de referência**	**Número**	**Frequência Semanal**
pH	Potenciométrico	4500-H+ B	3
OD	Luminescência		3
DQO	Colorimétrico	5220D	3
NTK	Kjeldahl	4500-Norg C	3
$N\text{-}NH_4^+$	Colorimétrico	4500-NH_3 C	3
$N\text{-}NO_2^-$	Colorimétrico		3
$N\text{-}NO_3^-$	Colorimétrico		3
Alcalinidade	Titulométrico	Dillalo Albertson (1961) modificado por Ripley et al. (1986)	3

Operação – Reator 1: Nitrificação parcial

O experimento foi dividido em 2 etapas operacionais- I: TDH = 6 horas e 0,5<OD < 1,5 $mg.L^{-1}$ e II: TDH = 12 horas e 1,0<OD<2,0 $mg.L^{-1}$. Cada etapa foi subdividida em fases nas quais algumas condições experimentais foram avaliadas com o objetivo de se estabelecer o processo de nitrificação parcial no reator 1. Estas etapas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Etapas de operação do reator de nitrificação parcial e os parâmetros operacionais adotados.

	TDH (h)	**OD ($mg.L^{-1}$)**	**T (°C)**	**Período (dias)**
Inoculação	-	1,0	36	5
Etapa I	6	0,5<OD<2,0	36	6 – 173
Etapa II	12	1,0<OD<2,0	36	174- 322

Operação – Reator 2: Anammox

O reator Anammox teve sua operação iniciada após 130 dias de operação do reator 1, uma vez que o efluente da etapa de nitrificação parcial é o substrato para desenvolvimento das bactérias Anammox. Durante os primeiros 30 dias de operação desse reator, utilizou-se o efluente do reator 1 sem nenhuma adequação dos nutrientes necessários ao desenvolvimento das Anammox, sendo que tal decisão resultou em efluente tratado de má qualidade. Desta forma, a partir do 180º dia, o efluente oriundo do reator 1, foi completado com fontes de $N - NH_4^+$ e $N - NO_2^-$ de acordo com a estequiometria necessária ao processo.

Resultados e Discussão

Água residuária

As características da água residuária estudada são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização do efluente da fábrica de insumos para ração animal

Parâmetros (unid.)	Quantidade
DQO ($mg.L^{-1}$)	400
NTK ($mg.L^{-1}$)	1400
N-amoniacal ($mg.L^{-1}$)	1200
N-nitrito ($mg.L^{-1}$)	0
N-nitrato ($mg.L^{-1}$)	0
pH	7,91
Alcalinidade a bicarbonato ($mg.L^{-1}$)	500

Observa-se que os valores de DQO são baixos, ou seja, há baixa concentração de matéria orgânica, enquanto que as concentrações de nitrogênio amoniacal são elevadas. Esta composição é, em princípio, favorável ao pós-tratamento deste efluente pelos processos de nitrificação parcial/Anammox para remoção de nitrogênio.

Operação do reator 1: Nitrificação parcial

Compostos nitrogenados

Efluente com altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixa concentração de DQO, como a água residuária utilizada durante os experimentos, são propícias para o tratamento através do processo Anammox. Porém, se faz necessário o estabelecimento do processo de nitrificação parcial previamente e, assim, ter disponibilidade de N-amoniacal e N-nitrito necessários ao processo Anammox. Desta forma, no reator 1, avaliou-se a ocorrência da nitrificação parcial da água residuária.

A Figura 2 apresenta as concentrações dos compostos de nitrogênio obtidas ao longo do período experimental no afluente e efluente do R1. O N-total afluente é composto por 86% N-amoniacal e 14% N-orgânico.

Durante o período de adaptação (6 dias), o OD foi mantido próximo a 1 $mg.L^{-1}$, com o objetivo de favorecer a ocorrência da nitrificação parcial. Quando a eficiência de remoção de N-amoniacal atingiu 80%, iniciou-se a partida do R1 com a água residuária.

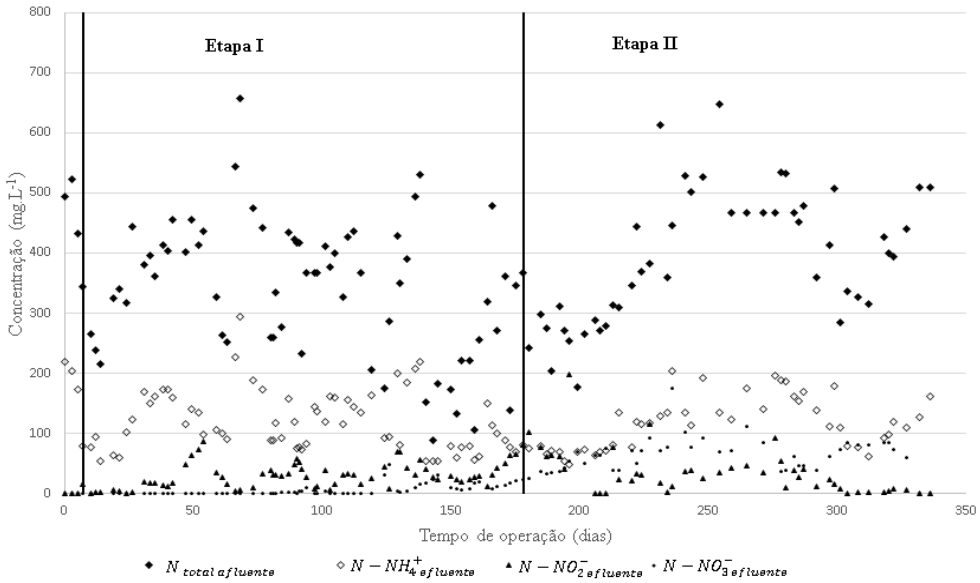


Figura 2: Compostos nitrogenados presentes no afluente e efluente do R1 para nitrificação parcial.

Visando favorecer a ocorrência do processo de nitrificação parcial no reator 1, a água residuária utilizada como substrato foi mantida com concentrações de N-amoniacal próximas a 200 $mg.L^{-1}$ (Chen et al., 2009; Miao et al., 2018). Ganigué et al.(2007) e Guo et al. (2009) confirmaram que concentrações de N-amoniacal superiores a 150 $mg.L^{-1}$ podem ser inibitórias para as espécies oxidadoras de nitrito.

A etapa I foi subdividida em 4 fases, nas quais variou-se a concentração de oxigênio dissolvido para valores entre 0,5 e 2,0 $mgO_2.L^{-1}$. Como as diferenças encontradas não foram significativas, considerou-se apenas a etapa como um todo. Sob as condições de baixa aeração e TDH de 6 horas, o percentual de oxidação média do N-amoniacal foi de 33%.

Durante os primeiros 40 dias de operação não foi comprovado o acúmulo de nitrito e nem de nitrato no meio reacional, mesmo tendo sido constatada a eficiência média de remoção de N-amoniacal de 45%, o que poderia ser indicativo da ocorrência dos processos PN/Anammox no mesmo reator. De acordo com essa hipótese, não era observado o acúmulo de nitrito, uma vez que este estava já sendo utilizado pelas bactérias Anammox que poderiam ter se desenvolvido nas regiões onde a transferência de massa de oxigênio era limitada (Ciudad et al., 2005). Todavia, os resultados encontrados nos primeiros 40 dias não se mantiveram

constantes e diversos ajustes operacionais (variação da concentração de OD, aumento na concentração de N-amoniacal no substrato, TDH) foram realizados a fim de favorecer a nitrificação parcial.

Ao final de 173 dias, como a nitrificação parcial não estava sendo alcançada, optou-se pelo aumento o TDH de 6 para 12 horas (Li et al., 2017; Third et al., 2001). Na Figura 3, é possível observar que com o incremento do TDH de 6 para 12 horas, a partir do 180º dia, resultou em melhora na eficiência de remoção de nitrogênio total de 43,61% para 81,84%. A produção de N-nitrito foi quase duplicada, mas também houve aumento na produção de N-nitrato de 3 $mg.L^{-1}$ para 60 $mg.L^{-1}$ revelando a existência e crescimento das bactérias oxidadoras de nitrito.

Após a mudança do TDH de 6 para 12 horas, a nitrificação parcial foi alcançada com sucesso nos primeiros 20 dias. Isto é, 50% do N-amoniacal afluente no reator 1 foi convertida a N-nitrito, estando este efluente com composição adequada para alimentar o reator 2. No 206º dia, houve uma queda de energia, provocando a parada das bombas de alimentação e, desde então, não foi mais possível restabelecer o processo de nitrificação parcial.

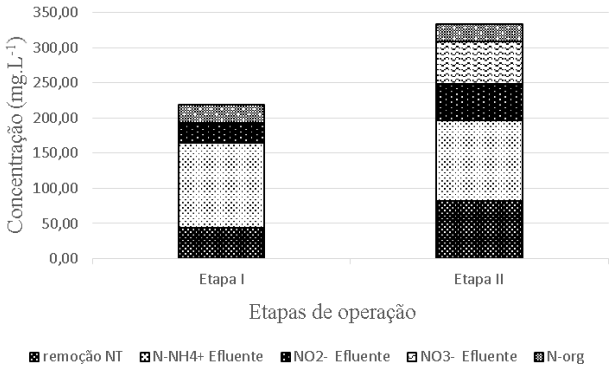


Figura 3: Composição médias dos compostos nitrogenados no efluente do reator 1 e fração de N-total removido durante as etapas I e II.

Pelo fato de o reator de leito estruturado ter se mostrado ineficiente para a obtenção da nitrificação parcial de forma estável, após 327 dias, a operação do reator 1 foi encerrada e novos estudos estão sendo realizados em reator de biomassa suspensa. Este modelo já é amplamente empregado em estudos para nitrificação parcial. Espera-se que, com essa nova configuração de reator, consiga-se, a partir do controle do tempo de retenção celular, criar condições desfavoráveis para o crescimento e permanência das bactérias oxidadoras de nitrito (BOA). Baixos valores de tempo de retenção celular devem favorecer o crescimento das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e, consequentemente, o processo de nitrificação parcial (Blackburne et al., 2008; Ganigué et al., 2007; Hellinga et al., 1998; Wu et al., 2011).

Demanda química de oxigênio

As análises de DQO foram realizadas a partir da fração suspensa do afluente e efluente do reator e são apresentados na Figura 4.

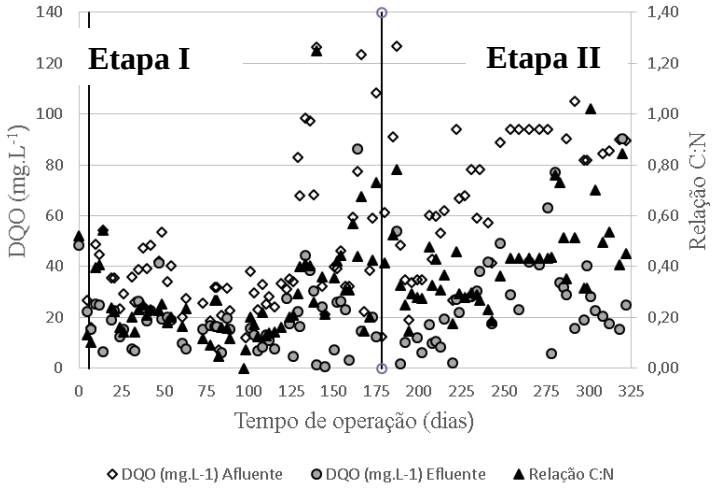


Figura 4: Variação da DQO afluente e efluente o longo da operação do reator 1.

Observa-se que, durante a etapa I, quando o OD variou entre 0,5 e 2,0 $mgO_2.L^{-1}$, houve remoção média de 50% de DQO. Neste mesmo período, a relação C/N média foi de 0,21. De acordo com Zielinska et al.(2012), a condição de baixa razão C/N aliada à baixa concentração de OD, favorece a nitrificação parcial. Já na etapa II, um incremento na concentração de OD entre 1,0 e 2,0 $mgO_2.L^{-1}$ resultou em um aumento na remoção de matéria orgânica, que alcançou o valor médio de 77%, com a relação C/N de 0,42.

Operação do reator 2 – Anammox

Com 130 dias de operação do reator 1, iniciou-se a operação do reator 2, com TDH de 3 horas. Diariamente, injetou-se uma mistura de 95% argônio e 5% CO_2O no recipiente de alimentação do reator 2, até que a concentração de oxigênio dissolvido tivesse atingido valores menores que 0,2 $mgO_2.L^{-1}$. Segundo Cho et al. (2011), a concentração de OD é um fator crítico para controle da taxa de reação quando se tem comunidades mistas, como BOA, BON e Anammox, durante o processo de oxidação da amônia. Na Figura 5, são apresentadas as variações dos compostos nitrogenados na entrada e na saída do reator 2.

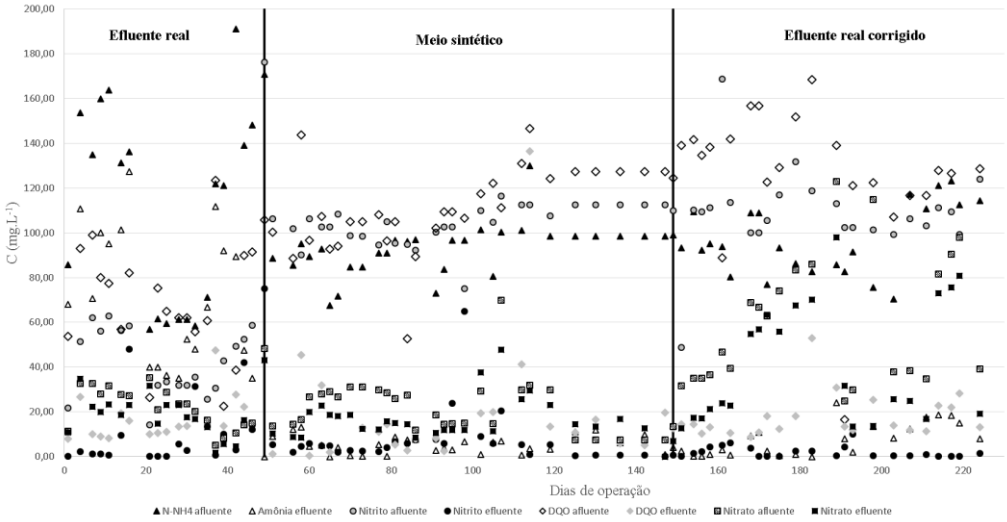


Figura 5: Variação dos compostos nitrogenados e DQO afluente e efluente do reator 2.

Observa-se que, durante os primeiros 49 dias, o reator 2 foi alimentado com o efluente resultante do reator 1 sem nenhum ajuste nas concentrações de N-amoniacal e N-nitrito. Neste período, a média da carga aplicada de nitrogênio no reator foi de 0,39 $Kg.m^3.dia^{-1}$ e a remoção

média de N-amoniacal foi de 35%. Por não estarem sendo disponibilizados os substratos adequados às bactérias Anammox, houve mudança na coloração da biomassa de vermelho para marrom, conforme Figura 6, juntamente com o decaimento da eficiência de remoção de N-total e N-amoniacal do reator. Além disso, nesse mesmo período houve problemas no aparato experimental de controle do OD e os níveis de OD chegaram a 2,93 $mgO_2.L^{-1}$, que é considerada concentração tóxica à comunidade Anammox (Yin et al., 2016).

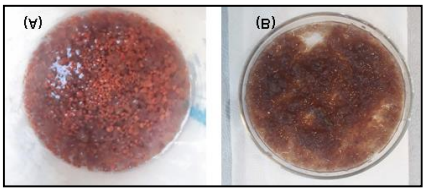


Figura 6: Comparação entre os grânulos Anammox no início da operação (A) e (B) após 49 dias de operação sem adequação dos substratos para o processo Anammox. E problemas no controle de OD.

Visando à recuperação da biomassa, o reator foi alimentado com meio sintético adaptado de Graaf et al. (1996) e TDH de 3 horas, entre o 50º e 149º dias. Nesse período, a carga de nitrogênio aplicada foi de 0,32 $Kg.m^3.dia^{-1}$ e a eficiência média de remoção de N-amoniacal foi de 94% com eficiência média de remoção de N-nitrito de 92% e N-total igual a 80%.

Entre os dias 151 e 224, manteve-se o TDH de 3 horas e a biomassa foi alimentada com o efluente do reator 1, porém desta vez, com adição dos N-amoniacal e N-nitrito na estequiometria de 1:1,32. Nesse período, a eficiência média de remoção de N-amoniacal foi de 92%, com média de carga aplicada de nitrogênio igual a 0,25 $kgNT.m^{-3}.dia^{-1}$ e eficiência média de remoção de NT de 80,27%.

A partir do 225º dia, o reator 2 vem sendo operado com TDH de 1,5 horas e efluente do reator 1 com adição de N-nitrito e N-amoniacal quando necessário.

O processo: Nitrificação parcial/Anammox

Para avaliação do processo PN/Anammox, foram consideradas as concentrações iniciais de N-amoniacal, NTK e N-orgânico afluentes no reator 1 e o efluente do reator 2. As concentrações afluentes e efluentes de N-nitrito e N-nitrato foram utilizadas na avaliação d reator 2, visto que os valores eram ajustados para alimentação do reator 2. As variações dos compostos nitrogenados durante o processo, bem como as eficiências de remoção do N-amoniacal e N-total são apresentadas na Figura 7.

O processo PN/Anammox demonstra-se muito eficiente e estável quando analisada a oxidação do N-amoniacal, com valores médios de 83,9% considerando-se os resultados obtidos no reator 2 desde o primeiro dia de operação. Este valor médio tem um leve aumento para 95,3% e se mantém constante a partir do 180º dia, quando as concentrações de N-Amoniacal e N-Nitrito estavam de acordo com a estequiometria do processo Anammox. Ao se considerar apenas o período em que as concentrações estavam adequadas, a remoção de N-nitrito média foi de 94,8%, a de N-nitrato foi de 47,6% e a de N-total média de 78%.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos até o presente momento, pode-se afirmar que o reator de leito estruturado e submetido a baixos valores de OD não se mostrou a melhor opção para controle do crescimento das bactérias oxidadoras de amônia e oxidadoras de nitrito. A causa provável é a adesão das BON ao meio suporte ao longo do tempo, tornando-se muito difícil a remoção seletiva dessa população. Essas bactérias vencem a competição com as bactérias BOA pelo oxigênio e a nitrificação parcial fica prejudicada. Desta forma, o reator contendo biomassa em suspensão e operado com baixas concentrações de OD se torna uma alternativa melhor e vem

apresentando melhores resultados para nitrificação parcial.

O processo Anammox vem se mostrando eficiente e estável na remoção de N-amoniacal e N-total da água residuária coletada na indústria, desde que as concentrações de N-nitrito e N-amoniacal sejam adequados ao processo.

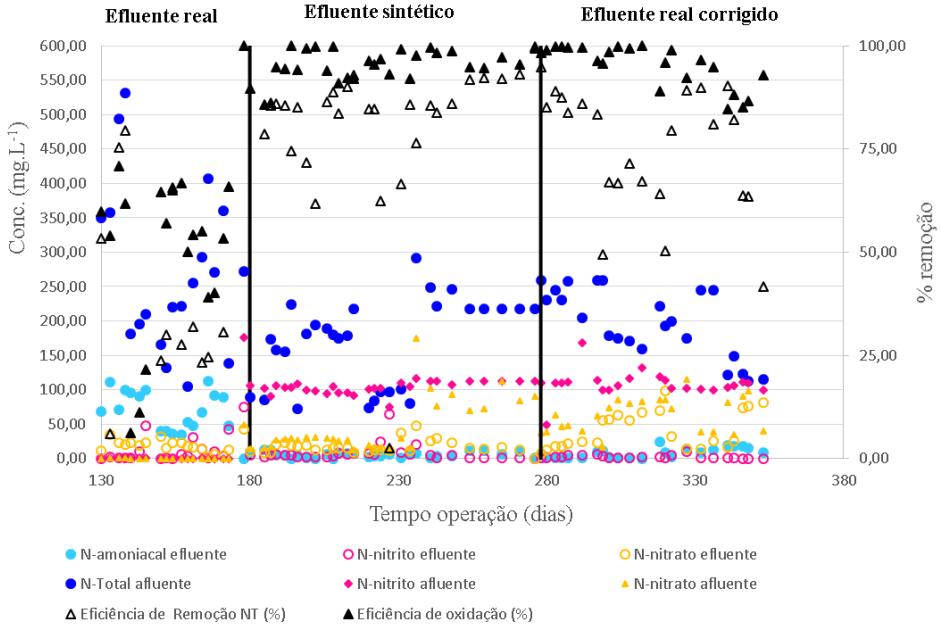


Figura 7: Variações dos compostos nitrogenados considerando-se o processo PN/Anammox.

Referências Bibliográficas

Barana, A.C., Lopes, D.D., Martins, T.H., Pozzi, E., Damianovic, M.H.R.Z., Del Nery, V., Foresti, E., 2013. Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant. J. Environ. Chem. Eng. 1, 453–459. https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.06.015

Blackburne, R., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. Biodegradation 19, 303–312. https://doi.org/10.1007/s10532-007-9136-4

Chen, H., Liu, S., Yang, F., Xue, Y., Wang, T., 2009. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. Bioresour. Technol. 100, 1548–1554. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.003

Cho, S., Fujii, N., Lee, T., Okabe, S., 2011. Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. Bioresour. Technol. 102, 652–659. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.031

Ciudad, G., Rubilar, O., Muñoz, P., Ruiz, G., Chamy, R., Vergara, C., Jeison, D., 2005. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. Process Biochem. 40, 1715–1719. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.058

Dosta, J., Vila, J., Sancho, I., Basset, N., Grifoll, M., Mata-Álvarez, J., 2015. Two-step partial nitritation/Anammox process in granulation reactors: Start-up operation and microbial characterization. J. Environ. Manage. 164, 196–205. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.023

Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I., Siegrist, H., 2002. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. J. Biotechnol. 99, 295–306. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00220-1

Ganigué, R., López, H., Balaguer, M.D., Colprim, J., 2007. Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. Water Res. 41, 3317–3326. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.027

Graaf, A.A. Van De, Bruijn, P. De, Robertson, L.A., Jetten, M.M., Kuenen, J.G., 1996. Autotrophic growth of anaerobic am mon i u m-oxi d izi ng m i cro-org a n isms in a fluidized bed reactor.

Microbiology 142, 2187–2196.
Guo, J.H., Peng, Y.Z., Wang, S.Y., Zheng, Y.N., Huang, H.J., Ge, S.J., 2009. Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater. Process Biochem. 44, 979–985. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.022
Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. Water Sci. Technol. 37, 135–142. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00281-9
Kartal, B., Kuenen, J.G., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Sewage Treatment with Anammox. Science (80-.). 328, 702–703. https://doi.org/10.1126/science.1185941
Lan, Chien-Ju; Kumar, Mathava; Wang, C.-C.L., Jih-Gaw, 2011. Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor. Bioresour. Technol. 102, 5514–5519.
Li, J., Zhang, L., Peng, Y., Zhang, Q., 2017. Effect of low COD/N ratios on stability of single-stage partial nitritation/anammox (SPN/A) process in a long-term operation. Bioresour. Technol. 244, 192–197. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.127
Miao, Y., Peng, Y., Zhang, L., Li, B., Li, X., Wu, L., Wang, S., 2018. Partial nitrification-anammox (PNA) treating sewage with intermittent aeration mode: Effect of influent C/N ratios. Chem. Eng. J. 334, 664–672. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.072
Philips, A.M.L., 2008. Utilização de reator de biodiscos para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio. Universidade Federal de Santa Catarina.
Santos, C.E.D., Moura, R.B., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., 2016. Influence of COD/N ratio and carbon source on nitrogen removal in a structured-bed reactor subjected to recirculation and intermittent aeration (SBRRIA). J. Environ. Manage. 166, 519–524. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.054
Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., & Jetten, M.S.M., 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microor- ganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 589–596.
Third, K.A., Sliekers, A.O., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 2001. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 24, 588–596. https://doi.org/10.1078/0723-2020-00077
Wang, S., Liu, Y., Niu, Q., Ji, J., Hojo, T., Li, Y.Y., 2017. Nitrogen removal performance and loading capacity of a novel single-stage nitritation-anammox system with syntrophic micro-granules. Bioresour. Technol. 236, 119–128. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.164
Wu, C., Peng, Y., Wang, S., Li, X., Wang, R., 2011. Effect of sludge retention time on nitrite accumulation in real-time control biological nitrogen removal sequencing batch reactor. Chinese J. Chem. Eng. 19, 512–517. https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60014-1
Yin, Z., Santos, C.E.D. dos, Vilaplana, J.G., Sobotka, D., Czerwionka, K., Damianovic, M.H.R.Z., Xie, L., Morales, F.J.F., Makinia, J., 2016. Importance of the combined effects of dissolved oxygen and pH on optimization of nitrogen removal in anammox-enriched granular sludge. Process Biochem. 51, 1274–1282. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.025
Zhang, F.Z., Peng, Y., Miao, L., Wang, Z., Wang, S., Li, B., 2017. A novel simultaneous partial nitrification Anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. Chem. Eng. J. 313, 619–628. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.105
Zielinska, M., Bernat, K., Cydzik-Kwiatkowska, A., Sobolewska, J., Wojnowska-Baryla, I., 2012. Nitrogen removal from wastewater and bacterial diversity in activated sludge at different COD/N ratios and dissolved oxygen concentrations. J. Environ. Sci. (China) 24, 990–998. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60867-X
Zoppas, F.M., Bernardes, A.M., Meneguzzi, Á., 2016. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. Eng. Sanit. e Ambient. 21, 29–42. https://doi.org/10.1590/S1413-41520201600100134682

ANÁLISE INTEGRADA DA DEGRADAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E LICOR DE PENTOSES EM UM INOVADOR REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FIXO COMPARTIMENTADO TERMOFÍLICO

Laís Américo Soares[1]; Edson Luis Silva[2]; Maria Bernadete Amâncio Varesche[3]

[1] Pos doutoranda do Programa de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar;
[3] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Este estudo avaliou o efeito do tempo de detenção hidráulico (TDH) e DQO aplicada na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reator anaeróbio de leito fixo compartimentado em condição termofílica utilizando licor de pentose como fonte de carbono e bagaço de cana-de-açúcar como meio suporte para o crescimento bacteriano e substrato. Máximo rendimento de hidrogênio (1,63 molH_2.mol de carboidratos solúveis convertidos^{-1}) foi observado em TDH de 24 h com DQO afluente de 3,0 g.L^{-1} e pH ajustado para 6,0 via fermentação butírica, o que corresponde a 81,5% do rendimento máximo teórico. As populações bacterianas dos reatores operados em TDH de 12h foram 46% semelhantes àquelas presentes nos reatores em TDH de 48h, indicando significativo efeito do TDH na seleção de populações de bactérias. A menor diversidade e maior dominância bacteriana (1,84 e 0,19, respectivamente) foram observadas em R3, cujo máximo rendimento de hidrogênio foi obtido, indicando a seleção e favorecimento de bactérias especializadas na conversão do substrato complexo e produção de hidrogênio.*

Introdução

O aumento na demanda por combustíveis fósseis os quais são escassos e causam inúmeros problemas ambientais tem encorajado a indústria e academia a buscar fontes alternativas de energia sustentável (Dutta et al., 2013). O Brasil é um dos líderes mundiais na produção etanol e açúcar a partir da cana-de-açúcar, cujo processamento gera elevada quantidade (250 kg.ton de cana processada^{-1}) de bagaço de cana-de-açúcar (Cgee, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um tipo de biomassa lignocelulósica que consiste basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, cuja interação entre estes componentes gera alta resistência e recalcitrância à estrutura da biomassa. Consequentemente, a hidrólise da fibra do BCA torna-se um passo limitante para a utilização desta biomassa como substrato em processos fermentativos, fazendo com que a aplicação de pré-tratamentos seja uma etapa prévia necessária para a recuperação de produtos de elevado valor agregado (Datar et al., 2007).

O pré-tratamento hidrotérmico tem sido convencionalmente usado para desestruturar a fibra de biomassas lignocelulósicas, removendo a lignina e favorecendo a hidrólise de açúcares solúveis (Soares et al., 2018a, 2017). O pré-tratamento hidrotérmico do BCA gera uma fração líquida (licor de pentoses) e uma fração sólida (fibra de BCA) que podem ser utilizadas como substrato em processos biológicos que visam à produção de energia. A fração sólida resultante do pré-tratamento hidrotérmico tem sido utilizada como doente de carbono para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reatores em batelada tanto em condição mesofílica quanto termofílica (Soares et al., 2019, 2018a, 2018b, 2017). Hongdan et al. (2013) reportaram produção de 3,85 g de xilose, 13,21 g de xilo-oligossacarídeos e 37,27 g de glicose na fração líquida, para cada 100 g de BCA pré-tratado hidrotérmicamente (180ºC por 30 minutos), enquanto que usando ambas as frações, sólida e líquida, do pré-tratamento hidrotérmico (200ºC por 10 minutos), Costa et al. (2014) reportaram produção potencial

máxima de 197,5 L CH_4.kg BCA^{-1}, corroborando o potencial desta biomassa para produção de bioenergia.

Produção de biogás tem sido reportada em diferentes configurações de reatores, tais como reatores em batelada (Rabelo et al., 2018; Soares et al., 2019), reatores anaeróbios de leito fixo (Fontes Lima and Zaiat, 2012; Penteado et al., 2013), reatores de leito empacotado (Fuess et al., 2018), reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (Ribeiro et al., 2017). No entanto, em todas as configurações reportadas, substrato líquido foi utilizado na alimentação dos reatores, uma vez que não existe na literatura, até onde vai nosso conhecimento, reatores operando em fluxo contínuo alimentado com resíduo sólido.

Assim, neste estudo, um inovador reator anaeróbio de leito fixo compartimentado (RALFC) foi idealizado e operado utilizando ambas as frações, líquida e sólida, do pré-tratamento hidrotérmico do BCA (licor de pentoses e fibra de BCA), como substrato e substrato/material suporte, respectivamente, visando à produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos via fermentação. Para tanto quatro TDHs (12, 24, 36 e 48 h) e três concentrações de licor de pentoses (aproximadamente 500, 3000 e 10000 mg $DQO.L^{-1}$) foram aplicadas.

Material e Métodos

Substratos

Bagaço de cana-de-açúcar foi disponibilizado pela indústria São Martinho (Pradópolis, SP-Brasil). Pré - tratamento hidrotérmico à 200ºC por 10 minutos foi realizado para rompimento da estrutura lignocelulósica e liberação de açúcares, de acordo com Soares et al. (2017). Licor de pentoses foi disponibilizado pelo laboratório nacional de ciência e tecnologia do bioetanol (Campinas, SP- Brasil), o qual foi obtido do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar à 190ºC por 10 minutos.

Inóculo

Lodo proveniente de reator UASB termofílico do tratamento de vinhaça foi disponibilizado pela indústria São Martinho (Pradópolis, SP-Brasil) e pré-tratado termicamente à 90ºC por 10 minutos (Kim et al., 2006). O consórcio microbiano presente no lodo pré-tratado termicamente foi bioaumentado com microrganismos endógenos do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (10 $g.L^{-1}$) e biomassa enriquecida em meio de cultura (Atlas, 2005) suplementado com 3 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura à 60ºC (Soares et al., 2017).

Descrição dos reatores

Quatro reatores anaeróbios de leito fixo compartimentado (RALFC) foram confeccionados em acrílico, de modo a comportar o efluente liquido (licor de pentoses) e o substrato sólido (bagaço de cana-de-açúcar). Tais reatores possuíam seis módulos para o efluente líquido e cinco compartimentos para o resíduo sólido, conforme Figura 1.

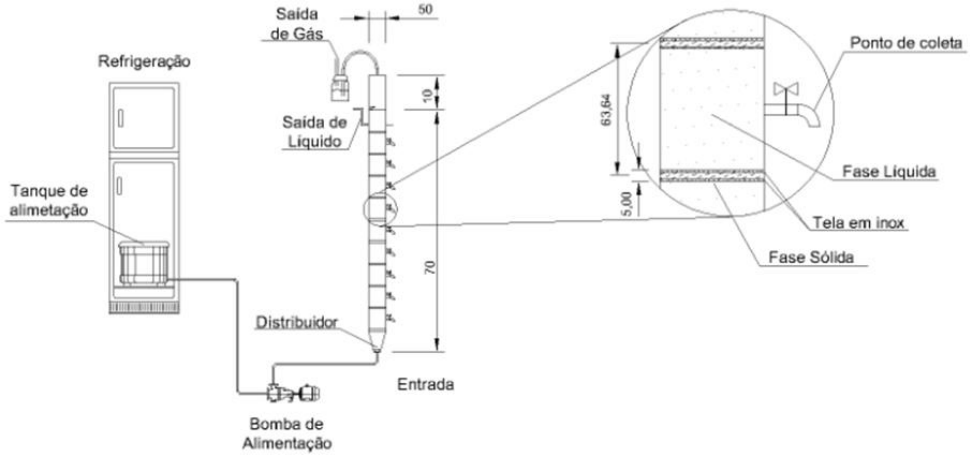
Operação dos reatores

Em cada compartimento dos quatro reatores foi adicionado 1 g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado à 200ºC por 10 minutos (Soares et al., 2017). O inóculo foi recirculado nos quatro reatores por aproximadamente duas semanas (17 dias) para adaptação dos microrganismos e favorecimento da adesão dos mesmos à superfície do bagaço de cana-de-açúcar dispostos nos compartimentos. Posteriormente, os reatores foram alimentados com licor de pentoses diluído em solução de nutrientes (Rosa et al., 2014) em quatro fases distintas e operados em 4 TDHs (48, 36, 24 e 12 horas, RALFC 1, RALFC 2, RALFC 3, e RALFC 4, respectivamente). Na primeira fase (95 dias de operação), o pH afluente foi em média de

5.6±0.3, a DQO média foi de 571±59 g.L^{-1} e a média dos carboidratos dissolvidos foi de 287±92 g. $^{-1}$.

Na segunda fase (55 dias de operação) o pH afluente médio foi de 4,3 ±0,2, a DQO média foi de 3118 ±295 g.L^{-1} e a média dos carboidratos dissolvidos foi de 1528 ±588 g.L^{-1}. A terceira fase durou 26 dias, na qual os reatores foram operados em pH de 3,9 ±0,04, DQO média de 9206 ±866 g.L^{-1} e média de carboidratos dissolvidos de 6816 ±1130 g.L^{-1}. Após esta fase os reatores foram mantidos em sistema fechado para recirculação do inóculo por 8 dias. Na quarta fase (37 dias de operação), o pH afluente foi mantido em 6,2 ±0,4, a DQO média foi de 2955 ±453e a média de carboidratos dissolvidos foi de 2507 ±453 g.L^{-1}.

Figura 1: Diagrama esquemático da configuração dos reatores



Métodos analíticos

A determinação da concentração dos carboidratos dissolvidos foi realizada de acordo com DuBois et al. (1956). Análises de DQO e pH foram realizadas de acordo com APHA (2005). A concentração de ácidos orgânicos e álcoois foi realizada por cromatografia liquida de alta performance (HPLC, Shimadzu®) de acordo com metodologia descrita por Penteado et al. (2013). A determinação de gases foi realizada em cromatografia gasosa de acordo com Ratti et al. (2013).

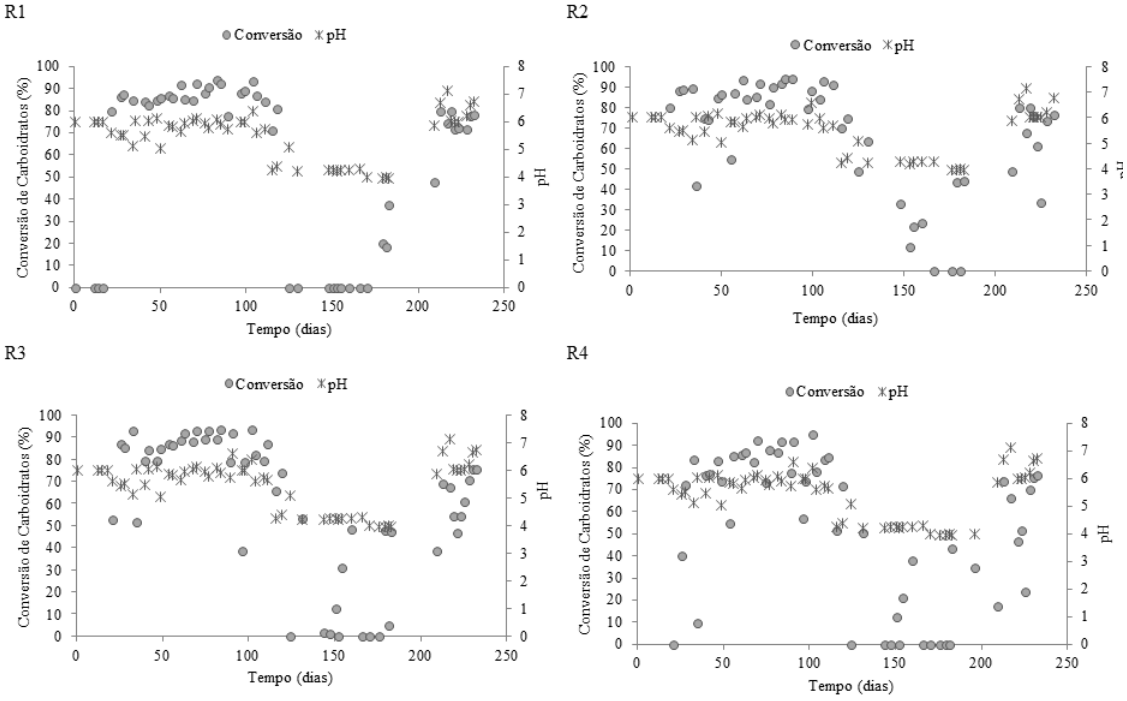
Análises de PCR/DGGE

As comunidades dos domínios Archaea e Bacteria presentes no final de cada fase de operação dos reatores, foram comparadas por reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR/DGGE). O DNA genômico das amostras foi extraído de acordo com o protocolo de Griffiths et al. (2000) modificado. A PCR da região V3 do gene 16S do rRNA foi realizada utilizando os set de primers 968 FGC e 1392 R (Kudo et al., 1997) e 1100 FGC e 1400R (Muyzer et al., 1993) para os domínios Bacteria e Archaea, respectivamente. O DGGE foi realizado usando os gradientes desnaturantes de 45% e 65% para ambos os domínios. O dendograma de similaridade (Correlação de Pearson) foi construído baseado no UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) Software BioNumerics (versão 7,0 – Applied Maths). Os índices de diversidade (Shannon-Wiener) e dominância foram determinados usando Software Past.

Resultados e Discussão

A conversão de carboidratos foi negativamente afetada em pH afluente abaixo de 5 (Figura 2).

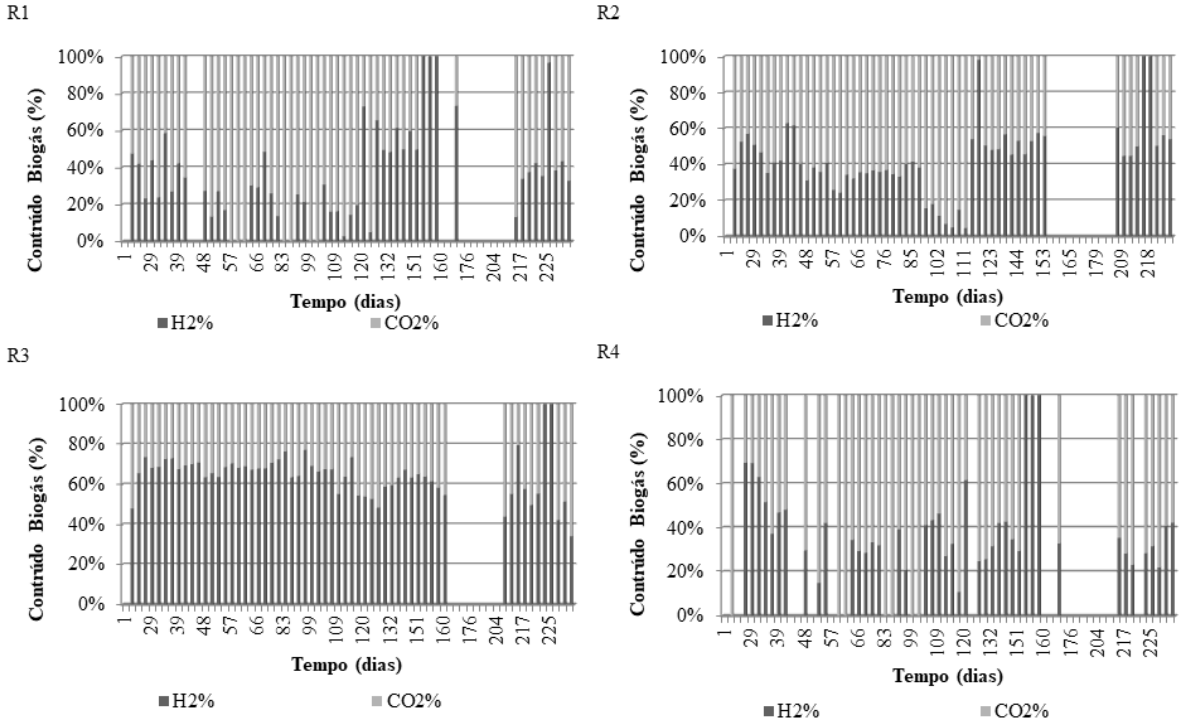
Figura 2: Conversão de carboidratos ao longo do tempo em função do pH afluente



Na primeira fase, o pH médio do afluente foi de 5,8±0,3, apenas diluindo o licor de pentoses em solução de nutrientes para atingir DQO de 0,5 $g.L^{-1}$. Nesta condição, a conversão de carboidratos foi de 86±3, 83±11, 82 ±13 e 73±22% em R1, R2, R3 e R4, respectivamente. Na segunda fase, a DQO foi de aproximadamente 3,0 $g.L^{-1}$ e o pH foi reduzido para 4,3±0,2. Nesta condição, após dez dia de operação não observou-se conversão de carboidratos no R1. Considerando R2, R3 e R4, a conversão de carboidratos foi de 28 ± 20, 18 ±16, e 15 ±13%, respectivamente. Na terceira etapa o pH afluente foi de 3,9 ±0,03, uma vez que a DQO foi aumentada para aproximadamente 10,0 $g.L^{-1}$. Nesta condição a conversão de carboidratos foi menor do que 30 % em todas as condições. Na quarta fase, a DQO aplicada foi de 3,0 $g.L^{-1}$, e o pH afluente foi ajustado para aproximadamente 6,0 com bicarbonato de sódio. Nestas condições, observou-se conversão de carboidratos de 68±9,68±15, 63±11 e 65±10, em R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

O conteúdo de H_2 no biogás foi de 21±0,2%, 35±0,1%, 68±0,05% e 26±0,2% em R1, R2, R3 e R4, respectivamente na primeira fase. Aumento do conteúdo de hidrogênio foi observado em todos os reatores na segunda fase (53±0,3%, 41±0,3%, 52±0,2% e 40±0,3%, R1, R2, R3 e R4, respectivamente). Não foi observada produção de gases na terceira fase. Na quarta fase, o conteúdo de hidrogênio no biogás foi de 34±0,2% 56±0,2 %, 61±0,2 % e 59 ±0,2% em R1, R2, R3 e R4, respectivamente. Não foi observada produção de metano no biogás durante todo o período experimental, indicativo de que o pré-tratamento aplicado ao lodo e as condições operacionais dos sistemas foram adequadas para evitar o crescimento de arquéias metanogênicas. Embora na literatura tenha sido reportada fermentação em diferentes faixas de pH, a produção de gases, principalmente hidrogênio, é negativamente afetada em pH menor do que 5,0 (Ferraz Júnior et al., 2014; Fuess et al., 2016) padrão corroborado no presente estudo.

Figura 3: Conteúdo de hidrogênio (H2) e gás carbônico (CO2) no biogás ao longo do período de operação



Embora hidrogênio tenha sido detectado por cromatografia gasosa em todos os reatores, a produção deste gás não foi suficiente para gerar deslocamento no medidor de gases e, portanto não foi possível calcular a produtividade e o rendimento nestes reatores.

Em condições normais de temperatura e pressão (CNTP) os valores máximos de produtividade volumétrica e o rendimento de hidrogênio foram de 1,87 $mLH2.L.h^{-1}$, 0,08 mmol $H_2.h^{-1}$ e 0,45 molH_2.mol de carboidratos solúveis consumidos^{-1}, respectivamente em R2.

Nas mesmas condições (CNTP), a produtividade volumétrica e o rendimento de hidrogênio atingiram valores médios de 0,5 ±0,3 mmol $H_2.h^{-1}$, 10,8 ±7,1 $mLH_2.L.h^{-1}$ e 1,63 ±0,9 molH_2.mol carboidratos solúveis consumidos^{-1}, respectivamente em R3. Rendimentos semelhantes aos observados no presente estudo podem ser encontrados na literatura, a partir de substratos como sacarose lactose e vinhaça de cana de açúcar (Tabela 1).

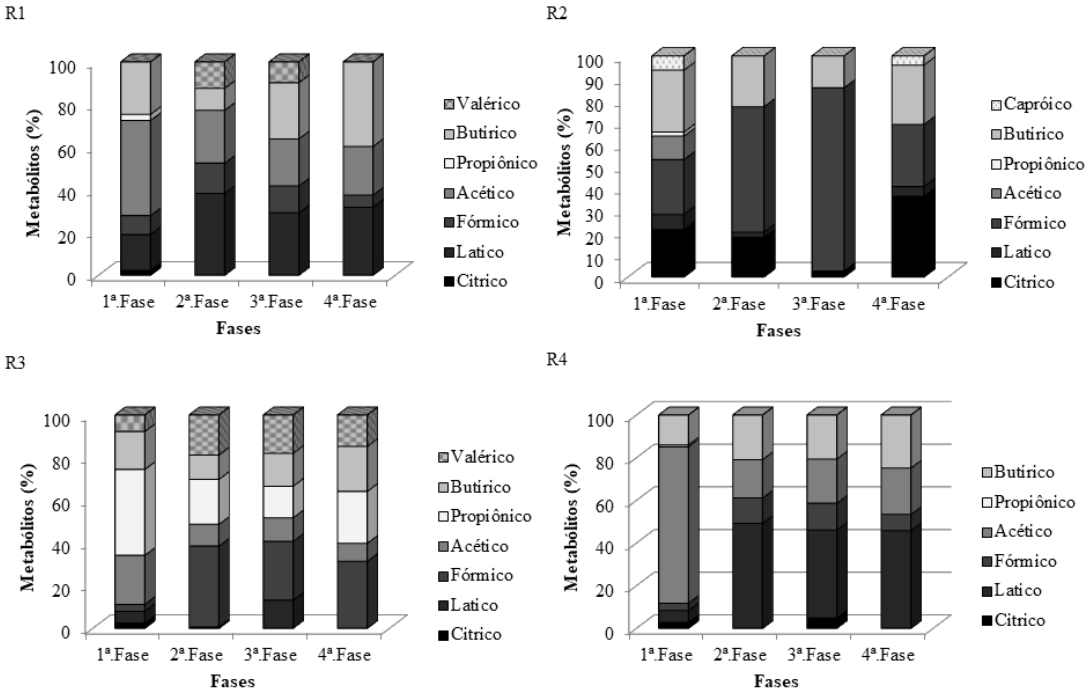
Tabela 1: Rendimentos de hidrogênio a partir de diferentes substratos

Reator	T (ºC)	Substrato	TDH (h)	Rendimento (molH_2.mol carboidratos^{-1})	Referências
RALFC	55	Licor/BCA	24	1,63	Este estudo
AFBR	55	Sacarose	4	0,97	Ferreira et al. (2018)
UASB	55	Sacarose	12	1,53	Dong et al. (2011)
AFBR	30	Lactose	4	1,33	Rosa et al. (2014)
APBR	55	Vinhaça		2,40	Ferraz Jr et al. (2014)
CSTR	55	Resíduo de arroz	2	2,14	Yu et al. (2002)

A produção de hidrogênio foi acompanhada pela geração de ácidos orgânicos, tais como cítrico, lático, fórmico, propiônico, butírico, valérico e capróico (Figura 4). Nos reatores R1 e R4, nos quais não produtividade e rendimento de hidrogênio não foram detectados, observou-se elevada porcentagem de ácido lático (16,8; 38,3; 29,1 e 31, 8 % na 1ª. 2ª. 3ª. e 4ª.

fase , respectivamente em R1 e 5,6; 49,2; 41,2 e 45,8% na 1ª. 2ª. 3ª. e 4ª. fase, respectivamente, em R4). A produção de ácido lático ocorre a partir de uma rota metabólica alternativa desempenhada por bactérias láticas para obtenção de energia em condições de baixa disponibilidade de carboidratos (Fuess et al., 2018). Tendo em vista que as bactérias láticas competem pelo substrato com as bactérias produtoras de hidrogênio (Equação 1), a produção deste metabólito é desfavorável em sistemas acidogênicos que visam a produção de hidrogênio.

Figura 4: Metabólitos produzidos ao longo do período de operação dos reatores



$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_3H_6O_3 \qquad (Equação.1)$$

A presença de bactérias láticas em sistemas acidogênicos tem sido associada a baixos rendimentos de hidrogênio (Fuess et al., 2018; Gomes et al., 2015) devido principalmente à competição por substrato e produção de bacteriocinas, que interagem com células-alvo levando à lise celular de bactérias produtoras de hidrogênio, tais como *Clostridium* e *Bacillus* (Gomes et al., 2015).

Embora maior rendimento de hidrogênio (1,63 molH_2.mol de carboidratos convertidos^{-1}) ter sido observado em R3, neste reator foi observada elevada porcentagem de ácido propiônico (40,3; 21,1; 14,8 e 24,3 %, na 1ª. 2ª. 3ª. e 4ª. fase, respectivamente, cuja produção ocorre a partir do consumo do gás hidrogênio (Equação 2).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O \qquad (Equação\ 2)$$

A produção de ácido acético em R3 diminuiu de 22,9% na primeira fase para 8,5 % na quarta fase, enquanto que a produção de ácido butírico aumentou de 17,8 para 21,1 %, indicando que a produção de hidrogênio ocorreu via fermentação butírica. Vale ressaltar que a produção de ácido acético leva a produção teórica de 4 mol H_2.mol glicose consumida^{-1}, enquanto que apenas 2 mol H_2.mol glicose consumida^{-1}, são gerados a partir da fermentação butírica (Equações 3 e 4, respectivamente). Assim, no presente estudo o rendimento de hidrogênio atingiu 81,5% do rendimento teórico a partir da fermentação butírica.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \qquad (Equação\ 3)$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \qquad (Equação\ 4)$$

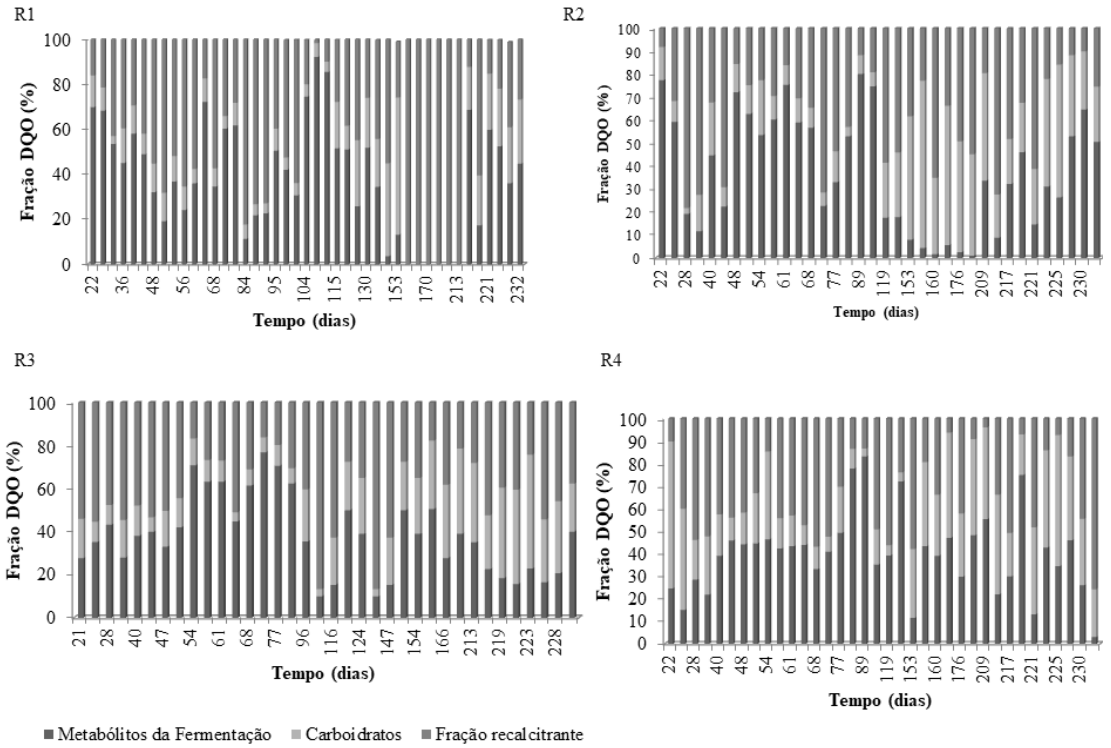
Em R2, o mesmo padrão de R3 foi observado, isto é, produção de ácido propiônico (1,9%) foi observada apenas na 1ª. fase. No mesmo sentido, baixa porcentagem de ácido lático (6,9; 2;4; 0 e 4,4 % na 1ª. 2ª. 3ª. e 4ª. fase, respectivamente) foi observada neste reator. Vale ressaltar que produtividade volumétrica de 0,08 mmol $H_2.h^{-1}$ e rendimento de 0,45 molH_2.mol de carboidratos solúveis consumidos^{-1} foram observados neste reator. Ainda em R2, a produção de hidrogênio ocorreu exclusivamente via rota do ácido butírico, uma vez que ácido acético (10,6%) foi observado apenas na primeira etapa ocorreu via fermentação butírica, enquanto que a produção de ácido butírico ocorreu em todas as fases (28,0; 23,0;14,5 e 26,9%, na 1ª. 2ª. 3ª. e 4ª. fase, respectivamente).

A partir do monitoramento contínuo ao longo do período operacional foi possível calcular o balanço de massas, em termos de DQO (Figura 5). Em R1, 47,9; 25,7 e 34,8% da DQO corresponderam à produção de metabólitos da fermentação na 1ª. 2ª. e 4ª. fase, respectivamente, enquanto que 43,5; 51,2;100 e 46,8% corresponderam a fração recalcitrante (na 1ª. 2ª. 3ª e 4ª. fase, respectivamente).

Em R2, a fração recalcitrante correspondeu a 36,9; 45,5; 51,9 e 31,9 % da DQO, na 1ª. 2ª. 3ª e 4ª. fase, respectivamente enquanto 52,1; 9,1; 1,8 e 36,1 % corresponderam a produção de ácidos orgânicos. Em R3 e R4, a fração da DQO correspondente a produção de ácidos orgânicos diminuiu de 46,9 para 23,9% e de 42,1 para 33,7% da primeira para a quarta fase, respectivamente.

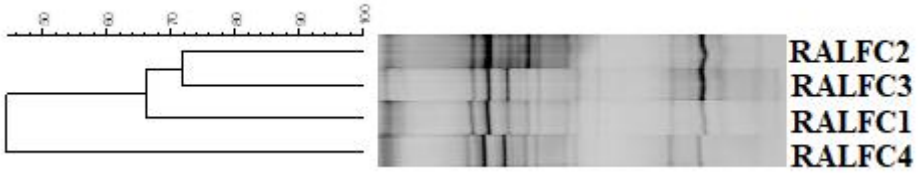
As populações bacterianas presentes no final da operação dos reatores foram avaliadas por PCR/DGGE. Similaridade de 72% foi observada entre R2 e R3, condições em que observaram-se produtividade e rendimentos de hidrogênio (0,08 mmol $H_2.h^{-1}$ e rendimento de 0,45 molH_2.mol de carboidratos solúveis consumidos^{-1} e 0,5 ±0,3 mmol $H_2.h^{-1}$, e 1,63 ±0,9 molH_2.mol^{-1}, respectivamente). Já R1 e R4 foram 66 e 46% semelhantes aos demais reatores, indicando que o maior e menor TDH (48 e 12h) ocasionaram modificações nas populações bacterianas.

Figura 5: Balanço de massas em termos de DQO ao longo do período operacional.



Assim como o presente estudo, Ferreira et al. (2018), observaram que o decréscimo no TDH (de 8 para 1 h) ocasionou modificações no perfil de bandas do DGGE, resultando na diminuição da similaridade entre as populações dos reatores.

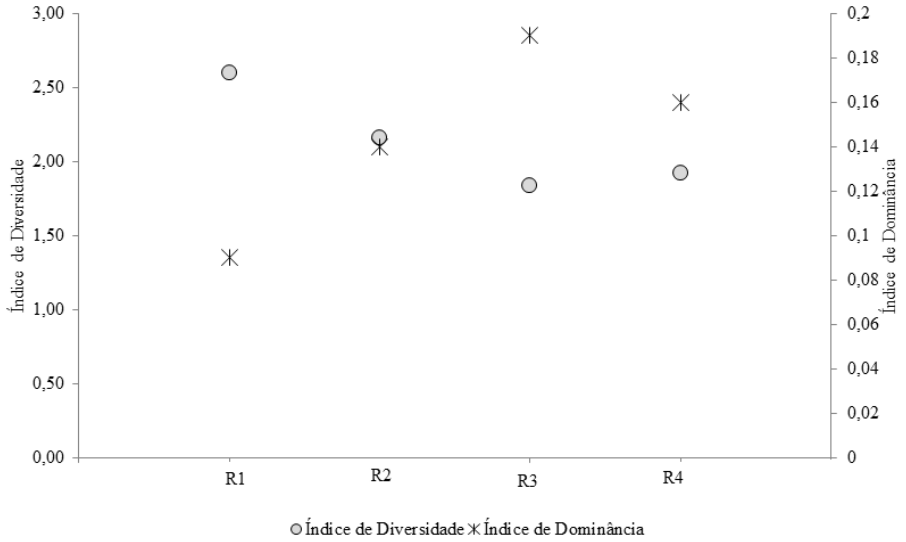
Figura 6: Perfil de bandas de DGGE no final de operação dos reatores.



Em R3, cujos valores máximos de produtividade e rendimento de hidrogênio foram obtidos (0,5±0,3 mmol $H_2.h^{-1}$, e 1,63±0,9 molH_2.mol^{-1}, respectivamente) observou-se o menor índice de diversidade (1,84) e maior índice de dominância (0,19), indicando que nesta condição, houve seleção de populações de bactérias especializadas na degradação de bagaço de cana-de-açúcar e licor de pentoses, levando à produção de hidrogênio. Visto que neste reator houve predomínio de ácido butírico em relação ao acético, pode-se inferir que tais populações bacterianas foram responsáveis pela fermentação butírica (Figura 7).

Comparando-se R2 e R3, cuja produtividade volumétrica e rendimento de hidrogênio foram detectados, observou-se diversidade de 2,16 e 1,84 e dominância de 0,14 e 0,19, respectivamente. Em R2 observou-se a produção de ácidos cítrico, lático, fórmico, butírico e capróico, enquanto que em R3 observou-se a produção de ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e isovalérico, corroborando as diferenças metabólicas entre as populações bacterianas.

Figura 7: Índice de diversidade de Shannon e dominância de populações bacterianas



Em R1 e R4 a diversidade foi de 2,6 e 1,9, respectivamente e a dominância foi de 0,09 e 0,16, respectivamente. Todavia, não foi detectada produtividade e rendimento de hidrogênio nestes reatores, bem como os mesmos ácidos orgânicos foram produzidos em ambos (lático, fórmico, acético e butírico), indicando que apesar da diferença entre as populações bacterianas houve redundância metabólica, isto é, bactérias capazes de desempenhar as mesmas rotas metabólicas foram favorecidas nos reatores de menor e maior TDH.

Conclusões

Neste estudo demonstramos a viabilidade de aplicar bagaço de cana-de-açúcar como substrato e meio suporte em um reator anaeróbio de leito fixo compartimentado alimentado com licor de pentoses. Máximo rendimento de hidrogênio (1,63 molH_2.mol de carboidratos solúveis convertidos^{-1}) foi observado em TDH de 24 h com DQO afluente de 3,0 g.L^{-1} e pH ajustado para 6,0 via fermentação butírica. Populações microbianas distintas foram selecionadas de acordo com o TDH aplicado, sendo que similaridade de apenas 46% foi observada entre as populações dos reatores operados em maior (48 h) e menor (12 h) TDH. A menor diversidade e menor dominância de populações bacterianas no reator de maior rendimento de hidrogênio (R3) indica a seleção e favorecimento de bactérias especializadas na degradação de biomassa lignocelulósica complexa como bagaço de cana-de-açúcar e substrato recalcitrante, como o licor de cana-de-açúcar.

Referência Bibliográfica

APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Am. Public Heal. Assoc. Am. Water Work. Assoc. Water Environ. Fed.

Atlas, R.M., 2005. Handbook of Media for Environmental Microbiology. Microbiology.

Cgee, 2010. Química verde no Brasil: 2010-2030, Carioca, JO.

Costa, a. G., Pinheiro, G.C., Pinheiro, F.G.C., Dos Santos, a. B., Santaella, S.T., Leitão, R.C., 2014. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. Chem. Eng. J. 248, 363–372.

Datar, R., Huang, J., Maness, P.C., Mohagheghi, A., Czernik, S., Chornet, E., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. Int. J. Hydrogen Energy 32, 932–939.

Dong, F., Li, W.W., Sheng, G.P., Tang, Y., Yu, H.Q., Harada, H., 2011. An online-monitored thermophilic hydrogen production UASB reactor for long-term stable operation. Int. J. Hydrogen Energy 36, 13559–13565.

DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J.K., Rebers, P. a., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Dutta, S., De, S., Saha, B., 2013. Advances in biomass transformation to 5-hydroxymethylfurfural and mechanistic aspects. Biomass and Bioenergy.

Ferraz Jr, A.D.N., Zaiat, M., Gupta, M., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G., 2014. Impact of organic loading rate on biohydrogen production in an up-flow anaerobic packed bed reactor (UAnPBR). Bioresour. Technol. 164, 371–379.

Ferraz Júnior, A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy 39, 16852–16862.

Ferreira, T.B., Rego, G.C., Ramos, L.R., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., de Oliveira, L.L., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2018. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy 43, 18908–18917.

Fontes Lima, D.M., Zaiat, M., 2012. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 37, 9630–9635.

Fuess, L.T., Ferraz, A.D.N., Machado, C.B., Zaiat, M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. Bioresour. Technol. 247, 426–433.

Fuess, L.T., Mazine Kiyuna, L.S., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 41, 8132–8145.

Gomes, B.C., Rosa, P.R.F., Etchebehere, C., Silva, E.L., AmâncioVaresche, M.B., 2015. Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. Int. J. Hydrogen Energy 40, 8650–8660.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A. g, 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5488–5491.

Hongdan, Z., Shaohua, X., Shubin, W., 2013. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. Bioresour. Technol. 143, 391–396.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochem. 41, 199–207.

Kudo, Y., Nakajima, T., Miyaki, T., Oyaizu, H., 1997. Methanogen flora of paddy soils in Japan. FEMS Microbiol. Ecol.

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrogen Energy 38, 6137–6145.

Rabelo, C.A.B.S., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. J. Environ. Manage. 223, 952–963.

Ratti, R.P., Botta, L.S., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2013. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. Int. J. Hydrogen Energy 38, 9707–9717.

Ribeiro, F.R., Passos, F., Baeta, B.E.L., Aquino, S.F. De, 2017. Anaerobic digestion of sugarcane bagasse hemicellulose after hydrothermal pretreatment in a UASB reactor. Sci. Total Environ. 584–585, 1108–1113.

Rosa, P.R.F., Santos, S.C., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. Bioresour. Technol. 161, 10–19.

Soares, L.A., Borges Silva Rabelo, C.A., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018a. Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse. Biomass and Bioenergy 117, 78–85.

Soares, L.A., Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Monteiro, P.A.S., Seleghim, P., Varesche, M.B.A., 2018b. Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities. Waste and Biomass Valorization 0, 0.

Soares, L.A., Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2017. Design and optimization of hydrogen production from hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using response surface methodology. Water Sci. Technol. 75, 95–105.

Soares, L.A., Rabelo, C.A.B.S., Delforno, T.P., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2019. Experimental design and syntrophic microbial pathways for biofuel production from sugarcane bagasse under thermophilic condition. Renew. Energy 140, 852–861.

Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., Zhang, H., 2002. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. Int. J. Hydrogen Energy 27, 1359–1365.

ADSORÇÃO DO NONILFENOL EM LODO ANAERÓBIO GRANULAR SOB CONDIÇÕES ASSÉPTICAS

Rômulo Mota Teixeira [1]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [2]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A cinética de adsorção do Nonilfenol Etoxilado (NFE) no lodo granular anaeróbio mostrou que a concentração de equilíbrio do NFE em solução foi atingido em aproximadamente 36 horas, numa faixa de 0,509 mg.L⁻¹ em pH 4,0 e 0,648 mg.L⁻¹ em pH 8,5. Tal fato foi atribuído à desprotonação da molécula orgânica (fenólica) que inibe a difusão e diminui a adsorção em pH alcalino. As isotermas de adsorção mostraram que o modelo de Freundlich se ajustou melhor aos dados de adsorção (R^2 = 0,982), cujos parâmetros cinéticos, (Kf = 1,0 L.g⁻¹ e 1/n = 0,4803), obtidos estão em concordância aos valores apresentados na literatura para lodos anaeróbios. Por fim, a concentração de NFE no sólido (lodo anaeróbio) foi superior em, aproximadamente, 3 vezes em relação a concentração no meio líquido, devido à natureza hidrofóbica do NFE.*

Introdução

O Nonilfenol etoxilado (NFE) é um surfactante não iônico amplamente utilizado em aplicações industriais e domésticas, tais como: Formulações de pesticidas e herbicidas, produtos de higiene pessoal, detergentes, tintas, polímeros, assim como em indústrias de celulose e papel.

Existem várias formas de NFE descritas na literatura, podendo ser na forma linear ou ramificada, com a cadeia de 9 carbonos (nonil) ligada na posição -orto, -meta ou -para no anel fenol. Contudo, o subproduto mais encontrado em águas residuárias é o 4-nonilfenol, sendo o grupamento nonil situado na posição -para do anel fenólico (Barhoumi et al., 2003).

Além disso, tal composto tem sido relatado como desregulador endócrino, devido à capacidade de mimetizar o hormônio sexual feminino (17β-Estradiol) por meio de uma interação direta com o receptor de estrogênio, acarretando elevada toxidade a biota aquática (Navarro et al., 2008; Omeroglu et al., 2015; Dai et al., 2018). Ademais, a presença do NFE no corpo humano pode induzir a redução da contagem de espermatozoides e pode causar câncer de mama e testículos.

Desse modo, o NFE foi enquadrado na lista das 33 substâncias perigosas prioritárias na *Water Framework Directive (WFD)* e recentemente nos Estados Unidos na *Environmental Protection Agency's Contaminant Candidate List (CCCL$_4$)*. Assim, em alguns países europeus, o NFE tem sido substituído pelo álcool polietoxilado, devido aos efeitos adversos (Toxicidade, atividade estrogênica e hidrofobicidade) dos subprodutos de degradação do NFE, com 0 a 2 unidades etoxiladas. No entanto, os polietoxilados alcoólicos possuem preços elevados e são menos eficientes em geral, o que aumenta a produção ilegal e o uso exacerbado de NFE (Bouki et al., 2010; Al-Ahmari et al., 2018).

Com a produção excessiva do NFE, esse surfactante tem alcançado diversos compartimentos ambientais, (águas superficiais, sedimentos, águas subterrâneas, solo e ar), em concentrações elevadas, através do efluente das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) municipais e industriais, em virtude da ausência de tratamento avançado de águas residuárias, (Isobe et al., 2001; Komori et al., 2006; Navarro et al., 2008; Yung-Dun; Dai et al., 2018).

Ying et al. (2002) relataram concentrações de NFE (6 a 343 µg.L⁻¹) em efluentes de ETEs na Espanha. Ademais, nesta região, o lodo da ETE continha entre 100 a 500 mg.kg⁻¹ de NFE, enquanto que os sedimentos fluviais que se formavam a montante da ETE possuía entre 50 a 200 µg.kg⁻¹ de NFE, indicando que esse composto estava amplamente disperso na área.

Mediante ao exposto, torna-se necessário a aplicação de técnicas de remoção do NFE. Assim, devido às suas propriedades físico-químicas, foram propostos processos orientados à adsorção (Iwasaki et al., 2002; Barhoumi et al., 2003; Bouki et al., 2010), processos orientados à membrana (Li et al., 2000; Crini et al., 2007), processos biotecnológicos e oxidação avançada (Synder et al., 2006; Hyunook et al., 2007; Sun et al., 2008).

Entretanto, entre as tecnologias apresentadas, a adsorção é considerada a opção mais importante, uma vez que o NFE apresenta baixa solubilidade em água e alto valor de log Koc (Coeficiente de partição de carbono orgânico) (Barrera-Días et al. 2018).

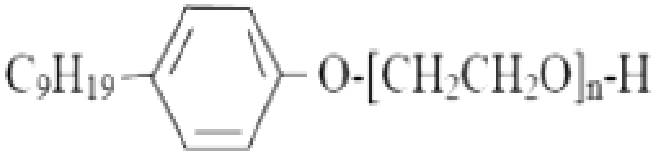
Além disso, diversos autores relataram que as principais vias para remoção de NFE são a adsorção em adsorventes como carbono (Yu et al., 2008; Cheng et al., 2017), bioadsorventes (Yamada et al., 2009), partículas magnéticas (Kurinobu et al., 2007), solos e sedimentos (During et al., 2002; Liorca-Porcel et al., 2009).

Todavia, existem raríssimos estudos que relatam o comportamento da adsorção do NFE em lodo anaeróbio granular, assim como o equilíbrio isotérmico do processo de adsorção. Assim, os objetivos do artigo são fornecer as isotermas de adsorção para a compreensão da adsorção do NFE em lodos anaeróbios e obter a distribuição relativa do NFE entre a fase líquida e a fase sólida (biomassa).

Material e Método

O Nonilfenol etoxilado NFE (Figura 1) utilizado no experimento foi obtido da empresa Destilaria Bauru LTDA, de aparência líquida, incolor e pureza de 87%. Preparou-se uma solução padrão de 500 $mg.L^{-1}$ de NFE, do qual foi retirado as demais concentrações adicionadas nos reatores em bateladas. No tocante ao inóculo, o mesmo foi proveniente do reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) do tratamento de água residuária da Avícola Céu Azul (Pereira, São Paulo), sendo esse lodo anaeróbio coletado em frascos plásticos com capacidade de 5L e armazenado em câmara fria a 4ºC.

Figura 1: Estrutura química do Nonilfenol etoxilado (NFE), onde n é o numero de unidades etoxiladas



Fonte: Noorimtlagh et al., (2018)

Meio de cultura

A alimentação dos reatores em batelada foi composta pelo meio basal Zinder (Zinder et al.,1984). O meio de cultura foi preparado pela dissolução dos componentes em água ultrapurificada, obtido pelo equipamento (Merck Millipore®), na ordem apresentada na Tabela 1. Após a preparação, o meio foi distribuído no frasco Duran® (1L) e mantido sob atmosfera de N_2 (100%) durante 10 minutos.

O gás foi introduzido nos frascos, através do sistema de distribuição simultânea de gases, passando pela coluna catalítica capaz de reter traços de oxigênio geralmente presentes nas linhas de condução e os cilindros estoque dos gases comerciais (Vazoller, 1995). Em seguida, fechou-se o frasco com tampa de borracha de butila e rosca plástica e estocado a 4ºC na ausência de luz.

Tabela 1: Composição do meio de cultivo ZINDER

Componentes	Quantidades – Q.S.P. 1000 mL de água ultrapurificada
NH_4Cl	500 mg
K_2HPO_4	400 mg
$MgCl_2.\ 6H_2O$	100 mg
$CaCl_2.\ 2H_2O$	50 mg
Solução Traço de Metais	10,0 mL

Fonte: ZINDER et al. (1984)

Além disso, preparou-se a solução traço de metais, com a dissolução inicial de TritriplexIII em água ultrapurificada e o pH final ajustado para 7,0 com solução de KOH 10N. Posteriormente, os sais foram acrescentados e dissolvidos na solução, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 2. Tal solução foi mantida no escuro sob refrigeração (4ºC).

Tabela 2: Composição da solução traço de metais do meio de cultivo ZINDER

Componentes	Quantidades – Q.S.P. 1000 mL de água ultrapurificada
Tritriplex III	4,5g
$FeSO_4.7H_2O$	0,556g
$MnSO_4.H_2O$	0,086g
$CoCL_2.6H_2O$	0,17g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,21g
H_3BO_3	0,19g
$NiCL_2$	0,02g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,01g

Fonte: ZINDER et al. (1984)

Ademais foram acrescentadas solução de bicarbonato de sódio (10%) (1g. L^{-1}) e solução de vitaminas (Tabela 3) (Dubourguier, 1987).

Tabela 3: Composição da solução de vitaminas

Componentes	Quantidades – Q.S.P. 1000 mL de água ultrapurificada
Biotina	0,002g
Ácido fólico	0,002g
Tiamina-HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantotenato de cálcio	0,005g
Piridoxina-HCl	0,010g
Vitamina B12	0,0001g
Ácido lipoico	0,005g

Fonte: DUBOURGUIER (1987)

A solução de vitaminas foi preparada pela dissolução dos seus componentes (Tabela 3), em água ultrapurificada, esterilizada por filtração rápida em membrana e distribuídos em frascos âmbar, envolvidos em papel alumínio e armazenados sob refrigeração (4ºC).

Adsorção do Nonilfenol Etoxilado – Fases de operação

Com o intuito de avaliar a adsorção do Nonilfenol no lodo anaeróbio, foram realizados ensaios em batelada, em duplicata, para determinar a isoterma de adsorção. Os experimentos foram divididos em duas fases.

A primeira fase consistiu em determinar o tempo de saturação do NFE no lodo anaeróbio, afim de obter a concentração de equilíbrio da solução. Nessa fase, utilizou-se frascos Erlenmeyer de 2L, os quais foram preenchidos com 470 ml de meio de cultura e 130 ml de inóculo, ou seja, 600mL de solução (meio + inóculo). Destaca-se que o volume de inóculo foi calculado em função da concentração de Sólidos Totais (ST) do lodo anaeróbio e foi padronizado em todos os reatores uma concentração de 7,2 $gST.L^{-1}$, conforme metodologia descrita por Okada (2012). Vale salientar, que durante essa fase, foi testado três diferentes valores de pH (4, 7 e 8,5), a fim de verificar a influência do pH na adsorção do NFE no lodo anaeróbio.

Na segunda fase, utilizou-se frascos Erlenmeyer de 500mL, sendo 174mL de meio de cultura e 26mL de inóculo, totalizando 200mL de solução, correspondendo a 20mL de volume reacional (10%). Nessa fase, foram utilizadas 6 concentrações de NFE (0,5; 0,75; 1,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $mg.L^{-1}$), com o objetivo de construir a isoterma de adsorção. Cabe ressaltar que em todas as fases de operação do experimento, os reatores foram mantidos sob agitação de 150 rpm e 30ºC.

Nas fases anteriormente descritas, o inóculo foi previamente esterilizado em autoclave por três vezes durante 60min, 121ºC e 1 atm, como descrito na metodologia de Mogensen et al. (2003). Posteriormente, a fim de evitar a oxidação do NFE, foi fluxionado nitrogênio (100%) durante 10 min em todos os reatores em batelada, conforme descrito no método de Okada (2012). Em seguida, os reatores foram fechados com tampa de borracha de butila e levados para o agitador (*New Brunswick^{TM} I26*) com transmissão contrabalançada Tri-excêntrico Eppendorf.

Preparo das amostras

O método de Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction -SPE*) foi usado para purificação das amostras. Os cartuchos (C18-ODS, Agilent Technologies®) foram acoplados a estação de filtração a vácuo (*Vacuum Manifold Processing Station,* Agilent Technologies®) e submetidos a filtração com bomba de vácuo (Prismatec®) a pressão de 5 bar. Os cartuchos foram condicionados em metanol (2mL) e eluição com etanol (1mL) seguida de lavagem com água ultrapurificada (1 mL), conforme metodologia descrita por Dornelles (2019).

As amostras para determinação da concentração de NFE foram coletadas após a injeção do surfactante e ao final do ensaio. A concentração de NFE foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), com acetonitrila/água na proporção de 90:10 (v/v) como fase móvel, sendo a temperatura do forno em 40ºC, fluxo de eluição de 0,8 $mL.min^{-1}$ e coluna C-18 (Shimadzu®) como fase estacionária. No detector de fluorescência usou-se comprimento de onda de 220nm (λ_{exc}) e 315nm (λ_{em}) (Dornelles, 2019).

Isotermas de adsorção

Os dados de adsorção do NFE no lodo foram ajustados à equação de Freundlich e Langmuir (Equação 2 e 4), respectivamente.

Equação de Freundlich:

$$q = K_f \times C^{1/n} \quad (1)$$

A Equação 1 foi reescrita na forma linearizada a fim de ajustar os parâmetros Kf e 1/n, a partir de uma regressão linear, obtendo a Equação 2:

$$\log qe = \log K_f + \frac{1}{n} \log Ce \quad (2)$$

Sendo:
qe = Concentração de Nonilfenol etoxilado adsorvida por fase sólida (mg NFEO.g^{-1}ST);
K_f = Coeficiente de adsorção (L.g^{-1});
C = Concentração de equilíbrio da solução (mg NFEO.L^{-1});
1/n = Ordem de potência relacionada ao mecanismo de adsorção;

Equação de Langmuir:

$$q = \frac{qmáx\ x\ b\ x\ c}{1+b\ x\ c} \quad (3)$$

Onde:
q = Capacidade de adsorção na concentração de equilíbrio (mg NFEO.g^{-1});
$q_{máx}$ = Capacidade máxima de adsorção (mg NFEO.g^{-1});
b = Medida de afinidade do adsorvato pela superfície e acessibilidade da superfície (L.mg^{-1} NFEO);
C = Concentração de equilíbrio da solução (mg.L^{-1});

Para a verificação do ajuste à Equação de Langmuir, a equação 3 foi reescrita para realizar a linearização entre os parâmetros C/q e C, obtendo a Equação 4.

$$\frac{C}{q} = \frac{1}{q_{máx}\ x\ b} + \frac{1}{q_{máx}}\ x\ C \quad (4)$$

Os parâmetros Kf, n (modelo de Freundlich) e qmáx, b (modelo de Langmuir) foram calculados para as isotermas de adsorção, usando a função Solver do Microsoft Excel ™, minimizando o erro médio quadrático residual (EMQR), que para m pontos experimentais e p parâmetros ajustáveis é definido pela equação 5 (Kinniburgh, 1986):

$$EMQR = \left(\frac{SRQ}{m-p}\right)^{1/2} \quad (5)$$

onde SRQ é a soma residual de quadrados, que para m dados experimentais é dado por (Equação 6):

$$SRQ = \sum_{i=1}^{m} \frac{(Ca,exp,i - Ca,cal,i)^2}{(Ca,cal,i)^2} \quad (6)$$

Sendo:
Ca,exp,i = Concentração adsorvida experimental;
Ca,cal,i = Concentração adsorvida calculada;

Resultados e Discussão

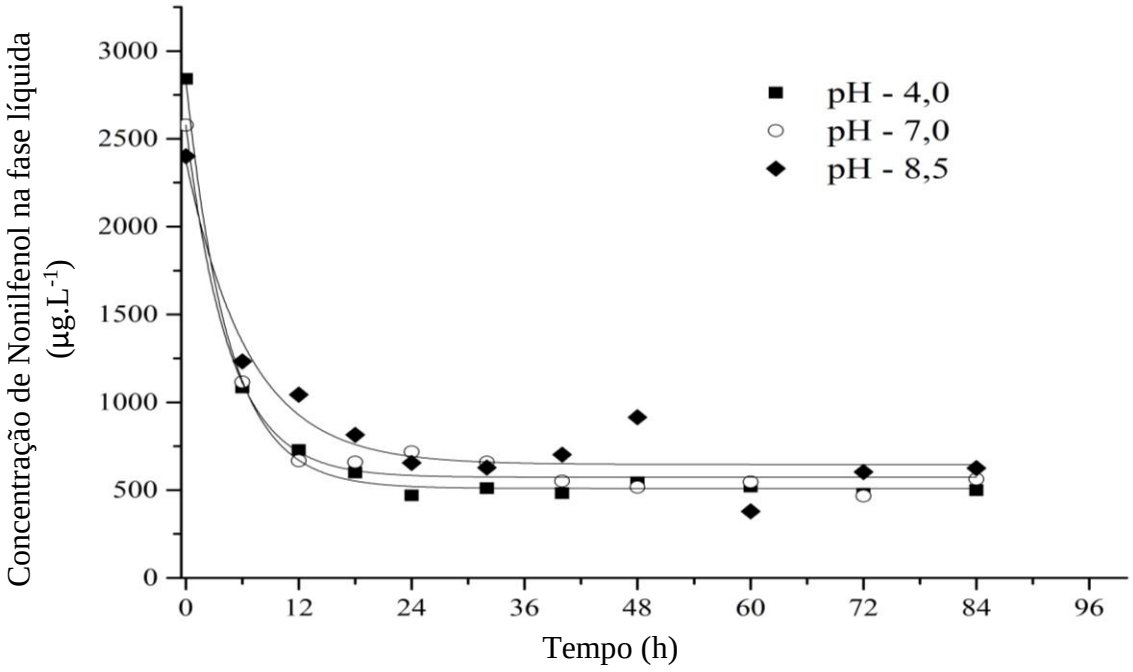
Primeira fase de operação

Na primeira fase, a fim de analisar a cinética de adsorção do NFE no lodo anaeróbio, utilizou-se concentração teórica de NFE (5 $mg.L^{-1}$), como metodologia utilizada por Bouki et al. (2010) e Cheng et al. (2017). Além disso, testou-se diferentes valores de pH (4, 7 e 8,5) com o intuito de averiguar a influência do pH na adsorção do NFE na biomassa. A Figura 2 apresenta a curva de decaimento de NFE na fase líquida durante período de 84 horas. Nas primeiras 12 horas foi observado uma remoção de NFE da fase líquida, com pH (4,0 e 7,0), de 75%, enquanto que para pH (8,5) houve uma remoção de 57%. Em 36 horas a remoção de NFE por adsorção aumentou para 84%, 79% e 72% em pH 4,0; 7,0 e 8,5, respectivamente. Ademais, após 36 horas a concentração de NFE na fase líquida permaneceu constante até o final do experimento.

Desse modo, pode-se inferir que o tempo necessário para a superfície do adsorvente (biomassa) apresentar todos seus sítios ativos preenchidos pelo NFE foi de 36 horas para todas as faixas de pH testadas. A concentração de equilíbrio da solução (C) variou de 0,509 $mg.L^{-1}$ (pH 4,0) a 0,648 $mg.L^{-1}$ (pH 8,5). O resultado obtido está de acordo com os estudos de Dai et al. (2018) e Shah et al. (2018), os quais observaram que em pH mais alcalino, a adsorção do 4-nonilfenol decrescia, devido a desprotonação da molécula orgânica (fenólica) que inibe a difusão e diminui a adsorção.

Outro fator importante observado foi a velocidade de decaimento (k) pertinente a cinética de adsorção. Notou-se valores de k semelhantes tanto para pH 4,0 e 7,0 ($k = 0,20. d^{-1}$) e para pH 8,5 valor menor de k ($0,15.d^{-1}$).

Figura 2: Cinética de adsorção do NFE no lodo anaeróbio em diferentes faixas de pH



Hou et al. (2005) obtiveram o mesmo comportamento atinente à adsorção do NFE no solo, onde a adsorção pode ser dividida em três partes, a parte descendente rápida, a parte ascendente aparente e a parte de declive lenta. Assim, a medida que o NFE se desloca para a superfície da biomassa, a concentração do adsorvato torna-se maior na fina camada próxima a biomassa do que na solução. Como o NFE têm grupos funcionais hidrofílicos e hidrofóbicos,

eles podem formar autoagregados denominados de micelas (Paria e Khilar, 2004).

No entanto, algumas moléculas associadas às micelas podem não ser tão estáveis quanto aquelas ligadas diretamente à superfície da biomassa, os quais podem ser novamente liberadas na solução, sendo considerado responsável pela fase de dessorção aparente. Após essa fase, o processo de adsorção torna-se mais lenta, como pode ser observado de forma clara em pH 7,0 (Figura 2).

Segunda fase de operação

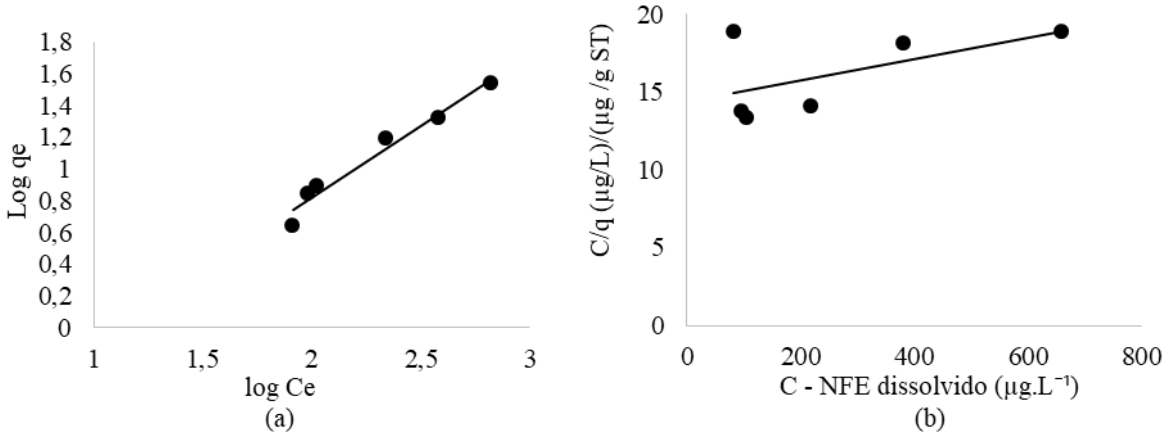
Com o tempo de adsorção determinado na primeira fase (36 horas), escolheu-se para a segunda fase do experimento pH 7,0; haja vista que em comparação com o pH 4,0 (comportamento cinético semelhante), a concentração de NFE biodisponível na fase líquida em pH 7,0 foi superior, em torno de 0,573 mg.L^{-1}. Deve-se salientar que em pH 7,0 tem o favorecimento da biodegradação do NFE utilizando diferentes condições nutricionais (metanogênica e desnitrificante).

Na segunda fase do experimento, foi construído a isoterma de adsorção, onde foram utilizadas concentrações diferentes de NFE (0,5; 0,75; 1,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L^{-1}) onde cada concentração gerou um ponto na isoterma de adsorção. Os valores de NFE foram escolhidos com base em trabalhos anteriormente publicados (Bouki et al., 2010; Milinovic et al., 2015; Cheng et al., 2017; Kent et al., 2018; Dai et al., 2018; Al-Ahmari et al., 2018). Os dados de adsorção de NFE ao lodo granulado anaeróbio foram ajustados à equação de Freundlich (Eq. 2) e de Langmuir (Eq. 4), sendo observado maior coeficiente de determinação (R^2) no ajuste a equação de Freundlich (Figura 3; Tabela 4)

Tabela 4: Ajuste dos dados de adsorção de NFE ao lodo granulado anaeróbio às equações de Freundlich e Langmuir

Equação			R^2
Freundlich	$q = 1{,}0\ C^{0{,}4803}$	Kf = 1,0 L.g^{-1} ST; 1/n = 0,4803	0,9820
Langmuir	$q = \frac{146{,}846\ x\ 10{,}17\ x\ c}{1 + 10{,}17\ x\ c}$	b = 10,17; qmáx = 146,846 µg NFE.g^{-1} ST	0,5728

Figura 3: Isoterma de Freundlich (a) e Langmuir (b) para adsorção de NFE ao lodo granulado



A equação de Freundlich pressupõe que a adsorção decresce logaritmicamente à medida que a superfície é coberta pelo soluto (NFE). Sendo assim, a adsorção de NFE ao lodo granulado torna-se mais difícil à medida que os sítios de adsorção são preenchidos. Além disso, em outros estudos pertinente à adsorção do NFE em diferentes adsorventes (solo, lodos ativados, carvão ativado, lodo granulado anaeróbio, hematita e goethita) observou-se melhor

ajuste dos dados de adsorção na isoterma de Freundlich (Al-Ahmari et al., 2018; Shan et al., 2018; Milinovic et al., 2015; Cheng et al., 2015; Okada, 2012; Bouki et al., 2010). A Tabela 5 mostra os diferentes valores dos parâmetros cinéticos do modelo da isoterma de Freundlich (Kf e n) em diferentes adsorventes.

Tabela 5: Modelo cinético e os parâmetros de adsorção do nonilfenol em diferentes adsorventes

Modelo de Isoterma	Adsorvente	K ($L.g^{-1}$)	1/n	R^2	Autor
Freundlich	Lodos ativados	13,860	1,317	0,918	Bouki et al. (2010)
Freundlich	Cinzas da casca de arroz	43,507	2,560	0,948	Cheng et al. (2017)
Freundlich	Cinzas volante	3,423	1,81	0,975	Cheng et al. (2017)
Freundlich	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	33,20	1,123	0,994	Dai et al. (2018)
Freundlich	Solo	1,160	0,9	0,98	Milinovic et al. (2015)
Freundlich	Sedimento	0,85	0,88	0,988	Navarro et al. (2008)

Em lodos anaeróbios, observou-se coeficientes de adsorção (Kf) entre 0,796 e 3,24 $L.g^{-1}$, e ordem de potência 1/n entre 0,35 e 0,92 (Mogensen et al., 2003; Garcia et al., 2006a). Assim, o coeficiente de adsorção (Kf = 1,0 $L.g^{-1}$) e a ordem de potência 1/n (0,4803) obtidos no presente trabalho estão dentro da faixa de valores.

Conclusões

O Nonilfenol etoxilado apresenta uma forte tendência em adsorver na biomassa, conforme o coeficiente de adsorção (Kf = 1,0 $L.g^{-1}$) obtido, apresentando baixa solubilidade em água. Ademais, conforme a primeira fase, os sítios ativos da biomassa granulada são preenchidos em, aproximadamente, 36 horas nas faixas de pH testada, onde a concentração de NFE no equilíbrio (Ce) variou de 0,509 a 0,648 mg. L^{-1}. Ademais, notou-se que a adsorção do NFE no lodo anaeróbio se deu em três partes, parte descendente rápida, a parte ascendente aparente e a parte de declive lenta. Em pH mais alcalino, observou uma tendência de dessorção mais acentuada, devido a desprotonação da molécula orgânica (fenólica) que inibe a difusão e diminui a adsorção.

Na segunda fase, os dados de adsorção foram ajustados aos modelos de Freundlich e Langmuir, onde obteve uma correlação (R^2) de 0,982 para o modelo de Freundlich, semelhantemente a outros estudos analisados. Os parâmetros cinéticos obtidos (Kf=1,0 $L.g^{-1}$ e 1/n=0,4803) estão em concordância com os valores encontrados para o lodo granular anaeróbio na literatura. Além disso, a concentração de NFE na fase sólida (biomassa) atingiu níveis de até três ordens de magnitude superior a concentração da fase aquosa de equilíbrio. Isso se deu principalmente em virtude da natureza hidrofóbica do NFE.

Referências Bibliográficas

Al-Ahmari, S.D., Watson, K., Fong, B.N., Ruyonga, R.M., Ali, H., 2018. Adsorption kinetics of 4-n-nonylphenol on hematite and goethite. Journal of Environmental Chemical Engineering, 6, 4030-4036.

Barhoumi, M., Beurroies, I., Demoyet, R., Said, H., Hanna, K., 2003. Coadsorption of Alkylphenols and nonionic surfactants onto Kalonite. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 219, 25-33.

Barrera-Díaz, C.E.; Frontana-Uribe, B.A.; Rodríguez-Peña, M.; Gomez-Palma, J.C.; Bilyeu, B., 2018. Integrated advanced oxidation process, ozonation-electrodegradation treatments, for nonylphenol removal in batch and continuous reactor. Catalysis Today, 305, 108-116.

Bouki, C., Dvorakova, M., Diamadopoulos, E., 2010. Adsorption of Nonylphenol on Activated Sludge Biomass Under Aseptic Conditions. Soil, Air, Water, 38, 516-520.

Cheng, G., Sun, M., Ge, X., Ou, Y., Xu, X., Lin, Q., Lou, L., 2017. Adsorption-Desorption Characteristics of Nonylphenol on Two Different Origins of Black Carbon. Water Air Soil Pollut., 228-311.

Crini, G., Badot, P.M., 2007. Treatment and Purification of Polluted Industrial Water. University Press of Franche-Comte, Besancon, France.

Dai, Y., Shah, K.J., Huang, C.P., Kim, H., Chiang, P.C., 2018. Adsorption of Nonylphenol to Multi-Walled Carbon Nanotubes: Kinetics and Isotherm Study. Applied Sciences, 8, 2295.

Dornelles, H.S. Caracterização microbiana da remoção e degradação de 4-nonilfenol em reator anaeróbio de leito fluidificado em escala aumentada. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Dubourguier, H.C; Buisson, M. N., Tissier, J. P., Prensier, G., Albagnac, G., 1987. Structural characteristics and metabolic activities of granular anaerobic sludge on a mixed defined substrate. In: Granular anaerobic sludge; Microbiology and technology, Proceedings of the GASTMAT – worshop. Pudoc, Netherlands, 78-86.

During, R., Krahe, S., Gath, S., 2002. Sorption behavior of nonylphenol in terrestrial soils. Environmental Science & Technology, 36, 4052-4057.

Garcia, M.T., Campos, E., Dalmau, M., Ribosa, I., Sanchez-leal, J.,2006a. Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. Biodegradation, 17, 39-46.

Hou, S.G., Sun, H.W., Gao, Y., 2006. Sorption of small metabolites of nonylphenol polyethoxylates in single and complex systems on aquatic suspended particulate matter. Chemosphere, 63, 31–38.

Hyunook., K., Guisu, P., Myongin, Y., Eunjung, K., Yongkook, H., Colosimo, M., 2007. Oxidation of nonylphenol in water using O3. Research Journal of Chemistry and Environment, 11, 7-12.

Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takada, H., 2001. Distribution and Behavior of Nonylphenol, Octylphenol, and Nonylphenol Monoethoxylate in Tokyo Metropolitan Area: Their Association with Aquatic Particles and Sedimentary Distributions. Environmental Science & Technology, 35, 1041.

Iwasaki, S., Fukuhara, T., Abe, I., Yanagi, J., Mouri., M., Iwashima, Y., Tabuchi, T., Shinohara, O., 2002. Adsorption of Alkylphenols onto microporous carbon prepared from coconut shell. Synth. Mater, 125, 207-211.

Kent, J., Tay, H. T., 2018. Treatment of 17α-ethinylestradiol, 4-nonylphenol, and carbamazepine in wastewater using an aerobic granular sludge sequencing batch reactor, Science of the Total Environment, 652, 1270-1278.

Kinniburgh, D.G., 1986. General purpose adsorption isotherms. Environmental Science & Technology,20, 895-904.

Komori, K., Okayasu, Y., Yasojima, M., Suzuki, Y., Tanaka, H., 2006. Occurency of Nonylphenol, Nonylphenol Ethoxylate Surfactants and Nonylphenol Carboxylic Acids in Wastewater in Japan. Water Science & Technology, 53, 27-33.

Kurinobu, S., Tsurasaki, K., Natui, Y., Kimata, M., Hasegawa, M.,2007. Decomposition of pollutants in wastewater using magnetic photocatalystic particles. J. Magn. Mater, 310, 1025-1027.

Li, H.Q., Jiku, F., Shroder, H.F., 2000. Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography–mass spectrometry and –tandem mass spectrometry: Comparison of conventional and membrane-assisted biological wastewater treatment processes. Journal of Chromatography A, 889, 155-176.

Liorca-Porcel., J., Martinez-Parreno, M., Martinez-Soriano, E., Valor, I., 2009. Analysis of cholorophenols bisphenol-A, 4-tert-octylphenol and 4 nonylphenols in soils by means of ultrasonic solvent extraction and stir-bar sorptive extraction with in situ derivatization. Journal of Chromatography A, 1216, 5955-5961.

Milinovic, J., Lacorte, S., Rigol, A., Vidal, M., 2015. Sorption behaviour of nonylphenol and nonylphenol monoethoxylate in soils. Chemosphere, 138, 952-959.

Mogensen, A. S.; Haagensen, F., Ahring, B. K., 2003. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate. Environmental Toxicology and Chemistry, 22, 706-711.

Navarro, A., Endo, S., Gocht, T., Barth, J.A.C., Lacorte, S., Barceló, D., Grathwohl, P., 2009. Sorption of alkylphenols on Ebro River sediments: comparing isotherms with field observations in river water and sediments. Environ. Pollut, 157, 698– 703.

Okada, Y.D. Degradação de surfactant anionico em reator UASB com água residuária de lavanderia. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Omeroglu, S., Murdoch, F. K., Sanin, F. D., 2015. Investigation of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge samples from a metropolitan wastewater treatment plant in Turkey. Talanta, 131, 650-655.

Paria, S., Khilar, K.C., 2004. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid–water interface. Adv. Colloids Interface Sci. 110, 75–95.

Snyder, S.A., Wert, E. C., Rexing, D. J., Zegers, R. E., Drury, D. D., 2006. Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and waste water. Ozone: Science & Engineering, 28, 445-460.

Sun, Q., Deng, S., Huang, J., Yu, G., 2008. Relationship between oxidation products and estrogenic activity during ozonation of 4-nonylphenol. Ozone: Science & Engineering, 30, 120-126.

Vazoller, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operando com vinhaça sob condições termofílicas. Tese (Doutorado em Hidráulica e Sanaemento) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

Yamada, K., Tamara, T., Azaki, Y., Kashiwada, Y., Hata, Y., Higashida, K., Nakamura, Y., 2009. Removal of linear and branched p-alkylphenols from aqueous solutions by combined use of melB and chitosan beads. Journal of Polymers and the Environment, 17, 95-102.

Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenols ethoxylates: a review, Environ. Int., 28, 215–226.

Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P., 2008. Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound Naproxen, carbamazepine and nonylphenol on activated carbono. Water Research, 42, 2873-2882.

Zinder, S.H., Cardwell, S. C., Lee, M., Anguish, T., 1984. Methanogenesis in a thermophilic (58ºC) anaerobic digestor. Methanotrix sp. as a importante aceticlastic methanogen. Applied Environmental Microbiology, 47, 796-807.

EFEITOS DA DOSAGEM DE ETANOL, VAZÃO DE RECIRCULAÇÃO E TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA NA REMOÇÃO DE SURFACTANTE EM REATOR DE LEITO FLUIDIFICADO COM ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA

Thais Z. Macedo [1]; Gabriele G. F. Jorge [2]; Ana Luiza V. Marques [2]; Henrique Dornelles [1]; Tiago P. Deforno[3]; Vitor B. Centurion[4], Valéria M. Oliveira[5]; Edson L. Silva [6]; Maria B. A. Varesche[7]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Aluno de Iniciação Científica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Pós-doutorando da Divisão de Recursos Microbianos CPQBA/UNICAMP;
[4] Doutorando da Divisão de Recursos Microbianos CPQBA/UNICAMP;
[5] Professora da Divisão de Recursos Microbianos CPQBA/UNICAMP;;
[6] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFScar;
[7] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *Avaliou-se o tratamento de água residuária de lavanderia comercial em co-digestão com esgoto doméstico em reator de leito fluidificado (19,8L). TDH de 30 horas (fase IX) resultou elevada eficiência de remoção de DQO e LAS (83% e 77% de eficiência de remoção para LAS e DQO, respectivamente para carga de 1,2±1,2 mgLAS.gSV^{-1}.d^{-})^{1}. Concentração mais elevada de ácidos orgânicos voláteis como ácido acético no efluente (AOVs) esteve associada à maior concentração de EOH (200 mg.L^{-1}) e à redução na velocidade ascensional aplicada (v_{asc}) para ácido propiônico.* A *redução da v_{asc} resultou em maior concentração de biomassa aderida que reduz a biodisponibilidade de LAS para degradação e maior abundância relativa para o domínio Archaea. Na fase IX observou-se predominância de representantes do filo Proteobacteria e organismos capazes de reduzir sulfato. Em todas as amostras, para categoria I do KEGG, a maior porcentagem classificada foi metabolismo (>41%). O somatório da abundância relativa para enzimas codificadoras de genes (KO numbers) relacionados a fosforilação oxidativa foi maior na fase III (1,3 v_{mf}). Enquanto, KO numbers relacionados a metanogênese foram identificados com elevada abundância relativa na amostra da fase V (0,7 v_{mf}).Na fase IX, KO numbers relacionados ao metabolismo de enxofre apresentaram maior abundância relativa.*

Introdução

O tratamento biológico de água residuária de lavanderia comercial (ARLC) para remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é alternativa promissora. Por meio de estudos recentes, concluiu-se que a própria ARLC pode ser fonte de nutrientes essenciais ao metabolismo dos microrganismos (Okada et al., 2014, Delforno et al., 2015, Macedo et al., 2015) dispensando, desta forma, gastos com suplementação alimentar dos reatores. Todavia, um dos grandes desafios no tratamento biológico de tal surfactante aniônico é a redução na eficiência de remoção para concentrações mais elevadas. Concentrações próximas de 15 mg.L^{-1} costumam causar instabilidade reacional em sistemas anaeróbios (Delforno et al., 2015). Por isso, a maioria dos estudos já realizados empregaram diluições em alimentação sintética ou água de abastecimento, o que onera o tratamento e o distancia da aplicabilidade em escala real. Neste sentido, a co-digestão de esgoto doméstico (ED) e ARLC surge como alternativa sustentável para biorremediação do LAS, uma vez que, o esgoto doméstico é abundante no meio urbano e facilmente obtido, podendo contribuir com alcalinidade, DQO e outros substratos (Faria et al., 2017). Faria et al. (2017) e Centurion et al. (2018) operaram reator *Expanded Granular Bed* (EGSB) em co-digestão de ARLC e esgoto doméstico. Os autores reportaram baixas eficiências de remoção de LAS e DQO (~60%), comparativamente a estudos em que se empregou diluição e alimentação sintética (~90%) com cargas aplicadas

próximas (Granatto et al., 2018). Em estudos anteriores, no entanto, foram apresentadas vantagens de Reator de leito Fluidificado (RLF) para tratamento de concentrações mais elevadas de LAS de água residuária real (Macedo et al. 2017, >20 mgLAS L^{-1}) comparativamente a configurações como EGSB (Delforno et al. 2019). A formação do biofilme em material suporte, a fluidificação do leito resultante de recirculação do efluente, a possibilidade de presença de biomassa facultativa somam vantagens nesta configuração reacional (Iza, 1991) para remoção de compostos recalcitrantes como o LAS. Em contrapartida, o gasto energético para fluidificação/ recirculação é uma desvantagem econômica e ambiental (Delforno et al., 2019). A finalidade deste estudo foi avaliar a possibilidade de se obter remoções elevadas de LAS e DQO de ARLC em co-digestão com ED em FBR, a partir de otimização das condições operacionais e nutricionais. Empregou-se um afluente real e de composição complexa com ajuste da dosagem de etanol como co-substrato, da velocidade ascensional e TDH aplicados ao longo de 592 dias de operação do FBR em escala aumentada (19,8 litros). A biomassa desenvolvida no material suporte foi caracterizada via *Whole Genome Shotgun Metagenomic* (WGSM) possibilitando associar gêneros e enzimas codificadoras de genes presentes na microbiota aos resultados de eficiência de remoção do reator e a sua atmosfera.

Material e Métodos

Design Experimental

O reator com 19,8 litros de volume útil e 10 cm de diâmetro foi confeccionado em PVC com parte em acrílico. Como material suporte, foram adicionados 4.670 gramas de areia com diâmetro entre 0,84 e 1,19 mm com velocidade mínima de fluidificação determinada experimentalmente de 0,5 cm s^{-1}. O inóculo utilizado foi proveniente de sistema de lodos ativados usado no tratamento de esgoto sanitário (Volkswagen, São Carlos) com 2,4 ± 0,6 $gSTV^{-1}$ L^{-1}. A fim de colonizar a areia e ativar o aparato enzimático na presença de LAS, o reator em escala aumentada foi operado durante 28 dias em 2 etapas distintas (Tabela 1). Após o período de inoculação e de adaptação da biomassa procedeu-se a abertura do reator e operação em sistema contínuo.

Tabela 1: Estágios de operação do RLF para colonização do material suporte e adaptação da biomassa

Estágio de operação	Tempo (dias)	Circuito	Composição do meio
I – Inoculação	10	Fechado	Lodo ativados (30% volume do reator) + extrato de levedura + etanol + solução de sais (Torres, 1992) + bicarbonato de sódio (Macedo et al., 2015)
II – Adaptação	18	Fechado	Esgoto doméstico + água de lavanderia (~20 $mg.L^{-1}$ de LAS)

O período de operação de 592 dias em circuito aberto foi dividido em 9 fases de acordo com a adição de etanol e velocidade de fluidificação aplicada (Tabela 2). A alimentação consistiu de água residuária de lavanderia comercial e esgoto doméstico na proporção 1:3 em volume, respectivamente, etanol (a partir da fase II até a fase VII) e bicarbonato de sódio (a partir da fase III até a fase VI) (Tabela 1). A velocidade ascensional aplicada variou ao longo das etapas sendo determinada em 0,7, 1 e 1,3 vezes a velocidade mínima de fluidificação. A adição do etanol variou entre 0 (fase I, VIII e IX), 50 $mg.L^{-1}$ (fase II) , 200 $mg.L^{-1}$ (fases III, IV e V) e 100 $mg.L^{-1}$nas fases de operação (VI e VII).

Água residuária de lavanderia comercial foi coletada quinzenalmente em lavanderia comercial da cidade de São Carlos – SP e armazenada em frascos de polietileno de alta

densidade com volume de 10 ou 20 litros a 4°C. O esgoto doméstico empregado nesta pesquisa foi obtido da rede de coleta municipal do bairro Santa Angelina – São Carlos, SP em ligação direta do laboratório de pesquisa no posto de visitação localizado no campus II – USP, São Carlos.

Análises físico-químicas e cromatográficas do afluente e efluente do reator foram realizadas duas vezes por semana, excetuando-se ácidos orgânicos voláteis que foram realizados uma vez por semana ao longo da operação do reator. Análises de demanda química de oxigênio (DQO), pH (potencial hidrogeniônico), sulfeto e sólidos suspensos voláteis foram realizadas de acordo com APHA (2005). A determinação da alcalinidade foi realizada de acordo com Ripley (1986). Os ácidos voláteis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Penteado et al. (2013). As análises para a determinação da concentração de LAS foram realizadas segundo metodologia desenvolvida por Duarte et al. (2006). A biomassa aderida ao material suporte foi determinada de acordo com Chen e Chen (2000).

Tabela 2: Composição da alimentação, TDH, velocidade ascensional aplicada, concentração de LAs afluente e período de operação

Fase	Tempo (Dias)	Alimentação	TDH (h)	v_{asc} (cm s^{-1})	LAS afluente (mg.L^{-1})
I	54	ARLC e ED	21±2	1,3 v_{mf} = 0,9	19,8±10,8
II	62	ARLC, ED e etanol (50 mg.L^{-1})	18±2	1,3 v_{mf} = 0,9	23,8±16,8
III	63	ARLC, ED, etanol (200 mg.L^{-1}) e BS (250 mg.L^{-1})*	21±5	1,3 v_{mf} =0,9	23,5±11,6
IV	66	ARLC, ED, etanol (200 mg.L^{-1}) e BS (250 mg.L^{-1})	21±7	v_{mf} = 0,7	21,9±12,4
V	53	ARLC, ED, etanol (200 mg.L^{-1}) e BS (300 mg.L^{-1})	18±3	0,7 v_{mf} = 0,5	23,7±16,8
VI	33	ARLC, ED, etanol (100 mg.L^{-1}) e BS (300-0 mg.L^{-1})	20±3	v_{mf} = 0,7	16,5±1,9
VII	90	ARLC, ED, etanol (100 mg.L^{-1})	19±3	v_{mf} = 0,7	6,3±1,3
VIII	60	ARLC, ED	30±3	v_{mf} = 0,7	6,4±3,4
IX	30	ARLC, ED	31±3	v_{mf} = 0,7	24,7±7,1

Análises de biologia molecular

Extração de DNA

Ao final das fases III, IV, V e IX de operação do RLF foram retiradas amostras da biomassa aderida ao material suporte visando caracterizá-la de modo taxonômico e funcional via análise metagenômica. Na fase VII foi amostrada biomassa aderida ao material suporte e biomassa granular que se desenvolveu acima do leito de areia. A extração do DNA genômico das amostras foi realizada com FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals) armazenado em tubo apropriado a - 20°C.

Sequenciamento massivo

Após extração, o DNA das amostras do RLF foi submetido a sequenciamento de ultima geração (Illumina-Hiseq 2x100 bp para as amostras III, IV e V e NovaSeq 2x150 bp). As sequências obtidas foram analisadas no programa fastqc (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), para avaliação da qualidade do sequenciamento. Reads de baixa qualidade (Phred score ≤ 20) e adaptadores foram filtrados

pela ferramenta Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Foi utilizada a ferramenta SqueezeM (Tamames; Puente-sanchez, 2018) na função "co-assembly" para melhor montagem dos contigs. Com isso, todas as amostras foram combinadas em um único arquivo de entrada. Somado a isso, SqueezeM usa um compilado de outras ferramentas para as análises posteriores, compreendendo: MegaHit (Li et al., 2015), para montagem de contigs; Bowtie2 (Langmead; Salzberg 2012), para mapeamento de reads nos contigs; Samtools (Li et al., 2009) e Bedtools (Quinlan 2010), para contagem e cobertura dos reads nos contigs para efeito de estastística; Prodigal (Hyatt et al., 2010), para predição de ORFs (Open Read Frames) de procariotos; Diamond (Buchfink et al., 2015), ferramenta de alinhamento de ORFs para análise Taxonômica e Funcional; e "Scripts inhouse" para a compilação de todas as informações em uma única tabela. Para tanto, a ferramenta SqueezeM utiliza para as análises taxonômicas o banco de dados RefSeq, do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) com o parâmetro LCA (Lowest Common Ancestor). Para as análises funcionais, SqueezeM utiliza os bancos de dados de ortologias Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa et al., 2017) e COG, e domínios pelo PFAM. As tabelas com todas as informações foram filtradas pela função Kegg, excluindo células em branco.

Resultados e Discussão

Operação do Reator de leito Fluidificado

Foram observadas médias de eficiência de remoção de LAS entre 29% (fase V; 4,5±2,1 mgLAS.gSV-1.d^{-1}; 200 mgEOH L^{-1}; v_{asc}=0,7v_{mf}) e 89% (fase VIII; 0,1±0,1 mgLAS^{-1} gSV d^{-1}; v_{asc}=1,0v_{mf}). Para eficiência de remoção de DQO, os valores médios resultaram entre 49% (fase III; 6,1±3,6 mgLAS.gSV-1.d^{-1}; 0,16±0,08 mgDQ.gSV-1.d; 200 mgEOH L^{-1}; v_{asc}=1,3v_{mf}) e 79% (fase VII; 1,6±0,7 mgLAS.gSV-1.d^{-1}; 0,05±0,02 mgDQ.gSV-1.d; 100 mgEOH L^{-1}; v_{asc}=1,0v_{mf}).

Tabela 3: Valores de carga específica de LAS de DQO e eficiências de remoção

Fase	Carga de LAS específica aplicada (mgLAS.gSV^{-1}.d^{-1})	Eficiência de Remoção de LAS (%)	Carga orgânica específica (mgDQ.gSV^{-1}.d)	Eficiência de Remoção de DQO(%)
I	4,5±2,5	54±15	0,10±0,03	50±15
II	4,6±3,3	57±22	0,11±0,04	54±11
III	6,1±3,6	44±27	0,16±0,08	49±12
IV	6,3±3,2	42±25	0,19±0,09	57±15
V	4,5±2,1	29±25	0,12±0,04	56±13
VI	4,5±1,5	53±14	0,09±0,02	59±17
VII	1,6±0,7	52±23	0,05±0,02	79±9
VIII	0,1±0,1	89±5	0,04±0,03	74±14
IX	1,2±1,2	83±10	0,03±0,01	77±11

Não se observou diferença significativa na eficiência de remoção de LAS e DQO (teste Anova one-way seguido de Tukey; Tabela 3) para concentração de etanol de 0 (fase I) , 50 mg.L^{-1} (fase II), 100 mg.L^{-1} (fase VI) e 200 mg.L^{-1} (fases III e IV) em condições operacionais similares (v_{asc}=1,3 v_{mf} para fases I, II e III e v_{asc}=1,0v_{mf} para fases IV e VI e TDH de 18 horas), que se mantiveram entre 42-57% e 49-59% para LAS e DQO, respectivamente, ao longo destas fases operacionais, a carga específica aplicada variou entre 4,5 e 6,3 mgLAS. gSV^{-1}.d^{-1}, não diferindo significativamente.

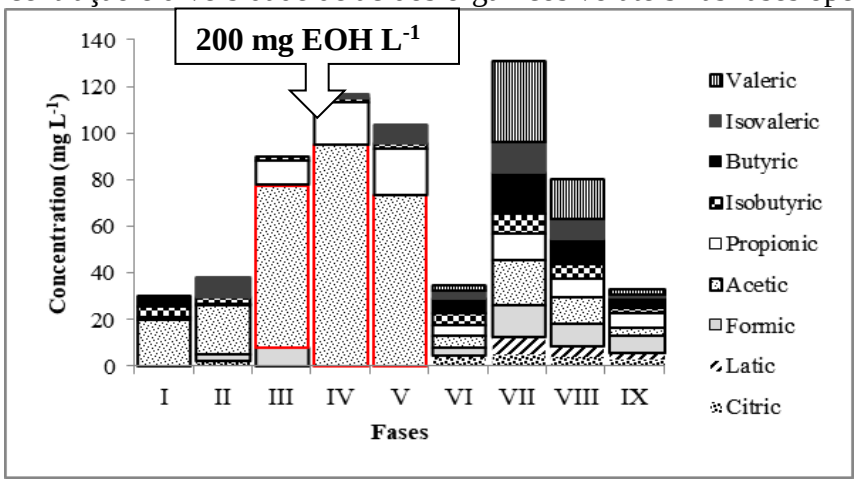
Neste estudo, o pH afluente e efluente se manteve entre neutro à alcalino nas fases operacionais entre I e IX. Todavia, a adição de etanol em 200 EOH L^{-1} resultou em maior

acúmulo de ácidos orgânicos no efluente (Figura X), seguida de adição de bicarbonato de sódio para tamponamento do sistema a partir de 20 dias de iniciada a fase III.

De fato, a concentração de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) identificados e quantificados via HPLC foi superior a partir da fase III, sobretudo ácido acético, quando da adição de 200 mgEOH L^{-1} (Figura 1). Provavelmente, os ácidos orgânicos foram produzidos em excesso a partir do co-substrato que foi fornecido.

A concentração de AOVs esteve associada a taxa de diluição (velocidade ascensional aplicada) para ácido propiônico nas fases III, IV e V , uma vez que, a concentração do ácido aumentou em 42% e 91% da fase III para fase IV e V, respectivamente (variou de 10,5mg.L^{-1} na fase III para 1,3 v_{mf} a 18,1 mgL^{-1} na fase IV e 20,1mg.L^{-1} na fase V para 0,7 v_{mf}). A recirculação melhora o contato do substrato com a biomassa e facilita a utilização de substratos, tais como os ácidos orgânicos voláteis gerados na digestão anaeróbia (Iza, 1991).

Figura 1– Concentração e diversidade de ácidos orgânicos voláteis nas fases operacionais



Entre as fases III, IV e V manteve-se parâmetros operacionais como carga de LAS aplicada (6,1±3,6 mgLAS.$gSV^{-1}.d^{-1}$, 6,3±3,2 mgLAS.$gSV^{-1}.d^{-1}$ e 4,5±2,1 mgLAS.$gSV^{-1}.d^{-1}$, respectivamente para fases III, IV e V), TDH (~18 horas), dosagem de co-substrato (200 mg EOH L^{-1}) variando-se apenas a velocidade ascensional aplicada (vazão de recirculação). A redução da v_{asc} de 1,3 v_{mf} para 1,0 v_{mf} não resultou diferença significativa na eficiência de remoção de DQO e LAS (fases III e IV; 44% e 42% de eficiência de remoção, respectivamente). Todavia, a redução da velocidade ascensional para uma velocidade inferior àquela mínima determinada experimentalmente (0,7v_{mf}), implicou redução na eficiência de remoção de LAS (29% para 4,5±2,1 mgLAS.$gSV^{-1}.d^{-1}$). A eficiência de remoção de DQO, contudo, manteve-se próxima a das demais fases operacionais (56%) (Tabela 3).

Além do acúmulo de ácidos voláteis, destaca-se que a redução da vasc para uma velocidade inferior a velocidade mínima determinada experimentalmente resultou em maior concentração de biomassa aderida o que interfere na biodisponibilidade para degradação. Provavelmente, a elevada recirculação favorece o desprendimento da biomassa pela turbulência ocasionada no leito. A concentração de biomassa aderida foi de 53,2±19,1, 52,7±16,9, 53,7±21,3, 46,3±8,8, 86,4±11,9 45,8±9,8 e 24,0±0,5 gSV para fases I, II, III, IV, V, VI e IX, respectivamente. A redução da concentração de biomassa com ligeiro aumento da degradação de LAS foi reportada por Haggensen et al., (2002) e Mogensen et al., (2003).

Foi observada menor eficiência de remoção de LAS nas fases com TDH 18 h (fases I à VII; entre 29-57% de eficiência de remoção) comparativamente as fases com TDH de 30 horas (fases VIII e IX; 83 e 89% de eficiência de remoção de LAS, respectivamente) (Tabela 3), o que pode ser indicativo de que o TDH aplicado inicialmente, independentemente dos demais ajustes operacionais, não foi suficiente para as reações envolvidas na degradação do surfactante. No presentes estudo, a retirada de co-substrato e aumento do TDH foram

concomitantes nas fases VIII e IX, resultando na maior eficiência de remoção de LAS e DQO. Nestas fases operacionais, as cargas específicas de LAS (0,1±0,1 e 1,2±1,2 mgLAS.gSV^{-1}.d^{-1} para fases VIII e IX, respectivamente) e orgânica (0,04±0,03 e 0,03±0,01 mgDQ.gSV^{-1}.d para fases VIII e IX, respectivamente) também foram mais reduzidas o que resulta em maior eficiência de remoção de LAS (Okada et al. 2013). Todavia na fase I (4,5±2,5 mgLAS.gSV^{-1}.d^{-1} e 0,10±0,03 mgDQ.gSV^{-1}.d), a não adição de co-substrato metabólico e TDH aplicado de 18 horas não resultou em eficiência de remoção de LAS e DQO mais elevada. Portanto, justifica-se atribuir ao TDH mais elevado a eficiência de remoção superior nas fases VIII e IX.

Na fase VI (4,5 mgLAS.gSV^{-1}.d^{-1}; 0,09 mgDQ.gSV^{-1}.d; 100 mgEOH L^{-1}; TDH de 18 horas e v_{asc}=1,0v_{mf}), comparativamente, as fases I à V, para carga específica de LAS próximas, não se observou diferença significativa na eficiência de remoção pela dosagem de etanol de concentração de 100 mg.L^{-1} (53% de eficiência de remoção de LAS). Além disso, entre as fases VI e VII, para mesma dosagem de etanol adicionada (100 mg.L^{-1}), v_{asc}=1,0vmf, TDH de 18 horas, a variação na carga específica de LAS afluente aplicada também não resultou diferença significativa na eficiência de remoção de LAS e DQO (4,5 mg gSV^{-1} d^{-1}; 53% de eficiência de remoção de LAS para fase VI e 1,6 mg gSV^{-1} d^{-1} e 52% para fase VII). De modo semelhante, comparando-se as fases VIII e IX, a variação na carga específica de LAS aplicada não resultou em variação na remoção de LAS (83 e 89% de eficiência de remoção de LAS nas fases VIII e IX;, respectivamente).

A estratégia operacional de adição de etanol como co-substrato metabólico não resultou aumento significativo da eficiência de remoção de LAS nas dosagens aplicadas de 50 mg.L^{-1}, 100 mg.L^{-1} ou 200 mg.L^{-1} (fases II, III, IV, V e VI) (teste ANOVA One-way seguido de Tukey; $p<0,05$). Entretanto, a adaptação da biomassa na presença do álcool pode ter favorecido biomassa mais resistente à toxicidade do LAS e outros compostos recalcitrantes presentes na composição da água residuária, uma vez que não se observou redução na eficiência de remoção para dosagens mais elevadas de LAS (comparação entre fases VI e VIII e entre fases VIII e IX). Todavia, como esperado, redução na carga específica de DQO aplicada acompanhou maior eficiência de remoção de DQO a partir da fase VII até a fase IX.

Durante os 592 dias de operação, o reator recebeu cerca de 188 g de LAS afluente, enquanto 108 g de LAS saíram no efluente do reator, ou seja, 43% do LAS adicionado foi removido, 0,97 g de LAS foram removidos por adsorção (1,2% do total removido), 79,5 g de LAS foram biodegradados ao longo de todo o período operacional (98,8% do total removido).

Análise de Biologia Molecular

O sequenciamento gerou aproximadamente 30 milhões de *reads* para todas as amostras e após a análise de qualidade com a ferramenta Trimmomatic (BOLGER et al., 2014), aproximadamente, 10% das *reads* foram descartadas, gerando aproximadamente 24 milhões de *reads*. As *reads* com alta qualidade (Phred score ≥ 20) foram então utilizadas nas co-montagens (co-assembly) dos metagenomas que totalizou 898.383 *contigs* ≥150 pb. A partir da informação do N50 obteve-se *contigs* com tamanhos adequados, visto que para a maioria deles obteve-se tamanho de 1.293 pb. O número de ORFs variou de ~60.000 a ~90.000, sendo o banco de dados PFAM com as maiores anotações.

Perfil Taxonômico

Para avaliar a composição taxonômica dos microrganimos, procedeu-se a análise de metagenômica, empregando-se o banco de dados do KEGG. Em relação à classificação filogenética obteve-se entre 83% (IV) e 94% (VII-BS) das sequências classificadas em nível de reino e 81%(IV) à 95% (VII-MS) em nível de filo. Para família, o percentual classificado ficou entre 70% (IV) e 83% (VII-MS). Para gênero, os percentuais foram de 51% (III) até 60% (VII-MS).

Com relação a classificação taxonômica, observou-se elevada abundância relativa para gêneros com capacidade de degradar compostos aromáticos e matéria orgânica facilmente assimilável como ácidos orgânicos e etanol. Provavelmente, nas fases III, IV e V os

microrganismos usaram preferencialmente a matéria orgânica prontamente degradável ao invés de LAS. Sobretudo na fase V, em que se observou a menor eficiência de remoção do LAS (29% para) e acúmulo de ácidos orgânicos voláteis.

Observou-se maior abundância relativa para o domínio Archaea nas fases IV e V, após a redução na velocidade ascensional aplicada (Tabela 4). De fato, para representantes deste domínio, verificou-se predominância do filo Euryarchaeota, que inclui os microrganismos metanogênicos (Li et al., 2013). Possivelmente, a alta velocidade ascensional resultante da elevada vazão de recirculação efluente na fase III (230 L h^{-1}) desfavoreceu estes microrganismos, uma vez que altas taxas de recirculação podem representar fonte potencial de reoxigenação devido ao aumento da turbulência dentro do reator (Macedo et al., 2015).

A predominância de representantes pertencentes ao filo Proteobacteria está relacionada à versatilidade metabólica de tais microrganismos. Elevada abundância relativa de organismos relacionados a este filo foram reportados comumente em estudos visando remoção de LAS e associados à degradação deste composto recalcitrante (Delforno et al., 2012, Oliveira et al., 2013). Na fase com maior eficiência de remoção de LAS (IX; 86±9% de eficiência de remoção), observou-se maior abundância relativa de representantes do Filo Proteobacteria em relação às outras fases de operação. Organismos semelhantes a *Pseudomonas, Dechloromonas, Desulfobulbus, Desulfomicrobium* e *Geobacter* são capazes de reduzir sulfato e foram identificados em maior abundância na fase VII, em que se observou maior eficiência de remoção de LAS.

Possivelmente, o aumento do TDH para 30 horas na fase IX, induziu o uso de LAS como fonte de carbono, após o consumo de substratos facilmente degradáveis, que por sua vez, estavam presentes em concentração inferior às demais fases. A menor eficiência de degradação de LAS observada nas fases com TDH 18 h pode ser indicativo que o TDH aplicado não foi suficiente para as reações envolvidas na degradação do surfactante, uma vez que, organismos associados a degradação do LAS como *Dechloromonas* e *Pseudomonas*, por exemplo, foram identificados com elevada abundância relativa nas fases IV e IX, entretanto, com eficiência de remoção inferior aquela observada na fase IV em TDH de 18 horas.

Em todas as amostras, para categoria I do KEGG, a maior porcentagem classificada foi metabolismo (>41%), seguida de processamento de informação genética (>21%), processamento de informação ambiental (>10%) e processos celulares (>5%); enquanto sistemas de organismos (>2%) e doenças humanas (<1%) representaram porcentagens mais baixas na classificação. Trata-se, portanto, como esperado, de comunidade com elevado potencial metabólico. Cabe destacar, neste estudo, a categoria II, biodegradação e metabolismo de xenobióticos, cuja abundância relativa observada foi de 1,27%, 1,23%, 1,13%, 1,15% e 1,29% para as amostras das fases III, IV, V, IX-MS e IX-BS, respectivamente (Figura X). Comparando-se as fases em que se variou a velocidade ascensional, a redução deste parâmetro resultou em menor abundância relativa para a categoria na fase V, quando foi observada a menor eficiência de remoção do LAS (29%). Na fase IX, em que se observou elevada eficiência de remoção do LAS, observou-se abundância relativa mais baixa na amostra da biomassa do material suporte (1,15% para fase IX-MS), todavia, na biomassa granular desenvolvida acima do suporte (fase IX-BS), foi observada a maior abundância relativa para esta categoria de biodegradação e metabolismo de xenobióticos (1,29%).

Na categoria II, metabolismo de energia, houve representação significativa das sub-categorias metabolismo de metano, metabolismo de enxofre e fosforilação oxidativa que são discutidas a seguir.

Foram identificados 72 enzimas codificadoras de genes associados a fosforilação oxidativa. Sendo que, o somatório da abundância relativa dos KO identificados foi maior na amostra da fase III em que se empregou a maior velocidade ascensional (1,3 v_{mf}). O que corrobora que a elevada vazão de recirculação pode ser uma fonte de reoxigenação no sistema do RLF (MACEDO et al. 2017; DELFORNO et al. 2017a), uma vez que o potencial genético para esta categoria foi desfavorecido com a redução da velocidade ascensional. Todavia, não

se observou diferença significativa no total de KO relacionados à fosforilação oxidativa para redução da velocidade ascensional de 1,0 v_{mf} para 0,7 v_{mf}. Destacam-se os genes nuoG (NADH-quinone oxidoreductase subunit G); sdhA, frdA (succinate dehydrogenase / fumarate reductase, flavoprotein subunit); ccoNO; (cytochrome c oxidase cbb3-type subunit I/II); ATPF1A, atpA (F-type H+-transporting ATPase subunit alpha) e ATPF1B, atpD (F-type H+-transporting ATPase subunit beta). Sendo que, os genes ccoNO (K15862; 0,07338%) e sdhB, frdB (K00239; 0,055%) foram classificados com elevada abundância relativa na fase III. Estes KO foram atribuídos a diversos gêneros de microrganismos identificados no reator. O gene ccoNO foi atribuído aos gêneros *Chryseobacterium Draconibacterium, Labilibacter e Parafilimonas*, enquanto o gene sdhB, frdB foi atribuído a 60 gêneros diferentes, sobretudo ao gênero *Chryseobacterium* com elevada abundância relativa na fase III.

Foram identificados 46 enzimas codificadoras de genes relacionados a metanogênese, via KEGG módulo, com maior abundância relativa na amostra da fase V (0,7 v_{mf}, TDH de 18 h; 200 mgEOH L^{-1}; 24 mgLASL^{-1}), assim como observou-se pela classificação taxonômica organismos relacionados a metanogênese. O KO *number* mais abundante correspondeu a K14126 relacionado ao gene codificador da enzima F420-*non-reducing hydrogenase large subunit*, que é transportadora central de elétrons na metanogênese. Este gene foi atribuído aos gêneros *Methanobacterium; Methanobrevibacter; Methanothermobacter* no reator. Estes resultados estão em concordância com a classificação taxonômica, por meio da qual observou-se predominância de representantes do domínio Archaea nas amostras das fases IV (1,0 v_{mf}, TDH de 18 h; 200 mgEOH L^{-1}; 22 mgLASL^{-1}) e V (0,7 v_{mf}, TDH de 18 h; 200 mgEOH L^{-1}; 24 mgLASL^{-1}), sobretudo na fase V. Utilizando-se os módulos KEGG para genes funcionais codificadores de enzimas para a metanogênese, observou-se predominância da via hidrogenotrófica (CO_2 reduzido a CH_4), seguida da acetoclástica (acetato reduzido a CH_4) e, por fim, vias metilotróficas (grupo metil reduzido a CH_4).

22 KO *numbers* foram relacionados a enzimas codificadoras de genes associados ao metabolismo de enxofre. Foi possível visualizar maior abundância relativa para os KO na fase VII (vermelho). Abundância relativa mais elevada foi observada para K00394, que corresponde a adenylylsulfate reductase, enzima citoplasmática que governa uma das etapas de redução do sulfato (Postgate, 1984; Oldom; Peck, 1984). Os principais gêneros atribuídos para o gene codificante desta enzima foram *Allochromatium, Bilophila, Desulfatitalea, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfofaba Desulfomicrobium, Desulfonema, Desulfopila, Desulforhabdus, Desulfosarcina, Desulfotalea, Desulfovibrio, Syntrophobacter*, *Thiobacillus e Thiodictyon*.

Neste estudo, as funções biológicas ativas e suas taxonomias atribuídas permitiram definir um consórcio microbiano ativo envolvido em todas as etapas envolvidas na biodegradação do LAS. Para a adição de fumarato à cadeia alquilica, foram identificados 3 genes codificantes da enzima fumarato redutase: frdA; frdB e frdC com abundância relativa entre 0,00008% e 0,01952%. Esta enzima foi atribuída taxonomicamente a 14 gêneros diferentes identificados na biomassa do reator, com maior abundância relativa dos gêneros *Sulfurospirillum, Desulfovibrio, Desulfomicrobium, Arcobacter* e *Geobacter*.

Diversidade de genes codificadores de enzimas relacionadas à etapa de beta-oxidação foi observada (27 no total), com destaque para 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase e 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase/3-hydroxybutyryl-CoA epimerase e coenzyme A (3-hydroxyacyl-CoA) dehydrogenase. Ressalta-se que o somatório das porcentagens referentes às abundâncias relativas das enzimas relacionadas à beta-oxidação resultou em valor mais elevado para as amostras das fases IV e V. De fato, nestas fases, verificou-se maior concentração de ácidos orgânicos. Todavia, esta a análise de metagenômica permite discutir o potencial genético, e não sua expressão. A atribuição taxonômica relacionada às 27 enzimas classificadas resultou em 43 gêneros diferentes, sendo que os gêneros mais abundantemente relacionados à etapa de beta-oxidação foram *Acidovorax, Arcobacter, Azoarcus, Azonexus, Chlorobium, Chryseobacterium,*

Dechloromonas, *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Riemerella*, *Sulfuricurvum* e *Sulfurospirillum*.

Na etapa de clivagem do anel aromático, foram elencadas as enzimas do KEGG relacionadas à degradação do anel aromático de modo geral, sendo que 40 enzimas foram classificadas; dentre essas: benzoyl-CoA reductase subunidades A, B, C e D (K04112; K04113; K04114; K04115); phenol hydroxylase P3 protein (K16242).

Dezesseis números diferentes de KO foram observados na etapa de dessulfonação, que consiste na remoção de compostos de enxofre de compostos alifáticos e aromáticos (COOK et al., 1998). Nesta etapa de degradação do LAS, foi observada maior abundância relativa para a fase IX em relação às demais.

Conclusões

A co-digestão de ARLC e ED em FBR dificulta a remoção de LAS e DQO. Todavia, estratégias operacionais e nutricionais adequadas resultaram em elevada eficiência de remoção nesta configuração reacional. A redução da v_{asc} resultou decréscimo na remoção de LAS. A adição de etanol como co-substrato metabólico não favoreceu a remoção de LAS. Enquanto, a dosagem mais elevada de álcool aplicada neste estudo (200 mgEOH L^{-1}) resultou em maior acúmulo de ácidos. Este acúmulo, por sua vez, foi maior para velocidades ascensionais mais baixas. Todavia, a adaptação de biomassa na presença deste co-substrato, associada a elevado TDH favoreceu estabilidade para remoção de maiores dosagens de LAS. A v_{asc} foi correlacionada a potencial re-oxigenação do sistema. Para as enzimas codificadoras de genes, observou-se prevalência relacionada a fosforilação oxidativa na fase III, em que se empregou a maior velocidade ascensional. Enquanto, nas fase com v_{asc} reduzida houve prevalência de enzimas associadas a metanogênese. Organismos semelhantes a gêneros de BRS foram correlacionados a maior remoção de LAS na fase IX com TDH de 30 horas, nesta fase a enzimas associadas a metabolismo de enxofre foram prevalentes em relação às demais fases. Com relação a degradação da molécula de LAS foram identificadas enzimas codificadoras de genes e gêneros a todas as etapas de degradação.

Referências Bibliográficas

APHA. 2005. Standard methods For examination of water and wastewater, 21th Ed. Washington, American Public Health Association.

Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.

Buchfink, B., Xie, C., Huson, D. H. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. methods*, *12*(1), 59.

Centurion, V. B., Moura, A. G. L., Delforno, T. P., Okada, D. Y., Dos Santos, V. P., Varesche, M. B. A., Oliveira, V. M. 2018. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: The influence of surfactant concentration on microbial diversity. *Int Biodeter Biodegr*, *127*, 77-86.

Chen, C. Y., Chen, S. D. 2000. Biofilm characteristics in biological denitrification biofilm reactors. *Water Sci Technol*, *41*(4-5), 147-154.

Delforno, T. P., Okada, D. Y., Polizel, J., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A. 2012. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. *Bioresource Technol*, *107*, 103-109.

Delforno, T. P., Moura, A. G. L., Okada, D. Y., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A. 2015. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. *Bioresource technol*, *192*, 37-45.

Delforno, T. P., Macedo, T. Z., Midoux, C., Lacerda Jr, G. V., Rué, O., Mariadassou, M., Oliveira, V. M. 2019. Comparative metatranscriptomic analysis of anaerobic digesters treating anionic surfactant contaminated wastewater. *Sci Total Environ*, *649*, 482-494.

Duarte, I., Oliveira, L. L., Buzzini, A. P., Adorno, M. A. T., Varesche, M. 2006. Development of a method by HPLC to determine LAS and its application in anaerobic reactors. *J Brazil Chem Soc*, *17*(7), 1360-1367.

Faria, C. V. D., Delforno, T. P., Okada, D. Y., Varesche, M. B. A. 2019. Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. *Environ Technol*, *40*(8), 988-996.

Granatto, C. F., Macedo, T. Z., Gerosa, L. E., Sakamoto, I. K., Silva, E. L., Varesche, M. B. A. 2019. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded granular sludge bed reactor. *Int Biodeter Biodegr*, *138*, 23-32.

Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., Hauser, L. J. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, *11*(1), 119.

Iza, J. 1991. Fluidized bed reactors for anaerobic wastewater treatment. *Water Sci and Technol*, *24*(8), 109-132.

Kanehisa, M. 2017. Kegg glycan. In *A Practical Guide to Using Glycomics Databases* (pp. 177-193). Springer, Tokyo.

Langmead, B., Salzberg, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. methods*, *9*(4), 357.

Li, W. 2009. Analysis and comparison of very large metagenomes with fast clustering and functional annotation. *BMC bioinformatics*, *10*(1), 359.

Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T. W. 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, *31*(10), 1674-1676.

Macedo, T. Z., Okada, D. Y., Delforno, T. P., Braga, J. K., Silva, E. L., Varesche, M. B. A. 2015. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. *Bioproc biosyst eng*, *38*(10), 1835-1844.

Macedo, T. Z., Delforno, T. P., Braga, J. K., Okada, D. Y., Silva, E. L., Varesche, M. B. A. 2017. Robustness and Microbial Diversity of a Fluidized Bed Reactor Employed for the Removal and Degradation of an Anionic Surfactant from Laundry Wastewater. *J Environ Eng*, *143*(9), 04017062.

Okada, D. Y., Delforno, T. P., Esteves, A. S., Sakamoto, I. K., Duarte, I. C., Varesche, M. B. 2013. Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. *Bioresource technol*, *128*, 125-133.

Okada, D. Y., Delforno, T. P., Etchebehere, C., Varesche, M. B. 2014. Evaluation of the microbial community of upflow anaerobic sludge blanket reactors used for the removal and degradation of linear alkylbenzene sulfonate by pyrosequencing. *Int Biodeter Biodegr*, *96*, 63-70.

Oliveira, L. L., Costa, R. B., Sakamoto, I. K., Duarte, I. C. S., Silva, E. L., Varesche, M. B. A. 2013. Las degradation in a fluidized bed reactor and phylogenetic characterization of the biofilm. *Braz J Chem Eng*, *30*(3), 521-529.

Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., Zaiat, M. 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *Int J Hydrogen Energ*, *38*(14), 6137-6145.

Postgate, J. R. 1984. The Sulfate-Reducing Bacteria, Cambridge Univer.

Quinlan, A. R., Hall, I. M. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, *26*(6), 841-842.

Ripley, L. E., Boyle, W. C., Converse, J. C. 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes, *Journal WPCF*, 406-411.

Tamames, J., Puente-Sanchez, F. 2018. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Front Microbiol*, *9*.

ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO LICOR DE PENTOSES GERADO A PARTIR DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Liliane Folli Trindade [1]; Marcelo Zaiat [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental da EESC/USP;
[2] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A biomassa lignocelulósica tem se mostrado um substrato interessante para a produção de hidrogênio por ser um subproduto disponível em elevadas quantidades e com alta concentração de carboidratos. Entretanto, a dificuldade para o desenvolvimento de inóculo por processo de autofermentação torna necessária a utilização de cultura microbiana mista. Neste sentido, para que a produção de hidrogênio seja maximizada, os microrganismos consumidores de hidrogênio devem ser inibidos por pré-tratamentos. Assim, este artigo avalia a produção de hidrogênio obtida a partir de pré-tratamento térmico e ácido por meio da xilose a 35ºC com carga orgânica específica de 5 gDQO.gSVT^{-1}. A produção de hidrogênio obtida pelos dois pré-tratamentos foi superior à obtida nos reatores com lodo sem pré-tratamento, indicando que os processos foram eficientes para inibição dos consumidores de hidrogênio. A maior produção foi obtida pelo lodo com pré-tratamento térmico onde foi verificada uma produção de cerca de 200 mL H_2.gDQO^{-1}. Além disso, para este pré-tratamento não foi verificada a presença de metano na composição do biogás em nenhum momento do ensaio.*

Introdução

A redução das reservas de petróleo e o aumento da preocupação com o aquecimento global resultaram no cenário ideal para o desenvolvimento de fontes alternativas e mais sustentáveis de energia. Neste contexto, tem-se o hidrogênio, gás leve com elevada quantidade de energia cujo único produto da combustão é água (Muñoz-Páez et al., 2019). O hidrogênio pode ser encontrado na natureza combinado com diversos outros compostos como carbono, enxofre, nitrogênio, entre outros. No entanto, para que seja utilizado como combustível é necessário que esses compostos sejam alterados para obtenção do hidrogênio elementar (Łukajtis et al., 2018).

As formas convencionais de produção de hidrogênio necessitam de grandes quantidades de energia para serem viabilizadas. Essa energia é fornecida, muitas vezes, por meio de combustíveis fósseis, o que acaba por impedir a consolidação do hidrogênio como uma fonte de energia limpa (Ren et al., 2009). Segundo Ren et al. (2016) a utilização do hidrogênio está fadada ao fracasso se métodos mais eficazes de produção não forem desenvolvidos. Por isso, a produção de hidrogênio por processos biológicos tem se mostrado cada vez mais interessante.

A produção de hidrogênio por via biológica fermentativa ocorre por meio da oxidação de compostos orgânicos em que os elétrons que são liberados precisam ser dispostos para a manutenção do meio eletricamente neutra (Elbeshbishy, Dhar e Nakhla, 2017). Segundo estes autores, os prótons H^+ são os principais aceptores de elétron, que por sua vez, são reduzidos a H_2.

No entanto, esse tipo de produção ainda é pouco empregado devido aos custos do processo que podem ser minimizados com a utilização de substratos disponíveis em grandes quantidades e que são subutilizados como é o caso de biomassas lignocelulósicas como o bagaço da cana-de-açúcar (Ren et al., 2016). Nesse tipo de biomassa, a celulose e a hemicelulose são extremamente indicadas para a produção de hidrogênio pelo processo de fermentação já que podem ser degradadas em carboidratos do tipo hexoses e pentoses (Łukajtis et al., 2018).

A produção efetiva de hidrogênio pode ser obtida quando microrganismos fermentativos capazes de utilizar os açúcares da biomassa lignocelulósica estão presentes (Ren et al., 2009). As culturas mistas são empregadas na produção de H_2 por serem mais robustas, mais fáceis de se encontrar e poderem ser aplicadas ao tratamento de substratos cuja composição tende a ser mais complexa, como é o caso da biomassa lignocelulósica.

Penteado et al. (2013) ao analisarem a produção de hidrogênio obtida a partir de um reator anaeróbico de leito empacotado alimentado com sacarose verificaram que o tipo de inóculo mais adequado para a produção desse biogás é o gerado pelo processo de autofermentação. No entanto, Pontes (comunicação interna) encontrou dificuldades para a geração de biomassa por este processo a partir de água residuária proveniente de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço da cana-de-açúcar.

Neste sentido, é indicada a utilização de comunidade microbiana bem estabelecida como inóculo. No entanto, neste tipo de cultura é comum a presença de microrganismos consumidores de hidrogênio que reduzem o rendimento, como é o caso das bactérias homoacetogênicas e das arqueias hidrogenotróficas (Wang e Wan, 2008). Assim, a aplicação de pré-tratamento que permita a seleção dos microrganismos produtores de hidrogênio é recomendada. O pré-tratamento pode ser realizado por meio de alterações na temperatura da biomassa microbiana, no pH, adição de inibidores químicos, aeração, choques de carga orgânica ou ainda alterações nas condições de operação como o tempo de detenção hidráulica.

(Hu e Chen, 2007) compararam o pré-tratamento ácido, térmico e com aplicação de clorofórmio para inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio em lodo anaeróbico granular. No estudo em batelada utilizando glicose como substrato a 35ºC foi verificado que a melhor produção de hidrogênio foi observada em lodo pré-tratado com clorofórmio.

(Wang e Wan, 2008) testaram o pré-tratamento ácido, básico, térmico, com aeração e clorofórmio em lodo de digestor anaeróbio alimentado com glicose com pH 7,0 a 35ºC. Para este caso, os autores concluíram que o lodo submetido a pré-tratamento térmico se mostrava como o mais eficiente.

(Ren et al., 2008) utilizaram lodo proveniente de decantador secundário sob pré-tratamento ácido, térmico, alcalino e com aeração intermitente para avaliar a produção de hidrogênio obtida a partir de glicose. Os autores concluíram que a 35ºC o pré-tratamento com maior rendimento foi o submetido a aeração intermitente.

Chang, Li e Liu (2011) avaliaram a produção de hidrogênio obtida a partir de inóculo proveniente de sistema de lodos ativados sob pré-tratamento ácido, básico, térmico, com aeração, aplicação de clorofórmio e aplicação de 2-bromoetanosulfonato. Os autores verificaram que em estudo em batelada sob pH 7,0, a 35ºC e tendo glicose como substrato o pré-tratamento ácido foi o mais eficiente.

(Wang e Yin, 2017) relatam que a decisão do pré-tratamento deve ser baseada no tipo de inóculo, substrato e nas condições de operação. Assim, verifica-se que ainda há uma lacuna na literatura cientifica disponível no que diz respeito à avaliação do pré-tratamento mais eficaz para a obtenção de hidrogênio quando se utiliza água residuária proveniente de biomassa lignocelulósica. Desse modo, este artigo propõe a avaliação da produção de hidrogênio obtida a partir de pré-tratamento térmico e ácido quando lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB, do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) é utilizado para produzir hidrogênio a partir de xilose, carboidrato representativo de água residuária proveniente de biomassa lignocelulósica.

Material e Métodos

Inóculo e pré-tratamentos

O lodo granular utilizado é proveniente de reator UASB empregado no tratamento de água residuária do abatedouro de aves da Avícola Dacar S.A., localizada na cidade de Tietê/SP. Previamente ao ensaio, o lodo foi batido em liquidificador para rompimento dos grânulos. Para

o pré-tratamento térmico, a biomassa foi aquecida, em banho de glicerina à 100ºC por 60 minutos e submetida a choque térmico até temperatura ambiente (25ºC) em banho de gelo. No pré-tratamento ácido, o lodo foi mantido por 24 horas em câmara aquecida à 35ºC com o pH reduzido para 3,0 com ácido clorídrico (HCl) 1M.

Solução de substratro

A solução de substrato foi preparada com xilose (6,15 $g.L^{-1}$), bicarbonato de sódio (500 $mg.L^{-1}$ (Fernandes et al., 2013)), ureia na proporção C:N de 140 (Anzola-Rojas et al., 2015) e solução de micronutrientes adaptado de Del Nery (1987) adicionado para cada 1 $gDQO.L^{-1}$ conforme apresentado na Tabela 1. O pH final da solução foi ajustado para 5,5 com ácido clorídrico 1 M.

Tabela 1 – Composição da solução adaptada de micronutrientes para cada $gDQO.L^{-1}$

Componente	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Sulfato de níquel ($NiSO_4.H_2O$)	0,81
Sulfato ferroso ($FeSO_4.7H_2O$)	4,09
Cloreto férrico ($FeCl_3.6H_2O$)	0,41
Cloreto de cobalto ($CoCl_2.2\ H_2O$)	0,06
Cloreto de cálcio ($CaCl_2.2\ H_2O$)	3,37
Dióxido de selênio (SeO_2)	0,06
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	8,76
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	2,12
Fosfato de sódio dibásico ($NaHPO_4.2H_2O$)	4,41

Fonte: Adaptado de Del Nery (1987)

Procedimentos experimentais

O volume de lodo correspondente a 0,21 g de sólidos voláteis totais (SVT) foi lavado em centrífuga a 9000 rpm por 10 minutos com água destilada. Nesse processo, 20 mL de água destilada foi adicionada, o lodo foi centrifugado e o sobrenadante retirado. Este processo foi repetido por três vezes. Ao final, o sobrenadante foi retirado e o volume de lodo completado para 10 mL.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata em frascos do tipo Duran autoclavados com volume nominal de 250 mL. Adicionou-se 10 mL de lodo pré-tratado e 150 mL da solução de substrato. Para o controle, foram adicionados 10 mL de lodo sem pré-tratamento e 150 mL da solução de substrato.

Após a mistura, o pH inicial foi medido e 10 mL de amostra para análises iniciais de demanda química de oxigênio (DQO) e carboidratos foi coletada. Gás nitrogênio foi fluxionado por 4 minutos nos frascos para criação de ambiente anaeróbio. Os reatores foram então fechados e o nitrogênio foi fluxionado novamente por mais 2 minutos para troca do *headspace*. A pressão inicial dos frascos foi padronizada e estes foram mantidos em câmara com temperatura controlada a 35ºC. Neste ensaio não foi utilizada mesa agitadora, pois o objetivo era comparar as respostas entre si, assim, manter os reatores sob as mesmas condições era suficiente para o resultado buscado.

Amostras gasosas foram retiradas ao longo do experimento para análise da composição do biogás e montagem da curva de produção acumulada de hidrogênio. Ao fim do experimento, amostras líquidas foram coletadas para análise de DQO, carboidratos e ácidos orgânicos. A decisão do melhor pré-tratamento foi pautada na maior produção de biohidrogênio assim como a eficiência em inibir microrganismos consumidores deste biogás.

Metodologia analítica

As análises de pH, DQO e SVT foram conduzidas conforme metodologia expressa no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA e WEF,

2012). O biogás produzido foi avaliado por cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu Scientific Instruments®) com coluna capilar Supelco Carboxen 1010 PLOT ® (30m x 0,53mm x 0,30µm) equipado com detector de condutividade (TCD) utilizando argônio como gás de arraste com injetor a 220ºC e detector a 230ºC e tempo de corrida de aproximadamente 6 minutos. As concentrações de ácido cítrico, málico, succínico, lático, fórmico, acético, propiônico, isobutírioco, isovalérico, levunílico e capróico, além do furfural e HMF serão determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para tanto, será utilizado sistema Shimadzu® com coluna Aminex HPX-87H, detectores de ultravioleta com arranjos de diodos. O eluente será ácido sulfúrico 0,005 mol L^{-1} com fluxo de 0,5mL min^{-1} e temperatura de forno de 43ºC. As amostras injetadas terão volume de 100 µL e serão preparadas na proporção 1000:40 µL de amostra para ácido sulfúrico 0,2M. Os carboidratos (i. e. celobiose, glicose, manose, galactose, xilose e arabinose) também terão sua concentração determinada por HPLC em sistema Shimadzu® com coluna Aminex HPX-87P e detectores de índice de refração. Água ultrapurificada será empregada como eluente. As condições que serão utilizadas para o fluxo e a temperatura de forno ainda estão em desenvolvimento.

Resultados Parciais e Discussão

Os reatores em batelada foram operados por aproximadamente 440 horas para garantir o estabelecimento da fase estacionária. No entanto, após 350 horas verificou-se a queda nas pressões dos frascos. O ensaio foi então mantido apenas para garantir que não haveria mais alterações, mas a pressão continuou em declínio e o experimento foi encerrado. As médias da produção acumulada de hidrogênio para os frascos com lodo submetido a pré-tratamento térmico, lodo submetido a pré-tratamento ácido e lodo sem pré-tratamento, denominado de controle, são apresentadas na Figura 1.

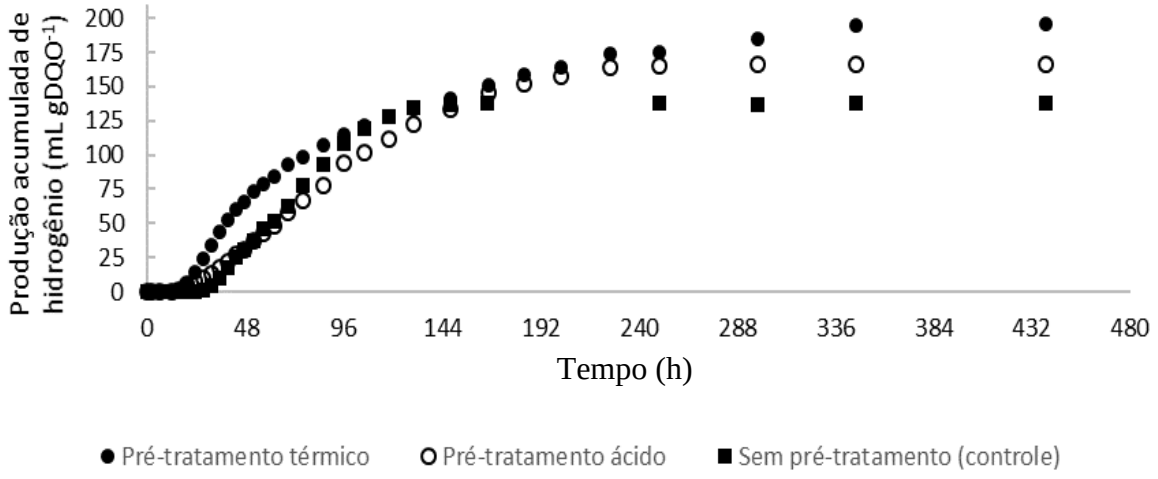


Figura 1: Produção acumulada de hidrogênio obtida a partir de xilose com inóculo sob diferentes condições.

A partir da Figura 1 observa-se que os lodos tratados termicamente e com ácido apresentaram tempo de fase lag semelhantes e próximo de 20 horas. Os frascos de controle, ou seja, sem pré-tratamento, apresentaram um tempo de fase lag de cerca de 24 horas. Durante praticamente todo o ensaio a produção de hidrogênio dos frascos com pré-tratamento térmico foi superior à produção obtida nas demais condições, exceto no período entre 100 e 130 horas, quando a produção dos fracos sem pré-tratamento e lodo pré-tratado termicamente foram semelhantes. Após este período, a produção de hidrogênio do controle atingiu a fase estacionária e a produção do lodo pré-tratado termicamente continuou em fase exponencial por

quase todo ensaio, demonstrando um melhor desempenho em termos de produção de hidrogênio em relação ao pré-tratamento ácido.

O pré-tratamento térmico foi o que apresentou a maior produção de hidrogênio atingindo aproximadamente 200 mL $H_2.gDQO^{-1}$, seguido pelo pré-tratamento ácido cuja produção acumulada foi próxima de 175 mL $H_2.gDQO^{-1}$. Ao contrário do esperado, o lodo sem pré-tratamento apresentou uma produção elevada de hidrogênio com valores próximos de 150 mL $H_2.gDQO^{-1}$.

A presença de hidrogênio nos frascos de controle pode ser decorrente das condições do ensaio. Chandra, Takeuchi e Hasegawa. (2012) descrevem que para pH abaixo de 6,6 a comunidade metanogênica tem suas atividades comprometidas, o que favorece a produção de hidrogênio e um acúmulo deste biogás no sistema. Enquanto isso, segundo Ren et al. (2009) melhores produções de hidrogênio são obtidas para sistemas operados numa faixa de pH entre 5,0 e 7,5. Logo, como o pH inicial do meio reacional (mistura entre substrato e lodo) estava próximo de 6,0, acredita-se que as metanogênicas podem ter sido desfavorecidas. Além do pH, a aplicação de uma COE de 5 $gDQO.gSVT^{-1}$, valor este considerado elevado, pode levar a um desequilíbrio das populações metanogênicas e acúmulo de ácidos e hidrogênio no sistema (Chernicharo, 1997).

A fim de comprovar estas hipóteses e demonstrar que a comunidade metanogênica do lodo está bem estabelecida, novos ensaios estão sendo realizados com uma COE de 0,5$gDQO.gSVT^{-1}$ como indicado por (Aquino et al., 2007). No entanto, como estes ensaios ainda estão em andamento, os resultados encontrados não foram incluídos neste artigo. As produções de metano obtidas para cada condição estão apresentadas na Figura 2.

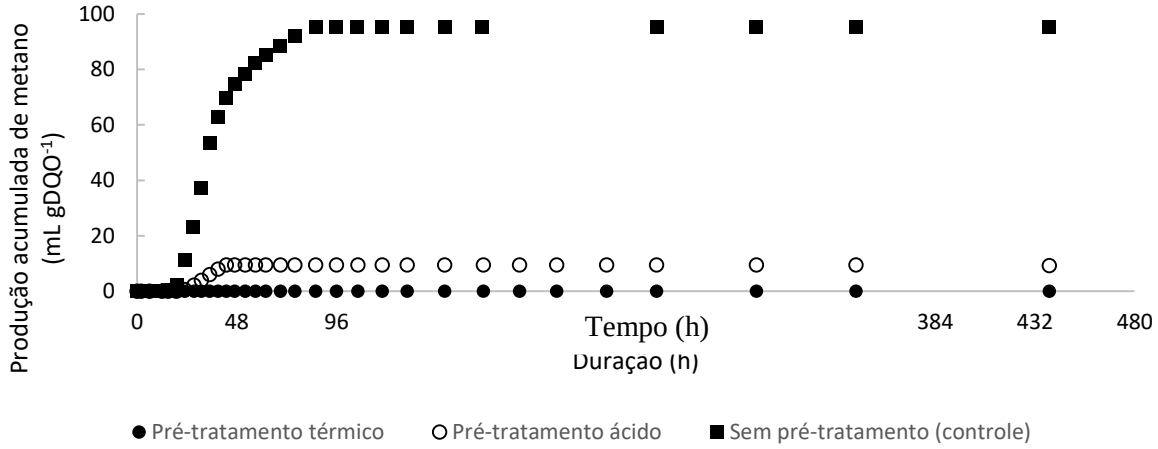


Figura 2: Produção acumulada de metano obtida a partir de xilose com inóculo sob diferentes condições.

Verifica-se na Figura 2 que não foi observado metano ou este esteve abaixo dos limites de detecção do cromatógrafo (0,07 µmol) nos frascos com lodo pré-tratado termicamente durante todo o experimento. Essa situação corrobora com o melhor desempenho obtido por este pré-tratamento para a produção de hidrogênio. Os reatores com lodo pré-tratado com ácido apresentaram produção de metano com fase lag de cerca de 24 horas, ou seja, a produção de metano foi iniciada após a produção de hidrogênio, que apresentou fase lag de cerca de 20 horas. Esta situação pode indicar que ou os substratos para a metanogênese não estavam prontamente disponíveis ou que o tempo de adaptação das arqueias metanogênicas é superior ao apresentado pelas bactérias acidogênicas. Assim, observa-se que o metano e o hidrogênio começaram a ser produzidos juntos nestes reatores. Os reatores de controle foram o que apresentaram a maior produção de metano como já era esperado já que não houve nenhum tipo de pré-tratamento direto para a inibição das arqueias metanogênicas além das condições de operação favoráveis às produtoras de hidrogênio.

A Figura 3, Figura 4 e Figura 5 apresentam a composição do biogás obtida nos frascos com inóculo sob pré-tratamento térmico, sob pré-tratamento ácido e sem pré-tratamento.

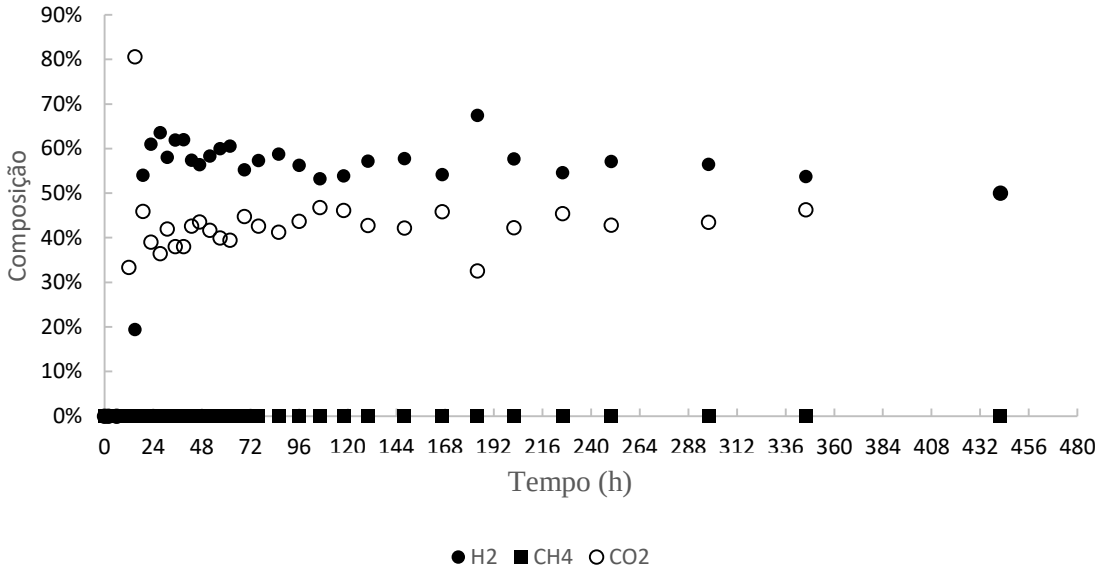


Figura 3: Perfil da composição do biogás nos reatores com lodo pré-tratado termicamente

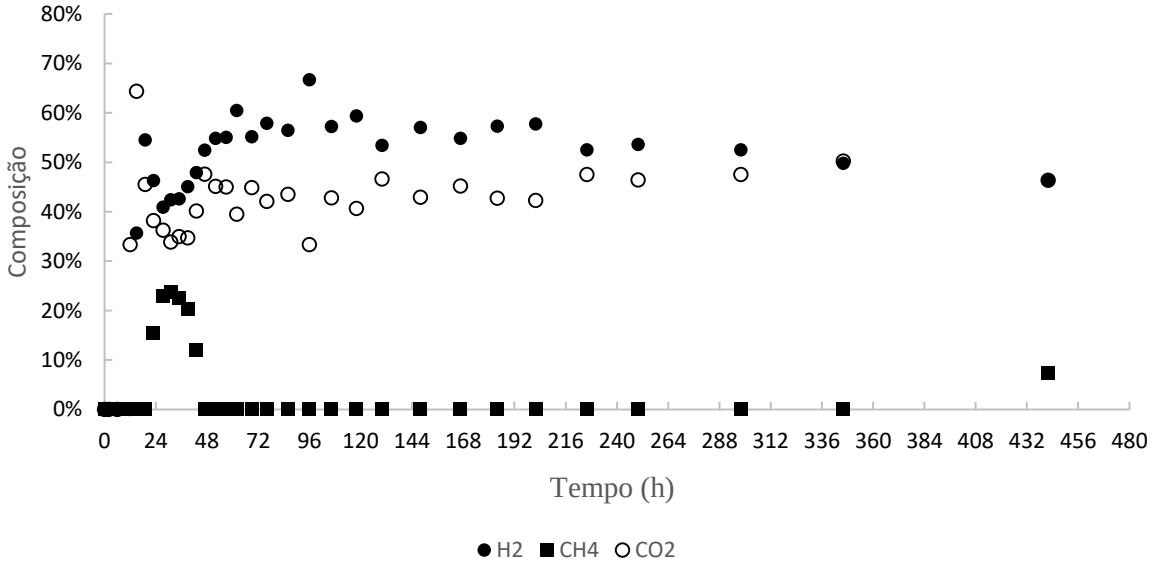


Figura 4: Perfil da composição do biogás nos reatores com lodo pré-tratado com ácido

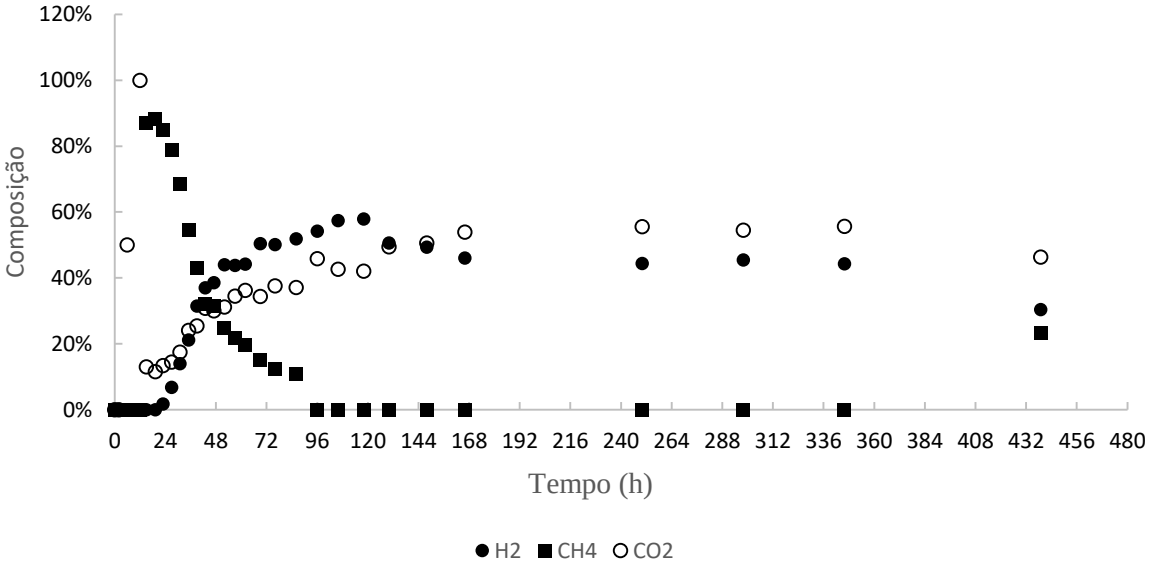


Figura 5: Perfil da composição do biogás nos reatores com lodo sem pré-tratamento

Na Figura 3 observa-se que inicialmente houve a produção de dióxido de carbono, seguido da produção de hidrogênio sem que houvesse qualquer indício da produção de metano. As proporções de hidrogênio no reator se mantiveram na faixa de 50% a 70% durante todo o experimento.

Analogamente, na Figura 4, os reatores com lodo de pré-tratamento ácido apresentaram inicialmente o dióxido de carbono e então o hidrogênio. Entretanto, ao contrário do pré-tratamento térmico, os reatores de lodo com pré-tratamento ácido apresentaram metano na fase inicial do experimento, próximo das 20 horas. É possível verificar ainda que à medida que a proporção de metano aumentou, a porcentagem de hidrogênio no biogás foi reduzida o que sugere uma maior produção de metano do que de hidrogênio nessas 36 primeiras horas ou um consumo do hidrogênio pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e homoacetogênicas que não foram eficientemente inibidas. No entanto, apenas pela análise desses dados não é possível afirmar o que de fato está acontecendo. Após essas 36 horas, verifica-se que a produção de hidrogênio foi recuperada e esse biogás passa a ser predominante na mistura. Aos poucos a produção de hidrogênio foi recuperada e a proporção de metano passou a decair. Essa situação indica uma redução na velocidade de produção de metano ou inibição das metanogênicas seja ou pelo aumento da pressão parcial de hidrogênio quanto ou pelo aumento da concentração de ácidos no sistema que passaram a inibir a atividade das consumidoras de hidrogênio.

A Figura 4 contribui ainda para compreender o porquê de a produção de hidrogênio pelo pré-tratamento ácido ter sido inferior à obtida pelo pré-tratamento térmico do lodo. O hidrogênio pode ter sido consumido a medida que era produzido, situação mantida até que a velocidade de produção de hidrogênio se tornou superior à velocidade de consumo, comportamento semelhante ocorreu nos frascos de controle (Figura 5).

Na Figura 5 verifica-se novamente que o primeiro gás a aparecer no processo foi o dióxido de carbono, seguido do metano cuja proporção decaiu a medida que a porcentagem de hidrogênio aumentava. Essa situação se torna interessante quando se considera que o lodo utilizado possui uma comunidade metanogênica bem estabelecida, sendo assim, o que se esperava eram volumes muito pequenos de hidrogênio e altas produções de metano. Estudo em batelada realizado por Wang e Wan (2008) com COE de aproximadamente 6 $gDQO.gSSV^{-1}$ (sólidos suspensos voláteis) também apresentou hidrogênio nos frascos de controle. No entanto, não foi detectado nenhum metano no biogás durante o experimento que teve duração de 36 horas. Os autores atribuem este fenômeno à natureza do lodo que possuía uma população majoritária de bactérias fermentativas.

Em relação às homoacetogênicas, devido ao declínio das pressões verificadas nos frascos com redução na porcentagem de hidrogênio sugere-se que não tenha ocorrido a inibição dessas em nenhum dos pré-tratamentos avaliados. Pois, a proporção de metano não aumentou nesse momento, o que poderia indicar a atividade de metanogênicas hidrogenotróficas. Além disso, como os frascos são vedados, acredita-se que a única explicação plausível para esta queda seja mesmo o consumo de hidrogênio e dióxido de carbono pelas homoacetogênicas. Bundhoo, Mohee e Hassan (2015) indicam que em alguns casos o pré-tratamento térmico não é eficiente para a inibição das homoacetogênicas, mas não há informações em relação ao pré-tratamento ácido, por exemplo.

Assim, é possível concluir que os pré-tratamentos se mostraram eficientes para a inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio já que as produções de hidrogênio obtidas nos reatores com pré-tratamento foram superiores aos frascos sem pré-tratamento. Entre os pré-tratamentos avaliados, o térmico se mostrou como o mais eficiente para inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio. Wang e Wan (2008) também chegaram a esta conclusão em seu estudo a partir de glicose quando compararam o pré-tratamento térmico, ácido, básico, por aeração e aplicação de clorofórmio. De Sá et al. (2013) analisaram o pré-tratamento ácido, térmico e básico em bateladas com 10 $g.L^{-1}$ de glicose e indicam o pré-tratamento térmico como o mais adequado.

As análises de DQO, ácidos e carboidratos não foram realizadas até a data de submissão do presente artigo, mas seus resultados serão incorporados nos relatórios futuros.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que tanto o pré-tratamento ácido quanto o térmico se mostram eficientes para a inibição de microrganismos consumidores de hidrogênio assim como produtores de metano. Além disso, foi possível verificar que as condições de operação possuem uma grande influência nos resultados obtidos dado que mesmo o lodo sem pré-tratamento apresentou uma elevada produção de hidrogênio, mesmo com a produção de metano, que foi reduzida ao longo do ensaio a medida que a produção de hidrogênio aumentava. Os resultados demonstraram que a maior produção foi obtida pelo pré-tratamento térmico como cerca de 200 mL de H_2. Além disso, o lodo exposto a este pré-tratamento não apresentou metano em sua composição em nenhum momento do desenvolvimento do ensaio. Estas situações em conjunto contribuem para concluir que o pré-tratamento térmico é o mais eficiente para inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio quando xilose é utilizada como substrato a 35ºC e com meio de substrato com pH inicial de 5,5.

Referências Bibliográficas

Anzola-Rojas, M. del P., Fonseca, S. G., Silva, C. C., Oliveira, V. M., Zaiat, M., 2015. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. Biotechnol. Rep. 5, 46–54.

APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard Methods of Examination of Water and Wastewater, 21st. ed. ed. APHA, Washington DC.

Aquino, S.F., Chernicharo, C.A.L., Foresti, E., Santos, M. de L.F. dos, Monteggia, L.O., 2007. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. Eng. Sanit. E Ambient. 12, 192–201.

Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R., Hassan, M.A., 2015. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. J. Environ. Manage. 157, 20–48.

Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T., 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. Renew. Sustain. Energy Rev. 16, 1462–1476.

Chang, S., Li, J.-Z., Liu, F., 2011. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. Renew. Energy 36, 1517–1522.

Chernicharo, C.A.L., 1997. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, 2ª. ed. UFMG.

de Sá, L.R.V., Cammarota, M.C., de Oliveira, T.C., Oliveira, E.M.M., Matos, A., Ferreira-Leitão, V.S., 2013. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. Int. J. Hydrog. Energy 38, 2986–2997.

Del Nery, V., 1987. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Universidade de São Paulo, São Carlos.

Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Lee, H.-S., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. Renew. Sustain. Energy Rev. 79, 656–668.

Fernandes, B.S., Saavedra, N.K., Maintinguer, S.I., Sette, L.D., Oliveira, V.M., Varesche, M.B.A., Zaiat, M., 2013. The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. Appl. Biochem. Biotechnol. 170, 1348–1366.

Hu, B., Chen, S., 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. Int. J. Hydrog. Energy, International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells 2005 32, 3266–3273.

Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., Kamiński, M., 2018. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. Renew. Sustain. Energy Rev. 91, 665–694.

Muñoz-Páez, K.M., Alvarado-Michi, E.L., Buitrón, G., Valdez-Vazquez, I., 2019. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. Int. J. Hydrog. Energy, The 2nd International Conference on Alternative Fuels and Energy (ICAFE2017) 44, 2289–2297.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrog. Energy 38, 6137–6145.

Pontes, A.F.V., 2018. Produção de hidrogênio e metano a partir de licor de pentoses gerado no pré-tratamento hidrotérmico do bagaço da cana-de-açúcar. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J., Gao, L., 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. Biotechnol. Adv., Biotechnology for the Sustainability of Human Society 27, 1051–1060.

Ren, N.-Q., Guo, W.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Liu, B.-F., Wang, X.-Z., Ding, J., Chen, Z.-B., 2008. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. Int. J. Hydrog. Energy 33, 4318–4324.

Ren, N.-Q., Zhao, L., Chen, C., Guo, W.-Q., Cao, G.-L., 2016. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H2: Key challenges and new insights. Bioresour. Technol., Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy 215, 92–99.

Wang, J., Wan, W., 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. Int. J. Hydrog. Energy, 2nd World Congress of Young Scientists on Hydrogen Energy Systems 33, 2934–2941.

Wang, J., Yin, Y., 2017. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. Int. J. Hydrog. Energy 42, 4804–4823.

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITORIO ASSOCIADO À MONENSINA SÓDICA E AOS β-ÁCIDOS DE LÚPULO NA BIODIGESTÃO ANAEROBIA DA VINHAÇA NO CONTEXTO DA INDUSTRIA SUCROALCOOLEIRA BRASILEIRA

Oscar Daniel Valmaña Garcia [1]; Ana Maria Pereira Neto [2];
Mercia Regina Domingues Moretto [3]; Marcelo Zaiat [4]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Energia UFABC;
[2] Professora do Programa de Pós-Graduação em Energia UFABC;
[3] Professora do Curso de Engenharia Ambiental e Urbana da UFABC;
[4] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A tecnologia mais apropriada para gerenciar e recuperar energeticamente a vinhaça na indústria sucroalcooleira brasileira, continua sendo um aspecto muito polêmico na comunidade científica. Lacunas de informação sobre os efeitos de antibióticos na biodigestão anaeróbia da vinhaça, que poderiam impactar negativamente na adopção destas tecnologias, foram alertadas. O objetivo da pesquisa será avaliar o efeito inibitório da monensina sódica e de β-ácidos de lúpulo sob o processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça. Lodo anaeróbio e vinhaça serão coletados e caraterizados física e quimicamente. Um estudo de otimização do rendimento de metano no tratamento anaeróbio da vinhaça, será desenvolvido para evitar que o pH e a quantidade de substrato e de inóculo utilizadas nos ensaios anaeróbios com antibióticos ocultem os efeitos destes compostos. Ensaios de toxicidade anaeróbia serão efetivados para avaliar concentrações inibitórias da atividade metanogênica do inóculo associadas à monensina sódica e aos β-ácidos de lúpulo, além da cinética de inibição. Ensaios de potencial bioquímico de metano com a vinhaça para cada antibiótico encerrarão a pesquisa, procurando revelar o efeito inibitório destes antibióticos sob o tratamento anaeróbio da vinhaça. Este resultado constituirá o principal aporte científico da pesquisa.*

Introdução

A vinhaça é um dos efluentes da produção de etanol. As usinas geram entre 10 e 15 litros de vinhaça por litro de etanol (Basso, Olitta e Nitsche, 2011). No Brasil, a safra de cana-de-açúcar 2018/2019 alcançou um volume de etanol total recorde de 33,14 milhões de m^3 (CONAB, 2019). Considerando uma média de 13 litros de vinhaça por litro de etanol produzido (BDNES e CGEE, 2008), a geração de vinhaça na safra referenciada foi aproximadamente 397 milhões de m^3.

O predomínio da fertirrigação com vinhaça na indústria sucroalcooleira brasileira sob outras tecnologias de gerenciamento, sobretudo as tecnologias de biodigestão anaeróbia, mantem ativa a polémica em relação ao procedimento mais conveniente para o tratamento e recuperação energética da vinhaça (Moraes et al., 2014; Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015). Segundo a Lei Nº 12.3051 de 2010, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos e estabelece diretrizes à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, a vinhaça pode ser classificada como tal. Consequentemente, sua gestão e recuperação energética é permitida sempre que seja através de tecnologias tecnicamente, economicamente e ambientalmente viáveis. Neste sentido, Fuess et al. (2018) reportaram que a potência elétrica total obtida da vinhaça através da biodigestão anaeróbia em duas fases, pode variar entre 841-1.319 MW (com base na geração de vinhaça na safra 2014/2015), aproximadamente 15-20% da capacidade das barragens de Tucuruí (8.540 MW) e Itaipu (7.000 MW). Entretanto, a viabilidade deste processo e sua capacidade para recuperar a vinhaça, pode estar comprometida pelo uso de antibióticos para combater as infecções bacterianas durante a fermentação alcoólica.

Na indústria do álcool do Brasil, os antibióticos mais utilizados são: penicilina, virginiamicina e monensina sódica (Oliva-Neto e Yokoya, 2001). O uso qualitativo de

antibióticos termicamente resistentes (Moraes, Zaiat e Bonomi 2015) supõe sua presença na vinhaça. O efeito inibitório destes sob o processo de biodigestão anaeróbia tem sido reportado (Ince et al. 2012; Arikan et al. 2018). No entanto, Moraes, Zaiat e Bonomi 2015 advertiram da existência de lacunas na identificação de antibióticos na vinhaça e dos efeitos destes sob a biodigestão anaeróbia deste substrato. Por outro lado, o uso de antibióticos em base lúpulo (α-ácidos e β-ácidos) tem sido reportado na indústria do etanol no Brasil e nos Estados Unidos de América (Caetano e Madaleno, 2011; Faour, 2015; Prado e Venturini Filho, 2014), mas os efeitos sob a biodigestão anaeróbia não foram suficientemente reportados. Neste contexto, será proposto como objetivo de pesquisa avaliar o efeito inibitório da monensina sódica e de β-ácidos de lúpulo sob o processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça.

Material e Métodos

Estratégia de trabalho

Será utilizada a vinhaça da "Usina São Martinho" (vinhaça de caldo e melaço sem antibióticos) e o lodo do reator UASB do abatedouro de aves "Ideal Ltda.". A vinhaça vai ser conservada a -20 ºC e o inóculo a 4 ºC. Uma caraterização físico-química destes materiais será desenvolvida. Seguidamente, vão ser estabelecidas as melhores condições de pH, concentração de inóculo (Ci) e relação quantidade de substrato / quantidade de inóculo (S/I) que favoreçam o rendimento de metano no processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça, mediante um ensaio de potencial bioquímicos de metano (PBM) e um desenho fatorial completo 2^3 em dois níveis e com três repetições no ponto central (11 tratamentos em total, Tabela 1). Posteriormente, de acordo com os resultados do desenho fatorial, será executado um desenho composto central para desenvolver um estudo de otimização do rendimento de metano no processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça. Isto permitirá que os efeitos do pH e a quantidade de substrato e de inóculo utilizadas não emascarem o efeito dos antibióticos nos ensaios subsequentes de PBM. Nos desenhos antes apontados serão usadas como variáveis-resposta o rendimento de metano máximo ($Y_{CH4\ máx.}$), a constante de hidrólise (k_0), a atividade metanogênica específica (AME) e a eficiência de remoção da demanda química de oxigênio solúvel do substrato ($\eta_{rem.\ DQO\ sol.}$).

Tabela 1: Níveis e fatores do planejamento fatorial completo 2^3 para o ensaio PBM

Fatores	Nível inferior	Ponto central	Nível superior
	-1	0	+1
pH	6,6	7,0	7,4
Ci ($gSSV.L^{-1}$)	14,3	16,5	19,0
S/I ($gDQO_{sol}.gSSV^{-1}$)	0,1	0,4	0,6

Posteriormente, serão realizados ensaios de toxicidade anaeróbia tanto para a monensina sódica quanto para os β-ácidos de lúpulo, a fim de conhecer o efeito inibitório destes compostos sob o inóculo anaeróbio. Nestes experimentos serão utilizadas concentrações destes antibióticos que tenham sido reportadas na literatura como inibitórias do processo anaeróbio. Estas concentrações serão definidas mediante uma revisão bibliográfica e tendo presente as dosagens recomendadas pelas empresas comercializadoras destes compostos, para o controle da contaminação durante a fermentação do vinho de cana-de-açúcar. Como variáveis-resposta serão utilizadas o porcentual de inibição (%I) da atividade metanogênica e as concentrações inibitórias do 20%, 50% e 80% desta atividade (IC_{20}, IC_{50} e IC_{80}). Simultaneamente, serão avaliadas as cinéticas de inibição na faixa de concentrações estudada e utilizando modelos procurados na literatura. Finalmente, em base aos resultados do estudo de toxicidade anaeróbia do inóculo, será avaliado o efeito inibitório da monensina sódica e dos β-ácidos de lúpulo sob a biodigestão anaeróbia da vinhaça mediante ensaios de PBM, utilizando as condições otimizadas de pH, concentração de inóculo e relação quantidade de substrato / quantidade de inóculo.

Procedimentos experimentais e análises química

A caraterização físico-química será implementada através dos métodos descritos no *Standard Methods* (APHA, AWWA e WEF, 2005).

Os ensaios de PBM da pesquisa serão realizados em batelada e escala laboratorial de acordo à metodologia padronizada por Holliger et al. (2016). Os tratamentos vão ser incubados a 35 ^{o}C e agitados. Os experimentos serão encerrados quando a produção acumulada de CH_4 seja menor de 1%. Não serão utilizadas soluções de macro e micronutrientes e dissolução tampão, uma vez que se procurarão condições mais próximas à dos digestores anaeróbios industriais. Os ensaios serão executados no equipamento *Automatic Methane Potential Test System II* (AMPTS II) com avaliação direta da produção de metano depois da lavagem do biogás com uma dissolução de NaOH (12%).

No ensaio PBM para estabelecer as melhores condições de pH, Ci e S/I que favoreçam o rendimento de metano, o pH e a DQO total e solúvel serão avaliados na partida e no final do ensaio, de acordo com os procedimentos de *Standard Methods*. O ensaio de PBM para avaliar o efeito inibitório da monensina sódica e dos β-ácidos de lúpulo sob a biodigestão anaeróbia da vinhaça, estarão compostos por um controle (vinhaça sem antibiótico) e os tratamentos em triplicata (vinhaça mais antibiótico). A concentração de inóculo, a concentração substrato e o pH serão ajustados de acordo aos resultados do estudo de otimização. O desenvolvimento do processo anaeróbio será acompanhado mediante a análise de amostras de frascos de sacrifício. Os parâmetros a monitorar serão pH, DQO total e solúvel, AOCC (ácido acético, propiônico e butírico), alcalinidade, glicerol, ácido lático e carboidratos totais. O pH e DQO total e solúvel serão analisados de acordo com os procedimentos de *Standard Methods*, os AOCC mediante o método de Adorno, Hirasawa e Varesche, (2014), a alcalinidade segundo o método de Ripley, Boyle e Converse (1986), o glicerol através do método de Valdez et al. (2012), os carboidratos totais mediante o método de Dubois et al. (1956) e o ácido lático de acordo com o procedimento de Taylor (1996).

Os ensaios de toxicidade anaeróbia serão realizados para cada antibiótico, nas faixas de concentrações definidas e mediante a metodologia de Field, Alvarez e Lettinga (1988) e complementada como o trabalho de Sierra-Alvarez et al. (2004). Cada ensaio estará composto por um controle (inóculo sem antibiótico) em triplicata e os tratamentos em duplicata (inóculo mais antibiótico). Como fonte de carbono será utilizada uma mistura de ácido acético, propiônico e butírico. Soluções de macro e micronutrientes e dissolução tampão serão agregados em uma composição segundo Field, Alvarez e Lettinga (1988). As marcas comerciais Kamoran® (monensina sódica como princípio ativo) e BetaBio 45® (β-ácidos de lúpulo como princípio ativo), das empresas *Química Real* e *Wallerstein Industrial e Comercial Ltda*., respetivamente, vão ser usas como fonte de antibióticos. Os ensaios serão executados no equipamento *Automatic Methane Potential Test System II* (AMPTS II) com avaliação direta da produção de metano depois da lavagem do biogás com uma dissolução de NaOH (12%). A evolução do processo será avaliada através da análise do pH, da DQO total e solúvel e dos ácidos orgânicos de cadeia corta (AOCC) (ácido acético, propiônico e butírico) de amostras de frascos de sacrifício. A análise dos AOCC será realizada através do método de Adorno, Hirasawa e Varesche, (2014) e pH, da DQO total e solúvel mediante *Standard Methods*. Os ensaios serão encerrados depois de aproximadamente cinco e/ou sete dias.

Análises de dados

As variáveis $Y_{CH4\ máx.}$ e k_0 serão determinadas a partir da regressão não linear do Y_{CH4} experimental, utilizando o modelo cinético de Roediger. Para este cálculo será utilizado o método Gradiente Reduzido Generalizado (GRG) Não Linear, disponível no suplemento *Solver* do *software Microsoft Excel® 2016*. Os resultados do desenho fatorial completo e composto central vão ser examinados mediante testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) com um nível de confiança de 95%. Nestes, serão calculados os efeitos dos fatores sob o $Y_{CH4\ máx.}$ e

suas interações. No desenho composto central, um modelo preditivo para o $Y_{CH4\,máx.}$ será gerado e verificado. A superfície de resposta e curvas de contorno serão analisadas para definir as faixas ótimas dos fatores. Para a análise estatística será aplicado o *software Action Stat® 3.5.152.34*. A cinética de inibição para cada antibiótico nos ensaios de toxicidade anaeróbia, vai ser avaliada mediante regressão com o modelo de inibição mais afim às respostas experimentais. O método de cálculo será o Gradiente Reduzido Generalizado (GRG) Não Linear, disponível no suplemento *Solver* do *software Microsoft Excel® 2016*.

Resultados Esperados

Serão otimizadas as vaiáveis pH, concentração de inóculo e relação quantidade de substrato / quantidade de inóculo para maximizar o rendimento de metano no processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça. Consequentemente, estes fatores não encobrirão os efeitos dos antibióticos nos ensaios de PBM ulteriores. Será reportada a porcentagem de inibição da atividade metanogênica que perde o inóculo frente os efeitos tóxicos das diferentes concentrações de antibióticos, tanto de monensina sódica quanto de β-ácidos de lúpulo. Também, de acordo à resposta do processo aos antibióticos, se poderá reportar a concentração inibitória do 20% ou 50% ou 80% da atividade metanogênica do inóculo. Concomitantemente, serão indicadas as cinéticas de inibição na faixa de concentrações estudadas. Finalmente, será exposto o efeito inibitório do processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça, frente algumas das concentrações de monensina sódica e de β-ácidos de lúpulo testadas nos ensaios de toxicidade anaeróbia.

Conclusões

Contribuir com o processo de investigação para revelar o efeito inibitório de antibióticos sob a biodigestão anaeróbia da vinhaça, particularmente o efeito da monensina sódica e dos β-ácidos de lúpulo, constituirá o principal aporte científico da pesquisa. Isto colocaria respostas no debate sobre a adopção das tecnologias de biodigestão anaeróbia como alternativa para a recuperação energética da vinhaça no setor sucroalcooleiro brasileiro.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Analyt. Chem. 5, 406-414.

APHA-AWWA-WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st ed, American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Washington DC.

Arikan, O.A., Mulbry, W., Rice, C., Lansing, S., 2018. The fate and effect of monensin during anaerobic digestion of dairy manure under mesophilic conditions. Plos One 13, 1-12.

Basso, L.C., Olitta, Th.B., Nitsche, S.R., 2011. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation, in: Dos Santos, M. A. B. (Ed.), Biofuel Production - Recent Developments and Prospects, IntechOpen, pp. 86-100.

BNDES, CGEE, 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável, 1. ed. Rio de Janeiro, Brasil https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2002, Acesso 2018/10/21.

Caetano, A.C., Madaleno, L.L., 2011. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. Ciência & Tecnologia Fatec-JB 2, 27-37.

CONAB, 2019. Boletim da safra de cana-de-açúcar, 4º Levantamento – Safra 2018/19. Brasília, Brasil. https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar, Acesso 2019/05/01.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

Faour, S., 2015. Dual benefits of using hop acid extracts in ethanol plants. Cooperat. Sugar 47, 36-41.

Field, J.; Alvarez, R.S.; Lettinga, G., 1988. Ensayos Anaerobios, in: Fernandez-Polanco, F.; Garica, P.A.; Hernando, S. (Eds.), 4º Seminario de Depuración Anaerobia de Aguas Residuales: Actas del 4º Seminario D.A.A.R, pp. 52-80.

Fuess, L.T., Klein, B.C., Chagas, M.F., Rezende, M.C.A.F., Garcia, M.L., Bonomi, A., Zaiat, M., 2018. Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and environmental approach. Renew. Energ. 122, 674-687.

Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J. C., De Laclos, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G.; Hartel, M.; Heerenklage, J.; Horvath, I. S.; Jenicek, P.; Koch, K.; Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J. V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Rüsch Pfund, F., Strömberg, S., Torrijos, M., Van Eekert, M., Van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. Water Sci. Technol. 74, 2515–2522.

Ince, B., Coban, H., Turker, G., Ertekin, E., Ince, O. Effect of oxytetracycline on biogas production and active microbial populations during batch anaerobic digestion of cow manure. Bioprocess Biosys. Eng. 36, 541-546.

Moraes, B.S., Junqueira, T.L., Pavanello, L.G., Cavalett, O., Mantelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M., 2014. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? Appl. Energ. 113, 825-835.

Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renew. Sust. Energ. Rev. 44, 888-903.

Oliva-Neto, P., Yokoya, F., 2001. Susceptibility of Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. Braz. J. Microbiol. 32, 10-14.

Prado, J.L.; Venturini Filho, W.G., 2014. Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica. Energia na Agricultura 29, 277-281.

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. J. Water Pollut. Control Fed. 8, 406-411.

Sierra-Alvarez, R., Cortinas, I., Yenal, U., Field, J.A., 2004. Methanogenic Inhibition by Arsenic Compounds. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5688-5691.

Taylor, K.A., 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochem. Biotechnol. 56, 49-58.

Valdez, H.D.C., Amado, R.S., Souza, F.C., D'ELIA, E., Vieira, E., 2012. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. Química Nova 35, 601-607.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS TERMÓFILAS PARA OBTENÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Vanessa Silva [1]; Isabel Sakamoto [2]; Maria Bernadete A Varesche [3]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Pesquisadora Técnica do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A obtenção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais vem sendo um desafio para o novo cenário de biorefinaria. Um dos principais entraves refere-se em utilizar microrganismos capazes de degradar diferentes compostos orgânicos, como pentoses e hexoses. Duas cepas de bactérias anaeróbias e termófilas foram isoladas de consórcio enriquecido de lodo de reator UASB termófilo usado no tratamento de vinhaça de cana de açúcar. Bactéria produtora de etanol e hidrogênio a partir de xilose, Thermoanaerobacterium calidifontis VCS1 (99% de similaridade), e bactéria produtora de hidrogênio, Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum VCS6 (100% similaridade). Para a cultura VCS1, nas condições de isolamento com 13,3 mmol.L^{-1} de xilose, pH 7 e 55ºC, em meio de cultivo AMM modificado, obteve-se rendimentos de 0,79 mol H_2.mol^{-1} xilose e 0,59 mol etanol.mol^{-1} de xilose. Para a cultura VCS6, observou-se rendimento de 2,69 mol-H_2.mol^{-1} xilose a partir de 13,3 mmol.L^{-1} da pentose, meio T. ethanolicus, pH 6,8 a 55°C. Não se observou significativa produção de metabólitos a partir da vinhaça por VCS1 em condição de cultura pura, provavelmente, as condições nutricionais da vinhaça foram desfavoráveis para seu metabolismo. Para VCS6, obteve-se rendimento de 1,22 mmol-H_2.g^{-1} DQO em cultura pura e 1,03 mmol-H_2.g^{-1}DQO em condição de bioaumentação.*

Introdução

A produção de biocombustíveis a partir de recursos renováveis e resíduos vêm se tornando uma alternativa considerável para os problemas econômicos e ambientais. Em países em desenvolvimento, a cana-de-açúcar é uma fonte de bioenergia renovável com boa relação custo-benefício obtida através da produção de etanol, entretanto, esse processo gera resíduos que estão sendo destinados ao solo e água dos rios, agravando ainda mais a disponibilidade desses outros recursos naturais (Fuess et al., 2017; Fito et al., 2019).

A vinhaça, termo utilizado para designar a água residuária do processo de destilação do álcool, é considerada um dos principais poluidores (Wilkie et al., 2000). No Brasil, a produção de etanol a partir da cana de açúcar gera cerca de 11,5 litros de vinhaça por litro de etanol produzido, com carga orgânica potencial de 288 gramas de DQO por litro de etanol. Este resíduo é aplicado como fertilizante nas lavouras de cana-de-açúcar devido as concentrações altas de nitrogênio, fósforo, potássio e micronutrientes, entretanto, a aplicação sem critérios de dosagem de vinhaça ao solo pode causar desequilíbrio de nutrientes, que podem ser lixiviados, contaminando assim as águas subterrâneas (Elia Neto, 2016; Fuess et al., 2017).

Outra alternativa englobando o conceito de biorefinaria é utilizar os açúcares residuais presentes na vinhaça para obtenção de energia a partir da fermentação. A fermentação por culturas puras é vantajosa em relação a fermentação por consórcios microbianos, uma vez que os açúcares são limitados, as condições de cultivo restritas, e busca-se a melhor eficiência no processo de conversão do resíduo em produtos de agregado valor econômico. Conseguinte, o emprego de consórcios microbianos pode não favorecer as relações sintróficas de protocoopeção entre os organismos, sugerindo competição por nutrientes ao invés de conversão cooperativa de metabólitos (Packard et al., 2019).

Bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium*, pertencente à classe Clostridia, já foram relacionadas com produção de hidrogênio em reatores anaeróbios para o tratamento de vinhaça (Ferraz et al., 2016; Fuess et al., 2018; Lazaro et al., 2014) e também em reatores de produção de hidrogênio a partir da biomassa lignocelulósica (Ratti et al., 2015). *Thermoanaerobacterium* são bactérias termófilas com ótimo crescimento entre 55 e 70°C, anaeróbias e capazes de degradar diversas fontes de carbono e produzir ácidos orgânicos, etanol e hidrogênio (Onyenwoke e Wiegel, 2009). É capaz de degradar o polissacarídeo xilana (Khamtib e Reungsang, 2012; Ren et al., 2008; Saripan e Reungsang, 2013), principal componente da hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica, evidenciando assim, a possibilidade de sua aplicação na degradação desse resíduo.

Dessa forma, o presente trabalho concentra-se no isolamento de bactérias degradadoras de xilose a partir de um consórcio termofílico utilizado para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar e na avaliação de suas atividades fermentativas. Os fatores físico-químicos que afetam a fermentação da xilose pela cultura isolada VCS1 foram estudados a partir de metodológicas estatísticas visando a produção otimizada de hidrogênio e/ou etanol. Por fim, aplicou-se as culturas isoladas VCS1 e VCS6 na vinhaça de cana-de-açúcar e constatou a capacidade de produção de biocombustíveis a partir de vinhaça, e validou a produção de hidrogênio por via ácido lático / acético pela estirpe *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* VCS6.

As informações obtidas no presente estudo podem favorecer a aplicação da estirpe *Thermoanaerobacterium calidifontis* VCS1 e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* VCS6 como inóculo e como bio-aumentação na produção biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos, englobando no conceito de biorefinaria.

Material e Métodos

Isolamento

Para este trabalho, utilizou-se consórcio microbiano anteriormente enriquecido por Silva et al., (2018) . Este consórcio foi proveniente de lodo de reator UASB utilizado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar da Usina São Martinho (Pradópolis – SP). As técnicas utilizadas para isolar culturas de bactérias anaeróbias e termófilas foram adaptação ao meio de cultivo específico, diluição seriada em condição anaeróbia e plaqueamento por semeadura.

O consórcio foi adaptado aos meios de cultura específicos, sendo que R1 foi adaptado ao meio AMM modificado (Adaptação A1) com 1,0 $g.L^{-1}$ de xilose (6,6 $mmol.L^{-1}$) e pH 7 e R2 ao meio *T. ethanolicus* suplementado com 1,0 $g.L^{-1}$ (6,6 $mmol.L^{-1}$) de xilose e pH 6,8 (Adaptação A2) e ao meio *Ethanoligenens* utilizando 1,0 $g.L^{-1}$ de celobiose (2,92 $mmol.L^{-1}$) e pH 6,0 (Adaptação A3).

Na etapa de diluição seriada, para a diluição D1 foram preparados 10 frascos com meio de cultivo AMM modificado correspondendo a diluição na escala de 10^{-1} a 10^{-10}, alimentados com 1,0 $g.L^{-1}$ (6,6 $mmol.L^{-1}$) de xilose e inoculados com a cultura adaptada A1. Para a diluição D2 e D3, foram preparados 10 frascos com o meio de cultivo *T. ethanolicus* e 10 frascos com o meio *Ethanoligenens*, alimentados com 1,0 $g.L^{-1}$ (6,6 $mmol.L^{-1}$) de xilose e 1,0 $g.L^{-1}$ (2,92 $mmol.L^{-1}$) de celobiose, e inoculados com as culturas A2 e A3, respectivamente. Para a última diluição, na qual foi observada turvação do meio de cultura foi utilizada para obtenção de colônias isoladas via plaqueamento. As colônias foram submetidas a extração de DNA para análise de DGGE e sequenciamento e foram nomeadas em VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6.

Identificação

Previamente a extração de DNA, as amostras foram lavadas (3x) com tampão fosfato, seguida de centrifugação a 4°C por 8000 rpm durante 5 minutos, e armazenadas a -2°C. O DNA genômico foi extraído baseado na metodologia descrita por Griffiths et al. (2000) modificada, utilizando fenol tamponado com Tris e clorofórmio. Para cada biomassa úmida coletada foi adicionado de 0,1 – 0,3g de *glass beads*, 1 mL de PBS, 1 mL de fenol tamponado e 1 mL de clorofórmio. Em seguida, as amostras foram homogenizadas em vortéx por 10 a 15 segundos e centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm à 4°C. Retirou-se 1 mL do sobrenadante e adicionou 1 mL de fenol tamponado, seguido de uma breve agitação no vortex e centrifugação nas condições descritas anteriormente. Posteriormente, coletou-se 800 µL do sobrenadante da etapa anterior, acrescentou-se 800 µL de clorofórmio, e submeteu-se a agitação e centrifugação nas mesmas condições. Por fim, 300 µL do sobrenadante foi transferido para um eppendorf e as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

A partir do DNA genômico extraído da colônia isolada, realizou-se a PCR com o primer 27F – 1492R. Após a purificação do produto da PCR, submeteu-se ao sequenciamento parcial 16S rRNA gene pelo método Sanger. O consenso das seqüências obtidas foram realizados por meio do programa SeqMan do software DNASTAR (Lasergene sequence analysis). As seqüências foram comparadas no Banco de Dados NCBI-database (National Center for Biotechnology Information) para aproximação da identidade filogenética com seqüências do RNAr 16S representado na base de dados Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Caracterização morfológica e fisiológica

Após identificação filogenética, as culturas isoladas VCS1 e VCS6 foram submetidas a caracterização morfológica, a partir de visualização de imagem em microscopia de contraste de fase (microscópio Olympus BX60), equipado com câmera digital (Olympus DP74) e aplicou-se coloração de Gram seguindo o método DSM, 1991.

Para a caracterização, as culturas isoladas VCS1 e VCS6 foram submetidas a diferentes fontes de carbono, como glicose, celobiose, xilose, sacarose, galactose, frutose, manose, arabinose, celulose e extrato de levedura. Os ensaios foram preparados em reatores em batelada, em duplicata, em frascos de 100 mL, com 50 mL de volume reacional, inoculados com a cultura isolada, e concentração de 1 $g.L^{-1}$ de cada substrato, mantidos em condições anaeróbias e termófilas (55°C). Foram analisados o crescimento celular, utilização dos substratos e análise de produtos finais.

Cinética de crescimento

Os ensaios foram preparados em frascos de 1.000 ml, mantendo a relação 50% volume reacional e 50% volume de *headspace*. Para a cultura isolada VCS1, o meio de cultivo utilizado foi AMM modificado, alimentado com 2,0 $g.L^{-1}$ (13,3 $mmol.L^{-1}$) de xilose e ajustados a pH 7. Para a cultura isolada VCS6, o meio de cultivo foi *T. ethanolicus*, pH 6,8, alimentado com 2,0 $g.L^{-1}$ (13,3 $mmol.L^{-1}$) de xilose. Todos os reatores foram submetidos a atmosfera de N_2 (100%). Todos os ensaios foram preparados em condições estéreis como descritos anteriormente.

Os reatores foram preparados em batelada em triplicata, e inoculados com densidade celular inicial de 0,200 (absorbância 600 nm). Foi feita uma relação densidade celular / massa celular ($mg.L^{-1}$) a partir da análise de sólidos totais. Os reatores foram incubados à 55°C e mantidos até estabilização de crescimento.

Consumo de xilose e cinética de produção de metabólitos

Preparou-se reatores em batelada, em frascos de 1.000 ml, sendo 50% correspondente ao volume reacional e 50% ao *headspace*. Manteve-se os meios de cultivos da etapa de isolamento, sendo AMM modificado para a cultura isolada VCS1 e meio *T. ethanolicus* para a

cultura isolada VCS6. Ambos os ensaios foram preparados utilizando 2,0 $g.L^{-1}$ (13,3 $mmol.L^{-1}$) de xilose. Todos os reatores foram submetidos a atmosfera de N_2 (100%) e incubados à 55°C. Foram preparados reatores em batelada em triplicata para amostragem da fase líquida e reatores em triplicata para amostragem da fase gasosa. (Lazaro et al, 2014; Shaw et al, 2008). Os reatores foram inoculados com as culturas isoladas mantendo-se densidade celular inicial de 0,25 abs. Todos os materiais foram preparados em condições estéreis como descritos anteriormente.

Planejamento experimental

Para analisar a influência do pH e concentração de substrato na formação de produtos, a cultura isolada VCS1 foi submetida à ensaios utilizando o modelo estatístico referente à planejamento experimental em cinco níveis (+1; -1; 0; +1,42, -1,42), com duas repetições do ponto central, em ensaios em triplicatas.

Para a metodologia da superfície de resposta (delineamento de composto central rotacional), foram levados em consideração 2 fatores: concentração do xilose e pH, denotados como X_1 e X_2, respectivamente. As concentrações de xilose foram 13,3 $mmol.L^{-1}$, 36,6 $mmol.L^{-1}$ e 60,0 $mmol.L^{-1}$, e as faixas de pH foram 6,2, 7 e 7,8. O meio de cultivo utilizado foi AMM modificado, ajustado ao pH indicado no delineamento, e filtrado em membrana 0,22µm. Os reatores foram incubados à 55°C por 48 horas, e as amostras foram coletadas a cada 2 horas aproximadamente, em condições estéreis.

A superfície de resposta e análise dos parâmetros (Teste F e ANOVA) foram feitos com auxílio do programa *Statistica*10 (StatSoftInc, 2014, USA). Os parâmetros foram considerados significativos para nível de significância (*p*) menor que 0,05. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância dos fatores (concentração de xilose e pH) no ajuste da reação polinomial de segunda ordem.

Aplicação em vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça de cana-de-açúcar foi adquirida junto a Usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo. A vinhaça bruta foi submetida a processo de esterilização, a fim de inibir a atividade microbiana da própria vinhaça, sendo está submetida a autoclave à 121°C por 20 minutos. Resultando em duas condições de vinhaça: vinhaça bruta e vinhaça autoclavada.

A caracterização da vinhaça seguiu metodologia referente a determinação de DQO, carboidratos totais, glicerol, fenol, e metabólitos voláteis como ácidos e álcoois.

Para os ensaios foram preparados reatores em batelada, com frascos de 500 ml, sendo 50% volume reacional e 50% em *headspace* preenchido com N_2 (100%). Ambos em triplicata e anteriormente esterilizados.

Métodos analíticos

Para a análise da produção de etanol, ácidos orgânicos voláteis, álcoois e acetona, utilizou-se cromatógrafo GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (FID), com coluna HP INNOWAX de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25µm (espessura do filme) (Adorno et al., 2014).

Para a determinação de hidrogênio, metano e CO_2, utilizou-se cromatógrafo gasoso, Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica (TDC) e gás argônio como carreador. As temperaturas de operação do injetor, detector, e coluna foram 30°C, 200°C e 230°C, respectivamente (Adorno and Tomita, 2014). Para quantificar os substratos utilizados nos ensaios, empregou-se a determinação de carboidrato por espectrofotometria (Dubois et al., 1956).

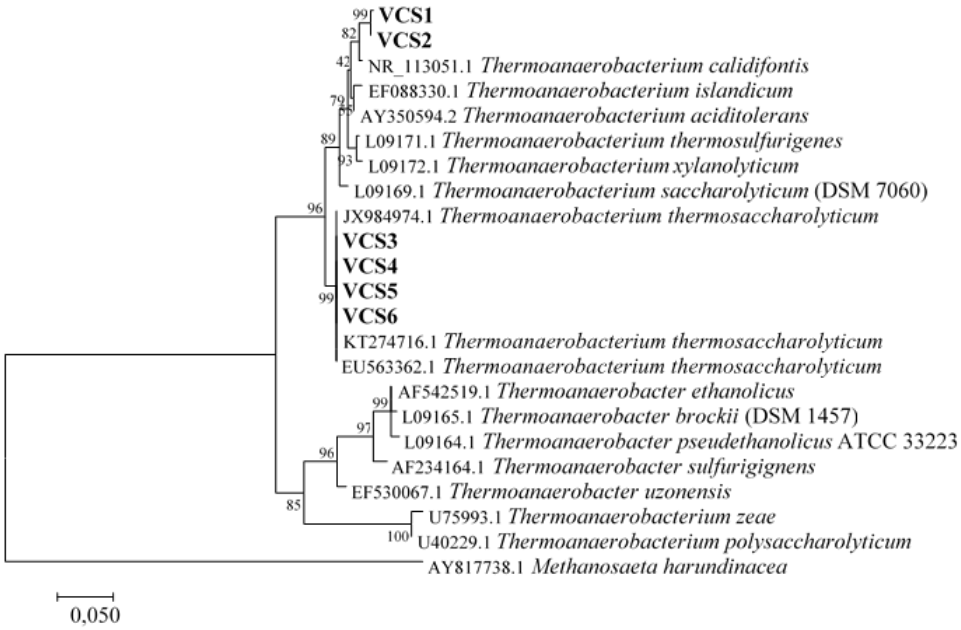
Resultados e Discussão

Sequeciamento

As colônias foram submetidas a análise de sequenciamento parcial do gene 16S RNAr 16S e comparação com o Banco de Dados NCBI-database. Obteve-se 99% de similaridade (100% das sequências submetidas ao programa foram alinhadas) das culturas VCS1 e VCS2 a *Thermanaerobacterium calidifontis.* Para bactérias das colônias VCS4, VCS5, VCS6 obteve-se 100% de similaridade a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (query cover 100%). Para as bactérias da colônia VCS3, a semelhança foi a mesma obtidas para VCS4, VCS5 e VCS6, todavia com similaridade de 99% a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Figura 1).

Para o gênero *Thermoanaerobacterium* tem-se apenas 9 espécies catalogadas a saber: *T. aciditolerans, T. aotearoense, T. saccharolyticum, T. thermosaccharolyticum, T. thermosulfurigenes, T. xylanolyticum, T. thermostercoris, T. islandicum* e *T. polysaccharolyticum* no banco de dados do centro de pesquisa mundial DSMZ (German Collection of Micro-organism and Cell Cultures) (DSMZ, 2018).

Figura 1 Árvore Filogenética das culturas isoladas VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6



Morfologia e cinética de crescimento

Para a cultura VCS1, observou-se bacilos alongados e estreitos com protuberância em uma das extremidades e coloração gram-positiva, com formação de colônias circulares, planas, rugosas, incolores, opacas com diâmetro entre 3 a 5 mm.

Observou-se morfologia de bacilos curtos para a cultura de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* VCS1, agrupados em duas ou mais células gram-positivas, com formação de colônias irregulares, protuberantes, rugosas, translúcidas e de diâmetro de 4 a 5 mm.

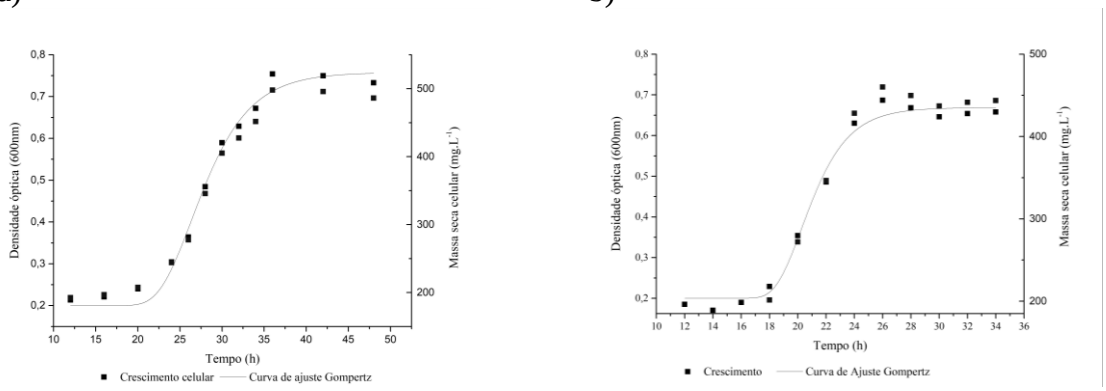
A fase *lag* da cultura isolada VCS1 foi de 22,50 horas, seguindo por período de fase exponencial de aproximadamente 16 horas de duração, com crescimento máximo de 386,8 $mg.L^{-1}$ (0,55 abs) (Ajuste ao modelo de Gomperz, $R^2 = 0,9873$) (Figura 2a). O período de fase *lag* foi superior aos obtidos por Shang et al (2013), porém, os autores observaram também período de 16 horas para a fase exponencial para a cultura isolada *T. calidifontis* Rx1.

Para a cultura isolada VCS6 obteve-se fase *lag* de 18,4 horas, e fase exponencial de aproximadamente 12 horas, com crescimento máximo de 331,9 $mg.L^{-1}$ (0,46 abs), em 34 horas de fermentação (Figura 2b), resultados estes bem próximos aos obtidos para a cultura isolada VCS1 ($R^2 = 0,9884$ ajustado pelo Modelo de Gompertz). Observou-se tempo de

geração de 6,1 horas, e velocidade específica de 0,11 h^{-1}. O tempo de geração foi menor em relação a cultura isolada VCS1, e aquele obtido por Hoster et al., (2001) para *T. thermosaccharolyticum* FH1, cujo tempo de geração foi de 7,8 horas em 5,0 $g.L^{-1}$ (27,7 $mmol.L^{-1}$) de glicose e 68°C.

Figura 2 Curvas de crescimento para a) *T. calidifontis* VCS1, nas condições de 2,0 $g.L^{-1}$ (13,3 $mmol.L^{-1}$) de xilose, meio AMM modificado, pH 7 e 55°C e b) *T. thermosaccharolyticum* VCS6 em 2,0 $g.L^{-1}$ (13,3 $mmol.L^{-1}$) de xilose, meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C

a) b)



Produção de metabólitos a partir de xilose

Para a cultura isolada VCS1, o consumo de xilose (2,0 $g.L^{-1}$ ou 13,3 $mmol.L^{-1}$) iniciou-se após aproximadamente 12 horas, e decorreu por 48 horas, com 99,9% de eficiência de remoção (residual de 35 $mg.L^{-1}$ ou 0,23 $mmol.L^{-1}$). Os produtos finais a partir da conversão da xilose foram etanol (7,72 $mmol.L^{-1}$ ±0,61), ácido acético (6,95 $mmol.L^{-1}$ ±0,07), ácido láctico (2,47 $mmol.L^{-1}$ ±0,004), gás carbônico (19,46 $mmol.L^{-1}$ ±2,28) e hidrogênio (10,26 $mmol.L^{-1}$ ±1,50) (Figura 3A). Não se observou formação de ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido capróico, acetona, metanol, n-butanol e glicerol.

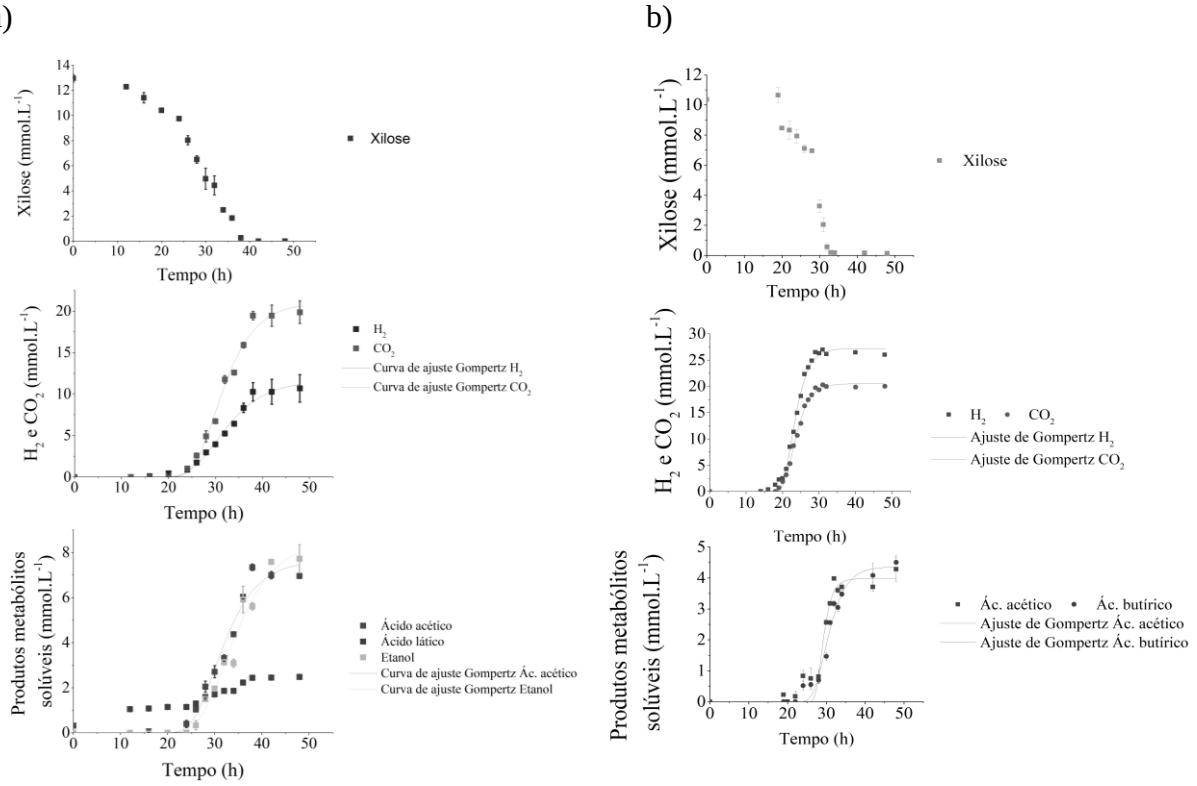
Shang et al., (2013) constataram a formação dos mesmos compostos a partir do consumo de 5,0 $g.L^{-1}$ (33,3 $mmol.L^{-1}$) de xilose à 55°C em 48 horas por *Thermoanaerobacterium calidifontis* Rx1, sendo etanol (29,3 $mmol.L^{-1}$), ácido acético (13,1 $mmol.L^{-1}$), ácido láctico (16,2 $mmol.L^{-1}$), H_2 (38,1 $mmol.L^{-1}$) e CO_2 (8,6 $mmol.L^{-1}$). Os autores observaram que os principais produtos formados foram etanol e hidrogênio, resultado esse similar ao obtido neste trabalho, uma vez que observou-se para a cultura VCS1 cerca de 41,55% de CO_2, 21,90% de H_2 e 16,48% de etanol em relação a todos os produtos formados.

Observou-se para VCS6 consumo de 99% da concentração inicial de xilose (1,5 $g.L^{-1}$ ou 10,0 $mmol.L^{-1}$) em período de 34 horas, nas condições de cultivo com meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C. Os produtos observados foram principalmente H_2 (26,13 $mmol.L^{-1}$ ±1,85), CO_2 (19,97 $mmol.L^{-1}$ ±0,79), ácido acético (4,27 $mmol.L^{-1}$ ±0,37) e ácido butírico (4,50 $mmol.L^{-1}$ ±0,39) (Figura 3B). Não se observou produção de etanol, acetona, metanol, n-butanol, glicerol, ácidos propiônico, isobutírico, valérico, isovalérico e capróico.

Ren et al., (2008) observaram para *T. thermosaccharolyticum* W16 a partir da fermentação de xilose (10,0 $g.L^{-1}$ ou 66,6 $mmol.L^{-1}$) em pH 6,5 e 60°C, os seguintes compostos: H_2 (10,7 $mmol.L^{-1}$ h), ácido acético (32,3 $mmol.L^{-1}$) ácido butírico (18,7 $mmol.L^{-1}$), etanol (9,1 $mmol.L^{-1}$) e butanol (0,85 $mmol.L^{-1}$). A partir dos resultados obtidos, os autores indicaram que a produção de hidrogênio pela cultura isolada W16, foi por via fermentativa acético-butírica.

Figura 3 Variação temporal de xilose, hidrogênio e dióxido de carbono e ácido acético, ácido láctico, ácido butírico e etanol por *T. calidifontis* VCS1 em meio de cultivo AMM

modificado, pH 7 e 55°C (a) e *T. thermosaccharolyticum* VCS6 em meio de cultivo *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C (b)



Otimização das condições de cultivo para cultura VCS1

A partir dos resultados obtidos, observou-se que na condição de pH 6,2, a rota de produção de hidrogênio foi favorecida em relação a do etanol. Sob tais condições (ensaio C1) obteve-se para potencial máximo de produção molar de hidrogênio (*P*) 10,2 mmol.L^{-1} e 7,9 mmol.L^{-1} de etanol. O mesmo ocorreu no ensaio C3 (pH 6,2), de 4,3 mmol.L^{-1} e 2,50 mmol.L^{-1}, respectivamente. Contudo, em faixa de pH (6,2) menores valores de *P* foram observados no ensaio C3, cuja concentração de xilose era consideravelmente maior que no ensaio C1, respectivamente de 60,0 mmol.L^{-1} e 13,3 mmol.L^{-1}, indicando assim possível inibição em maior concentração de substrato. A influência do pH inicial na produção de hidrogênio também foi observada por Roy et al. (2013) que utilizaram *T. thermosaccharolyticum* IIT BT-ST1 e glicose como substrato. Os autores relataram a necessidade de manter o pH do meio de cultivo próximo a 6,5 para favorecer a atividade enzimática da hidrogenase.

A rota de produção de etanol foi favorecida nos ensaios em pH 7,8 e 8,13, principalmente nos ensaios C2, C4 e C8, sendo valores de *P* de etanol superiores aqueles de hidrogênio. No ensaio C2, (pH 7,8 e 13,3 mmol.L^{-1} de xilose) obteve-se 9,05 mmol.L^{-1} de etanol e 7,83 mmol.L^{-1} de hidrogênio. Nas condições do ensaio C4 (pH 7,8 e 60,0 mmol.L^{-1} de xilose), obteve-se menor produção de etanol (7,44 mmol.L^{-1}) e de hidrogênio (6,28 mmol.L^{-1}). Observou-se novamente valores menores de *P* para 60,0 mmol.L^{-1} de xilose indicando inibição por substrato.

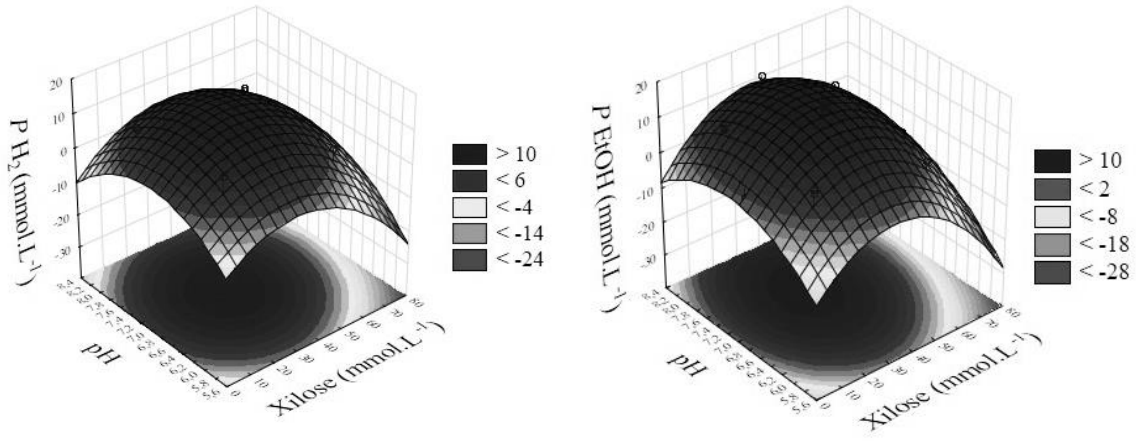
A influência do pH no fluxo metabólito também foi verificada por Ciranna et al. (2014) em seus estudos com a cultura pura *Caloramator celer* em fermentação de glicose (27,7 mmol.L^{-1}). Os autores observaram 106 mmol.L^{-1} para hidrogênio em pH 6, e para pH 7 e 8, a produção de H_2 foi 33% menor, enquanto a produção de ácido fórmico e etanol foi 2 vezes maior que a obtida em pH 6. Portanto, é possível concluir que para a cultura isolada VCS1, a faixa de pH influenciou na produção de etanol e hidrogênio, sendo que a condição de pH mais alcalino favoreceu a produção de etanol.

Analisando a superfície de resposta e as curvas de contorno para a variável hidrogênio (Figura 4a), verifica-se a existência de uma região ótima equivalente a produção de aproximadamente 10 mmol.L^{-1}, numa faixa de combinação de pH inicial de 6,7 à 7,5, e concentração de xilose de 24,6 a 43,3 mmol.L^{-1}.

Observou-se o mesmo comportamento para a variável resposta etanol, cuja região ótima em pH inicial de 6,7 a 7,9 e concentração de xilose de 23,3 a 50,0 mmol.L^{-1}, indicou produção de aproximadamente 10,0 mmol.L^{-1} (Figura 4b). Desta forma, a partir dos resultados de DCCR, foi possível inferir que o pH ótimo para o cultivo da cultura isolada VCS1 foi entre 6,7 e 7,9, e entre 20,0 a 50,0 mmol.L^{-1} de xilose. Valores inferiores e superiores a região ótima de produção de hidrogênio e etanol, não corresponderam a melhor condição de cultivo da cultura VCS1 visando a obtenção desses compostos.

Figura 4 Superfície de resposta em função da concentração de xilose e pH inicial para hidrogênio (a) e produção de etanol (b)

a) b)



Fermentação e bioaumentação das culturas isoladas VCS1 e VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar

A fermentação a partir da vinhaça de cana-de-açúcar autoclavada e inoculada com as culturas isoladas VCS1 e VCS6 objetivou-se a avaliar o comportamento das culturas puras na remoção de açúcares e compostos residuais da vinhaça.

A produção de hidrogênio foi observada em todas as condições analisadas, entretanto, não se observou produção de hidrogênio para a vinhaça autoclavada e inoculada com a cultura isolada VCS1, na qual a produção acumulada não excedeu 1,09±0,01 mmol.L^{-1} de hidrogênio durante as 96 horas de incubação. Na auto-fermentação da vinhaça obteve-se produção acumulada de H_2 de 22,89±1,84 mmol.L^{-1} em 72 horas, após esse período, observou-se diminuição da produção e formação de sulfeto na fase gasosa de 1,38 mmol.L^{-1} .

Para as condições dos ensaios com a vinhaça bruta e bioaumentada com a cultura isolada VCS1 observou-se os melhores resultados de produção acumulada de hidrogênio, cerca de 48,77±1,59 mmol.L^{-1} em 72 horas de incubação, e logo após, observou-se novamente diminuição dessa produção e formação de sulfeto.

Nos ensaios com a cultura isolada VCS6, também constatou significativa produção de hidrogênio. Na vinhaça autoclavada e inoculada com a cultura isolada VCS6, a produção observada foi de 25,38±1,26 mmol.L^{-1} em 96 horas de incubação, enquanto no processo de bioaumentação da vinhaça bruta com a cultura VCS6, a produção acumulada de hidrogênio foi de 33,63±1,21 mmol.L^{-1} em 72 horas, e depois decréscimo e surgimento de sulfeto. Sob tais condições, pode-se inferir que a cultura isolada VCS6, é uma bactéria produtora de hidrogênio, capaz de utilizar compostos orgânicos da vinhaça, entretanto, em conjunto com a

comunidade microbiana da vinhaça bruta, exerceu função importante na produção de hidrogênio, porém outras rotas podem ter sido favorecidas.

Dessa forma, o melhor rendimento observado foi de 1,52 mmol-H_2.g^{-1}DQO afluente e 2,24 mol-H_2.mol^{-1} carboidratos totais, a partir da bioaumentação da vinhaça bruta (30,9 g.L^{-1} de DQO) para a cultura isolada VCS1. Ressalta-se que o rendimento em hidrogênio para a cultura isolada VCS6, na qual estava pura, sem cooperação com outras populações de bactérias foi de 1,22 mmol-H_2.g^{-1}DQO afluente e 1,65 mol-H_2.mol^{-1}carboidratos totais.

Conclusões

Duas culturas do mesmo gênero, mas de espécies distintas foram isoladas, VCS1 (99% de similaridade *Thermoanaerobacterium calidifontis*) e VCS6 (100% de similaridade *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) a partir da aplicação de técnicas anaeróbias para bactérias termófilas.

A cultura VCS1 é uma bactéria anaeróbia e termófila, produtora de etanol e hidrogênio. As variáveis pH e concentração de xilose interferiram significativamente no metabolismo da cultura VCS1, sendo que a produção de hidrogênio foi favorecida em pH 6,2, e a produção de etanol em pH mais alcalino, 7,8 e 8,13. Além disso, para 60,0 mmol.L^{-1} de xilose, a remoção não foi maior que 70%, indicando assim, possível inibição por substrato. As melhores condições de cultivo para VCS1 foram pH 6,8 a 7,4 e concentração inicial de xilose de aproximadamente 20,0 mmol.L^{-1}.

Já a cultura isolada VCS6 é uma bactéria produtora de hidrogênio pela via acetato/butirato, com rendimento de 2,69 mol H_2 por mol de xilose, nas condições de meio *T. ethanolicus*, 2,0 g.L^{-1} ou 13,3 mmol.L^{-1} de xilose, pH 6,8 a 55°C.

Na aplicação da cultura isolada VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar, obteve-se resultados de produção de metabólitos, tanto para a condição de cultura pura, quanto na condição de bioaumentação. Destaca-se o crescimento da cultura isolada VCS6 em alto teor de matéria orgânica (31,9 g.L^{-1} de DQO) em vinhaça de cana-de-açúcar. O rendimento em hidrogênio foi considerado significante em relação ao obtido por consórcios microbianos em reatores alimentados com vinhaça, sendo 1,22 mmol-H_2.g^{-1}DQO em cultura pura e 1,03 mmol-H_2.g^{-1}matéria orgânica em condição de bioaumentação.

Referências Bibliográficas

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC-FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid – Liquid Extraction (LLE). American Journal of Analytical Chemistry 5, 406–414.

Adorno, M.A.T., Tomita, I., 2014. Development and validation of a method for nitrogen, hydrogen, methane and carbon dioxide determination by GC / DCT, in: Brazilian Chemical Society Annual Metting.

Ciranna, A., Pawar, S.S., Santala, V., Karp, M., Niel, E.W.J. Van, 2014. Assessment of metabolic flux distribution in the thermophilic hydrogen producer Caloramator celer as affected by external pH and hydrogen partial pressure. Microbial Cell Factories 13, 1–15.

DSMZ, 2018. URL www.dsmz.de

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilto, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28, 350–356.

Elia Neto, A., 2016. Novas Tecnologias para a Vinhaça. CAMPETRO Energy 2016.

Ferraz, N., Koyama, M.H., Araújo, M.M. De, Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse Ant o 89. doi:10.1016/j.renene.2015.11.064

Fito, J., Tefera, N., Kloos, H., Van Hulle, S.W.H., 2019. Physicochemical Properties of the Sugar Industry and Ethanol Distillery Wastewater and Their Impact on the Environment.

Sugar Tech 21, 265–277. doi:10.1007/s12355-018-0633-z

Fuess, L.T., Ferraz Júnior, A.D.N., Machado, C.B., Zaiat, M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. Bioresource, 247, 426–433. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.121

Fuess, L.T., Rodrigues, I.J., Garcia, M.L., Fuess, L.T., Rodrigues, I.J., Fertirrigation, M.L.G., 2017. Fertirrigation with sugarcane vinasse : Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. Journal of Environmental Science and Health, Part A 52, 1063–1072. doi:10.1080/10934529.2017.1338892

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J., 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. Applied and Environmental Microbiology 66, 5488–5491. doi:10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000

Hoster, F., Daniel, R., Gottschalk, G., 2001. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase 192, 187–192.

Khamtib, S., Reungsang, A., 2012. Biohydrogen production from xylose by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19 isolated from hot spring sediment. International Journal of Hydrogen Energy 37, 12219–12228. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.06.038

Lazaro, C.Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesche, M.B.A., 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. International Journal of Hydrogen Energy 39, 6407–6418. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.058

Onyenwoke, R.U., Wiegel, J., 2009. *Thermoanaerobacterium*, in: Se Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.. (Ed.), Bergey´s Manual of Sistematic Bacteriology. Springer International Publishing, Athenas, GA.

Packard, H., Taylor, Z.W., Williams, S.L., Guimarães, P.I., Toth, J., Jensen, R. V., Senger, R.S., Kuhn, D.D., Stevens, A.M., 2019. Identification of soil bacteria capable of utilizing a corn ethanol fermentation byproduct. Plos One 14, e0212685. doi:10.1371/journal.pone.0212685

Ratti, R.P., Delforno, T.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2015. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. International Journal of Hydrogen Energy 40, 6296–6306. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.03.067

Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D., 2008. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. International Journal of Hydrogen Energy 33, 6124–6132. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.107

Saripan, A.F., Reungsang, A., 2013. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1 : Culture conditions optimization using xylan as the substrate. International Journal of Hydrogen Energy 38, 6167–6173. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.130

Shang, S., Qian, L., Zhang, X., Li, K., Chagan, I., 2013. *Themoanaerobacterium calidifontis* sp . nov ., a novel anaerobic , thermophilic , ethanol - producing bacterium from hot springs in China. Arch Microbiol 195, 439–445. doi:10.1007/s00203-013-0895-5

Silva, V., Ratti, R.P., Sakamoto, I.K., Andrade, M.V.F., Varesche, M.B.A., 2018. Biotechnological products in batch reactors obtained from cellulose, glucose and xylose using thermophilic anaerobic consortium. Renewable Energy 125, 537–545. doi:10.1016/j.renene.2018.02.124

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks p. Biomass and Bioenergy 19, 63–102.

REMOCÃO E DEGRADACÃO DE NONILFENOL ETOXILADO EM CO-DIGESTÃO COM ESGOTO DOMÉSTICO E ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVANDERIA COMERCIAL EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO

Jeny Elihut Ventura Gutiérrez [1]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP

Resumo. *Nesta pesquisa pretende-se avaliar a remoção e degradação de nonilfenol etoxilado (NFEO), a partir da co-digestão de esgoto doméstico e água residuária de lavanderia comercial em Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (EGSB) em escala piloto. Para identificação e quantificação de NFEO utiliza-se NFEO 95 (CAS 27177-08-8) e cromatografia líquida de alta eficiência. Na primeira etapa, o reator foi alimentado apenas com substrato sintético e operado com TDH de 40 h, velocidade ascensional de 7 m.h^{-1} em temperatura ambiente (23 ± 4,2ºC). Em seguida, na etapa II, o reator foi alimentado com substrato sintético contendo concentração de 3,5 ± 1,0 mg.L^{-1} de NFEO. Na etapa III, a concentração de NFEO adicionada foi de 8,21± 1,8 mg.L^{-1}. Verificou-se elevada eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO ao longo da operação - acima de 95%, para 482,1 ± 50,2 mg DQO.L^{-1} afluente. Da mesma forma, verificou-se satisfatória eficiência de remoção do NFEO - 82,2 ± 9,2%. A adição de NFEO afetou negativamente a atividade metanogênica.*

Introdução

A ocorrência de micropoluentes no meio aquático tornou-se uma questão mundial de crescente preocupação ambiental. Micropoluentes consistem em um vasto e crescente conjunto de substâncias antropogênicas e naturais tais como produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, hormônios esteróides, surfactantes, produtos químicos industriais, pesticidas e muitos outros compostos emergentes. As atuais estações de tratamento de águas residuárias (ETAR) não foram projetadas para remover tais substâncias (Luo et al., 2014).

Surfactantes formam parte de um grupo de substâncias químicas produzidas em grande escala e utilizados diariamente em várias atividades industriais e domésticas. Após utilização, a maioria desses compostos e seus subprodutos de degradação são descarregados em estações de tratamento de esgoto (ETE) ou diretamente nos corpos de água, solo e sedimento (Ivanković & Hrenović, 2010). Uma vez presentes nas diferentes matrizes ambientais, podem sofrer vários processos físico-químicos (por exemplo, sorção, degradação) e migrar livremente no ambiente. Além disso, estes compostos podem se acumular em organismos vivos (bioacumulação), e causar efeitos indesejáveis sobre os elementos bióticos dos ecossistemas (por exemplo, toxicidade, perturbação do equilíbrio endócrino), assim como podem causar o aumento da solubilidade de poluentes orgânicos em fase aquosa, sua migração e acúmulo em diferentes compartimentos ambientais (Olkowska, Ruman, & Polkowska, 2014).

Surfactantes (Aniônicos, não iônicos, catiônicos e anfotéricos) são utilizados amplamente na indústria de detergentes, cosméticos, metalurgia, papel e indústria do couro, sendo seu maior mercado as aplicações domésticas. Um dos principais grupos de surfactantes não-iônicos são alquilfenois etoxilados (AFEO). Os dois principais tipos de AFEO são nonilfenol etoxilados (NFEO) e octilfenol etoxilados (OFEO), que representam aproximadamente 80% e 20% da produção total de AFEO, respectivamente (Morales, Padrón, Ferrera, & Rodríguez, 2009).

NFEO e seus produtos de degradação podem mimetizar estrogênios naturais e perturbar os sistemas endócrinos de muitos organismos, principalmente aquáticos. Estes agentes exógenos interferem ou interrompem a síntese normal, secreção, transporte, união e metabolismo dos hormônios naturais; eventualmente desregulando os mecanismos homeostáticos, reprodução e desenvolvimento dos organismos (Annamalai & Namasivayam, 2015).

A partir de 2007, no Laboratório de Processos Biológicos – LPB (USP-São Carlos), iniciou-se uma série de estudos visando à remoção de surfactantes aniônicos como (LAS) e não-iônicos como álcool linear etoxilado (LAE) em reatores anaeróbios. Ao longo desses anos de pesquisa, muito se avançou a respeito da remoção de LAS em água residuária de lavanderia em condição fermentativa-metanogênica e facultativa. Dentre os reatores estudados, observou-se maior eficiência de remoção de LAS Padrão (acima de 90%) em reator de leito fluidificado com areia como material suporte (Oliveira et al., 2010). Todavia, o custo de bombeamento para fluidificação de um leito de areia torna essa configuração reacional menos atraente para aplicação em escala real. Desse modo, outra possibilidade é o reator de leito de lodo expandido (Expanded Granular Sludge Bed – EGSB), no qual se utiliza lodo granular, cuja expansão exige menor vazão de bombeamento quando comparado com o leito de areia. As características do EGSB são similares às do reator de leito fluidificado; ou seja, regime de mistura completa, alta relação comprimento-diâmetro e recirculação efluente, adequada para diluir águas residuárias (Seghezzo, Zeeman, van Lier, Hamelers, & Lettinga, 1998).

Oliveira et al. (2010), J. K. Braga et al. (2015), T. Delforno, Moura, Okada, Sakamoto, and Varesche (2015) e Macedo et al. (2015) verificaram adequada remoção de LAS em reatores biológicos, bem como redução da carga poluidora dos efluentes de lavanderias comerciais. Entretanto, J. Braga and Varesche (2014) verificaram a presença de surfactantes não iônicos em águas residuárias de lavanderia tais como NFEO. A presença destes compostos químicos em águas residuáriais também foi verificada por Eriksson, Auffarth, Henze, and Ledin (2002). Esses autores observaram que os surfactantes utilizados em detergentes de lavagem de roupas e lava-louças, além dos produtos de higiene pessoal são os principais compostos das águas residuárias cinzas.

Desta forma, vê-se a necessidade de estudos que visem à degradação deste surfactante, bem como possibilitem a redução da toxicidade de amostras ambientais contaminadas. A partir dessas considerações pretende-se nesta pesquisa avaliar a remoção e degradação de NFEO em reator EGSB em condição fermentativa-metanogênica. Para tanto, utilizou-se método analítico para a determinação deste composto em matrizes contaminadas (esgoto doméstico e água residuária de lavanderia), para posteriormente monitorar sua remoção no reator.

Material e Métodos

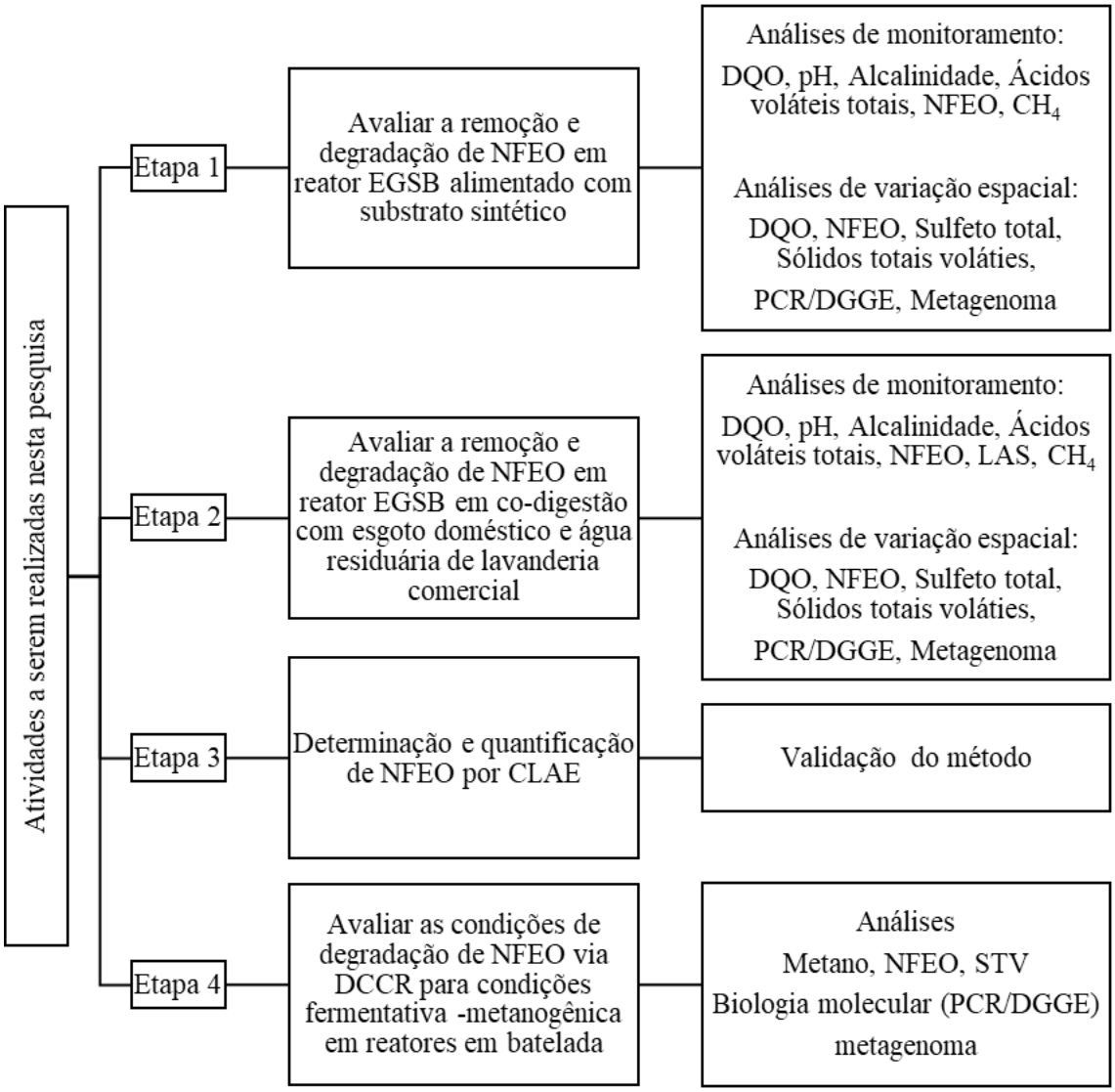
As etapas a serem abordadas nesta pesquisa estão apresentadas na Figura 1. O reator EGSB está sendo operado há 374 dias. Ao longo deste período, a operação do reator foi dividida em quatro etapas. Na primeira etapa (adaptação) o reator foi alimentado somente com substrato sintético. A partir da segunda etapa adicionou-se NFEO em concentração teórica de 5 a 10 $mg.L^{-1}$. Durante todo o período, análises de monitoramento foram realizadas periodicamente.

Nonilfenol etoxilado

Para o desenvolvimento desta pesquisa, utiliza-se o surfactante não-iônico, Nonilfenol Etoxilado 95, grau técnico, CAS Nº 27177-08-8, fórmula molecular $C_9H_{19}C_6H_4(OCH_2CH_2)nOH$, com um valor de n = 10, obtido na Destilaria Bauru (Catanduva/SP). A solução estoque foi preparada a partir de NFEO 95 dissolvido em água

ultrapurificada e armazenada a 4ºC em frascos âmbar, protegidos da luz e renovados periodicamente.

Figura 1: Esquema ilustrativo das etapas a serem abordadas nesta pesquisa.



Inóculo e meio sintético

O reator foi inoculado com lodo granular anaeróbio proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, instalado na Avícola Ideal, Pereira/SP. A carga orgânica aplicada no reator foi de 0,065 g DQO.$gSTV^{-1}d^{-1}$. O substrato sintético utilizado como base da alimentação do reator contém extrato de levedura (300 $mg.L^{-1}$), etanol (100 $mg.L^{-1}$), bicarbonato de sódio (400 $mg.L^{-1}$), NaCl (50 $mg.L^{-1}$), $MgCl_2.6H_2O$ (1,4 $mg.L^{-1}$), e $CaCl_2.2H_2O$ (0,9 $mg.L^{-1}$). As quantidades de cada componente foram escolhidas de forma a obter DQO média de 400 $mg.L^{-1}$.

Reator de leito granular expandido

O reator EGSB usado neste trabalho tem 3,5 m de altura e 150 mm de diâmetro, resultando em um volume total útil de 62 L. Está construído em PVC, excetuando-se a região de expansão que foi confeccionada em acrílico. O reator está dotado de um distribuidor de vazão na sua base e um dispositivo no topo que garante a separação entre as fases (sólida, líquida e gasosa) e um medidor de biogás.

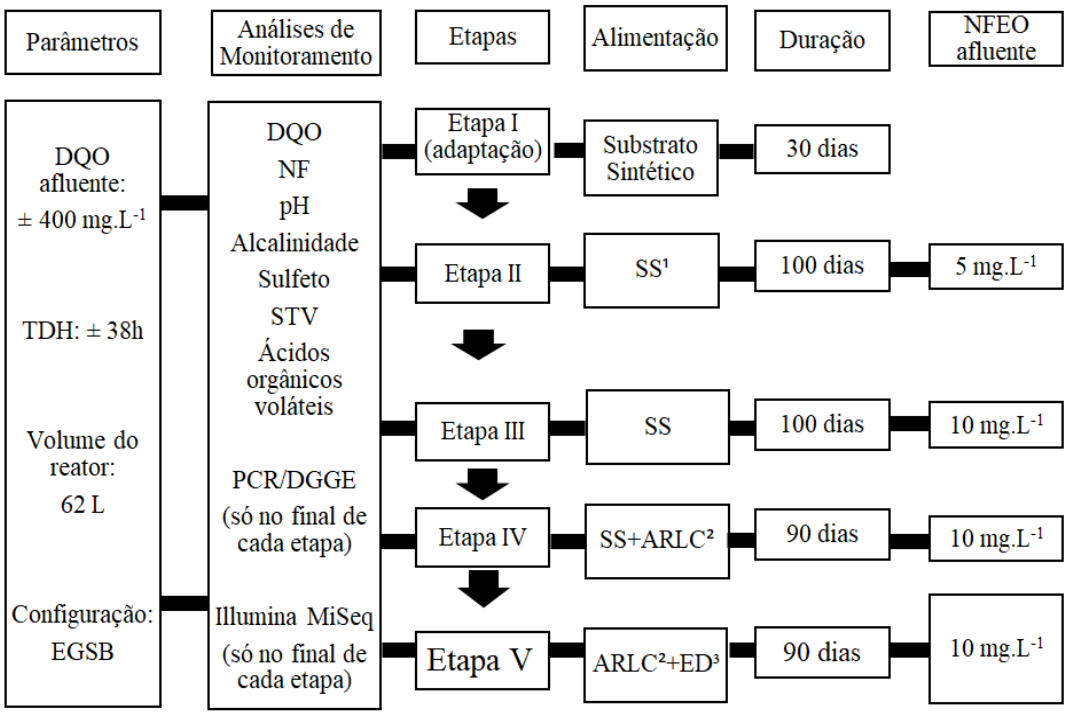
O reator é alimentado com vazão de 1,55 $L.h^{-1}$, resultando em tempo de detenção hidráulica (TDH) de 40 h. A vazão de recirculação aplicada foi de 126 $L.h^{-1}$, resultando em na velocidade ascensional de 7 $m.h^{-1}$.

Adaptação da biomassa e adição de NFEO

Após o período de adaptação da biomassa ao substrato sintético (etapa I), adicionou-se NFEO de forma gradual, permitindo, assim, a adaptação dos microrganismos ao composto. Inicialmente, NFEO comercial foi adicionado na concentração de 0,5 $mg.L^{-1}$ e logo foi-se acrescentando de 1,0 $mg.L^{-1}$ em 1,0 $mg.L^{-1}$, até atingir a concentração de 5 $mg.L^{-1}$, que foi a concentração definida para teste na etapa II. Na etapa III a concentração de NFEO foi aumentada até aproximadamente 10 $mg.L^{-1}$.

Nas próximas etapas de operação, a alimentação do reator será realizada com água residuária de lavanderia comercial diluída em substrato sintético, de forma a obter concentração aproximada de NFEO de 10 $mg.L^{-1}$ (Etapa IV). Na etapa V, pretende-se avaliar a remoção e degradação de NFEO em codigestão com esgoto doméstico e água residuária de lavanderia comercial, de forma a obter concentração aproximada de 10 $mg.L^{-1}$ de NFEO na composição afluente. As atividades a serem realizadas neste trabalho descrevem-se no fluxograma apresentado na Figura 2.

Figura 2: Fluxograma experimental da operação do EGSB.



¹Substrato sintético (SS); ²Água residuária de lavanderia comercial (ARLC); ³Esgoto doméstico (ED)

Determinação e quantificação de nonilfenol etoxilado por cromatrografia líquida de alta eficiência

Para determinação e quantificação do NFEO, utiliza-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com as seguintes condições: fase móvel (água ultrapurificada/acetonitrila), fase estacionária (Agilent Eclipse XDB-C8, 5µm, 4,6 x 150 mm), sistemas de eluição isocrática, detector de Fluorescência, temperatura de 40ºC, volume de injeção 100 µL e velocidade do fluxo 0,8 $mL.min^{-1}$.

Análises físico-químicas e cromatográficas

Análises físico-químicas e cromatográficas do afluente e efluente do reator estão sendo realizadas duas vezes por semana, excetuando-se de sólidos totais voláteis e ácidos orgânicos voláteis, que são realizados uma vez por semana (Tabela 1).

Tabela 1: Análises de monitoramento do reator EGSB.

Análise	Método	Referência
DQO bruta e filtrada	Espectrofotométrico	(APHA, 2005)
pH	Potenciométrico	(APHA, 2005)
Sulfeto[1]	Espectrofotométrico	(APHA, 2005)
Sólidos Totais Voláties	Gravimétrico	(APHA, 2005)
Alcalinidade[2]	Titulométrico	
Ácidos orgânicos voláteis	CLAE	(Penteado et al., 2013)
NFEO	CLAE	Metodología em desenvolvimento
LAS[1]	CLAE	(Duarte et al., 2006)
Metano	CG	(Perna et al., 2013)
Vazão	Volumétrico	

[1]Análises a serem realizados apenas nas próximas etapas de operação do reator (alimentação com água residuária de lavanderia e esgoto doméstico). [2]A determinação da alcalinidade foi realizada de acordo com Dilallo e Albertson (1961) modificada por Ripley et al., (1986).

A composição do biogás foi determinada por cromatografia gasosa segundo metodologia informada por Perna et al. (2013). O equipamento utilizado foi Shimadzu®, modelo GC-2010 com detector de condutividade térmica (DCT) e gás argônio como gás de arrastre. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram de 220°C, 230°C e 130°C, respectivamente. A produção de biogás foi medida continuamente com um medidor de gás úmido marca Ritter® modelo MilliGascounters.

Resultados e Discussão

Remoção de matéria orgânica

Ao longo deste período de operação do reator, observou-se elevada eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO filtrada, como pode ser observado na Tabela 2 e Figura 2.

Ressalta-se que a remoção de matéria orgânica manteve-se satisfatória após a adição de NFEO. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por T. P. Delforno, Okada, Polizel, Sakamoto, and Varesche (2012) que avaliaram a degradação de LAS, em reator EGSB, alimentado com meio mineral em presença dos co-substratos etanol e metanol. Os autores obtiveram eficiências de remoção de 97,6 ± 2,9% e 96,3 ± 3,4% para 573 ± 140 mg DQO.L^{-1} e 812 ± 92 mg DQO.L^{-1} afluente, na ausência de surfactante - e após adicionar 14,0 ± 1,3 mg.L^{-1} de LAS -, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2010), Andrade, Sakamoto, Corbi, Silva, and Varesche (2017) e Macedo et al. (2015) que avaliaram a remoção de LAS em diferentes configurações reacionais (RALF)

Tabela 2: Valores de DQO afluente e efluente, COV e eficiência de remoção.

Etapa	DQO afluente ($mg.L^{-1}$)	DQO efluente ($mg.L^{-1}$)	COV ($mg\ DQO.L^{-1}.d^{-1}$)	Remoção (%)
I	463,9 ± 31,0	12,9 ± 9,8	278,3 ± 18,6	97,2 ± 2,2
II	474,2 ± 31,2	18,7 ± 8,8	291,7 ± 16,4	96,5 ± 1,8
III	485,8 ± 39,9	29,2 ± 18,1	286,3 ± 24,5	93,9 ± 4,0

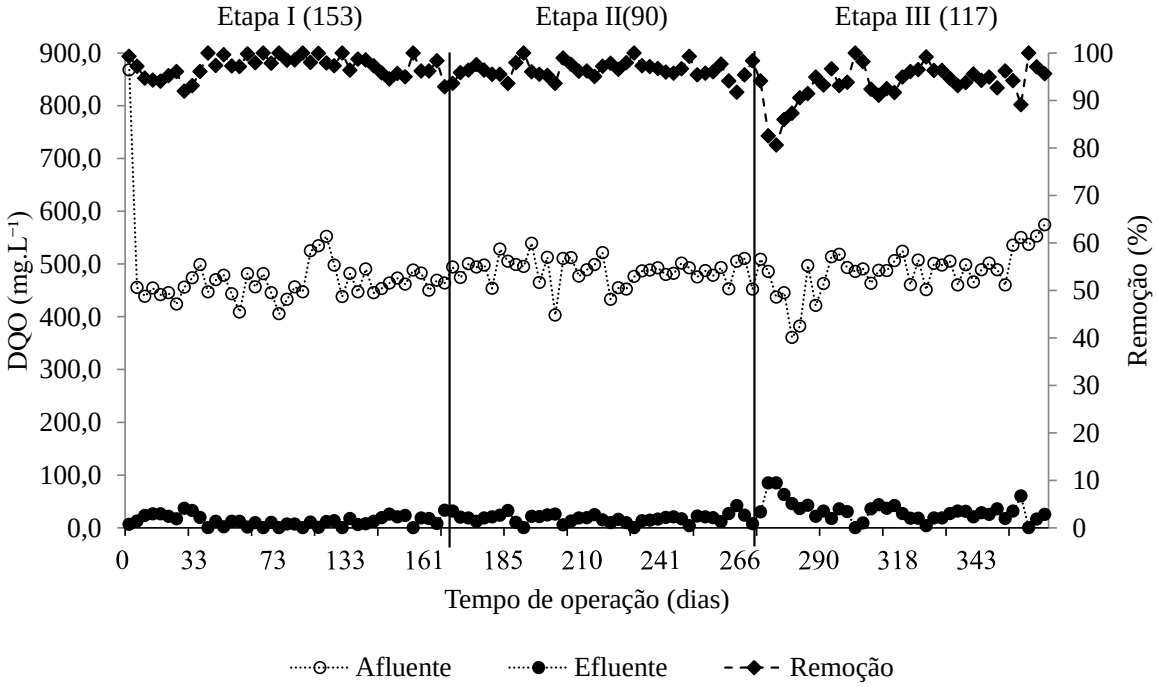


Figura 3: Variação temporal da $DQO_{filtrada}$ afluente e efluente e eficiência de remoção.

Considera-se que o reator EGSB tem capacidade de tratar altas taxas de carga orgânica volumétrica. No entanto, também tem sido observado bom desempenho no tratamento de águas residuárias de baixa carga, por exemplo, no trabalho realizado por Chu et al. (2005) que avaliaram reator EGSB no tratamento de águas residuárias domésticas. O reator foi operado em TDH de 3,5 a 5,7 h e temperatura na faixa de 11 a 25 ºC, sendo obtido remoção de 85 a 96% para 1,6 a 4,5 g $DQO.L^{-1}.d^{-1}$ de carga orgânica volumétrica aplicada. Neste trabalho, entretanto, aplicou-se carga orgânica volumétrica consideravelmente menor (aproximadamente 278,3 ± 18,6 mg $DQO.L^{-1}.d^{-1}$), observando-se bom desempenho do reator.

Remoção de NFEO

Na segunda etapa (90 dias), após o período de adaptação da biomassa ao substrato sintético, foi adicionado 3,5 ± 1,0 $mg.L^{-1}$ de NFEO no substrato de alimentação, para o qual observou-se concentração média efluente de 0,6 ± 0,3 $mg.L^{-1}$, resultando em eficiência de remoção de 82,2% ± 9,2%. Entretanto, na etapa III aumentou-se a concentração de NFEO adicionada para 8,21± 1,8 $mg.L^{-1}$ verificando-se eficiência de remoção de 68,5 ± 9,3% (Tabela 3 e Figura 4). A eficiência de remoção obtida foi maior que a obtida em outros trabalhos, por exemplo, Gao, Li, Guan, Li, and Ren (2014) obtiveram remoção de 39%, 46% e 53% para concentrações de NF, NF1EO e NF2EO na faixa de 1,8 a 2,0 $\mu g.L^{-1}$ via digestão anaeróbia em estação de tratamento de esgoto (ETE) em escala real.

Tabela 3: Valores de NFEO afluente e efluente, e eficiência de remoção.

Etapa	Afluente ($mg.L^{-1}$)	Efluente ($mg.L^{-1}$)	Remoção (%)
II	3,5 ± 1,0	0,6 ± 0,3	82,2 ± 9,2
III	8,21 ± 1,8	2,6 ± 0,8	68,5 ± 9,3

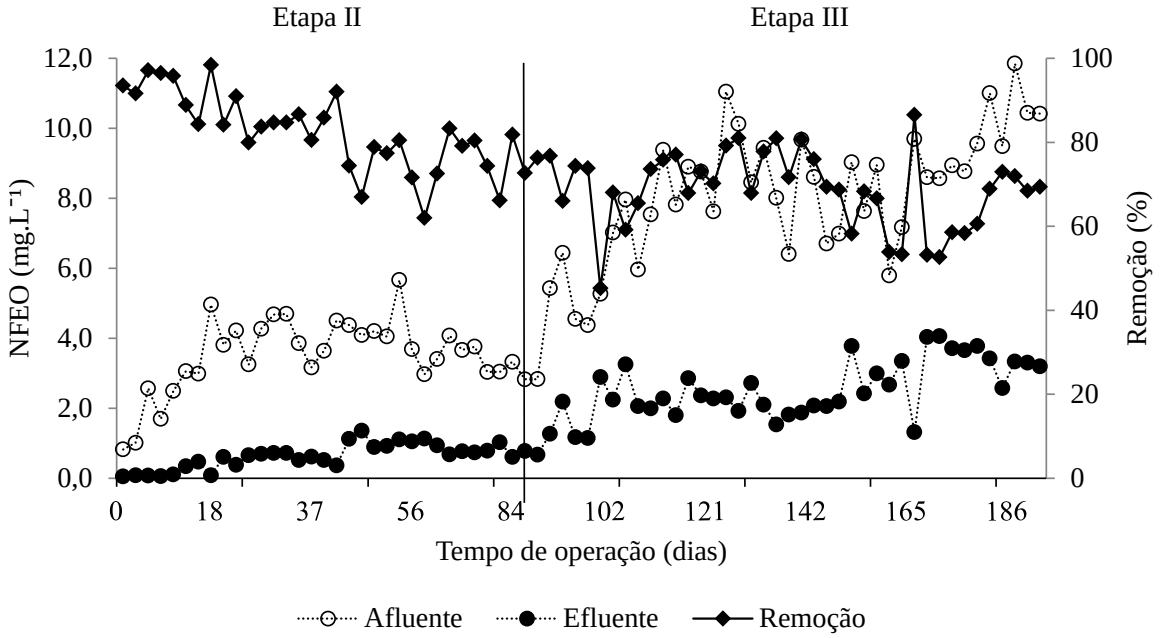


Figura 4: Variação temporal do NFEO afluente e efluente e eficiência de remoção.

Faria, Delforno, Okada, and Varesche (2017) também avaliaram degradação anaeróbia de LAS em reator EGSB e observaram eficiência de remoção de 77,2 ± 14.9% para 15.3 ± 4,9 $mg.L^{-1}$ de LAS presente em água residuária de lavanderia comercial. O reator foi operado com TDH de 38 h, velocidade ascensional de $4.m.h^{-1}$ em condições mesofílicas (30ºC). Da mesma forma, Centurion et al. (2018) observaram eficiência de remoção de 79.0 ± 31.8% para 4.0 ± 5.5 $mg.L^{-1}$ presente em água de lavanderia diluída em esgoto doméstico, utilizando configuração reacional idêntica à deste estudo (TDH 40 h, velocidade ascensional $4.m.h^{-1}$ a temperatura ambiente).

NF e NFEO de cadeia curta são altamente hidrofóbicos, com valores de coeficiente de partição octanol/água (log Kow) de aproximadamente 4 (Brix, Hvidt, & Carlsen, 2001; Gao et al., 2014). Assim, tais compostos poderiam estar associados à matéria orgânica nos sedimentos ou à fase particulada das águas residuárias (Gatidou, Thomaidis, Stasinakis, & Lekkas, 2007). De fato, altas concentrações destes compostos têm sido encontradas em sedimentos fluviais e lodo de ETE. Bouki, Dvorakova, and Diamadopoulos (2010) observaram adsorção de NF em lodo de ETE de até 99% da concentração adicionada (4,5 $mg.L^{-1}$) em apenas 5 horas. Desse modo, é provável que uma parte do NFEO adicionado ao reator tenha sido removida por adsorção.

Além disso, é provável que parte do NFEO adicionado no reator tenha ficado aderido às superfícies dos materiais que compõem o sistema devido a suas características hidrofóbicas. Logo, ensaios de adsorção e balanço de massa global serão realizados para determinar a quantidade de NFEO adsorvido no sistema ao longo da operação do reator. Em estudos realizados por Di Gioia et al. (2009) avaliaram a biodegradação aeróbia de NF e NFEO. Após balanço de massa global, verificou-se que aproximadamente 56% do NF

adicionado (30 mg) no foi transferida para o reator. Sendo que, 53% ficou retida no registro de alimentação (11,12 mg) e 3% na linha de entrada de ar (0,57 mg).

Produção de metano

A produção volumétrica de metano foi calculada para todo o período de operação e os resultados são apresentados na Tabela 4. Observou-se produção média de metano de 5,72 ± 0,6 $LCH_4.d^{-1}$ na etapa I. Entretanto, a partir da adição do surfactante, a produção de metano diminui consideravelmente até 0,70 ± 0,1 $L.d^{-1}$ na etapa III. Aparentemente, a adição de NFEO (3,5 ± 1 a 8,2 ± 2 $mg.L^{-1}$) afetou significativamente a população metanogênica no processo. Da mesma forma, Feitkenhauer and Meyer (2002) observaram diminuição de produção de metano de 50% na presença de surfactante (aproximadamente 58 g decil-sulfato de sódio. Kg de biomassa seca). Todavia neste trabalho, a diminuição observada foi muito maior (acima de 80%).

Tabela 4: Produção de CH_4 monitorada no reator.

Etapa	Biogás	Produção de CH_4 ($L.d^{-1}$)
I	CH_4	5,72 ± 0,58
	CO_2	0,23 ± 0,06
II	CH_4	2,50 ± 1,98
	CO_2	0,21 ± 0,04
III	CH_4	0,70 ± 0,45
	CO_2	0,03 ± 0,03

Em contrapartida não foi observada mudança significativa na composição de biogás durante o período monitorado (Tabela 5). Sabe-se que variação abrupta na composição do biogás, principalmente o aumento da porcentagem de dióxido de carbono, é sinal de instabilidade no sistema. Portanto, pode se inferir que a pesar de ter diminuído a atividade metanogênica o processo permaneceu estável durante todo o período monitorado.

Tabela 5: Composição do biogás no reator.

Etapa	Biogás	%
I	CH_4	96,57 ± 0,96
	CO_2	3,43 ± 0,96
II	CH_4	95,37 ± 1,16
	CO_2	4,63 ± 1,16
III	CH_4	95,56 ± 1,10
	CO_2	4,48 ± 1,10

O extrato de levedura é considerado fonte eficaz de nitrogênio para o crescimento celular (Hakobyan, Gabrielyan, & Trchounian, 2012). Quando adicionado em baixas concentrações, é conhecido por estimular o crescimento de muitos microrganismos metanogênicos (Garcia, Patel, & Ollivier, 2000). De fato, em estudo realizado por Wagner, Hohlbrugger, Lins, and Illmer (2012) avaliaram a influência de diferentes fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura, caseína, casaminoácidos, peptonas, extrato de carne, leite desnatado, gelatina) na produção de metano em processo de digestão anaeróbia. Os autores observaram maior produção de metano na presença de extrato de levedura (16 $g.L^{-1}$). Deste modo, em relação a este trabalho, a suplementação com extrato de levedura (30 $g.L^{-1}$) pode ter contribuído para a manutenção da população metanogênica no sistema.

Conclusões

O reator EGSB apresentou um bom desempenho na remoção de NFEO (média de 82,2 ± 9,2%) e de DQO (média de 95,8 ± 3,3%), sendo que esta não foi afetada pela adição do surfactante na faixa testada (3,5 ± 1 a 8,2 ± 2 $mg.L^{-1}$).

A produção de metano foi elevada na etapa 5,72 ± 0,6 $L.d^{-1}$. Entretanto, após adição de NFEO (etapa II e III), observou-se uma diminuição considerável na produção. Apesar disso, a composição do biogás manteve-se estável, verificando-se, por conseguinte, estabilidade do processo. É provável que a suplementação de fonte nutricional complexa como o extrato de levedura, seja um fator importante na optimização da produção de metano no processo da digestão anaeróbia.

Referências Bibliográficas

Andrade, M. V. F., Sakamoto, I. K., Corbi, J. J., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A., 2017. Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. Bioresource technology. 224, 246-254.

Annamalai, J., & Namasivayam, V., 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife. Environment international. 76, 78-97.

Bouki, C., Dvorakova, M., & Diamadopoulos, E., 2010. Adsorption of nonylphenol on activated sludge biomass under aseptic conditions. CLEAN–Soil, Air, Water. 38(5-6), 516-520.

Braga, J., & Varesche, M., 2014. Commercial laundry water characterisation. American Journal of Analytical Chemistry. 5(01), 8.

Braga, J. K., Motteran, F., Macedo, T. Z., Sakamoto, I. K., Delforno, T. P., Okada, D. Y., Varesche, M. B. A., 2015. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in commercial laundry wastewater by an anaerobic fluidized bed reactor. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 50(9), 946-957.

Brix, R., Hvidt, S., & Carlsen, L., 2001. Solubility of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. On the possible role of micelles. Chemosphere. 44(4), 759-763.

Centurion, V., Moura, A., Delforno, T., Okada, D., Dos Santos, V., Varesche, M., & Oliveira, V., 2018. Anaerobic co-digestion of commercial laundry wastewater and domestic sewage in a pilot-scale EGSB reactor: The influence of surfactant concentration on microbial diversity. International Biodeterioration & Biodegradation. 127, 77-86.

Delforno, T., Moura, A., Okada, D., Sakamoto, I., & Varesche, M., 2015. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. Bioresource technology. 192, 37-45.

Delforno, T. P., Okada, D. Y., Polizel, J., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A., 2012. Microbial characterization and removal of anionic surfactant in an expanded granular sludge bed reactor. Bioresource technology. 107, 103-109.

Di Gioia, D., Sciubba, L., Bertin, L., Barberio, C., Salvadori, L., Frassinetti, S., & Fava, F., 2009. Nonylphenol polyethoxylate degradation in aqueous waste by the use of batch and continuous biofilm bioreactors. Water Research. 43(12), 2977-2988.

Eriksson, E., Auffarth, K., Henze, M., & Ledin, A., 2002. Characteristics of grey wastewater. Urban water. 4(1), 85-104.

Faria, C. V. d., Delforno, T. P., Okada, D. Y., & Varesche, M. B. A., 2017. Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. Environmental technology. 1-9.

Feitkenhauer, H., & Meyer, U., 2002. Anaerobic digestion of alcohol sulfate (anionic surfactant) rich wastewater–batch experiments. Part I: influence of the surfactant concentration. Bioresource technology. 82(2), 115-121.

Gao, D., Li, Z., Guan, J., Li, Y., & Ren, N., 2014. Removal of surfactants nonylphenol ethoxylates from municipal sewage-comparison of an A/O process and biological aerated filters. Chemosphere. 97, 130-134.

Garcia, J.-L., Patel, B. K., & Ollivier, B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. Anaerobe. 6(4), 205-226.

Gatidou, G., Thomaidis, N. S., Stasinakis, A. S., & Lekkas, T. D., 2007. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1138(1-2), 32-41.

Hakobyan, L., Gabrielyan, L., & Trchounian, A., 2012. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by Rhodobacter sphaeroides strains from mineral springs. International Journal of Hydrogen Energy. 37(8), 6519-6526.

Ivanković, T., & Hrenović, J., 2010. Surfactants in the environment. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 61(1), 95-110.

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Wang, X. C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. Science of the Total Environment. 473, 619-641.

Macedo, T., Okada, D., Delforno, T., Braga, J., Silva, E., & Varesche, M., 2015. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. Bioprocess and biosystems engineering. 38(10), 1835-1844.

Morales, T. V., Padrón, M. T., Ferrera, Z. S., & Rodríguez, J. S., 2009. Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 28(10), 1186-1200.

Oliveira, L. L., Costa, R. B., Okada, D. Y., Vich, D. V., Duarte, I. C. S., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A., 2010. Anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in fluidized bed reactor by microbial consortia in different support materials. Bioresource technology. 101(14), 5112-5122.

Olkowska, E., Ruman, M., & Polkowska, Ż., 2014. Occurrence of surface active agents in the environment. Journal of analytical methods in chemistry. 2014.

Seghezzo, L., Zeeman, G., van Lier, J. B., Hamelers, H., & Lettinga, G., 1998. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. Bioresource technology. 65(3), 175-190.

Wagner, A. O., Hohlbrugger, P., Lins, P., & Illmer, P., 2012. Effects of different nitrogen sources on the biogas production–a lab-scale investigation. Microbiological research. 167(10), 630-636.

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E HOMOACETOGÊNESE DURANTE A CO-DIGESTÂO DE RESIDUOS DE CAFÉ

Alejandra Carolina Villa Montoya [1]; Edson Luiz Silva[2]; Maria Bernadete A. Varesche [3]

[1] Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento EESC/USP;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar;
[3] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A produção biológica de H_2 a partir de resíduos agrícolas é alternativa interessante, devido a sua abundância e conteúdo de carboidratos e nutrientes. No entanto, a homoacetogênese pode reduzir o rendimento do processo, devido ao consumo do H_2 para a síntese de ácido acético. A ausência de informação sobre a homoacetogênese a partir de resíduos de café limitam seu controle nos reatores, sendo tópico de estudo importante. O proposito deste estudo foi avaliar os fatores que influenciam a produção de H_2 e homoacetogênese com resíduos de café (polpa e casca pré-tratada em reator hidrotérmico e água residuária) e microrganismos autóctones aos resíduos. Os fatores estudados foram pH, headspace, concentração de polpa e casca e de água residuária, aplicando o planejamento fracionado 2^{4-1}. O máximo potencial de produção de H_2 (P) de 179 mL foi observado nas condições de pH 5,5, headspace 40%, concentração de polpa e casca 9 $g.L^{-1}$ e de água residuária de 30 $gDQO.L^{-1}$. Os principais ácidos produzidos foram o ácido acético (120-1.352 $mg.L^{-1}$) e butírico (31-3.684 $mg.L^{-1}$). O H_2 acumulado diminuiu (5-92 mL) e o ácido acético aumentou (1.271-6.142 $mg.L^{-1}$) em todos os ensaios, devido a ocorrência de homoacetogênese.*

Introdução

Os resíduos do processamento do café podem ser usados em processos fermentativos para obtenção de biogás. Por exemplo, a polpa e casca contém alto teor de carboidratos (70%), dos quais 16 - 43% estão na forma de celulose e 7 – 29% de hemicelulose. Em relação a água residuária tem-se elevada concentração de matéria orgânica (17.244 $mgDQO.L^{-1}$), além de macro e micronutrientes (nitrogênio, fosforo e potássio entre 23 e 625 $mg.L^{-1}$) (Bondesson, 2015; Rossmann et al., 2013).

Outra caraterística interessante do uso de resíduos de café para a produção de H_2 e o potencial de fermentação com microrganismos autóctones. Em pesquisas sobre os microrganismos associados o processamento via úmida de café, verificou-se a presença de *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Bacillus* sp. e *Rahnella* sp., bactérias produtoras de H_2 (Feng et al., 2016). No entanto, *Clostridium* sp. também foi observado, o qual tem a capacidade de consumir o H_2 via homoacetogênese.

O controle da homoacetogênese representa grande desafio, devido a sua ocorrência em ampla variedade de processos fermentativos, independente da configuração do reator, origem do inóculo e condições operacionais, consumindo entre 11 e 43% do H_2 presente nos reatores, para a síntese de ácido acético a partir de CO_2 e H_2 (Saady, 2013).

Diante da ausência de informação sobre a codigestão e homoacetogênese com resíduos de café, se faz necessário a realização de estudos aprofundados que permitam mapiar as condições biológicas e físico-químicas mais importantes para a fermentação. Para isto, a aplicação de desenhos fatoriais amplia o conhecimento do processo biológico.

Neste cenário, a motivação deste trabalho foi avaliar os fatores da fermentação na produção de H_2 e homoacetogênese, utilizando resíduos do processamento de café (resíduo de polpa e casca e água residuária) e consórcio de microrganismos autóctones.

Material e Métodos

Codigestão de resíduos de café e homoacetogênese.
Foi realizado um planejamento fracionado 2^{4-1} (Tabela 1) com 4 pontos centrais. O pH, *headspace*, concentração de água residuária e concentração de resíduo de polpa e casca foram ajustadas para cada ensaio segundo a Tabela 1. O volume dos reatores foi de 500 mL, com volume reacional de 300 mL para *headspace* 40%, 250 mL para *headspace* 50% e 200 mL para *headspace* 60%. Os reatores foram inoculados com consórcio microbiano obtido dos resíduos do processamento de café (0,5 $gSSV.L^{-1}$) e alimentados com água residuária e resíduo de polpa e casca. O resíduo de polpa e casca era previamente pré-tratado mediante reator hidrotérmico a severidade 3,5 (180 °C durante 15 min). O *pellet* do consórcio microbiano correspondente a cada ensaio era adicionado e N_2 gasoso foi borbulhado por 5 min nos reatores, sendo fechados com tampa de butila e incubados a 30 °C em ausência de agitação. Os reatores foram operados 9 dias após estabilização da produção de H_2, mediante monitoramento do biogás por cromatografia gasosa. Amostras do início e final da fermentação foram coletadas para a realização de análises físico-químicas e determinação de ácidos orgânicos e álcoois. A presença de metabolismo homoacetogênico também foi verificada mediante a quantificação do H_2 acumulado no *headspace* e síntese de ácido acético por homoacetogênese em 3 momentos diferentes: (1) Homoacetogênese 1: Após 3 d de atingida a estabilização na produção de H_2, (2) Homoacetogênese 2: Após 6 d de atingida a estabilização na produção de H_2 e, (3) Final da fermentação: Após 9 d de atingida a estabilização na produção de H_2. Amostras da fase gasosa e liquida eram coletadas em cada momento, para análise do biogás por cromatográfica gasosa e quantificação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida. Para a determinação da produção de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}) utilizou-se a equação 1 modificada por Luo et al. (2011) (concentrações em mM):

$$Ac_{Homo} = (2[\text{Ácido butírico}] + 2[\text{Ácido acético}] - [\text{Ácido propiônico}] - [H_2])/6 \qquad (\textit{Eq. 1})$$

Tabela 1: Matrix experimental.

Ensaios	Valores codificados				Condições Experimentais			
	pH	*Headspace*	Polpa e casca	Água residuária	pH	*Headspace*	Polpa e casca	Água residuária
						(%)	($g.L^{-1}$)	($g.L^{-1}$)
1	-1	-1	-1	-1	5,5	40	3	10
2	1	-1	-1	1	7,5	40	3	30
3	-1	1	-1	1	5,5	60	3	30
4	1	1	-1	-1	7,5	60	3	10
5	-1	-1	1	1	5,5	40	9	30
6	1	-1	1	-1	7,5	40	9	10
7	-1	1	1	-1	5,5	60	9	10
8	1	1	1	1	7,5	60	9	30
9 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20
10 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20
11 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20
12 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20

PC= Ponto central.

Análises Físico-químicas

Com amostras do início e final da fermentação foram realizadas as análises físico-químicas de carboidratos dissolvidos e pH (APHA, 2005).

Análises cromatográficas. A quantificação de gás H_2 foi realizada por cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu®) através de coluna capilar Carboxen™ 1010 PLOT (30m x 0,53mm, Supelco) com argônio como gás de arraste. Os álcoois foram analisados por

cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu®); utilizando coluna HP-INNOWAX (30m x 0,25mm x 0,25µm) com detector de ionização de chama (FID) usando hidrogênio como gás de arraste, e ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. Ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu®), equipado com bomba LC-10ADvp, injetor automático SIL e 20A HT, forno CT-20A, detector ultravioleta com arranjo de diodos do modelo SCL-M10AVP, e detector com índice de rarefação RID-10A, adicionalmente coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad). O eluente foi uma solução de H_2SO_4 0,005M, a um fluxo de 0,5 mL.min^{-1}, temperatura do forno de 43ºC e injeção de 100 µL.

Análises cinéticas

A produção acumulada de H_2 no *headspace* foi utilizada para ajustar os dados à equação de Gompertz modificada (Equação 2) (Zwietering et al., 1990):

$$H = P.\exp\{-exp[\frac{Rm.e}{p}(\lambda - t) + 1]\} \quad \textit{(Eq. 2)}$$

Sendo: *H*= Produção acumulada de H_2 (mL) no tempo (h), *P*= Potencial máximo de produção de H_2 (mL), *Rm*= Velocidade máxima de produção de H_2 (mL.h^{-1}), *e*=2,718281828, λ=Tempo de início da produção de H_2 (h).

Análises estatísticas. Os efeitos dos fatores foram analisados utilizando o programa *Protimiza Experimental design* para identificar significância estatística (95% de confiança) sobre a cinética de produção de H_2 e homoacetogênese.

Resultados e Discussão

Os maiores valores de *P* de 189, 135 e 97 mL e *Rm* de 5,0, 7,0 e 6,9 mL.h^{-1} foram obtidos nos ensaios 5 (pH 5,5), 2 (pH 7,5) e 8 (pH 6,5), respectivamente (Tabela 1). Por meio da análise estatística não foi evidenciado influência significativa do pH sobre a *P* (α=0,05), portanto, foi possível atingir maior produção de H_2 nos três níveis de pH estudados (pH 5,5, 6,5 e 7,5). Isto porque as condições ótimas de produção de H_2 não depende exclusivamente do pH, mas também de outros fatores ambientais e natureza dos substratos. Neste caso, verificou-se que independente da maior concentração de água residuária (30 gDQO.L^{-1}) adicionada em ambos os ensaios de maior produção de H_2 (ensaios 5 e 2) observou-se fermentação em amplo intervalo de pH (5,5 a 7,5, respectivamente).

Verificou-se aumento significativo de *Rm* (α=0,05) com alteração do pH de 5,5 para 7,5. Valores de 3,1 ± 2,0 mL.h^{-1} foram obtidos em pH 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7), 3,7 ± 2,1 mL.h^{-1} em pH 6,5 (ensaios 9, 10, 11 e 12) e 4,6 ± 1,8 mL.h^{-1} em pH 7,5 (ensaios 2, 4, 6 e 8). Por tanto, valores de pH neutros foram favoráveis para obtenção de alto valor de *Rm*, uma vez que possibilitou maior crescimento celular, consumo de carboidratos e atividade metabólica.

Observou-se aumento dos valores de λ com diminuição do pH de 7,5 para 5,5. Valores de 18,7 ± 3,6 h foram obtidos em pH 7,5 (ensaios 2, 4, 6 e 8), seguidos de 22,5 ± 7,9 h em pH 6,5 (9, 10, 11 e 12) e finalmente 30,9 ± 8,7 h em pH 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7). Como referido anteriormente, pH próximo ao neutro favoreceu maior produção de H_2 (*P* de 189 mL em pH 7,5, ensaio 5) e, portanto, maior capacidade metabólica com consequente diminuição do tempo de adaptação dos microrganismos aos substratos.

A diminuição do *headspace* de 60% para 40% favoreceu aumento significativo de *P* e *Rm* (α=0,05), obtendo-se valores maiores com 40% (189 mL e 5 mL.h^{-1}, respetivamente, no ensaio 5), intermediários com 50% (67 ± 27 mL e 3,7 ± 2,1 mL.h^{-1}, respetivamente, para os ensaios 9, 10, 11 e 12) e baixos com 60% de *headspace* (14 mL e 1,4 mL.h^{-1}, respetivamente, no ensaio 7). Mesmo com pouco volume de *hesdspace* e aumento da pH_2 no meio, o acúmulo de biogás na fração gasosa não impediu o deslocamento do H_2 do meio líquido para o gasoso. Segundo Ciranna et al. (2014), maior pH_2 podem conduzir ao decréscimo na síntese de H_2, levando a mudança de rota para a produção de metabolitos reduzidos, tais como ácido láctico, etanol, butanol e acetona. No entanto, baixa produção de metabólitos reduzidos foram

observadas nos ensaios com *headspace* 40% (por exemplo, no ensaio 5, o ácido láctico e etanol foram observados abaixo do limite de detecção do método), inferindo que, as pH_2 atingidas nestes ensaios não afetaram a síntese deste gás (*P* de 189 mL e *Rm* de 5 $mL.h^{-1}$).

Tabela 2: Parâmetros cinéticos e físico-químicas durante a operação de reatores em batelada para a produção de H_2 com resíduos de café.

Ensaios	Parâmetros cinéticos			Parâmetros físico-químicos			
	P	*Rm*	*λ*	Carboidratos dissolvidos		pH	
	(mL)	($mL.h^{-1}$)	(h)	Inicial ($mg.L^{-1}$)	Final ($mg.L^{-1}$)	Estabilização	Final
1	22	1,4	37,1	607	79	6,7	5,0
2	135	7,0	21,0	2.350	210	8,5	5,0
3	98	4,6	35,5	2.483	174	7,6	5,0
4	18	2,7	15,4	560	133	5,5	5,0
5	189	5,0	32,8	2.633	224	7,7	4,8
6	32	4,2	15,5	545	157	5,7	4,9
7	14	1,4	18,0	525	90	5,7	4,8
8	125	4,4	22,1	2.267	172	8,0	5,1
9 PC	70	2,8	25,7	1.427	133	6,3	5,0
10 PC	70	2,6	15,5	1.167	127	5,9	4,9
11 PC	31	2,6	16,7	1.097	137	7,1	4,8
12 PC	97	6,9	32,1	1.247	267	7,1	5,0

PC= Ponto central, *P* = Potencial máximo de produção de H_2, *Rm* = Velocidade máxima de produção, λ = Tempo de início da fermentação.

Em relação ao volume de *headspace* não foi verificado efeito significativo sobre o λ dentro da faixa estudada. Por exemplo, tempos próximos de 15,4, 15,5, 15,5 h foram obtidos nos ensaios 4, 10 e 6, correspondendo a volumes de *headspace* de 60, 50 e 40%, respectivamente. Possivelmente porque a pH_2 não exerceu efeito direto sobre a velocidade de crescimento da microbiota (Ciranna et al., 2014).

A concentração de polpa e casca aumentou significativamente a *P* (α=0,1). Aumento nos valores de *P* de 68 ± 58 e 67 ± 27 para 90 ± 82 mL foram obtidos utilizando-se 3, 6 e 9 $g.L^{-1}$ de polpa e casca, respectivamente. Do mesmo modo, para maior concentração de polpa e casca foi reduzido o tempo de início da fermentação (λ) de 27,2 ± 10,7 h (3 $g.L^{-1}$) para 22,5± 7,9 h (6 $g.L^{-1}$) e posteriormente para 22,1 ± 7,6 h (9 $g.L^{-1}$).

Verificou-se que maior concentração de polpa e casca tiveram efeito positivo sobre a fermentação, ao representar uma fonte de substrato complexa com alto teor de carboidratos insolúveis, que podem ser aproveitados para a produção de H_2 mediante a hidrólise por enzimas celulolíticas que facilitam sua transformação em material dissolvido. Além disso, este resíduo é obtido em ambientes abertos na fazenda e é constituído da microbiota natural do resíduo que contribuem como inóculo e diminuem o tempo de adaptação dos microrganismos ao substrato. Portanto, maior quantidade de polpa e casca podem ser aplicadas, em concentrações que permitem aumentar a obtenção de bioenergia sem causar efeitos negativos na fermentação.

Observou-se também que o aumento da concentração de água residuária de 10 para 30 $gDQO.L^{-1}$ influenciou significativamente *P*, *Rm* e λ (α=0,05). Obteve-se valores máximos de *P*, *Rm* e λ no ensaio 5 com 30 $gDQO.L^{-1}$ (189 mL, 5 $mL.h^{-1}$ e 32,8 h, respectivamente), seguido do ensaio 12 com 20 $gDQO.L^{-1}$ (97 mL, 6,9 $mL.h^{-1}$ e 32,1 h, respectivamente) e ensaio 6 com 10 $gDQO.L^{-1}$ (32 mL, 4,2 $mL.h^{-1}$ e 15,5 h, respectivamente). Verificou-se a importância da natureza dos resíduos na fermentação, uma vez que água residuária rica em carboidratos dissolvidos tornou-se substrato adequado para a fermentação e contribuiu para aumento das velocidades de produção de H_2. Enquanto, o material lignocelulósico (polpa e casca de café) pode ter sua aplicação limitada, devido à dificuldade no processo de hidrólise

diante de necessidade de ruptura da lignina e estrutura cristalina da celulose (Nissilä et al., 2014).

Em relação ao λ, constatou-se que o aumento da concentração de DQO da água residuária resultou em maior tempo de início da fermentação. Isto pode ser devido à necessidade adicional de enzimas para a conversão do substrato em H_2, além disso, o aumento da concentração da água residuária eleva proporcionalmente a quantidade de fenóis, furfural e 5-hidroximetilfurfural, requerendo maior tempo de adaptação da biomassa para seu posterior crescimento.

Não se observou relação direta da redução de carboidratos com a produção de H_2 (Tabela 2), uma vez que obteve-se similar consumo de carboidratos em ensaios com *P* menor de 98 mL (ensaio 3: redução de carboidratos de 93%, concentração inicial de carboidratos 2.483 $mg.L^{-1}$) e maior de 189 mL (ensaio 5: redução de carboidratos de 91%, concentração inicial de 2.633 $mg.L^{-1}$). Os carboidratos podem ser convertidos em ácidos orgânicos, etanol e H_2 por ampla variedade de espécies de bactérias (Rosales-Colunga and De León Rodríguez, 2014), portanto, pode-se inferir que nos ensaios com maior redução de carboidratos e baixa *P*, ocorreu a síntese de outros compostos dissolvidos (como ácido acético e butírico).

Os principais metabólitos observados nos reatores para produção de H_2 foram os ácidos acético, butírico, propiônico e etanol (Figura 1). O isobutanol, *n*-butanol, ácido isobutírico, isovalérico e valérico foram quantificados nos diferentes ensaios, mas as concentrações obtidas foram inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico, portanto, não foram considerados durante a presente discussão.

Em relação ao pH, verificou-se diminuição do início até estabilização da produção de H_2 nos ensaios 4, 6, 9 e 10 (inicial entre 6,5 e 7,5 e final entre 5,5 e 6,3) e aumento nos outros ensaios (ensaios 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11 e 12, inicial entre 5,5 e 7,5 e final entre 5,7 e 8,5). A diminuição do pH foi consequência da síntese de ácidos orgânicos e álcoois, com produção de 1.299 ± 560 $mg.L^{-1}$ em pH inicial de 7,5 (ensaios 4 e 6) e 3.200 ± 114 $mg.L^{-1}$ em pH inicial de 6,5 (ensaios 9 e 10).

Caso contrário, o incremento do pH (ensaios 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11 e 12) pode ser consequência de reações de consumo de ácido láctico e propiônico com síntese de bicarbonato. Sob tais condições observou-se diminuição para ambos os ácidos (concentração inicial e na estabilização para ácido láctico de 1.685 ± 1987 e 154 ± 227 $mg.L^{-1}$ nos ensaios 1, 5, 7, 8, 11 e 12, e para ácido propiônico de 44 ± 13 e 18 ± 21 $mg.L^{-1}$ nos ensaios 1, 3, 5 e 11, respectivamente).

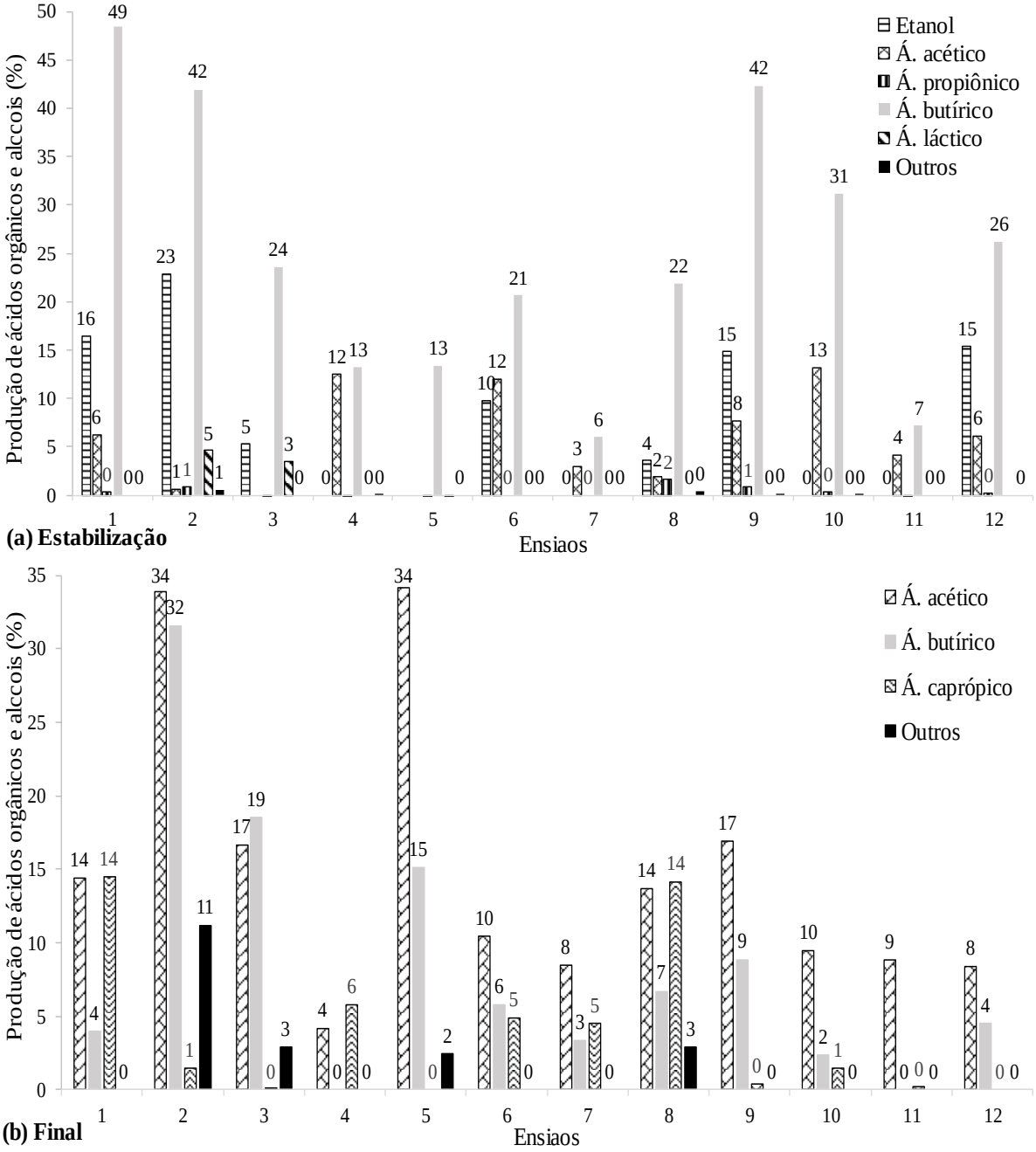
Observou-se produção média de ácido acético de 103 ± 24 $mg.L^{-1}$ em pH 5,5 (ensaios 1 e 7), 790 ± 490 $mg.L^{-1}$ em pH 6,5 (ensaios 9, 10, 11 e 12), e 512 ± 227 $mg.L^{-1}$ em pH 7,5 (ensaios 4, 6 e 8). Alguns autores referenciam que a faixa de pH entre 6,0 a 7,0 favorece a rota deste ácido, justificando maior concentração nos ensaios 9, 10, 11 e 12 (Shanmugam et al., 2014). Não foi observado efeito estatístico significativo (α=0,05) do pH, *headspace* ou concentração de substratos na produção de ácido acético, possivelmente pela complexidade durante a síntese, diversidade de microrganismos, nutrientes, substratos, e parâmetros operacionais que influenciam a produção deste metabólito (Saady, 2013). Adicionalmente, observou-se produção de ácido acético utilizando diferentes compostos encontrados nos resíduos de café, como carboidratos, ácido láctico, propiônico, etanol e fenol na água residuária, mediante rotas acetogênicas, fermentação de carboidratos ou degradação de fenol com co-produção de H_2.

Observou-se efeito significativo da concentração de água residuária na produção de ácido butírico (α=0,05), obtendo-se valor máximo de 3.684 $mg.L^{-1}$ no ensaio 2 com 30 $gDQO.L^{-1}$ e mínimo de 151 $mg.L^{-1}$ no ensaio 7 (10 $gDQO.L^{-1}$). Isto porque maior concentração de água residuária potencializaram a produção de H_2 e, portanto, a co-produção de ácidos orgânicos como o butírico

A importância da água residuária, tanto para a produção de ácido butírico, quanto para a redução de carboidratos e crescimento celular pode ser consequência da presença ácidos

orgânicos neste resíduo, uma vez que estimulam microrganismos celulolíticos, como *Clostridium* sp., cujo crescimento inicial com ácidos orgânicos facilita a adaptação rápida a substratos como a polpa e casca (Lynd et al., 2002).

Figura 1: Produção de ácidos orgânicos e álcoois nos reatores em batelada com resíduos de café na (a) Estabilização da produção de H_2 e (b) Final da fermentação.



Na maioria dos ensaios (ensaios 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) verificou-se aumento da concentração de ácido butírico da fase inicial (937 ± 662 $mg.L^{-1}$) para a exponencial (1.563 ± 782 $mg.L^{-1}$ depois de aproximadamente 30 h de fermentação) e estabilização (2.674 ± 1.639 $mg.L^{-1}$). A predominância da rota butírica na maioria das condições testadas pode ser consequência da bio-aumentação com consórcio microbiano obtido dos resíduos de café, com bactérias produtoras de ácido butírico como um dos principais produtos metabólicos (Lee et al., 2010).

Por outro lado, nos ensaios com *headspace* de 40% (ensaios 1, 2, 5 e 6) observou-se maior produção de ácido butírico (entre 741 e 3.684 $mg.L^{-1}$) quando comparado com os de

50% (entre 32 e 2.426 mg L^{-1}, ensaios 9, 10, 11 e 12) e 60% (entre 151 e 2.319 mg.L^{-1}, ensaios 3, 4, 7 e 8), sem efeito estatístico significativo (α=0,05). Nos ensaios com menor volume de *headspace* (ensaios 1, 2, 5 e 6), a maior pH_2 pode levar a produção predominante deste ácido, uma vez que em altas pressão (>60 Pa) tem-se a produção de ácido butírico como estratégia de prevenção de inibição causada por acúmulo de equivalentes redutores (Angenent et al., 2004).

Verificou-se produção de etanol somente em 3 ensaios (ensaios 2, 6 e 12), dos quais os ensaios 2 e 6 tinham em comum o *headspace* de 40% e pH de 7,5. Nenhum dos fatores da fermentação teve efeito significativo na produção de etanol (α=0,05), embora, volumes de *headspace* de 40% podem ter levado a este resultado, uma vez que maior pH_2 permite à predominância da rota de produção de solventes (Sivagurunathan et al., 2016).

Em alguns casos (ensaios 3, 7, 8 e 10) observou-se aumento da concentração de etanol após aproximadamente 30 h de fermentação e diminuição na estabilização da fermentação, principalmente no ensaio 2, com concentrações de 2.088, 3.003 e 1.838 mg.L^{-1}, respectivamente. Rotas acetogênicas de obtenção de energia a partir do etanol podem ter ocorrido, uma vez que na estabilização da fermentação o esgotamento de substratos (principalmente carboidratos dissolvidos) pode induzir à degradação de alguns ácidos orgânicos e álcoois.

Observou-se produção de ácido propiônico somente nos ensaios 2, 8, 9, 10 e 12, com concentrações finais entre 22 e 215 mg.L^{-1}. Maior produção de H_2 entre 70 e 135 mL nos ensaios 2, 8 e 9 pode ter levado à produção deste metabólito, uma vez que esta rota permite o consumo de 2 mols de H_2 por reação, aliviando o acúmulo de H_2 com ganho energético ($\Delta G°'$ = - 279,4) (Saady, 2013).

Com o aumento da produção de ácido propiônico verificou-se diminuição da síntese de ácido láctico nos ensaios 2, 8 e 9. Por exemplo, no ensaio 8 com a máxima produção de ácido propiônico (225 mg.L^{-1}) constatou-se diminuição da concentração de ácido láctico de 3.908 mg.L^{-1} no início para 53 mg.L^{-1} na estabilização da fermentação. Isto porque o ácido láctico é o principal substrato para a formação de ácido propiônico, levando ao consumo do substrato e H_2 (Saady, 2013), portanto, é uma reação desfavorável para a produção de H_2.

Em relação ao ácido láctico verificou-se aumento após aproximadamente 30 h de fermentação de 1.416 ± 1.080 para 2.884 ± 1.684 mg.L^{-1} na maioria dos ensaios (ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 12) e diminuição para 361 ± 541 mg.L^{-1} na estabilização do processo, possivelmente devido a sua utilização para a produção de ácido butírico. Este resultado foi positivo, uma vez que bactérias do ácido láctico observadas nos resíduos de café (Jung et al., 2011) não foram estimuladas em nenhuma das condições testadas, favorecendo assim rotas de produção de H_2.

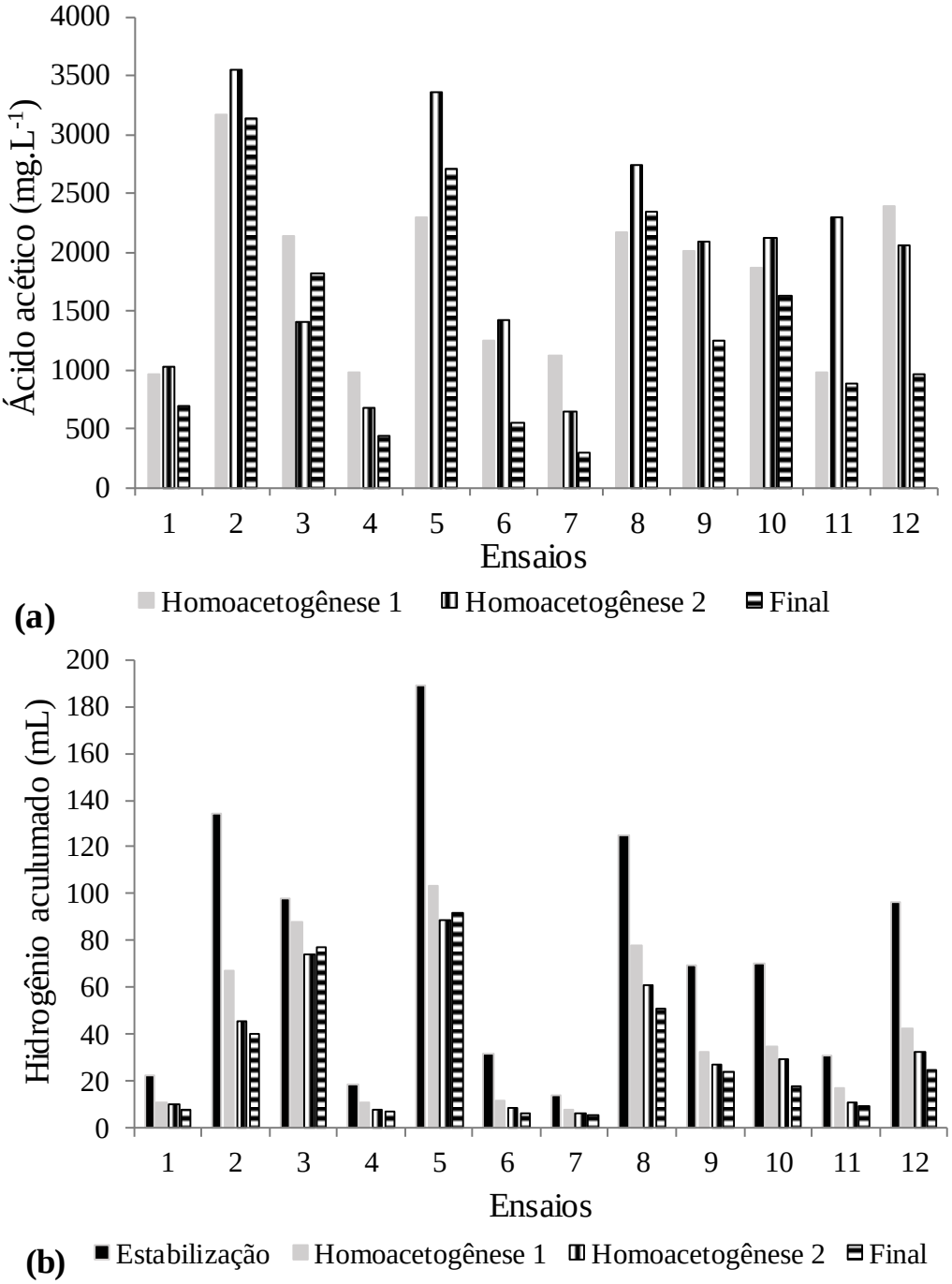
Bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. podem estar presentes no consórcio microbiano, uma vez que a capacidade de transformar ácido láctico em H_2, ácido butírico e CO_2 é amplamente observada nestes microrganismos sob condição de ausência de carboidratos, explicando o consumo deste ácido e maior produção de ácido butírico (Sikora et al., 2013). Para isto, é comum relação sintrófica com bactérias produtoras de ácido láctico (que provavelmente permitiram a produção de ácido láctico nas primeiras 30 h de fermentação), tornando a reação energeticamente favorável (Sikora et al., 2013).

Observou-se em todos os ensaios diminuição do H_2 acumulado de 14-139 mL na estabilização da produção de H_2, para 8-104 mL na Homoacetogênese 1, 6-89 mL na Homoacetogênese 2 e 5-92 mL no final da fermentação. Adicionalmente, produção de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}) de 962-3.169 mg.L^{-1} na Homoacetogênese 1, 638-3.545 mg.L^{-1} na Homoacetogênese 2 e 290-3.139 mg.L^{-1} no final da fermentação. Verificou-se ausência de metanogênese, portanto, as perdas de H_2 acumulado foram associadas principalmente com a homoacetogênese. Possivelmente após a estabilização da fermentação, o esgotamento de substrato e outras condições de estresse podem ter permitido o crescimento autotrófico de bactérias acetogênicas a partir de H_2/CO_2 (Saady, 2013). Similarmente, o

acúmulo de ácidos orgânicos e maior pH_2 permitem que a reação de produção de Ac $_{Homo}$ seja termodinamicamente favorável (Equaçao 3) (Saady, 2013).

$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH_{(Á.\ acético)} + 2H_2O$ ($\Delta G°' = -104$) *(Eq. 3)*

Figura 2: (a) Produção de ácido acético por homoacetogênese e (b) H_2 acumulado nos reatores em batelada com resíduos de café.



Em relação ao pH inicial, observou-se efeito significativo na produção de Ac $_{Homo}$ somente durante a Homoacetogênese 2 (α=0,1). Isto porque o intervalo de pH analisado no desenho fracionado 2^{4-1} (5,5, 6,5 e 7,5) foi diferente do observado no início da homoacetogênese (entre 5,5 a 8,5 na estabilização da produção de H_2), não sendo possível concluir sobre seu efeito na produção de Ac $_{Homo}$. Embora, os valores da faixa citada como a de maior consumo de H_2 por homoacetogênese entre 4,0 a 5,5 (Dinamarca and Bakke, 2009), foram atingidos durante a fermentação como consequência do acúmulo de ácidos orgânicos (Tabela 2), influenciando positivamente a maior atividade homoacetogênica.

Verificou-se com menor volume de *headspace* aumento significativo da produção de Ac $_{Homo}$ (α=0,05). Isto foi evidente durante a Homoacetogênese 2 e no final da fermentação, sendo a produção de Ac $_{Homo}$ maior quando o volume do *headspace* foi de 40% (Homoacetogênese 2: 2.339 ± 1.298 mg.L^{-1}, Final da fermentação: 1.772 ± 1.345 mg.L^{-1}), seguido de *headspace* 50% (Homoacetogênese 2: 2.138 ± 109 mg.L^{-1}, Final da fermentação: 1.179 ± 336 mg.L^{-1}) e finalmente *headspace* 60% (Homoacetogênese 2: 1363 ± 984 mg.L^{-1}, Final da fermentação: 1.221 ± 1.013 mg.L^{-1}). Menores volumes de *headspace* permitem acúmulo de biogás com maior pressão (Sigurbjornsdottir and Orlygsson, 2012), aumentando a disponibilidade de produtos gasosos dissolvidos no meio líquido, os quais podem ser utilizados como substratos para a homoacetogênese e justificam a maior produção de Ac $_{Homo}$ em *headspace* de 40%.

Verificou-se efeito significativo da concentração de água residuária na produção de Ac $_{Homo}$ (α=0,05). Obteve-se maior concentração de Ac $_{Homo}$ em 30 gDQO.L^{-1} (Homoacetogênese 1: 2.444 ± 488 mg.L^{-1}, Homoacetogênese 2: 2.763 ± 968 mg.L^{-1}; Final da fermentação: 2.501 ± 563 mg.L^{-1}) seguido de 20 gDQO.L^{-1} (Homoacetogênese 1: 1.809 696 ± mg.L^{-1}, Homoacetogênese 2: 2.138 ± 109 mg.L^{-1}; Final da fermentação: 1.179 ± 336 mg.L^{-1}) e finalmente 10 gDQO.L^{-1} (Homoacetogênese 1: 1.079 ± 135 mg.L^{-1}, Homoacetogênese 2: 939 ± 367 mg.L^{-1}; Final da fermentação: 492 ± 168 mg.L^{-1}). Isto pode ser devido à maior *P* observada para maior concentração de água residuária, permitindo obter alto teor de H_2 e CO_2 no biogás, substratos utilizados pelos microrganismos homoacetogênicos (Saady, 2013).

Conclusões

As condições que maximizaram a produção de H_2 (maior concentração de substrato e baixo volume de *headspace*) também levaram a maiores produções de ácido acético por homoacetogênese. Por tanto, retirada do biogás na estabilização da fermentação H_2 é recomendável para evitar perdas no H_2 acumulado. Sob todos os fatores físico-químicos da fermentação avaliados foi verificado consumo do H_2 acumulado e síntese de ácido acético via homoacetogênese. A origem do inóculo foi mais importante que os fatores da fermentação na ocorrência de homoacetogênese.

Referências Bibliográficas

Angenent, L.T., Karim, K., Al-dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Domı, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater 22. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001

Bondesson, E., 2015. A nutritional analysis on the by- product coffee husk and its potential utilization in food production.

Ciranna, A., Pawar, S.S., Santala, V., Karp, M., Niel, E.W.J. Van, 2014. Assessment of metabolic flux distribution in the thermophilic hydrogen producer Caloramator celer as affected by external pH and hydrogen partial pressure. Microb. Cell Fact. 13, 1–15.

Dinamarca, C., Bakke, R., 2009. Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications. Water Sci. Technol. 59, 1441–1447. https://doi.org/10.2166/wst.2009.135

Feng, X., Dong, H., Yang, P., Yang, R., Lu, J., Lv, J., Sheng, J., 2016. Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. Curr. Microbiol. 73, 190–195. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1047-3

Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Pereira, M.A., Abreu, A.A., Alves, M.M., 2014. On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. Int. J. Hydrogen Energy 39, 6402–6406. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.056

Jung, K.W., Kim, D.H., Shin, H.S., 2011. A simple method to reduce the start-up period in a H2-producing UASB reactor. Int. J. Hydrogen Energy 36, 1466–1473. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.095

Lee, H.S., Vermaas, W.F.J., Rittmann, B.E., 2010. Biological hydrogen production: Prospects and challenges. Trends Biotechnol. 28, 262–271. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.007

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. Van, Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 506–577. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506

Nissilä, M.E., Lay, C.H., Puhakka, J.A., 2014. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. Biomass and Bioenergy 67, 145–159. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035

Ratti, R.P., Botta, L.S., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2013. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. Int. J. Hydrogen Energy 38, 9707–9717. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.089

Rosales-Colunga, L.M., De León Rodríguez, A., 2014. Escherichia coli and its application to biohydrogen production. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14, 123–135. https://doi.org/10.1007/s11157-014-9354-2

Rossmann, M., Matos, A.T., Abreu, E.C., Silva, F.F., Borges, A.C., 2013. Effect of influent aeration on removal of organic matter from coffee processing wastewater in constructed wetlands. J. Environ. Manage. 128, 912–919. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.045

Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. Int. J. Hydrogen Energy 38, 13172–13191. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122

Shanmugam, S.R., Chaganti, S.R., Lalman, J. a., Heath, D.D., 2014. Statistical optimization of conditions for minimum H2 consumption in mixed anaerobic cultures: Effect on homoacetogenesis and methanogenesis. Int. J. Hydrogen Energy 39, 15433–15445. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.143

Sigurbjornsdottir, M.A., Orlygsson, J., 2012. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by Thermoanaerobacterium AK 54 , isolated from hot spring. Appl. Energy 97, 785–791. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.11.035

Sikora, A., Błaszczyk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U., 2013. Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence?, Lactic Acid Bacteria-R&D for Food, Health and Livestock Purposes. https://doi.org/10.5772/50364

Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S.-H., Kobayashi, T., Xu, K.Q., Lakner, G., Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2016. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. Int. J. Hydrogen Energy. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081

Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Riet, K.V., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appllied Environ. Microbiol. 56, 1875–1881.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGENIO A PARTIR DE RESIDUOS DE CAFÉ E CONSORCIO DE MICRORGANISMOS AUCTOCTONES

Alejandra Carolina Villa Montoya [1]; Edson Luiz Silva[2]; Maria Bernadete A. Varesche [3]

[1] Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar;
[3] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *O processamento do café via úmida gera grande quantidade de resíduos sólidos (casca e polpa) e água residuária. O estudo dos parâmetros da fermentação que afetam a produção de hidrogênio a partir de resíduos do café é pouco explorado, o que torna esse resíduo atrativo e foco de pesquisas futuras. Neste cenário, buscou-se avaliar as condições da fermentação que conduzem a otimização da produção de H_2 a partir de resíduos de café (água residuária, polpa e casca) e consórcio de microrganismos autóctones. Para isso, ensaios em reatores em batelada foram conduzidos avaliando os fatores pH, concentração de polpa e casca e headspace mediante delineamento composto central rotacional para otimização da produção de H_2. As condições operacionais ótimas para obtenção de 240 mL H_2 foram em pH 7,0, concentração de polpa e casca 7 $g.L^{-1}$ e volume de headspace 30%. Adicionalmente obteve-se modelo matemático, o qual foi validado nas condições otimizadas. No ensaio de validação os principais metabolitos produzidos foram o ácido butírico (3.838 $mg.L^{-1}$), ácido isobutírico (506 $mg.L^{-1}$), metanol (226 $mg.L^{-1}$) e n-butanol (156 $mg.L^{-1}$). Microrganismos semelhantes a Clostridium sp. (87,9%), Lactobacillus sp. (1,7%), Kazachstania sp (18,6%) e Saccharomyces sp. (16,3%) foram os principais gêneros observados no reator otimizado.*

Introdução

A produção biológica de H_2 a partir de resíduos da indústria de café (água residuária, polpa e casca) é uma alternativa de interesse, pela sua abundância, características adequadas para a fermentação, como alto conteúdo de carboidratos e nutrientes, possibilidade de diminuição da geração de poluentes e reaproveitamento da energia em processos de secagem e torrefação dos grãos dentro das fazendas. Para viabilizar esta tecnologia é importante pesquisar com profundidade o processo biológico, por exemplo mediante ferramentas estatísticas, permitindo reconhecer as variáveis importantes e otimizar a produção de H_2, de modo que os custos possam ser minimizados e o ganho energético e ambiental sejam significativos.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi otimizar o pH, *headspace*, concentração de polpa e casca para máxima produção biológica de H_2 a partir de resíduos da indústria de café (polpa, casca e água residuária) e microrganismos autóctones. Adicionalmente, analisar o perfil taxonômico associado as condições otimizadas.

Material e Métodos

Reatores em batelada

Foi realizado um desenho de composto central rotacional (DCCR, Tabela 1) com 3 pontos centrais. O pH, *headspace* e concentração de resíduo de polpa e casca foram ajustadas para cada ensaio segundo a Tabela 1. O volume dos reatores foi de 500 mL, com volume reacional de 165,9, 200, 250, 300 e 334,1 mL para *headspace* 66,82%, 60%, 50%, 40% e 33,18%, respectivamente. Os reatores foram inoculados com consórcio microbiano obtido dos resíduos do processamento de café (0,5 $gSSV.L^{-1}$) e alimentados com água residuária (30 $gDQO.L^{-1}$) e

resíduo de polpa e casca. O resíduo de polpa e casca era previamente pré-tratado mediante reator hidrotérmico a severidade 3,5 (180 °C durante 15 min). O *pellet* do consórcio microbiano correspondente a cada ensaio era adicionado e N_2 gasoso foi borbulhado por 5 min nos reatores, sendo fechados com tampa de butila e incubados a 30 °C em ausência de agitação. Os reatores foram operados até estabilização da produção de H_2, mediante monitoramento do biogás por cromatografia gasosa.

Tabela 1: Produção de H_2 a partir de resíduos de processamento de café.

Ensaio	Condições Experimentais			Hidrogênio			
	pH	*Headspace*	Polpa e casca	Produção	*P*	*Rm*	λ
		(%)	(g.L-1)	($LH_2.L^{-1}.d^{-1}$)	(mL)	($mL.h^{-1}$)	(h)
1	5,5	40	9	1,6	206	13,5	36,4
2	7,5	40	9	2,4	112	19,8	22,7
3	5,5	60	9	0,7	203	8,6	43,3
4	7,5	60	9	0,2	55	3,1	15,4
5	5,5	40	15	1,4	244	11,4	17,1
6	7,5	40	15	0,9	106	7,4	18,9
7	5,5	60	15	0,8	178	10,1	33,0
8	7,5	60	15	0,6	89	7,7	19,8
9	4,82	50	12	0,4	228	4,4	131,7
10	8,18	50	12	0,8	163	7,9	22,8
11	6,50	33,18	12	2,1	170	14,4	17,2
12	6,5	66,82	12	0,5	89	7,5	17,7
13	6,5	50	6,95	1,3	154	13,6	15,2
14	6,5	50	17,05	0,8	137	8,7	17,3
15 PC	6,5	50	12	1,1	157	7,3	11,3
16 PC	6,5	50	12	1,1	148	11,9	14,7
17 PC	6,5	50	12	1,0	154	10,4	11,1

PC= Ponto central, *P*= Potencial máximo de produção de H_2, *Rm* = Velocidade máxima de produção, λ = Tempo de início da fermentação.

Validação do modelo

O modelo matemático de produção de H_2 foi validado em duplicata utilizando reatores em batelada de 500 mL, com 30% de volume de *headspace* e 70% de volume reacional. As condições de fermentação foram 30 $gDQO.L^{-1}$ de água residuária, 7 $g.L^{-1}$ de resíduo de polpa e casca pré-tratada, bio-aumentação do consórcio microbiano de 10% (v/v), temperatura de 30 °C e pH inicial 7,0. N_2 gasosos foi borbulhado 5 min no meio líquido, os reatores fechados com tampa de butila e incubados a 30 °C sem agitação. Amostras do início e final da fermentação foram coletadas para a realização de análises físico-químicas e determinação de ácidos orgânicos e álcoois. No final da fermentação foi coletada biomassa microbiana para o estudo do perfil taxonômico.

Análises Físico-químicas

Foram realizadas as análises físico-químicas de carboidratos dissolvidos, pH, demanda química de oxigênio (DQO), fenol e sólidos suspensos totais (SST) (APHA/AWWA/WEF, 2012).

Análises cromatográficas

A quantificação de gás H_2 foi realizada por cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu®) através de coluna capilar Carboxen™ 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco)

com argônio como gás de arraste. Os álcoois foram analisados por cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu®); utilizando coluna HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25µm) com detector de ionização de chama (FID) usando hidrogênio como gás de arraste, e ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. Ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu®), equipado com bomba LC-10ADvp, injetor automático SIL e 20A HT, forno CT-20A, detector ultravioleta com arranjo de diodos do modelo SCL-M10AVP, e detector com índice de rarefação RID-10A, adicionalmente coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad). O eluente foi uma solução de H_2SO_4 0,005M, a um fluxo de 0,5 mL.min^{-1}, temperatura do forno de 43 ºC e injeção de 100 µl. As composições de carboidratos foram determinadas por HPLC (Shimadzu®) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) (300 x 7,8 mm), com fase móbil água ultra pura com H_2SO_4 0,005 N em fluxo de 0,5 mL min^{-1} e temperatura de forno de 43 °C (Ahmad et al., 2018).

Análises da comunidade microbiana

No final do ensaio de validação foram coletadas amostras de 120 mL dos reatores em batelada, que posteriormente foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min. A biomassa de cada amostra foi lavada em tampão PBSX1 (NaCl 8,2 g L^{-1}, Na_2HPO_4 1,05 g L^{-1}, NaH_2PO_4+H_2O 0,35 g L^{-1}) e centrifugadas novamente a 8.000 rpm por 5 min. Para liberação dos microrganismos aderidos na polpa e casca do café, adicionou-se 3 mL de PBSX1 e 1 mL de pérolas de vidro para cada 1 mL de *pellet*. As amostras foram submetidas ao vórtex por 30 segundos, as pérolas retiradas, e as amostras centrifugadas novamente a 8.000 rpm por 5 min. O DNA foi extraído via Kit FastDNA® SPIN for Soil (MPbio), de acordo com o protocolo do fabricante. Foi preparada a biblioteca (DNA com insertos curtos – 500 bp) e sequenciado o metagenoma (3Gbases sequencias, Paired End 150 bp, Q30 > 85%) mediante a Plataforma Illumina NovaSeq6000 no laboratório Genone & Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil, www.genone.com.br), de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi conferida via ferramenta fastqc (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), e sequencias foram filtrados via ferramenta Trimmomatic (Bolger et al., 2014) para remover adaptadores e sequencias de baixa qualidade (*phred score* ≤ 20). Logo após, seguiu-se com a montagem individual de cada biblioteca com a ferramenta metaSPAdes (Bankevich et al., 2012; Nurk et al., 2013), utilizando os k-mers 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101. A qualidade da montagem foi verificada com a ferramenta metaQUAST (Mikheenko et al., 2016). Para melhor anotação, um corte mínimo de 150 pb foi utilizado nos *contigs*. Para a anotação taxonômica e mapeamento de sequencias foi utilizado a ferramenta FMAP (*Functional Mapping and Analysis Pipeline for metagenomics and metatranscriptomics studies* (Kim et al., 2016)) com *cutoff* de identidade de 80%, e-value <1e-3 e genes com cobertura >80%. Para a anotação taxonômica, FMAP utilizou-se o banco de dados RefSeq (NCBI reference sequence database).

Análises cinéticas. A produção acumulada de H_2 no *headspace* foi utilizada para ajustar os dados à equação de Gompertz modificada (Equação 2) (Zwietering et al., 1990):

$$H = P.\exp\{-exp[\frac{Rm.e}{P}(\lambda - t) + 1]\} \qquad \textit{(Eq. 2)}$$

Sendo: H= Produção acumulada de H_2 (mL) no tempo (h), P= Potencial máximo de produção de H_2 (mL), Rm= Velocidade máxima de produção de H_2 (mL.h^{-1}), e=2,718281828, λ=Tempo de início da produção de H_2 (h).

Análises estatísticas. Utilizou-se o software Statstica 7.0 para a análise dos dados e desenho da superfície de resposta.

Resultados e Discussão

As maiores *Rm* foram observadas nos reatores em batelada em pH inicial 5,5 (10,9 ± 2,1 $mL.h^{-1}$, ensaios 1, 3, 5 e 7, Tabela 1), seguido de pH 6,5 (10,5 ± 2,9 $mL.h^{-1}$, ensaios 11, 12, 13 ,14, 15, 16 e 17), pH 7,5 (9,5 ± 7,2 $mL.h^{-1}$, ensaios 2, 4, 6 e 8), pH 8,18 (7,9 $mL.h^{-1}$, ensaios 10) e pH 4,82 (4,4 $mL.h^{-1}$, ensaios 9). Abreu et al. (2009), observaram resultados similares, ou seja de 2,1 $mL.h^{-1}$ em pH 5,5; 2,9 $mL.h^{-1}$ em pH 6,5; 1,7 $mL.h^{-1}$ em pH 7,5 e 1,9 $mL.h^{-1}$ em pH 8,0, reportando pH de 6,5 como o adequado para maiores velocidades de produção de H_2, similar ao observado no presente estudo. Maiores *Rm* a pH entre 5,5 e 6,5 pode estar relacionado com a obtenção do consórcio microbiano autóctone dos resíduos de café a pH inicial de 5,0, permitindo a seleção da população de bactérias com crescimento predominante em pH ácido.

O tempo de início da fermentação (λ) foi de 32,5 ± 11,1 h em pH inicial de 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7); 14,9 ± 2,8 h em pH inicial de 6,5 (ensaios 11, 12, 13 ,14, 15, 16 e 17) e 19,2 ± 3,0 h em pH inicial de 7,5 (ensaios 2, 4, 6 e 8). Muri et al. (2016) verificaram longos λ para condições ambientais extremas de pH. Por exemplo, especificamente com os resíduos de café obteve-se λ de 32,4 ± 11,1 h e 131,7 h para pH inicial 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7) e 4,82 (ensaio 9), respectivamente. Abreu et al. (2009) observaram λ de 19,3 h em pH 5,5; 14,5 h em pH 6,5 e 13,7 h em pH 7,5 utilizando açúcar simples (arabinose) para a alimentação do reator. Portanto, a partir da co-digestão de resíduos de café foi necessário maior tempo de adaptação devido à complexidade dos substratos (polpa, casca e água residuária), para os quais foram necessárias reações de hidrólise prévias à fermentação.

Em relação ao volume de *headspace* dos reatores, evidenciou-se os maiores *P* nos ensaios com 40% (167 ± 69 mL, ensaios 1, 2, 5, e 6), 50% (163 ± 30 mL, ensaios 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17) e 60% (131 ± 71 mL, ensaios 3, 4, 7 e 8). A maior produção de H_2 de 170 mL foi obtida no ensaio 11 com *headspace* menor (33,18%), entretanto, quando o volume de *headspace* foi aumentado para 66,82% a produção foi inferior, correspondendo a 89 mL H_2 (ensaio 12).

Verificou-se resultados similares em relação à *Rm*. Velocidades decrescentes de produção de H_2 foram obtidas utilizando-se 40% (13 ± 5,2 $mL.h^{-1}$, ensaios 1, 2, 5, e 6), 50% (9,2 ± 3,1 $mL.h^{-1}$, 9, 10**,** 13, 14, 15, 16 e 17) e 60% (7,4 ± 3,0 $mL.h^{-1}$, ensaios 3, 4, 7 e 8). Para 33,18% de *headspace*, obteve-se a maior *Rm* de 14,4 $mL.h^{-1}$ (ensaio 11) quando comparado com 66,82% (7,5 $mL.h^{-1}$, ensaio 12). De acordo com Shanmugam et al. (2014), volume menor de *headspace* pode conduzir a elevada pressão de H_2 e, consequentemente inibir a produção de H_2 e limitar o uso de substratos altamente concentrados. No entanto, na presente pesquisa, possivelmente os valores de pH_2 não foram suficientemente altas para afetar a fermentação, uma vez que as melhores *P* e *Rm* foram observadas nos menores volumes de *headspace*.

O λ mais longo de 32 ± 44,1 h foi observado em *headspace* de 50% (ensaios 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17), seguido de 27,9 ± 12,7 h a 60% (ensaios 3, 4, 7 e 8) e 23,8 ± 8,7 h a 40% (ensaios 1, 2, 5, e 6). Para as condições de *headspace* de 33,18% e 66,82% observou-se o λ de aproximadamente 17 h (ensaio 11 e 12). Possivelmente, condições extremas de pH (4,82 e 8,18, ensaios 9 e 10) e concentração de polpa e casca (6,95 e 17,05 $g.L^{-1}$) com 50% de *headspace*, podem ter favorecido maiores tempos de adaptação dos microrganismos.

Em relação a concentração de polpa e casca, não observou-se discrepância entre os valores obtidos de *P* para 9 $g.L^{-1}$ (144 ± 74 mL, ensaios 1, 2, 3 e 4), 12 $g.L^{-1}$ (158 ± 41 mL, ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17) e 15 $g.L^{-1}$ (154 ± 71 mL, ensaios 5, 6, 7 e 8). Similarmente, para 6,95 e 17,05 $g.L^{-1}$ de polpa e casca foi observado 154 e 137 mL, respectivamente. Portanto, altas concentrações de polpa e casca não proporcionaram maior produção de H_2.

Em contrapartida, maior velocidade de produção (*Rm*) foi observada em menor concentração de polpa e casca, uma vez que verificou-se valores superiores de *Rm* com 6,95 $g.L^{-1}$ (13,6 $mL.h^{-1}$, ensaio 13), seguido de 9 $g.L^{-1}$ (11,3 ± 7,1 $mL.h^{-1}$, ensaios 1, 2, 3 e 4), 12 $g.L^{-1}$ (9,1 ± 3,3 $mL.h^{-1}$, ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17), 15 $g.L^{-1}$ (9,2 ± 1,9 $mL.h^{-1}$, ensaios 5, 6, 7 e 8) e 17,05 $g.L^{-1}$ (8,7 $mL.h^{-1}$, ensaio 14). Segundo Cazier et al. (2015) maior concentração de sólidos pode favorecer o aumento na porcentagem de CO_2 e H_2 no reator.

Sob estas condições, a alta pH_2 conduz a inibição do processo hidrolítico e diminui a difusão de compostos intermediários dissolvidos, ocasionando em acúmulo na fração líquida. A informação destacada pelos autores possibilita justificar, no presente estudo, as menores velocidades de produção de H_2 (*Rm*) para maiores concentrações de polpa e casca (15 e 17,05 $g.L^{-1}$).

Verificou-se diminuição de λ para menor concentração de polpa e casca. Sendo assim, obteve-se λ de 32,4 ± 44 h (ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17) e 29,5 ± 12,7 h (ensaios 1, 2, 3 e 4) quando utilizou-se 12 e 9 $g.L^{-1}$ de polpa e casca, respectivamente. Além disso, valores de λ inferiores foram obtidos em reatores contendo 15 $g.L^{-1}$ de polpa (22,2 ± 7,3 h, ensaios 5, 6, 7 e 8). Como referido anteriormente, as condições de extrema acidez e menores volumes de *headspace* podem ter conduzido a maiores λ, como por exemplo com 12 $g.L^{-1}$ de polpa e casca. No entanto, pode-se observar que a concentração de polpa e casca não influenciou na adaptação dos microrganismos, uma vez que λ próximos de 15,2 h e 17,3 h foram obtidos para 6,95 $g.L^{-1}$ (ensaio 13) e 17,05 $g.L^{-1}$ (ensaio 14) de polpa e casca, respetivamente.

Uma das maiores dificuldades durante a adição de substratos hidrolisados em reator hidrotérmico é o aumento proporcional de compostos inibidores como fenóis e furfural. Uma estratégia estudada nesta pesquisa foi a bio-aumentação com bactérias autóctones dos resíduos de café, permitindo a seleção de populações adaptadas a estes compostos inibitórios (Sivagurunathan et al., 2017).

Estes resultados foram diferentes dos observados por Ratti et al. (2013) durante a produção de H_2 com celulose a 37 °C, utilizando reatores em batelada com adição de celulase e inóculo de lixiviado tratado termicamente (90°C por 10 min). Os autores obtiveram aumento de *P* (de 19,9 para 125,9 mmol), *Rm* (de 0,8 para 2,3 $mmol.h^{-1}$) e λ (de 5,1 para 9,2 h) para 2,5 para 10 $g.L^{-1}$ de celulose, respectivamente. Provavelmente, a obtenção de valores menores de *P, Rm* e λ durante a co-digestão de resíduos de café foi devido à complexidade lignocelulósica desses resíduos, além da faixa de concentração de polpa e casca (6,95 a 17,05 $g.L^{-1}$), os quais podem ter conduzido a limitações das reações hidrolíticas.

Os resultados dos parâmetros cinéticos da fermentação foram utilizados para calcular a produção de H_2 (Tabela 1) e ajustar modelo matemático (Tabela 2). A significância dos modelos foi avaliada mediante do teste de ANOVA (Tabela 3). Observou-se coeficiente de correlação de 89,6%, indicando que o modelo pode explicar até 89,6% da variação da resposta. O valor F do modelo (28,5) foi maior que os valore F tabulado (1,99), indicando que o modelo é válido.

A partir do modelo de produção de H_2 foram elaboradas superfícies de resposta (Figura 1). Verificou-se máxima produção de H_2 em pH entre 6,3 e 8,3, *headspace* entre 30 e 35%, e concentração de polpa e casca entre 6,0 e 9,0 $g.L^{-1}$. Valores máximos de produção de H_2 foram obtidas com pH ~7,0, possivelmente pH próximo a neutralidade (entre 6,5 e 7,5) pode estimular maior diversidade de microrganismos, conduzindo a maior velocidade de produção de H_2, uma vez que este estímulo pode aumentar a sinergia entre grupos de microrganismos com capacidade metabólica, tanto hidrolítica quanto fermentativa (de Sá et al., 2014).

Para as condições de *headspace* não foi observado ponto de curvatura, sendo verificado para valor inferior a 30% possivelmente pode ser observado maior *P*. No entanto, quando os reatores foram operados com 33% de *headspace* (ensaio 11) obteve-se alta pressão de gás com ruptura de algumas tampas de butila de segurança, tornando-se inviável testar níveis inferiores para este fator.

Em relação a região de otimização escolheu-se aquelas condições experimentais de pH inicial 7,0, *headspace* 30% e 7 $g.L^{-1}$ de polpa e casca para a validação experimental do modelo, para o qual determinou-se a cinética de produção de H_2. Obteve-se para as condições de operação do reator otimizado (Tabela 2) 3,04 $LH_2.L^{-1}.d^{-1}$, que foi próximo ao valor previsto mediante o modelo de 3,56 $LH_2.L^{-1}.d^{-1}$. Assim, os valores experimentais

correlacionam-se adequadamente com os valores previstos, em função da precisão deste modelo determinada mediante o desvio padrão de 0,37 $LH_2.L^{-1}.d^{-1}$.

Tabela 2: Validação do modelo de produção de H_2 e resultados da operação do reator otimizado a partir de resíduos de café.

Modelo para a produção de H_2			
Parâmetro	*Modelo*	R^2 *(%)*	*p-valor*
Produção ($LH_2.L^{-1}.d^{-1}$)	$Y = 1,11 – 0,16\ x_1^2 - 0,49\ x_2 + 0,10\ x_2^2 – 0,14\ x_3 – 0,09\ x_1\ x_2 – 0,14\ x_1\ x_3 + 0,26\ x_2\ x_3$	89,6	0,0000

Validação do modelo			
Condições:		*Valor previsto*	*Valor experimental*
pH (x_1)	7,0	3,56	3,04 ± 0,37
Volume de *headspace* (x_2)	30%		
Concentração de polpa e casca (x_3)	7 $g.L^{-1}$		

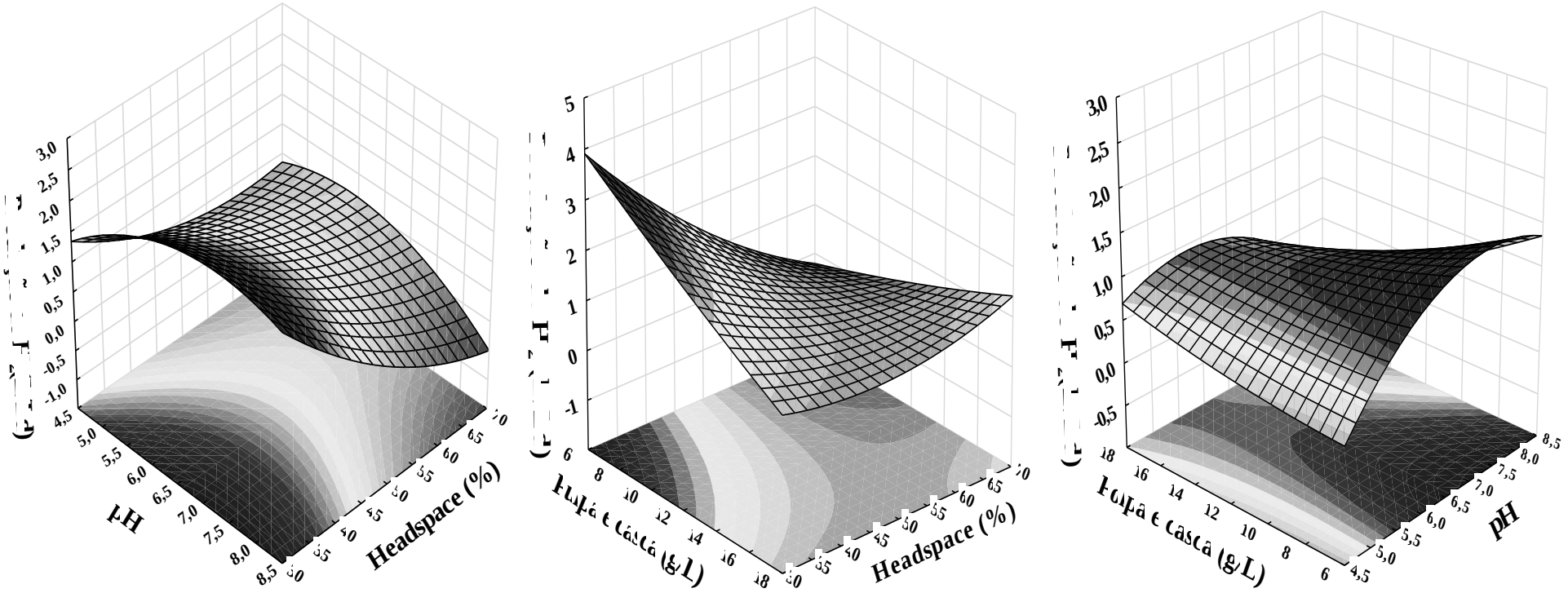
Operação do reator otimizado			
		Inicial	*Final*
P	mL		240
Rm	$mL.h^{-1}$		19,0
λ	h		12,1
pH		7,0	6,4
Redução de carboidratos dissolvidos	%		69
Celobiose	$mg.L^{-1}$	≤ LD	3
Arabinose	$mg.L^{-1}$	144	307
DQO dissolvida	$mg.L^{-1}$	22.000	22.600
Fenóis	$mg.L^{-1}$	383	517
SST	$mg.L^{-1}$	312	408
Ácido acético	$mg.L^{-1}$	843	508
Ácido propiônico	$mg.L^{-1}$	153	251
Ácido isobutírico	$mg.L^{-1}$	65	571
Ácido butírico	$mg.L^{-1}$	1.734	5.572
Ácido valérico	$mg.L^{-1}$	58	176
Ácido isovalérico	$mg.L^{-1}$	238	72
Ácido lático	$mg.L^{-1}$	4.550	1.510
Etanol	$mg.L^{-1}$	3.442	3.323
Metanol	$mg.L^{-1}$	≤ LD	226
n-Butanol	$mg.L^{-1}$	≤ LD	156

DQO= Demanda química de oxigênio, *SST* = Sólidos suspensos totais, ≤ *LD*= Inferior ao limite de detecção.

Tabela 3: ANOVA para o modelo de produção de H_2 com resíduos de café.

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	9,5	7	1,4	28,5
Resíduos	1,1	23	0,0	
Falta de Ajuste	1,0	7	0,1	16,6
Erro Puro	0,1	16	0,0	
Total	10,6	30		

Figura 1: Superfície de resposta do modelo de produção de H_2 a partir de residuos de café.



Os valores obtidos para a produção de H_2 (*P*) de 240 mL, *Rm* de 19 $mL.h^{-1}$ e λ de 12,1 h (Tabela 2), sendo verificado potencial de produção similar ao ensaio 5 (P: 244 mL), mas com velocidade de produção 6 vezes maior (*Rm*: 3,1 $mL.h^{-1}$, ensaio 5), pelo qual, pode ser considerado que a seleção das condições de fermentação mediante a análise da superfície de resposta permitiu aprimorar os resultados. Durante a operação do reator sob as condições otimizadas, observou-se redução de carboidratos de 69% para a síntese de biomassa (aumento de SST de 96 $mg.L^{-1}$), metabólitos gasosos (240 mL) e dissolvidos (1.282 $mg.L^{-1}$ de ácidos orgânicos + álcoois, Tabela 2). Observou-se aumento no final da fermentação dos carboidratos, como celobiose e arabinose, (de inferior ao limite de detecção e 144 mg.L-1 para 3 e 307 $mg.L^{-1}$, respectivamente), o qual confirma a atividade de enzimas hidrolíticas de bactérias e fungos no consórcio microbiano sobre a celulose e hemicelulose na polpa e casca, com liberação de açúcares mais simples, os quais podem ser utilizados para a fermentação. Observou-se para matéria orgânica dissolvida (inicial de 22.000 e final de 22.600 $mg.L^{-1}$) e fenol (inicial de 312 e final de 408 $mg.L^{-1}$) aumento no final da fermentação, pelo qual, pode ser considerado que processos de hidrólise como solubilização de matéria orgânica, e deslignificação com liberação de fenóis, os quais predominaram no reator otimizado.

Em relação aos ácidos orgânicos e álcool observou-se ácido butírico (3.838 $mg.L^{-1}$), ácido isobutírico (571 $mg.L^{-1}$) e em menor proporção ácido propiônico (98 $mg.L^{-1}$), ácido valérico (118 $mg.L^{-1}$), metanol (226 $mg.L^{-1}$) e n-butanol (156 $mg.L^{-1}$). Por meio desses resultados pode-se inferir em predomínio da rota de fermentação ácido butírica, com rendimento de 2 mol H_2 para cada mol de glicose (de Sá et al., 2014). Verificou-se diminuição dos ácidos acético e lático no final da fermentação (de 843 e 4.550 $mg.L^{-1}$ para 508 e 1.510 $mg.L^{-1}$, respectivamente), pelo qual, a reação de consumo de ácido lático e acético para a síntese de ácido butírico pode explicar o aumento de ácido butírico e isobutírico (de 1.734 e 65 $mg.L^{-1}$ para 5.572 e 571 $mg.L^{-1}$, respectivamente).

A produção de H_2 de 0,13 $LH_2.L^{-1}.h^{-1}$ a partir da co-digestão de polpa, casca e água residuária de café foi comparada com outras pesquisas utilizando resíduos desta indústria. Jung et al. (2012) obtiveram produção maior de 1,65 $LH_2.L^{-1}.h^{-1}$ com água residuária de café (31 $gDQO.L^{-1}$), durante a operação de reatores UASB a 35 °C e TDH de 6 h, inoculado com grânulos de microrganismos autóctones do resíduo.

Similarmente, Hernández et al. (2014) obtiveram maior produção em relação ao presente trabalho, com 0,31 $LH_2.L^{-1}.h^{-1}$ durante a co-digestão de mucilagem de café e dejetos de suinocultura (9,8 $gDQO.L^{-1}$), em reatores em batelada a 55 °C e tempo de fermentação de 30 dias. A inferior degradabilidade dos resíduos lignocelulósico (polpa e casca de café) quando comparado com os substratos utilizados pelos autores, pode ter influenciado a inferior transformação em biogás.

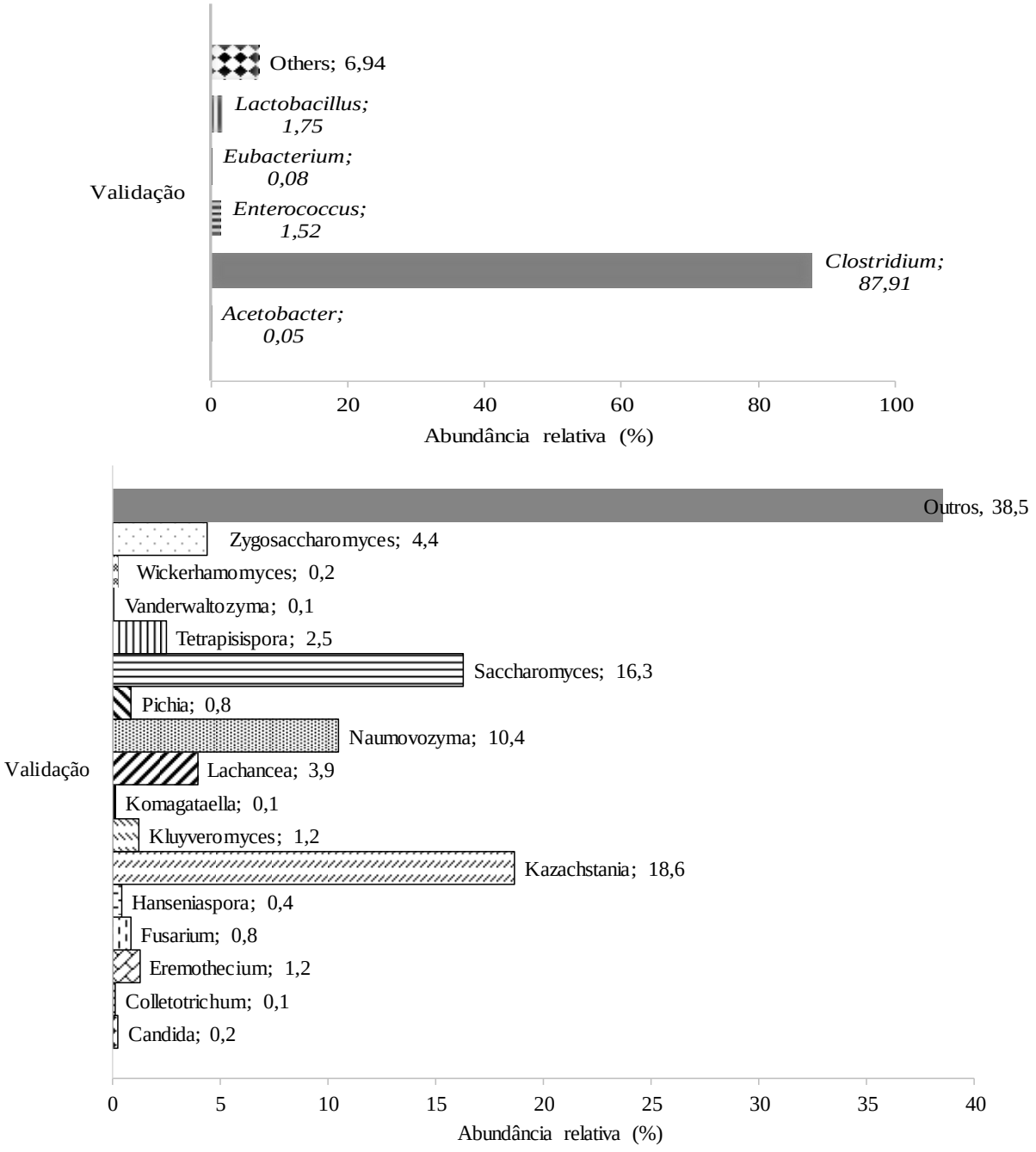
No entanto, obteve-se 98 $mLH_2.g^{-1}$ de polpa e casca, valor superior ao reportado por Dos santos et al. (2018) de 19 $mLH_2.g^{-1}$ de casca a partir da fração líquida do pré-tratamento de casca de café com ozônio (39,5 $gDQO.L^{-1}$), em reator de mistura completa a 35 °C, inoculado com lodo de esterco bovino. Isto porque a polpa e casca possuem maior teor de material fermentável (celulose e hemicelulose) quando comparado com a fração líquida, provendo maior quantidade de substratos propícios para a produção de H_2 no presente trabalho.

Este resultado corresponde a maior abundância relativa para o gênero *Clostridium* sp. (87,91%), seguido de *Lactobacillus* sp. (1,75%) e *Enterococcus* sp. (1,52%, Figura 3). Quando analisada a determinação de *Clostridium* sp. em outros sistemas com resíduos de café, observou-se valores maiores no reator otimizado quando comparado com o consórcio microbiano utilizado para a bio-aumentação (76,9%). Portanto, a adequada escolha das condições de fermentação foi mais importante para a seleção de gêneros com maior potencial para a produção de H_2, que a origem dos substratos ou do inóculo.

Os fungos identificados no reator otimizado pertenceram aos gêneros *Kazachstania* sp. (18,6%), *Saccharomyces* sp. (16,3%) e *Naumovozyma* (10,4%). A participação de leveduras

em reatores para a produção de H_2 com outros resíduos é um tema com limitada informação na literatura.Outros fungos identificados em menor proporção foram *Fusarium* sp. (0,8%), *Hanseniaspora* sp. (0,4%), *Kluyveromyces* sp. (1,2%) ou *Zygosaccharomyces* sp. (4,4%), os quais possuem enzimas para a degradação de celulose, hemicelulose e pectina, (Lynd et al., 2002; Sun e Cheng, 2002), contribuindo com a hidrólise da polpa e casca.

Figura 3: Gêneros de Bacterias e Fungos do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H_2 a partir de resíduos de café.



Conclusões

Condições de fermentação de pH inicial 7,0, concentração de polpa e casca 7 $g.L^{-1}$ e volume de *headspace* 30% permitiram otimizar a produção de H_2 para máximo de 3L $H_2.L^{-1}.d^{-1}$. Maior produção de H_2 a partir de resíduos de café foram consequência de comunidade microbiana com predominância de *Clostridium* sp., uma vez que tais bactérias possuem potencial metabólico abundante em enzimas para a produção de H_2.

Referências Bibliográficas

Ahmad, F., Skamoto, I., Maria, S., Adorno, A., Montteran, F., Silva, E.L., Vareche, M.B.A., 2018. Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. Waste and Biomass Valorization 1–20.

APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed, Études Rabelaisiennes.

Bankevich, A., Nurk, S., D., A., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., M., L. V., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J. Comput. Biol. 19, 455–447.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120.

Cazier, E.A., Trably, E., Steyer, J.P., Escudie, R., 2015. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. Bioresour. Technol. 190, 106–113.

de Sá, L.R.V., Cammarota, M.C., Ferreira-Leitão, V.S., 2014. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. Quim. Nova 37, 857–867.

Kim, J., Kim, M.S., Koh, A.Y., Xie, Y., Zhan, X., 2016. FMAP: Functional mapping and analysis pipeline for metagenomics and metatranscriptomics studies. BMC Bioinformatics 17, 1–8.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. Van, Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 506–577.

Mikheenko, A., Saveliev, V., Gurevich, A., 2016. MetaQUAST: Evaluation of metagenome assemblies. Bioinformatics 32, 1088–1090.

Muri, P., Osojnik-Črnivec, I.G., Djinovič, P., Pintar, A., 2016. Biohydrogen Production from Simple Carbohydrates with Optimization of Operating Parameters. Acta Chim. Slov. 63, 164–154.

Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Prjibelsky, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Sirotkin, Y., Stepanauskas, R., McLean, J., Lasken, R., Clingenpeel, S.R., Woyke, T., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2013. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads.

Sivagurunathan, P., Kumar, G., Mudhoo, A., Rene, E.R., Dattatraya, G., Kobayashi, T., Xu, K., Kim, S., Kim, H., 2017. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass : An overview of pre-treatment methods , inhibitor e ff ects and detoxi fi cation experiences. Renew. Sustain. Energy Rev. 77, 28–42.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. Bioresour. Technol. 83, 1–11.

Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Riet, K.V., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appllied Environ. Microbiol. 56, 1875–1881.

SISTEMA COMBINADO PARA A DEGRADAÇÃO DO TETRABROMOBISFENOL A (TBBPA) POR DIGESTÃO ANAERÓBIA E PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Williane Vieira Macêdo [1]; Eduardo Bessa Azevedo [2]; Marcelo Zaiat [3]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental;
[2] Professor do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da USP;
[3] Professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Resumo. *A presença de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos está relacionada com o lançamento de efluentes de estações de tratamento de águas residuárias e apresenta risco potencial para a saúde humana e para o meio ambiente. O Tetrabromobisfenol A (TBBPA), por exemplo, é um retardante de chama brominado proveniente da produção de plásticos, revestimentos e produtos eletrônicos considerado como interferente endócrino, imunotóxico e neurotóxico. A degradação biológica de poluentes aromáticos tem atraído a atenção dos ambientalistas, porém pouco se sabe sobre o sinergismo microbiano no processo e em qual etapa metabólica ela ocorre, sendo necessária a investigação aprofundada da degradação do TBBPA por processos biológicos. Os processos oxidativos avançados (POA), por sua vez, são tecnologias limpas aplicadas na degradação de compostos orgânicos complexos. Estas tecnologias apresentam vantagens como a oxidação de compostos em concentrações muito baixas e a geração de produtos não poluentes. A combinação de processos químicos e biológicos é especialmente adequada para a remoção de compostos de difícil degradação presentes em uma matriz complexa, como o esgoto sanitário. Desta forma, o objetivo desse trabalho é trabalho é estudar a degradação do TBBPA por digestão anaeróbia e foto-Fenton heterogêneo a fim de propor uma tecnologia de tratamento acoplada.*

Introdução

Os retardantes de chama bromados (BFR, do inglês Brominated Flame Retardants) são compostos químicos aplicados em diversos materiais, tais como: plásticos, revestimentos, circuitos e produtos eletrônicos, sendo o tetrabromobisfenol A (TBBPA) o composto de maior produção e distribuição mundial. A produção do TBBPA apresenta elevado risco ambiental, sendo classificado como interferente endócrino, imunotóxico, neurotóxico e carcinogênico (Covaci et al., 2009; Lefevre et al., 2019). A principal atividade responsável pela presença deste poluente em ecossistemas é a liberação do TBBPA por meio uso de produtos que o contém, chegando às redes de esgoto sanitário e, consequentemente, sendo lançado em corpos hídricos (Petrie, Barden e Kasprzyk-Hordern, 2015; Rothenbacher e Pecquet, 2018).

Processos biológicos para o tratamento de poluentes recalcitrantes vêem sendo investigados para a degradação de fármacos, retardantes de chama, surfactantes, agrotóxicos e pesticidas, mas ainda pouco se sabe sobre a degradação biológica do TBBPA (Husain e Qayyum, 2013; Pang et al., 2018; Lefevre et al., 2019). A digestão anaeróbia é um mecanismo de degradação robusto e bem estabelecido, mas o desenvolvimento de tecnologias objetivando principalmente a degradação do TBBPA envolve o conhecimento aprofundado dos mecanismos que influenciam o desempenho deste processo, em qual etapa da digestão anaeróbia se dá a desalogenação e quebra dos aneis aromáticos, e o papel e natureza dos compostos orgânicos atuantes nas rotas metabólicas (Peng e Jia, 2013; Fan et al., 2019; Lefevre et al., 2019).

Em contrapartida, a biotransformação dos BFRs, como o TBBPA, em sistemas controlados, pode ser inibida ou retardada por possuírem natureza tóxica à biomassa. Assim, tecnologias químicas podem ser aplicadas previamente, transformando a molécula do TBBPA em estruturas menos complexas. Além disso, ainda que o TBBPA seja degradado biologicamente sem pré-tratamento, o processo global pode ser otimizado a partir da aplicação

de processos oxidativos avançados (POAs) na degradação de produtos derivados da biodigestão, associando processos químicos e biológicos no tratamento de efluentes, caracterizando uma estratégia promissora ainda pouco explorada (Scott e Ollis, 1995; Chávez et al., 2019; Paździor, Bilińska e Ledakowicz, 2018). O processo Foto-Fenton heterogêneo, possui características que podem viabilizar sua aplicação em estações de tratamento de esgoto sanitário, tais como: elevada eficiência, fácil operação comparados a outros POAs, possibilidade de se utilizar materiais alternativos na imobilização de semicondutores e custos não elevados quando direcionados ao tratamento específico de um poluente-alvo (Oturan e Aaron, 2014; Pouran et al., 2014; Bansal e Verma, 2017).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é acoplar processos químicos e biológicos para configurar um sistema de tratamento que alcance alta eficiência de degradação do TBBPA, com reduzida demanda energética, a partir da associação estratégica dos pontos fortes de cada processo, considerando-se as caracteristicas da água residuária de estudo. Este processo dar-se-á por meio do aumento da biodegradabilidade do efluente a partir da quebra de estruturas complexas e atenuação da ecotoxicidade do composto (tratamento químico-biológico) ou do polimento do efluente já digerido biologicamente (tratamento biológico-químico).

Material e Métodos

Procedimento experimental

Este trabalho será dividido em quatro etapas sequenciais: (i) aplicação e validação de um método analítico para a quantificação do tetrabromobisfenol A (TBBPA) em esgoto sanitário, (ii) estudo da biodegradabilidade deste composto na matriz de estudo, (iii) avaliação da degradação do TBBPA pelo processo foto-Fenton heterogêneo com lâmpadas LED e (iv) estudo de um sistema acoplado químico-biológico ou biológico-químico a partir dos resultados das etapas anteriores. As etapas dois e três serão desenvolvidas por meio de metodologia de superfície de resposta (MSR), afim de otimizar a degradação deste composto a partir da variação das condições operacionais. No ponto ótimo, tentar-se-á determinar em qual etapa da digestão anaeróbia o TBBPA é degradado, correlacionando-se as condições operacionais com os derivados formados. Após a análise dos resultados obtidos nas fases anteriores, as melhores condições de cada sistema individualizado serão empregadas em um sistema de reatores contínuos acoplados tratando esgoto sanitário simulado. Os reatores contínuos constarão de um reator químico de leito fixo e um reator biológico de leito estruturado.

Método analítico de quantificação do TBBPA e subprodutos

A identificação e quantificação do TBBPA será feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguida por espectrometria de massas sequencial acoplados por meio de uma interface electrospray (ESI) (LC/MS). Serão utilizados um cromatógrado HPLC Agilent technologies 1260 Infinity com uma bomba Agilent 1260 Infinity Binary Pump e uma bomba Shimadzu LC 10-AD e um espectrômetro de massas ABSciex QTrap® 5500 equipado com uma fonte de íons TurboVTM. Para a extração e pré-concentração dos analítos, será adotada a técnica de extração em fase sólida (SPE). O método adotado será baseado em métodos descritos na literatura para a identificação do TBBPA em matriz complexa (Saint-Louis e Pelletier, 2004). A validação será feita pelos parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e robustez.

Água residuária de estudo e inóculo

A água residuária será esgoto sanitário simulado (Torres, 1992) com DQO afluente de 500 $mg.L^{-1}$ e concentração de TBBPA de 100 $\mu g.L^{-1}$ (Yang et al., 2012). O inóculo utilizado será o lodo anaeróbio de um reator de manta de lodo (UASB) operado na Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho na cidade de São Carlos/SP. Os ensaios biológicos em batelada serão desenvolvidos com e sem a previa adaptação ao poluente-alvo em bateladas controladas.

Ensaios abióticos

Serão avaliados no lodo biológico, nos materiais suporte e nos reatores contínuos e descontínuos, os fenômenos físicoquímicos de hidrólise, fotólise, volatilização e adsorção do TBBPA a fim de aumentar a confiabilidade dos ensaios de degradação. Testes de adsorção no lodo biológico serão realizados a partir da inativação da biomassa que dar-se-á como descrito e testado para contaminantes emergentes por Stevens-Garmon et al. (2011) por meio da técnica de liofilização e inativação por calor seco.

Degradação por digestão anaeróbia

Os ensaios de biodegradabilidade do poluente-alvo serão desenvolvidos em batelada em frascos Duran® de 250 mL e volume útil de 200 mL. Os frascos serão mantidos em um shaker a 170 rpm para a completa mistura durante o período de monitoramento e mantidos à temperatura de 30°C. Em sistema contínuo, um reator anaeróbio de leito fixo estruturado será utilizado para a avaliar a degradação anaeróbia do TBBPA em sistema contínuo. O reator será contruido em escala de bancada com diâmetro interno de 8 cm e altura do leito reacional de 30 cm. O material suporte aplicado será a espuma de poliuretano aplicada em hastes com 3 cm de diâmetro e 30 cm de altura. O reator de leito estruturado tem apresentado bom desempenho e praticidade operacional (Camiloti et al., 2014; Anzola-Rojas et al., 2016; Fuess et al., 2017).

Degradação por Foto-Fenton heterogêneo

No processo de Foto-Fenton heterogêneo, o leito fixo dos reatores químicos (batelada e contínuo) será formado por pequenas esferas de 10 a 20 mm de diâmetro confeccionadas utilizando-se argila e areia de fundição, resíduo da industria de fundição, que será a fonte do ferro necessário no processo. Esta matriz irá passar pelo processo de caracterização de sua composição, resistência a condições químicas extremas, porosidade e potencial de adsorção do poluente-alvo. A configuração de reator será a mesma proposta por Bansal e Verma (2017). Serão utilizadas lâmpadas LED como fonte de irradiação e serão testados diferentes comprimentos de onda para a escolha da lâmpada mais adequada para a reação.

Análises físico-químicas

As análises fisico-química de pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Carboidratos, Proteínas e a série de sólidos suspensos e totais serão realizadas de acordo com APHA, AWWA, WPCF (2005). Serão monitorados também a alcalinidade de acordo com Ripley, Boyle e Converse (1986) e ácidos orgânicos voláteis de acordo com Dilallo e Albertson (1961). O biogas dos reatores anaeróbios será monitorado por cromatografia gasosa realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC2014AT®, equipado com detector de condutividade térmica e coluna HP-PLOT/Q® (30 mm Å~ 0,53 mm Å~ 40 μm). A determinação da concentração de ácidos graxos voláteis (lático, acético, propiônico, butírico, valérico, isobutírico, isopropiônico, isovalérico, capróico, cítrico, málico e succínico) nos reatores anaeróbios (batelada e contínuo) será realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção no ultravioleta (HPLC-UV) segundo Penteado et al. (2013).

Análises de biologia molecular e ensaios de ecotoxicologia

Para os ensaios biológicos em batelada e para a biomassa nas fases estacionárias do reator contínuo, será realizada avaliação da modificação da estrutura, diversidade e riqueza microbiana por reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR/DGGE). Ainda, os DNAs extraído das amostras serão submetidos a sequenciamento genético para a identificação das comunidades microbianas presentes no processo. Serão realizados testes de ecotoxicidade aguda segundo Zagatto (2008) com organismos de *Daphnia similis* expostos à água residuária antes e após os tratamentos químico e biológico do sistema acoplado. Já para o teste de ecotoxicidade crônica, indivíduos de *Ceriodaphnia silvestrii* e

Ceriodaphnia dubia serão submetidos a testes de ecotoxicidade com duração aproximada de sete dias segundo os procedimentos estabelecidos pela ABNT (2005).

Referências Bibliográficas

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR: 13373., 2005. Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica. Método de ensaio com Ceriodaphnia ssp. (Cladocera, Crustácea).

Anzola-Rojas, M. del P., Zaiat, M., De Wever, H., 2016. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. Bioresour. Technol., 202, 42–49.

APHA, AWWA, WPCF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 Ed., American Public Health Association, Washington.

Bansal, P., Verma, A., 2017. Novel Fe-TiO 2 composite driven dual effect for reduction in treatment time of pentoxifylline: Slurry to immobilized approach. Mater. Des, 125, 135–145.

Camiloti, P. R., Mockaitis, G., Domingues Rodrigues, J. A., Rissato Zamariolli Damianovic, M. H., Foresti, E., Zaiat, M., 2014. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal: Innovative anaerobic bioreactor. J Chem Technol Biotechnol, 89(7), 1044–1050.

Chávez, A. M., Gimeno, O., Rey, A., Pliego, G., Oropesa, A. L., Álvarez, P. M., Beltrán, F. J., 2019. Treatment of highly polluted industrial wastewater by means of sequential aerobic biological oxidation-ozone based AOPs. Chem Eng J., 361, 89–98.

Covaci, A., Voorspoels, S., Abdallah, M. A.-E., Geens, T., Harrad, S., Law, R. J., 2009. Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. J. Chromatogr. A., 1216(3), 346–363.

DiLallo, R., Albertson, O. E., 1961. Volatile Acids by Direct Titration. J Water Pollut Control Fed., 33(4), 356–365.

Fan, M., Zhou, Y., Huang, Q., Chen, Y., Xu, H., Shen, S., 2019. The auxiliary effect of organic matter humic acids on the anaerobic biodegradation of tetrabromobisphenol A. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 1–10.

Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. Appl. Energy., 189, 480–491.

Husain, Q., Qayyum, S., 2013. Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: a review. Crit. Rev. Biotechnol., 33(3), 260–292.

Lefevre, E., Redfern, L., Cooper, E. M., Stapleton, H. M., Gunsch, C. K., 2019. Acetate promotes microbial reductive debromination of tetrabromobisphenol A during the startup phase of anaerobic wastewater sludge bioreactors. Sci. Total Environ. , 656, 959–968.

Oturan, M. A., Aaron, J.-J., 2014. Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications. A Review. Crit Rev Environ Sci Technol., 44(23), 2577–2641.

Pang, L., Ge, L., Yang, P., He, H., Zhang, H., 2018. Degradation of organophosphate esters in sewage sludge: Effects of aerobic/anaerobic treatments and bacterial community compositions. Bioresour. Technol., 255, 16–21.

Paździor, K., Bilińska, L., Ledakowicz, S., 2018. A review of the existing and emerging technologies in the combination of AOPs and biological processes in industrial textile wastewater treatment. Chem Eng J., S1385894718325294.

Peng, X., Jia, X., 2013. Optimization of parameters for anaerobic co-metabolic degradation of TBBPA. Bioresour. Technol., 148, 386–393.

Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrog. Energy., 38(14), 6137–6145.

Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. Water Res., 72, 3–27.

Rahim Pouran, S., Abdul Raman, A. A., Wan Daud, W. M. A., 2014. Review on the application of modified iron oxides as heterogeneous catalysts in Fenton reactions. J Clean Prod., 64, 24–35.

Ripley, L. E., Boyle, W. C., Converse, J. C., 1986. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. J Water Pollut Control Fed., 58(5), 406–411.

Rothenbacher, K. P., Pecquet, A. M., 2018. Summary of historical terrestrial toxicity data for the brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA): effects on soil microorganisms, earthworms, and seedling emergence. Environ Sci Pollut Res Int., 25(18), 17268–17277.

Saint-Louis, R., Pelletier, E., 2004. LC-ESI-MS-MS method for the analysis of tetrabromobisphenol A in sediment and sewage sludge. Analyst, 129(8), 724.

Sarria, V., Parra, S., Adler, N., Péringer, P., Benitez, N., & Pulgarin, C., 2002. Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds. Catal. Today, 76(2–4), 301–315.

Scott, J. P., Ollis, D. F., 1995. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: Review and recommendations. Environ. Prog., 14(2), 88–103.

Stevens-Garmon, J., Drewes, J. E., Khan, S. J., McDonald, J. A., Dickenson, E. R. V., 2011. Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. Water Res., 45(11), 3417–3426.

Torres, P., 1992. Desenvolvimento de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado–Escola de Engenharia de São Carlos–Universidade de São Paulo. São Carlos SP 128p).

Yang, S., Wang, S., Liu, H., Yan, Z., 2012. Tetrabromobisphenol A: tissue distribution in fish, and seasonal variation in water and sediment of Lake Chaohu, China. Environ Sci Pollut Res Int., 19(9), 4090–4096.

Zagatto, P. A. 2008. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. Ed. Rima.

MONITORAMENTO DE METAIS EM BIORREATORES PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES

Lauren N. M. Yabuki [1]; Camila M. R. Silva [2]; Amauri A. Menegário [3]; Marcelo Zaiat [4]; Marcelo L. Garcia [5]

[1] Pós-Doutoranda do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[2] Aluna de Iniciação Científica do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP);
[3] Pesquisador do Centro de Estudos Ambientais (CEA/UNESP);
[4] Professor da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[5] Professor do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE/UNESP).

Resumo. Neste *trabalho, a concentração total dos metais B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, V, W e Zn foi monitorada em 4 reatores metanogênicos de leito fixo estrututurado com espuma de poliuretano, alimentados com diferentes tipos de águas residuárias: amostras reais de melaço e vinhaça de cana-de-açúcar e amostras sintéticas de esgoto salino e drenagem ácida de mina_DAM, a fim de investigar a interação metal e o processo de biodigestão anaeróbia. As águas residuárias analisadas possuem características químicas específicas e diferenciadas, não cabendo a comparação entre estas águas. Para as amostras de melaço, houve decréscimo significativo das eficiências de remoção dos metais, quando houve a retirada prevista do alcalinizante, tornando o meio ácido e provocando a precipitação dos metais. Para as amostras de DAM, ocorreram as maiores remoções dos metais Co, Cu, Ni, V e Zn com eficiências de remoção superiores a 70%. As altas eficiências de remoção de metal foram diretamente proporcionais às concentrações afluentes, quando ocorreu a suplementação de metais em 20, 60 e 100 % de sua concentração inicial. A avaliação da concentração de metais é uma importante ferramenta de monitoramento, a qual pode prevenir uma eventual redução de desempenho dos biorreatores no tratamento de efluentes.*

Introdução

No contexto atual, a busca mundial por alternativas limpas e sustentáveis de produção de energia, visando à minimização dos impactos ambientais decorrentes da queima de combustíveis fósseis, tem crescido o interesse pela utilização de tecnologias baseadas na digestão anaeróbia para a geração de biogás (Holm-Nielsen, Seadi e Oleskowicz-Popiel, 2009). A digestão anaeróbia é um processo biológico composto por etapas interdependentes, pelas quais a matéria orgânica é convertida por um consórcio de microrganismos, na ausência de oxigênio, a hidrogênio, ácidos orgânicos e solventes, durante a fermentação, sendo convertida na sequência a metano e gás carbônico (Speece, 1983).

Desde algumas décadas, a digestão anaeróbia é considerada uma alternativa vantajosa para o tratamento de uma ampla gama de águas residuárias por sua característica mais favorável em relação aos processos aeróbios, como baixo custo, menor demanda energética, menor volume de lodo produzido, tolerância a altas cargas orgânicas, entre outras (Franklin, 2001). Atualmente, a digestão anaeróbia é uma tecnologia promissora para o incremento do balanço energético de plantas industriais, por exemplo, da indústria sucroalcooleira, ao associar a mitigação de impactos ambientais com a recuperação de biogás a partir dos efluentes gerados (Fuess e Garcia, 2015). O conceito de biorrefinaria aplicado às estações de tratamento biológico de águas residuárias (Ryan et al., 2009; Moraes et al., 2014; Surendra et al., 2015) tem sido foco de muitos estudos. Na biorrefinaria, os efluentes a serem tratados passam a ser considerados matérias-primas, devido ao seu potencial de transformação em produtos de alto valor agregado.

Entre os diversos fatores que podem limitar a recuperação de energia pelo processo anaeróbio está a quantidade de elementos traços presentes na água residuária, como: cobalto,

cobre, ferro, molibdênio, níquel, selênio, tungstênio e zinco (Zhang, Ouyang e Li, 2012; Worm et al., 2009; Zandvoort et al., 2006), os quais são essenciais para a atividade dos microrganismos que catalisam numerosas reações anaeróbias (Glass e Orphan, 2012). Por outro lado, a presença de metais potencialmente tóxicos em altas concentrações pode influir negativamente sobre o processo (Chen, Cheng e Creamer, 2008; Aquino, Brandt e Chernicharo, 2013).

A identificação dos metais traço e suas respectivas concentrações é importante, pois pode ajudar na elucidação dos fenômenos ambientais que ocorrem durante o tratamento anaeróbio de águas residuárias. Neste trabalho, realizou-se o monitoramento da concentração total de diversos metais, como boro, cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel, selênio, tungstênio, vanádio e zinco com o objetivo de oferecer subsídio sobre o conhecimento da concentração total destes metais durante o processo de biodigestão anaeróbia. De forma complementar, ao se dispor de dados sobre a produção de biogás e/ou remoção de matéria orgânica, outro objetivo foi correlacionar a influência conjunta destes metais na digestão anaeróbia de diferentes tipos águas residuárias.

Material e Métodos

Todas as determinações analíticas de monitoramento dos biorreatores foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP), com exceção da digestão das amostras e análises multielementares por ICP OES que foram realizadas no Instituto de Geociências e Ciências Exatas e Centro de Estudos Ambientais (IGCE/CEA/UNESP, Rio Claro/SP). As características dos reatores e águas residuárias monitorados quanto á concentração dos metais traço boro, cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel, selênio, tungstênio, vanádio e zinco, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos reatores e águas residuárias monitorados.

Reator	**Água residuária**	**Temperatura de operação**	**COV entrada ($g.L^{-1}.d^{-1}$)**	**Outras condições de operação**
reator metanogênico de fase única (ASTBR-MI) de leito fixo com espuma de poliuretano	amostra real de melaço de cana-de-açúcar **amostra A**	55°C	2,5 - 10	adição de bicarbonato ($NaHCO_3$), solução de nutrientes e solução de vitaminas
reator de leito fixo estruturado (ABFSB) com espuma de poliuretano	amostra real de vinhaça de cana-de-açúcar **amostra B**	70 °C	3,3 - 6,9	reator mantido sob temperatura termofílica extrema (70°C)
reator anaeróbio de leito fixo-estruturado e fluxo descendente (DFSBR)	amostra de drenagem ácida de mina (DAM) sintética **amostra C**	30 °C	1,8 - 5,2	reator com a finalidade de avaliar a redução de sulfato e remoção de metais (Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn)
reator de leito fixo estruturado (RALFO) com espuma de poliuretano	amostra sintética simulando fração solúvel de esgoto sanitário **amostra D**	30 °C	0,2 - 0,8	reator operado com lodo de abatedouro de aves afim de avaliar remoção do antibiótico SFX

Metodologia analítica

A operação e o monitoramento dos reatores foram realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP). A digestão de amostras dos reatores e a determinação total dos metais traço foram realizadas no Centro de Estudos Ambientais (CEA/IGCE/UNESP, Rio Claro-SP). A concentração total de metais traço foi analisada por meio da Espectroscopia de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) (iCAP 6000 Series, Thermo Scientific, EUA), após prévia digestão ácida em sistema aberto por bloco aquecedor (150ºC) (adaptado de Dimpe *et al.*, (2014); Dimpe, (2015); Krug e Rocha, (2016)). As amostras foram digeridas em tubos digestor de borossilicato de vidro com 10 mL das amostras de águas residuárias e 3 mL de água régia (HCl/HNO_3 3:1). Em seguida, aquecidas sobre o bloco aquecedor a 150°C durante aproximadamente 4 horas. As amostras foram digeridas em duplicata e para fins de validação do método foram digeridas também amostras de branco do método (porção de água ultra-pura processada exatamente como a amostra, incluindo exposição a todo equipamento, vidraria, procedimentos e reagentes), branco fortificado/spike (branco do método contendo todos os mesmos reagentes e preservativos como as amostras, no qual uma concentração conhecida dos analitos é adicionada) e amostra fortificada/spike (porção adicional de uma amostra na qual, antes do seu processamento, são adicionadas quantidades conhecidas dos analitos de interesse) (Zhang, 2007).

Resultados e Discussão

Melaço de cana-de-açúcar

As concentrações totais dos metais B, Co, Mo, Ni, Se, V e Zn foram determinadas nas correntes de entrada e saída do reator, a partir do 60° dia de operação, em que a estabilidade do reator era maior e a proporção de CH_4 era maior que 50% em relação a produção de CO_2. O monitoramento das concentrações dos metais-traço está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados das análises para as amostras de melaço de cana-de-açúcar

	Amostra	**A60**	**A68**	**A76**	**A81**	**A88**	**A95**	**A112**	**A113**	**A118**	**A122**	**A129**	**A136**	**A143**	**A150**	**A154**
Concentração de entrada ($\mu g.L^{-1}$)	**B**	249,3	221,0	227,0	61,8	49,6	179,2	80,1	49,8	101,9	277,3	139,5	160,4	19,4	240,5	< LD
	Co	18,4	13,8	13,5	10,5	10,7	13,5	9,9	7,3	12,2	11,7	12,5	13,4	6,0	14,7	5,6
	Mo	13,5	10,0	10,6	9,8	9,9	4,6	8,5	14,7	9,8	7,4	11,0	8,6	3,0	7,4	1,8
	Ni	32,7	24,2	23,5	18,9	41,3	21,2	18,2	15,7	25,1	25,8	26,7	28,7	9,2	25,5	5,6
	Se	14,3	28,2	30,5	28,7	35,5	12,3	36,3	30,7	34,1	42,5	37,0	46,2	38,5	46,3	40,3
	V	23,3	20,6	19,8	12,4	10,3	17,4	14,4	15,0	31,0	22,1	30,1	21,7	5,9	24,2	5,5
	Zn	543,6	569,8	115,6	386,6	622,0	152,1	505,3	314,3	314,1	392,8	824,9	454,3	65,1	209,2	25,0
Concentração de saída ($\mu g.L^{-1}$)	**B**	259,8	207,5	150,9	280,0	162,6	129,4	90,8	73,2	93,3	190,0	81,6	142,4	3,7	318,4	-
	Co	13,3	12,1	11,5	14,0	14,3	13,6	7,8	7,3	11,4	9,3	16,4	9,5	4,3	13,7	-
	Mo	5,1	3,3	9,2	7,0	9,0	9,9	2,5	0,3	3,0	1,2	11,2	5,5	1,1	3,1	-
	Ni	22,5	18,2	30,0	25,6	24,5	23,5	13,0	10,0	19,8	17,8	51,1	16,5	5,5	22,0	-
	Se	6,9	11,3	14,1	15,6	12,8	25,7	10,1	8,7	6,0	15,8	17,0	10,9	21,4	18,7	-
	V	16,7	16,7	18,9	18,2	19,5	17,8	12,4	14,9	20,3	13,7	31,2	12,2	7,1	18,7	-

Zn	627,9	475,5	1142	310,0	358,6	409,8	1648	390,1	277,9	59,1	589,7	507,9	10,5	102,5	-
PVM	1965	1643	2488	2157	2270	2917	2309	2356	1568	2226	2482	2219	2822	2244	827,7
ε (%)	78,5	84,9	87,4	80,0	84,2	82,8	86,3	87,2	87,1	89,8	88,0	87,4	89,2	89,3	30,3

Os valores afluentes de concentração de boro variaram de 19,4 a 277,3 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 149,9 ± 90,0 $\mu g.L^{-1}$. Para o cobalto, a faixa de concentração analisada foi de 5,6 a 18,4 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 11,6 ± 3,4 $\mu g.L^{-1}$. O molibdênio apresentou valores de concentração variando de 3,0 a 14,7 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 8,7 ± 3,5 $\mu g.L^{-1}$. As concentrações de níquel variaram de 5,6 a 41,3 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 22,8 ± 8,8 $\mu g.L^{-1}$. Para o selênio, a faixa de concentração analisada foi de 12,3 a 46,3 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 33,4 ± 10,0 $\mu g.L^{-1}$. Os valores das concentrações de vanádio, variaram de 5,5 a 31,0 $\mu g.L^{-1}$, com concentração média igual a 18,2 ± 7,7 $\mu g.L^{-1}$.

As eficiências médias de remoção dos metais Mo e Se foram maiores que 50% (54,7 ± 27,2 e 61,5 ± 11,7 %, respectivamente). Para os demais metais, as eficiências de remoção obtidas foram iguais a 42,3 ± 29,1 %; 30,1 ± 24,4 %, 22,6 ± 21,7 22,8 ± 14,7 % e 13,7 ± 17,8 % para Zn, B, V, Ni, e Co, respectivamente. As concentrações de tungstênio não foram reportadas, porque apresentaram valores abaixo do limite de detecção (LD < 1,9 $\mu g.L^{-1}$) em ambas correntes de entrada e saída. No trabalho de Silva, Yabuki e Garcia (2019), neste Anais, são apresentadas as concentrações de cobre, ferro e manganês.

As concentrações de zinco apresentaram grande variabilidade dentro da faixa analisada (0,0 a 824,9 $\mu g.L^{-1}$), com concentração média igual a 366 ± 227 $\mu g.L^{-1}$. Esta variabilidade também foi reportada nos estudos de Üstün, 2009 e Buzier et al., 2011, para as concentrações de Fe, Cu e Zn.

O desempenho do tratamento anaeróbio das amostras de melaço de cana-de-açúcar também foi avaliado, indicados pela produção volumétrica de metano (PVM) e eficiência de remoção de DQO (ε) (Tabela 2). Até 154° dia de operação do reator, a produção de CH_4 foi entre 827,65 e 2917,28 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$, com uma PVM média de 2166,10 ± 517 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$. O reator apresentou eficiência média de remoção de DQO de 82 ± 15 %, com carga orgânica volumétrica (COV) de 10,0 $g.L^{-1}.d^{-1}$ e tempo de detenção hidráulico (TDH) de 28h, mostrando ótima performance no tratamento de águas residuárias de melaço da cana-de-açúcar.

A partir do 148° dia de operação do reator, houve a retirada prevista do alcalinizante - $NaHCO_3$. A retirada do alcalinizante e como consequência, a acidificação do sistema, gerou a inibição das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas, ocasionando a falta de CH4 (por isso, a PVM apresentou o valor mais baixo de 827,7 mL CH_4. L^{-1}. d^{-1} e a eficiência de remoção de DQO decresceu para 30,3 %) (Oliveira, 2018). A concentração dos metais do 150° dia em relação à semana anterior (143° dia), também foi afetada com aumento das concentrações afluentes e efluentes para a maioria dos metais analisados, entretanto houve queda na eficiência de remoção dos metais (decréscimo na remoção dos metais de 81 para -32%, 29 para 7%, 61 para 57%, 40 para 14%, 84 para 51% para B, Co, Mo, Ni e Zn, respectivamente), indicando que pode ter ocorrido a precipitação dos metais com o decréscimo do pH (pH afluente de 7,8 para 6,0 e pH efluente de 8,6 para 4,4) e sua deposição nos lodos/biofilmes do reator com posterior ressolubização e liberação em tempo subsequente de operação (Fermoso et al., 2015).

Vinhaça de cana-de-açúcar

As concentrações médias afluentes (média ± sd, n = 4) determinadas para os metais B, Co, Mo, Ni, Se, V e Zn foram de 105 ± 73; 29,0 ± 13,7; 12,2 ± 8,2; 30,1 ± 12,6; 31,6 ± 29,6; 29,8 ± 15,4 e 706 ± 439 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente. O desvio padrão está com um valor próximo

ou superior a 50% em relação a média das concentrações, indicando que há uma dispersão muito elevada, devido às diferenças na composição da vinhaça coletada ao longo da safra da cana-de-açúcar (4 lotes de vinhaça utilizados, V1 com DQO de 36 $g.L^{-1}$: início ao 33° dia; V2 com DQO de 44 $g.L^{-1}$: 34° ao 65° dia; V3 com DQO de 24 $g.L^{-1}$: 66° ao 89° dia e V4 com DQO de 19 $g.L^{-1}$: 90° ao 125° dia). As concentrações efluentes são apresentadas na Tabela 3. As concentrações de tungstênio não foram reportadas, porque os valores foram abaixo do limite de detecção (LD < 1,9 $\mu g.L^{-1}$) em ambas correntes de entrada e saída. As concentrações de cobre, ferro e manganês estão apresentadas no trabalho *Monitoramento das concentrações totais de cobre, ferro e manganês na digestão anaeróbia de melaço e vinhaça*, deste Anais.

Tabela 3: Resultados das análises para as amostras de vinhaça de cana-de-açúcar

Amostra		B10	B19	B26	B32	B40	B45	B53	B69	B76	B96	B104	B111	B118	B125	B132	B138
Concentração de saída ($\mu g.L^{-1}$)	B	< LD	119,3	118,7	7,4	94,3	84,5	57,4	148,9	111,7	75,1	24,3	129,2	122,9	81,7	14,0	39,6
	Co	2,3	10,6	9,8	11,7	12,0	19,5	12,7	23,8	27,5	18,4	17,1	19,6	15,5	11,8	13,5	12,7
	Mo	< LD	1,4	2,0	2,0	1,5	3,3	1,4	0,6	1,1	1,5	1,1	0,7	< LD	< LD	< LD	0,5
	Ni	4,4	46,4	46,5	52,6	46,2	11,5	59,8	142,8	124,2	25,7	27,5	22,2	15,3	10,7	12,1	7,0
	Se	72,6	11,6	8,3	8,7	10,6	30,3	9,7	7,2	10,1	14,7	30,2	23,2	16,7	14,5	15,0	11,6
	V	< LD	16,2	13,1	15,1	16,3	18,3	18,2	19,9	23,2	9,4	21,8	8,7	5,5	4,5	6,4	4,9
	Zn	31,7	157,8	243,0	16,3	122,7	143,2	100,0	129,1	110,9	78,4	158,4	44,4	55,2	22,7	14,6	751,4

A partir do monitoramento da concentração total de metais no efluente tratado das amostras de vinhaça, observou-se que as concentrações de zinco apresentaram ampla faixa de concentração (15 a 751 $\mu g.\ L^{-1}$), com concentração média efluente igual a 148 ± 173 $\mu g.L^{-1}$. Esta variabilidade foi também constatada nas amostras de melaço (faixa de concentração efluente variando de 10,5 a 1648 $\mu g.L^{-1}$) e reportado nos estudos de Üstün (2009) e Buzier et al. (2011).

As faixas de concentração do efluente tratado determinada para os demais metais variaram de 14 a 179 $\mu g.L^{-1}$ para B; 2,8 a 28 $\mu g.L^{-1}$ para Co; 0,5 a 3,3 $\mu g.L^{-1}$, para Mo; 4,4 a 143 $\mu g.L^{-1}$ para Ni; 7,2 a 73 $\mu g.L^{-1}$ para Se e 4,5 a 23 $\mu g.L^{-1}$ para V. As concentrações efluentes médias (média e desvio padrão, n = 16) para B, Co, Mo, Ni, Se e V foram iguais 88 ± 28, 15 ± 1, 1,1 ± 0,9, 41 ± 2, 18 ± 3, 13 ± 2 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente.

Alguns metais apresentaram altas eficiências de remoção, na seguinte ordem: Mo (89 %) < Zn (81 %) < V (61 %) < Co (53 %). Eficiência de remoção nulas ou negativas foram encontradas para B (-97 %), Ni (-27 %) e Se (-22 %). Alguns autores também relataram eficiência de remoção de metal nulas ou negativas (Mn e As) (Üstün, 2009). Uma possível explicação deste fenômeno é atribuída à precipitação dos metais por íons sulfetos (S^{2-}), carbonatos (CO_3^{2-}) e fosfatos (PO_4^{3-}) e sua deposição nos lodos/biofilmes do reator (Kaplan et al., 1987; Kröpfelová et al., 2009)

Os resultados da produção de metano e remoção de matéria orgânica observados no reator metanogênico, não foram satisfatórios (PVM com valores entre 9,82 e 333,80 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$ e média igual a 135,9 ± 114 $mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}$ e eficiência de remoção de DQO variando de remoções negativas até 37,5 %), uma vez que o reator acidogênico/metanogênico em duplo estágio trabalhava em condição termofílica extrema (70 °C) com o objetivo de uma produção estável de hidrogênio (produção volumétrica de hidrogênio – PVH média de 571 ± 86 mL $H_2.L^{-1}.d^{-1}$) e acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) (80% de ácido acético) (Niz, 2019).

Drenagem ácida de mina

As concentrações afluentes de B e V, variaram de 132 a 358 e de 4,9 a 14,4 µg.L^{-1} (dados não mostrados), com concentrações médias de 225 ± 102 e 8,6 ± 5,1 µg.L^{-1}, respectivamente. Estes metais sofreram as menores variações em suas concentrações pois não foi realizada a suplementação para tais metais, durante a operação do reator. Os metais Co, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn apresentaram ampla faixa de concentração (5,9 - 13847; 29,7 - 42368; 6298 - 217961; 465 - 24843; 6,2 - 17191 e 1710 - 44821 µg.L^{-1}, respectivamente), pois estas faixas de concentração abrangem todas as fases de operação do reator onde houve a adição gradativa destes metais (20, 60 e 100 % de sua concentração inicial). Os metais molibdênio, selênio e tungstênio não foram reportados, porque suas respectivas concentrações apresentaram valores abaixo do limite de detecção (LD < 0,3; 3,0 e 1,9 µg.L^{-1} para Mo, Se e W, respectivamente)

Durante as fases de operação do reator IV (116-155) e V (156-175) ocorreram as maiores remoções dos metais Co, Cu, Ni, V e Zn com eficiências médias de remoção iguais a 87 ± 1, 73 ± 2, 88 ± 1, 63 ± 19 e 71 ± 8 %, respectivamente. Tal remoção pode ser explicada pelo início da suplementação de metais na fase IV (20%), aumentando a adição de metais para 60% na fase V (Watanabe et al., 2018). Alguns autores relataram similar relação entre a concentração de metal afluente e a eficiência de remoção onde foi observado que as eficiências de remoção de metal foram diretamente proporcionais às concentrações afluentes (Chipasa, 2001; Busetti et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Üstün, 2009)

As eficiências de remoção de Fe (Figura 1) foram altas durante todo o tempo de operação do reator (eficiência média de 75 ± 22 %). Em estudo de de la Varga et al. (2013), a alta remoção de Fe foi atribuída à alta solubilidade dos óxidos de Fe, em condições anaeróbicas, que são precipitados em sulfetos de Fe. Somente na última fase (VI, dias 176-237), a eficiência de remoção de Fe caiu para 43 %, indicando que a suplementação de 100% da concentração de Fe inicial, pode estar inibindo a remoção deste metal. Para todos os metais analisados, exceto Mn (que ao final do tempo de operação do reator apresentou 80% de eficiência de remoção), esta inibição na remoção dos metais também foi indicada.

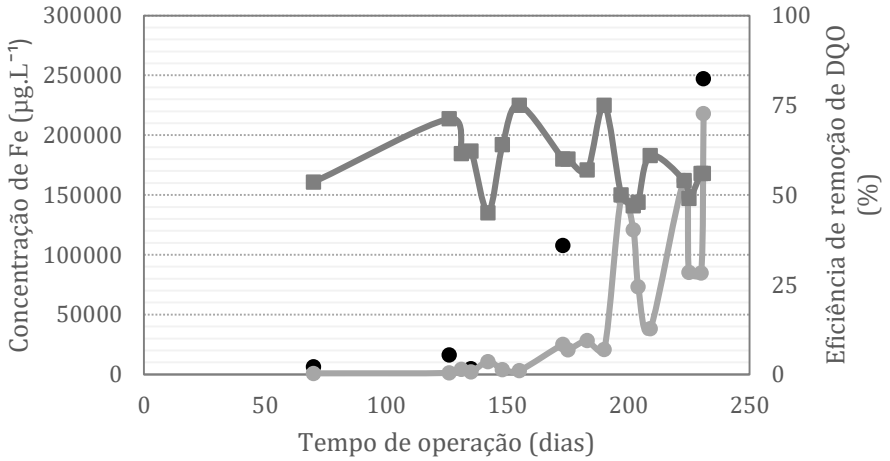


Figura 1: Perfil temporal da concentração de entrada (●) e de saída de ferro (●) relacionada com a eficiência de remoção de DQO (■) para as amostras de DAM.

A eficiência de remoção de Fe no presente estudo, tem valores similares ao apresentado por Godoi et al. (2017) que analisaram a remoção do Fe com concentrações variando de 50 a 400 mg. L^{-1} com remoção de Fe superiores a 80%. Resultados semelhantes foram apresentados por Bekmezci et al. (2011) que obtiveram remoções superiores a 99% para os metais Co, Cu, Fe e Ni.

As eficiências de remoção de Mn variaram de -7 a 18 % (com exceção da eficiência de 80 %, já relatada no parágrafo anterior). Tais valores foram similares aos dados relatados por Barbosa et al. (2014) que obtiveram baixa remoção de Mn, em experimento batelada, de apenas 27% quando a concentração inicial era de 1,5 mg. L^{-1}. Essa baixa eficiência de remoção e do Mn é relatada por alguns autores, que atribuem a baixa remoção de Mn à complexidade de interação deste metal, além da inibição na precipitação de Mn, no caso da relação das concentrações Fe/Mn serem altas (Bekmezci et al., 2011, Kröpfelová et al., 2009).

A Figura 1 apresenta as variações das eficiências de remoção de matéria orgânica de acordo com as concentrações de ferro na entrada e saída do reator operando com amostras de drenagem ácida de mina. Para as concentrações de ferro até 250000 $\mu g.L^{-1}$, houve um aumento na eficiência de remoção de DQO de 50 para 70 % (dia 126 - início da fase IV; adição de metais em 20 % da concentração total de metais), seguido por uma diminuição na concentração do metal, concomitante com a diminuição de eficiência de remoção de DQO. Nas fases posteriores do reator (fases V e VI com adição de metais em 60 e 100 % da concentração total de metais, respectivamente) as concentrações de ferro aumentam exponencialmente, mas as eficiências de remoção de DQO caem cerca de 10 %. A adição de metais nas fases V e VI pode ter afetado as eficiências de remoção de DQO (bem como a remoção de Fe, relatada anteriormente) dadas as menores eficiências de remoção observadas, podendo ser atribuída aos efeitos adversos sobre a biomassa devido a adição excessiva de ferro, por exemplo, nas concentrações mencionadas (100 % de sua concentração inicial).

Esgoto salino

As concentrações de Co, Mn, Mo, Ni, Se, V e W não foram quantificadas (os valores estavam abaixo do limite de detecção) nas correntes de entrada e saída do reator em questão. As concentrações afluentes dos metais B, Cu, Fe e Zn, apresentaram valores iguais a 239,5; 22,5; 4932,5 e 301,8 µg. L^{-1}, respectivamente. As concentrações efluentes dos metais B, Cu, Fe e Zn, os dados da produção volumétrica de metano (PVM) e eficiência de remoção de DQO (ε) para as amostras de esgoto salino, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados das análises para as amostras de esgoto salino

Amostra		**D01**	**D20**	**D23**	**D35**	**D38**	**D41**	**D56**	**D59**	**D66**	**D69**	**D72**	**D77**	**D79**	**D84**	**D87**
Concentração de saída (µg. L^{-1})	**B**	103,0	80,4	16,7	74,3	127,4	83,1	49,0	52,6	129,0	111,5	120,0	64,2	57,2	59,2	70,9
	Cu	9,4	11,6	6,6	13,5	12,0	12,7	7,3	5,9	9,0	5,7	8,9	9,5	9,2	7,5	6,8
	Fe	1850,8	172,2	309,5	244,6	194,8	229,1	256,4	89,5	181,8	161,2	235,3	209,5	482,7	185,0	164,4
	Zn	228,0	106,5	18,6	68,7	72,6	72,3	137,0	17,6	51,5	42,8	16,7	15,1	460,0	35,0	143,3
PVM		74,0	75,2	68,1	121,6	117,9	115,7	101,1	110,9	102,7	76,7	81,4	101,4	101,4	106,8	101,4
ε (%)		86,0	85,3	72,6	81,6	100,0	100,0	89,7	82,0	83,7	87,7	84,9	87,7	83,3	86,4	86,4

A concentração de ferro diminuiu consideravelmente para 1850,8 $\mu g.L^{-1}$ no primeiro dia de operação e depois foi reduzido para 164,4 $\mu g.L^{-1}$ no final do período de operação (Figura 3a e Fig. 3b), resultando em uma remoção de metal eficiente de 93 ± 9%. A redução da concentração de ferro durante este processo pode ter sido influenciada pela ocorrência de reações de precipitação entre o metal e alguns compostos que são produzidos durante os processos biológicos de redução do sulfato, como sulfetos, carbonatos e hidróxidos (Cohen, 2006). Dentro da faixa de concentração de ferro relatada (89,5 a 1850,8 $\mu g.L^{-1}$) não foi possível estabelecer uma relação de influência entre a PVM e/ou eficiência de remoção de DQO, não desempenhando um papel importante na limitação do desempenho geral do sistema.

As eficiências médias de remoção de metais para B, Cu e Zn foram, respectivamente,

67 ± 14, 60 ± 11 e 67 ± 38%. Uma ordem decrescente semelhante da eficiência média de remoção de metais (Fe > Zn > Cu) foi descrita por (Üstün, 2009) em seu estudo com estações de tratamento de águas residuárias urbanas. Durante o período de operação do reator, as concentrações totais do efluente tratado dos demais metais variaram de 16,7 a 129,0 $\mu g.L^{-1}$ para boro, 5,7 a 13,5 $\mu g.L^{-1}$ para cobre e 15,1 a 460,0 $\mu g.L^{-1}$ para zinco. Apesar de não ter sido encontrada uma correlação entre a concentração de metais e a performance do biorreator, é possível inferir que diante da configuração do reator em questão, a digestão anaeróbica pode ser usada para remover metais a uma extensão relativamente grande.

Conclusões

Pôde-se estabelecer uma avaliação dos sistemas de tratamento de efluentes, por meio da concentração total dos metais, utilizando quatro tipos de águas residuárias: melaço, vinhaça esgoto salino e drenagem ácida de mina, cada um com características bastante evidenciadas e particulares. A análise da concentração dos metais presentes nos afluentes e efluentes dos reatores foi importante e, quando são analisados conjuntamente aos parâmetros operacionais, auxilia na orientação do melhor funcionamento e desempenho dos reatores, visto que os processos bioquímicos envolvidos no tratamento dos efluentes podem ser influenciados pelas características específicas dos efluentes e reatores, associadas à presença de metais.

Referências Bibliográficas

Aquino, S.F., Brandt, E.M.F., Chernicharo, C.A.L. 2013. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. Eng. Sanit. Ambient. 18 (3),187-204.

Aquino, S.F., Chernicharo, C.A.L., Foresti, E., Santos, M.L.F., Monteggia, L.O. 2007. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. Eng. Sanit. Ambient. 12(2), 192-201.

Barbosa, L.P., Costa, P.F., Bertolino, S.M.,Silva, J.C.C., Guerra-Sá, R., Leão, V.A., Teixeira, M.C. 2014. Nickel, manganese and copper removal by a mixed consortium of sulfate reducing bacteria at a high COD/sulfate ratio. World J. Microbiol. Biotechnol. 30, 2171-2180.

Bekmezci, O.K., Ucar, D., Kaksonen, A. H., Sahinkaya, E. 2011. Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor.

J. Hazard. Mater. 189(3), 670–676. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.087

Busetti, F., Badoer, S., Cuomo, M., Rubino, B., Traverso, P. 2005. Occurrence and Removal of Potentially Toxic Metals and Heavy Metals in the Wastewater Treatment Plant of Fusina (Venice, Italy). Ind. Eng. Chem. Res. 44, 9264-9272.

Buzier, R., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Keirsbulck, M., Mouchel, J.-M., 2011. Inputs of total and labile trace metals from wastewater treatment plants effluents to the Seine River. Phys. Chem. Earth 36, 500–505.

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. Bioresour. Technol. 99, 4044-4064.

Chipasa, K.B. 2003. Accumulation and fate of selected heavy metals in a biological wastewater treatment system. Waste Manag. 23,135-143.

Cohen, R.R.H., 2006. Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. J. Clean. Prod. 14, 1146–1157.

Dimpe, K.M., Ngila, J.C., Mabuba, N., Nomgongo, P.N. 2014. Evaluation of sample preparation methods for the detection of total metal content using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in wastewater and sludge. Phys. Chem. Earth. 76-78, 42-48.

Dimpe, M. 2015. Sample preparation techniques for determination of total metal content in wastewater treatment plants in Gauteng Province. Dissertation of Master of Science Degree in Chemistry, University of Johannesburg, Department of Applied Chemistry, Johannesburg, África do Sul.

Fermoso F.G., van Hullebusch, G.E., Guibaud, D., Collins, G., Svensson, B.H., Carliell-Marquet, C., Vink, J.P.M., Esposito, G., Frunzo, L. 2015. Fate of Trace Metals in Anaerobic Digestion. In:

Guebitz G., Bauer A., Bochmann G., Gronauer A., Weiss S. (Eds.), Biogas Science and Technology. Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. vol 151. Springer, Cham, pp. 171-195.

Franklin, R.J. 2001 Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater. Water Sci. Technol. 44(8), 1-6.

Fuess, L.T., Garcia, M.L. 2014 Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. J. Environ. Manage. 145, 210–229.

Fuess, L.T.; Garcia, M.L. (2015) Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. J. Environ. Manage. 162, 102–114.

Giné-Rosias, M.F. 1998. Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES). Piracicaba/SP.

Glass, J.B., Orphan, V. 2012 Trace Metal Requirements for Microbial Enzymes Involved in the Production and Consumption of Methane and Nitrous Oxide. Frontiers in Microbiology. 3, 61.

Godoi, L.A.G., Foresti, E., Damianovic, M.H.R.Z. 2017 Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. J. Environ. Manage. 197, 597-604.

Gomes, S.D., Fuess, L.T., Manunga, T., Lima Gomes, P.C.F., Zaiat, M. 2016 Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. Int. J. Hydrogen Energy. 41, 8120-8131.

Hoenig, M., Baeten, H., Vanhentenrijk, S., Vassileva, E., Quevauviller, P. 1998 Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. Anal. Chim. Acta. 358 (1), 85-94.

Holm-Nielsen, J.P., Seadi, T., Oleskowicz-Popiel, P. 2009 The future of anaerobic digestion and biogas utilization. Bioresour. Technol. 100(22), 5478-84.

Kaplan, D., Abeliovich, A., Ben-Yaakow, S., 1987. The fate of heavy metal in wastewater stabilization ponds. Water Res. 21, 1189–1194.

Kröpfelová, L., Vymazal, J., Svehla, J., Stíchová, J., 2009. Removal of trace elements in three horizontal sub-surface flow constructed wetlands in the Czech Republic. Environ. Pollut. 157, 1186–1194.

Kola, H., Perämäki, P. 2004 The study of the selection of emission lines and plasma operating conditions for efficient internal standardization in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 59 (2), 231-42.

Korn, M.G.A., Boa Morte, E.S., Santos, D.C.M.B., Castro, J.T., Barbosa, J. T. P., Teixeira, A. P., Fernandes, A. P., Welz, B., Santos, W.P.C., Santos, E.B.G.M. 2008 Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - a review. Appl. Spectrosc. Rev. 43 (2), 67-92.

Krug, F.J. (Ed.) 2010 Método de preparo de amostras: fundamentos de preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracibaba/SP, 340 p.

Krug, F.J., Rocha, F.R.P. (Eds.) 2016 Métodos de preparo de amostras para análise elementar. São Paulo: EditSBQ, v. 1, p. 572.

Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G. 1998. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. Crit. Rev. Environ. Sci, 28 (1), 41-88.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C. 2013 Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy. 38(1), 54–62.

Prado, R.M., Caione, G., Campos, C.N.S. 2013 Filter Cake and Vinasse as Fertilizers Contributing to Conservation Agriculture. Appl. Environ. Soil Sci. Article ID 581984, doi: http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984.

Moraes, B.S., Junqueira, T.L., Pavanello, L.G., Cavalett, O., Mantelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M. 2014 Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: profit or expense? Appl. Energy. 113, 825–835.

Niz, M.Y.K., 2019. Produção biológica de hidrogênio e metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema. 144p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento), EESC, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Nogueira, E.W., de Godoi, L.A.G., Brucha, G., Damianovic, M.H.R.Z. 2018. Tratamento de drenagem ácida de minas sintética utilizando reator anaérobio de leito fixo-estruturado e fluxo descendente (DFSBR). ANAIS DO II SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO, EESC, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 412.

Oliveira, A.S., Bocio, A., Trevilato, T.M.B., Takayanagui, A.M.M., Domingo, J.L., Segura-Muñoz, S.I. 2007. Heavy Metals in Untreated/Treated Urban Effluent and Sludge from a Biological Wastewater Treatment Plant. Env. Sci. Pollut. Res, 14 (7), 483-489.

Oliveira, C.A.,2018. Digestão anaeróbia termofílica do melaço de cana-de- açúcar em reatores de leito fixo estruturado de duas fases e fase única para a produção de biogás. 132p. Dissertação (mestrado), EESC, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Ripley, A.L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C. 1986. Improved alkalimetric for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strenght wastes. 58, 406–411.

Ryan, D., Gadd, A., Kavanagh, J., Barton, G.W. 2009. Integrated biorefinery wastewater design. Chem. Eng. Res. Des. 87, 1261-1268.

Sapkota, A., Krachler, M., Scholz, C., Cheburkin, A.K., Shotyk, W. 2005. Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. Anal. Chim. Acta, 540 (2), 247–256.

Silva, C.M.R.; Yabuki, L.N.M.; Garcia, M.L, 2019. Monitoramento das concentrações totais de Cobre, Ferro e Manganês na digestão anaeróbia de melaço. Holos Environment, artigo em fase de edição, p. 19.

Speece, R.E. 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. Environ. Sci. Technol. 17(9), 416A-427A.

Surendra, K.C., Sawatdeenarunat, C., Shrestha, S., Sung, S., Khanal, S.K. 2015. Anaerobic Digestion-Based Biorefinery for Bioenergy and Biobased Products. Industrial Biotechnology 11(2), 103-112. Tähti, H., Kaparaju, P., Rintala, J., 2013. Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. Int. J. Hydrogen Energy 38, 4997–5002.

Torres, P. 1992. Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 185 p.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. 2007. SW-846 Method 6010: Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. Washington.

Üstün, G.E., 2009. Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants. J. Hazard. Mater. 172, 833–838. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.073

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M. 2000 Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass Bioenergy. 19, 63–102.

Worm, P., Fermoso, F.G., Lens, P.N.L., Plugger, C. 2009 Decreased activity of a propionate degrading community in a UASB reactor fed with synthetic medium without molybdenum, tungsten and selenium. Enzyme Microb. Technol. 45, 139–145.

Zandvoort, M.H., van Hullebusch, E. D., Golubnic, S., Gieteling, J., Lens, P.N.L. 2006 Induction of cobalt limitation in methanol-fed UASB reactors. J. Chem. Technol. Biot. 81(9), 1486-1495.

Zhang, C. 2007. Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis, Wiley & Sons, New Jersey.

Zhang, L., Ouyang, W., Li, A. 2012 Essential role of trace elements in continuous anaerobic digestion of food waste. Procedia Environ. Sci. 16, 102-111.

EFEITO DA CARGA ORGÂNICA NA PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELO TRATAMENTO DE SORO E GLICERINA EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA

Juliane N. Albuquerque [1]; Marina Chiara Hallak [2];
Suzana M. Ratusznei [3]; José Alberto D. Rodrigues [3]

[1] Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[2] Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[3] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Neste trabalho foi avaliado o efeito da carga orgânica na produção de metano pela codigestão de soro (25%) e glicerina (75%), em condições termofílicas (55°C), em reator anaeróbio, operado em batelada (B) e batelada alimentada (BA) sequenciais, com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica (80 rpm). Inicialmente, houve um período de adaptação da biomassa, na qual adotou-se a estratégia de submeter a biomassa ao aumento gradual da concentração de substrato (soro de leite), de 1000 a 5000 mgDQO·L^{-1}, e da temperatura (35 a 55^{o}C). Na sequência, o desempenho do AnSBBR (5,6 L) foi avaliado em função do aumento da concentração afluente (10 gDQO·L^{-1} e 20 gDQO·L^{-1}) para a mesma proporção de glicerina (75%) e a mesma temperatura de 55^{o}C. Ademais, para ambas condições, avaliou-se o efeito da estratégia de alimentação batelada e batelada alimentada. Verificou-se alta eficiência de remoção de matéria orgânica, carboidratos e glicerina no AnSBBR em todas as condições. Os valores mais elevados de eficiência de remoção (88%) e de rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida (17,6 molCH$_4$.kgDQO^{-1}) foram obtidos na condição operada em batelada (B) com menor concentração afluente (10 gDQO·L^{-1}). Os maiores valores de carga orgânica volumétrica removida (13,8 gDQO·L^{-1}·d^{-1} e de 12,4 gDQO·L^{-1}·d^{-1}) e de produtividade em metano (216,2 e de 223,4 molCH$_4$·m^{-3}·d^{-1}), foram obtidos, respectivamente, na operação em batelada (B) e em batelada alimentada (BA), para o maior valor de concentração (20,0 gDQO·L^{-1}). Desta forma verifica-se sistema foi mais sensível à alteração da concentração do que em relação à alteração na estratégia de alimentação.*

Introdução

O processo de digestão anaeróbia é uma tecnologia de tratamento de resíduos que possibilita tanto o controle de poluição quanto a recuperação de energia. Muitos resíduos agrícolas e industriais são passíveis de degradação por digestão anaeróbia devido aos seus altos níveis de materiais facilmente degradáveis. O produto final da digestão anaeróbia é o biogás que consta de uma mistura de metano (55-75 vol.%) e dióxido de carbono (25-45 vol.%) com um valor de combustão entre 22 e 30 MJ/Nm^3. A quantidade de metano que pode ser produzida depende da concentração da matéria orgânica digestível, das condições operacionais implementadas e do tipo de sistema utilizado (Mes et al., 2003).

A digestão anaeróbia ocorre com a participação de dois grupos distintos de microrganismos. O primeiro grupo é composto principalmente por bactérias acidogênicas que convertem a matéria orgânica a ácidos orgânicos de cadeia curta, gás carbônico e hidrogênio. O segundo grupo é composto por arqueias metanogênicas acetoclásticas, que convertem acetato a metano, e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, que produzem metano a partir de gás carbônico e hidrogênio. Aproximadamente 30% do metano produzido provêm da metanogênese hidrogenotrófica; o restante resulta da conversão de acetato a metano. A produção de metano depende, portanto, da conversão eficiente de matéria orgânica em acetato na etapa prévia.

A tecnologia de digestão anaeróbia foi empregada com sucesso para amenizar uma variedade de resíduos (Nguyen *et al*., 2015). O processo de biodigestão se desenvolve sobre

resíduos rurais (esterco), agroindustriais (vinhaça, efluentes das indústrias de laticínios e dos matadouros), domésticos ou comunitários (lama de esgotos) e, também, sobre plantas (aguapé) (Malajovich, 2012). Sobre este contexto, se destaca a codigestão do soro e glicerina.

O soro é um subproduto da indústria de laticínios, obtido durante a produção de queijo. Consiste em 80-90% do volume do leite utilizado para a produção de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou (Bezerra *et al*., 2009 e Lima *et al*., 2016). O soro é considerado um efluente altamente poluente devido à sua elevada carga orgânica e volume gerado, o que representa um impacto ambiental significativo para a indústria de laticínios. Por isso, o soro é utilizado em reatores acidogênicos e metanogênicos como substrato para a digestão anaeróbia. Porém, sua alta biodegradabilidade pode causar o aumento repentino de ácidos que causam a instabilidade do processo. Em vista disso, o uso de um cosubstrato com a capacidade tamponante no tratamento do soro ajudará na melhoria do processo (Rivero *et al*., 2014). Em vista disso, utiliza-se a glicerina, que possui capacidade tamponante, como um cosubstrato para o soro do leite.

A glicerina, ou glicerol, é o maior subproduto da indústria de biodiesel. Para cada 100 kg de biodiesel produzidos, cerca de 10 kg de glicerol bruto são gerados. Ademais, a glicerina é uma substância muito biodegradável, apresenta um pH que condiz com as condições da digestão anaeróbia e há uma grande variedade de microrganismos anaeróbios que utilizam a glicerina como fonte de carbono (Song *et al*., 2004; Tatara *et al*., 2005; Ueno *et al*., 2007; Yang *et al*., 2008; Ferraz Júnior *et al*., 2016).

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho consiste na aplicação do reator anaeróbio operado em batelada sequencial com agitação mecânica, 80 rpm, e biomassa imobilizada em suporte inerte (AnSBBR), aplicado à produção de metano pela codigestão de glicerol (efluente do processo de produção de biodiesel) e soro de leite (efluente da produção de laticínios) em condições termofílicas (55ºC). Por se tratar de resíduos que saem do processo produtivo à altas temperaturas, torna-se adequada a aplicação do referido biorreator em condições termofílicas. O desempenho do biorreator foi avaliado por indicadores de desempenho relacionados à remoção de matéria orgânica (na forma de DQO e carboidratos), estabilidade operacional (compostos intermediários do metabolismo anaeróbio), produtividade/composição do biogás (geração de metano), e do rendimento entre metano gerado e matéria orgânica consumida.

Material e Métodos

A Figura 1 apresenta o esquema do biorreator com agitação mecânica utilizado (BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co.) constituído por um frasco de vidro de 20 cm de diâmetro e de altura, com capacidade total de 6 L e capacidade útil de 5,6 L.

O material suporte foi confinado em um cesto de aço Inoxidável-316 e também na parte inferior do reator, entre a base do reator e o cesto. O cesto era perfurado apresentando as seguintes dimensões: 18 cm de altura, 7 cm e 17,5 cm de diâmetro interno e externo, respectivamente. A parte inferior do cilindro interno do cesto foi coberta por uma tela de aço inoxidável, de modo a reter o biofilme preso na parte inferior do reator. A agitação foi de 80 rpm, realizada por motor acoplado aos 2 impelidores tipo turbina de 6 cm de diâmetro constituído por seis lâminas planas (padrão Rushton) e instalados a 8 e 16 cm do fundo do tanque.

A alimentação e descarga foram realizadas por bombas tipo diafragma marca Prominent modelos β e Concept, respectivamente. Um sistema de automação composto por temporizadores foi responsável pelo acionamento/parada das bombas e do agitador, de modo a implementar as etapas da operação em batelada sequencial. A temperatura foi controlada pela circulação de água destilada pela jaqueta da parte inferior do reator, ligada a um banho ultratermostático (marca Marconi modelo MA-184).

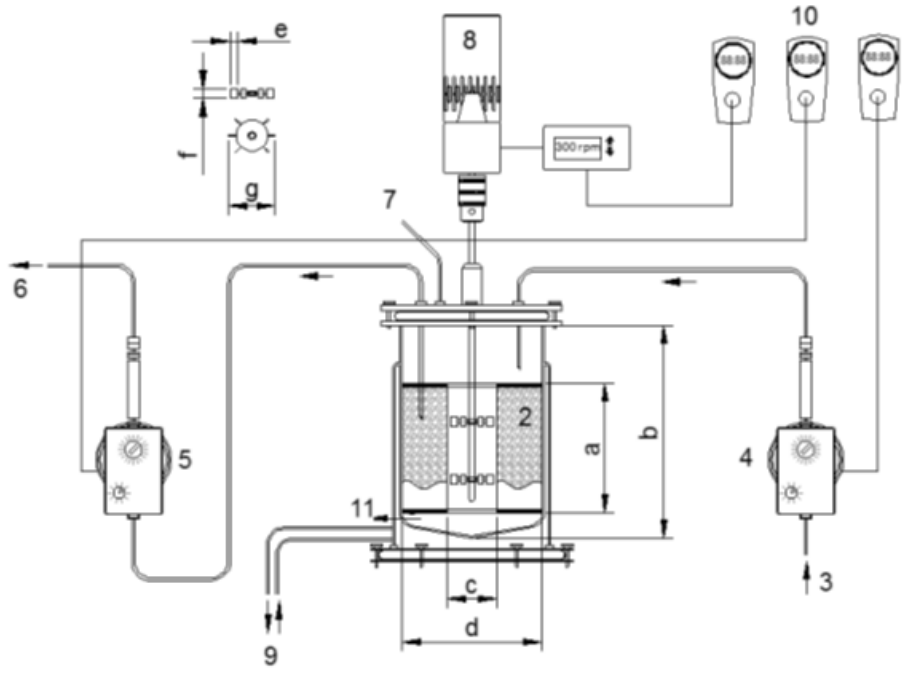


Figura 1: Representação esquemática do reator anaeróbio operado em batelada sequencial com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica

[Notação: (a) Reator: 1 – Biorreator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co.) com capacidade de 6 L (b = 29,5 cm; d = 18,0 cm); 2 – Cesto de retenção e material suporte de biomassa (a = 18,0 cm; c = 7,0 cm); 3 – Afluente; 4 – Bomba de alimentação; 5 – Bomba de descarga; 6 – Efluente; 7 – Saída de biogás; 8 – Sistema de agitação; 9 – Sistema de controle de temperatura (banho ultratermostático); 10- Sistema de automação; 11 – Espaço entre a base do reator e o cesto para retenção de biomassa. (b) Detalhes dos impelidores: Dois impelidores tipo turbina com seis pás planas
e = 2 cm; f = 1,5 cm; g = 6 cm)].

O inóculo (26,9 $gST \cdot L^{-1}$ e 16,5 $gSVT \cdot L^{-1}$) utilizado foi proveniente do sistema de tratamento termofílico (UASB) de vinhaça da Usina de São Martinho (Pradópolis, SP). O material utilizado como suporte inerte para imobilização da biomassa foi espuma de poliuretano na forma de cubos de 1,0 cm de aresta, com densidade aparente de 23 $kg \cdot m^{-3}$ e porosidade próxima a 95%. O lodo anaeróbio termofílico foi imobilizado conforme metodologia proposta por Zaiat *et al.* (1994).

A glicerina foi obtida de uma usina de produção de biodiesel. O soro comercial é obtido como efluente do processo de produção de laticínios. Foi utilizada a forma desidratada em pó (composição: 73% carboidratos, 11 % proteínas, 2% gordura, minerais 9%, umidade 5%), cuja água residuária foi obtida a partir da dissolução com água de torneira. Foi necessária a suplementação de alcalinidade pela adição de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) em função das características da água residuária.

Na Tabela 1 é apresentada a composição da água residuária, ressaltando-se que se tem as seguintes relações teóricas: 1000 mgDQO é igual a 787,6 mg de glicerina e igual a 897,0 mg de lactose.

Tabela 1: Composição da água residuária.

Composto	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Soro de leite	897,0
Glicerina	787,6
Bicarbonato de sódio	16

Análises físico-químicas

O monitoramento do sistema foi constituído por análises em amostras do afluente e do

efluente, realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1995), considerando também o método de Ripley *et al.* (1986) na determinação da alcalinidade e de Dubois *et al.* (1956) na determinação de carboidratos, além do método adaptado de Bondioli e Bella (2005), para a determinação de glicerina total. Os compostos intermediários do metabolismo anaeróbio e a composição do biogás foram analisados por cromatografia em fase gasosa. O volume acumulado de biogás produzido foi aferido por medidor de gás Ritter modelo MilligasCounter.

Procedimento experimental da operação do reator

Na Tabela 2 são apresentadas as 4 condições de operação implementadas (C1 a C4) no AnSBBR, na qual B refere-se à operação em batelada; BA refere-se à operação em batelada alimentada; C_{SAFL} é a concentração do afluente e t_F é o tempo de alimentação (10 e 240 min). O tempo de ciclo foi de 8 h, a frequência do agitador foi de 80 rpm e volume alimentado/descarregado foi de 1,0 L. A proporção de glicerina (G%) no afluente foi mantida em 75% para todas as condições enquanto a de soro (S%) manteve-se em 25%.

Tabela 2: Resumo das condições experimentais implementadas.

Condição	Afluente S(%)/G(%)	C_{SAFL} ($gDQO \cdot L^{-1}$)	Operação	t_F (min)	T (°C)
C1	25/75	10,0	B	10	55
C2			BA	240	
C3	25/75	20,0	B	10	
C4			BA	240	

O procedimento de operação do AnSBBR foi executado da seguinte forma: o primeiro ciclo foi realizado de maneira distinta, em que 2,5 L de água residuária foram alimentados durante 20 minutos. Após a alimentação, a agitação foi iniciada e permaneceu ligada durante o tempo de ciclo de 8 horas. No final desse tempo, a agitação foi desligada e descarregou-se 1,0 L de meio em 10 minutos. Imediatamente, após o final deste primeiro ciclo, foi alimentado 1,0 L de meio, em 10 minutos para a operação em batelada, e 4 h (50% do tempo total de ciclo) para a operação em batelada alimentada. Dessa forma, nas condições em batelada alimentada 50% do tempo total de ciclo o sistema funcionou em batelada alimentada (reação e alimentação) e nos 50% restantes em batelada (reação sem alimentação).

Em seguida, deu-se início a um período de adaptação dos microrganismos. O AnSBBR foi preenchido com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano e foi operado em batelada (B) em ciclos de 8 h, com afluente composto por soro de leite somente. Este período teve duração de 11 dias, nos quais houve aumento gradual da concentração afluente de 1000 a 5000 $mgDQO \cdot L^{-1}$ e da temperatura de 35 a 55 °C. Obteve-se uma boa eficiência de remoção de matéria orgânica e de carboidratos, indicando que os microrganismos já estavam adaptados ao sistema. Após esta etapa, iniciou-se a codigestão por meio da adição de 75% de glicerina (G) ao soro (S).

Na Condição C1 o AnSBBR foi operado em batelada (B) com tempo de alimentação (t_F) de 10 min com 10,0 $gDQO \cdot L^{-1}$ enquanto na Condição C2 alterou-se a operação para batelada alimentada (B), com tempo de alimentação de 240 min.

Na Condição C3 o AnSBBR foi operado em batelada (B) com tempo de alimentação (t_F) de 10 min com 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$ enquanto na Condição C4 alterou-se a operação para batelada alimentada (BA), com tempo de alimentação de 240 min.

Em todos os ensaios realizados no AnSBBR, se mantiveram constantes o volume de alimentação (1,0 L), o tempo de ciclo (8 horas), a temperatura (55ºC) e a agitação (80 rpm), valores estes sugeridos a partir da experiência de utilização deste sistema em trabalhos anteriores para a produção de metano (Bezerra *et al.*, 2011; Lovato *et al.*, 2012; Lovato *et al.*,

2016; Silva *et al*., 2013; Albanez *et al*., 2016; Almeida *et al*., 2017). Uma vez atingida a estabilidade nas condições experimentais, foram obtidos os perfis de algumas variáveis, cujas amostras foram colhidas ao longo do ciclo em intervalos de tempo de 30 a 60 min, sendo que o volume retirado foi de no máximo 300 mL. Desta forma, pôde-se obter uma melhor compreensão das vias metabólicas ao longo de um ciclo.

Resultados e Discussão

Na Tabela 3 e nas Figuras 2 a 6 são apresentados os resultados obtidos, nas quais COVA é a carga orgânica volumétrica aplicada, COVR é a carga orgânica volumétrica removida, Va é o volume alimentado/descarregado por ciclo, AVT é a concentração de ácidos voláteis totais, AB, alcalinidade à bicarbonato, ε_{SF} é a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO para amostras filtradas, ε_{CF} é a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de carboidratos para amostras filtradas, ε_{GF} é a eficiência de remoção de glicerina para amostras filtradas, PrM é a produtividade molar de metano, RMCR é o rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida, V_{CH4} é o volume de metano produzido por ciclo, n_{CH4} é a número de mols de metano produzido por ciclo e CH_4 é a porcentagem de metano no biogás.

Tabela 3: Principais resultados e índices de desempenho das Condições C1 a C4

	Condição							
	C1		C2		C3		C4	
Parâ-metro	10,0 gDQO·L^{-1}/B		10,0 gDQO·L^{-1}/BA		20,0 gDQO·L^{-1}/B		20,0 gDQO·L^{-1}/BA	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
COVA	10,6	–	11,2	–	20,8	–	19,0	–
COVR	–	9,4	–	9,0	–	13,8	–	12,4
V_A	1,02 ± 0,03	–	1,12 ± 0,05	–	1,01 ± 0,03	–	0,87 ± 0,03	–
AVT	91 ± 16	742 ± 85	83 ± 10	1128 ± 198	162 ± 15	5150 ± 583	160 ± 16	5338 ± 284
AB	2348 ± 13	1813 ± 73	2309 ± 41	1395 ± 192	6523 ± 578	1992 ± 114	7741 ± 749	2972 ± 827
pH	8,33 ± 0,11	7,3 ± 0,1	8,28 ± 0,08	7,2 ± 0,1	8,39 ± 0,1	7,5 ± 0,1	8,32 ± 0,07	7,6 ± 0,1
C_S	10120 ± 326	1322 ± 118	9964 ± 286	2122 ± 249	19803 ± 249	6946 ± 518	19965 ± 389	7310 ± 347
ε_{SF}	–	88 ± 1	–	81 ± 3	–	66 ± 3	–	65 ± 2
C_C	2072 ± 96	47 ± 13	2094 ± 157	82 ± 15	4124 ± 167	171 ± 106	4215 ± 298	210 ± 47
ε_{CF}	–	99 ± 1	–	98 ± 0	–	97 ± 2	–	97 ± 1
C_G	5186 ± 238	11 ± 2	5008 ± 702	6 ± 5	10824 ± 1292	11 ± 1	10889 ± 1080	12 ± 4
ε_{GF}	–	100 ± 0	–	99,9 ± 0,1	–	100 ± 0	–	100 ± 0
PrM	–	133,6	–	126,7	–	216,2	–	223,4
RMCR	–	17,6	–	16,0	–	13,9	–	15,7
V_{CH4}	–	2891 ± 164	–	2843 ± 360	–	4673 ± 179	–	4598 ± 415
n_{CH4}	–	0,4	–	0,4	–	0,6	–	0,6
CH_4	–	69	–	73	–	63	–	61

COVA/COVR (gDQO.L^{-1}.d^{-1}); V_A (L); AVT (mgHAc.L^{-1}); AB (mg$CaCO_3$.L^{-1}); pH (u); C_S (mgDQO.L^{-1}); C_C (mgCarboidrato.L^{-1}); C_G (mgGlicerina.L^{-1}); ε_{ST}/ ε_{CT}/ ε_{GF} (%); PrM (molCH_4.m^{-3}.d^{-1}); RMCR (molCH_4·kgDQO^{-1}); V_{CH4} (mL.ciclo^{-1}); CH_4 (%).

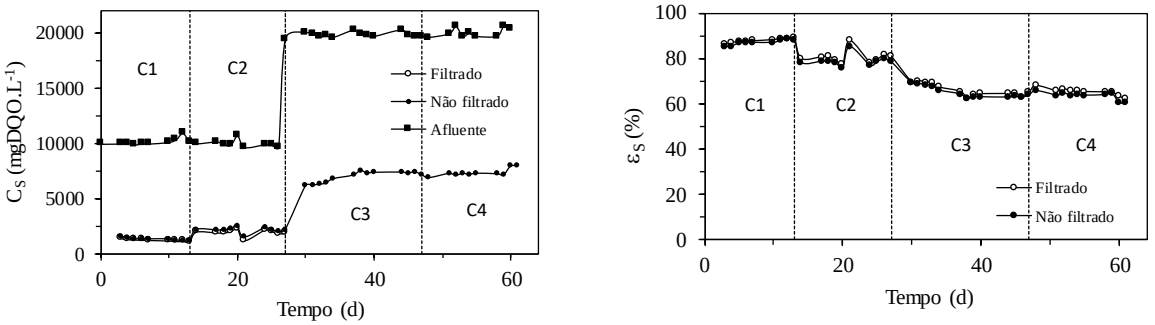


Figura 2: Concentração de matéria orgânica (C_S) no afluente e no efluente e eficiência de remoção (ε_S) nas Condições C1 a C4

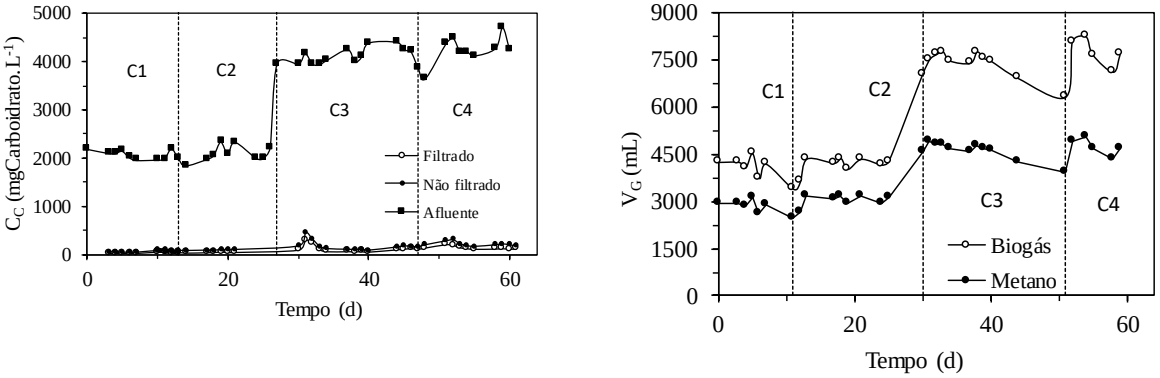


Figura 3: Concentração de carboidratos (C_C) no afluente e no efluente e volume de biogás produzido (V_G) nas Condições C1 a C4

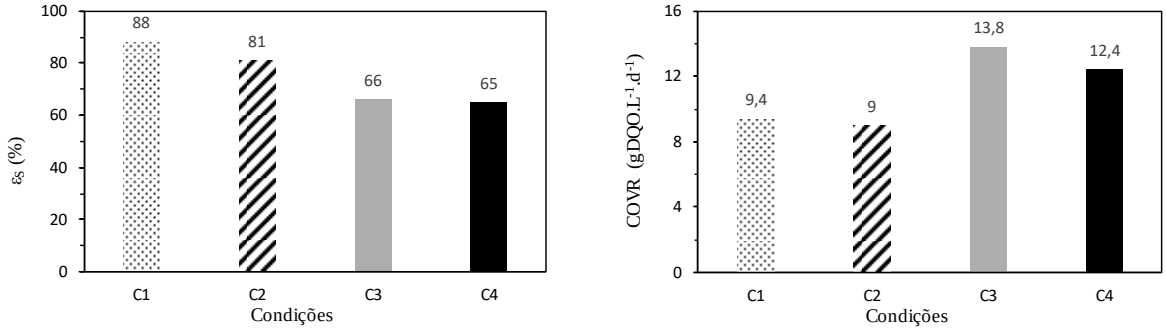


Figura 4: Eficiência de remoção de matéria orgânica para amostras filtradas (ε_S) e carga orgânica volumétrica removida (COVR) nas Condições C1 a C4

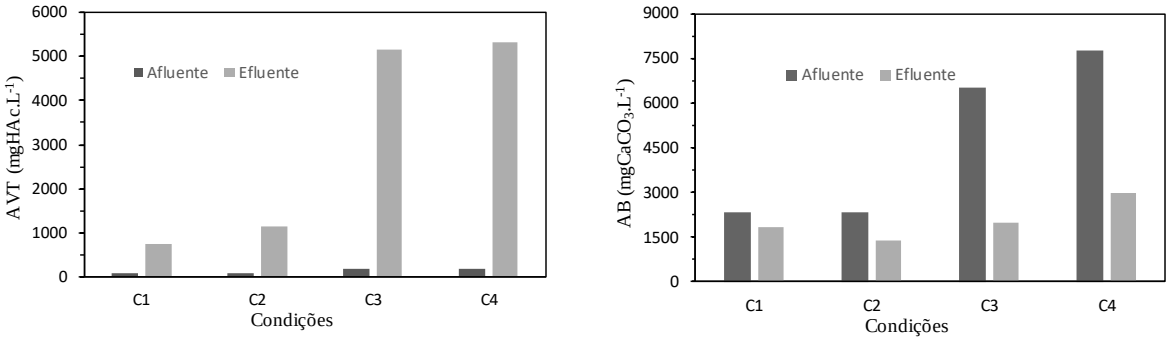


Figura 5: Ácidos voláteis totais (AVT) e alcalinidade à bicarbonato (AB) no afluente e no efluente nas Condições C1 a C4

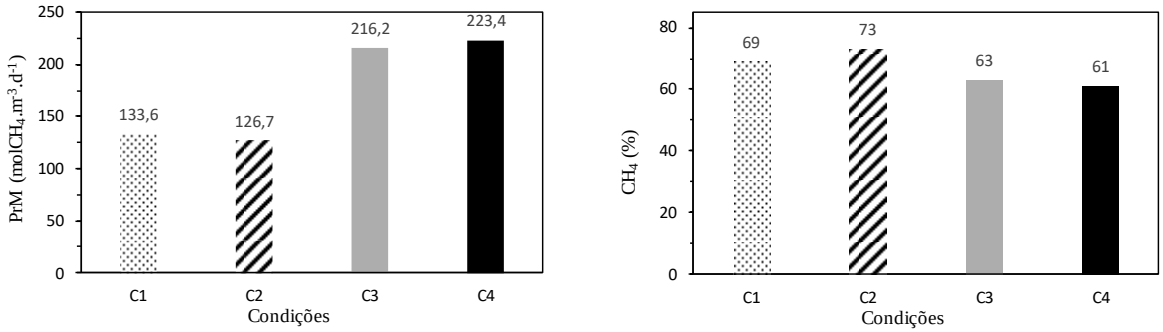


Figura 6: Produtividade em metano (PrM) e porcentagem de metano no biogás (CH_4 %) nas Condições C1 a C4

Analisando os valores de eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 3 e Figuras 2 e 4) verifica-se que o aumento da concentração afluente, de 10,0 para 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$, implicou em uma diminuição de eficiência de remoção de matéria orgânica, independente da estratégia de alimentação adotada. A maior eficiência foi obtida na Condição C1, na qual obteve-se 88%. A eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de carboidratos foi de, praticamente, 100 % em todas as condições.

Os menores valores de concentração de ácidos voláteis totais no efluente (Tabela 3 e Figura 5) foram obtidos nas Condição C1 e C2, nas quais a concentração foi de 10,0 $gDQO \cdot L^{-1}$. O aumento para 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$, implicou em acúmulo de ácidos voláteis totais no efluente. Em todas as condições os valores de alcalinidade no efluente foram inferiores aos valores do afluente (Tabela 3 e Figura 5). Houve maior consumo de alcalinidade do afluente nas condições com maior concentração afluente (Condições C3 e C4).

Os maiores valores de carga orgânica volumétrica removida foram obtidos nas Condições C3 (13,8 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$) e C4 (12,4 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$), na qual a concentração afluente foi maior, ou seja 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$ (Tabela 3 e Figura 4).

Quanto à produtividade em metano (Tabela 3 e Figura 6), verifica-se que o aumento da concentração afluente, de 10,0 para 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$, implicou em aumento da produtividade molar. Os maiores valores obtidos foram de 216,2 e de 223,4 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$, nas Condições C3 e C4, respectivamente. Entretanto, houve uma pequena diminuição na porcentagem de metano na composição do biogás com o aumento da concentração afluente.

Em relação à produção de metano no biogás (Tabela 3 e Figura 3), verifica-se que o volume de metano gerado por ciclo na Condição C1 (2891 ± 164 $mL.ciclo^{-1}$) foi similar ao volume gerado na Condição C2 (2843 ± 360 $mL.ciclo^{-1}$). Em contrapartida, o volume de metano gerado por ciclo na Condição C3 (4673 ± 179 $mL.ciclo^{-1}$) e na C4 (4598 ± 415 $mL.ciclo^{-1}$) foi superior em relação aos demais. Assim, houve elevação no volume de metano gerado com o aumento da concentração afluente.

Comparando-se as estratégias de operação em batelada (B) (Condições C1 e C3) e em batelada alimentada (BA) (Condições C2 e C4) verifica-se que a mudança não influenciou significativamente no acúmulo de ácidos voláteis totais e no consumo de alcalinidade a bicarbonato (AB). Além disso, os resultados de carga orgânica volumétrica removida (COVR) e de produtividade em metano (PrM) foram próximos e superiores, para o maior valor de concentração de 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$. Desta forma o AnSBBR poderá ser operado tanto em batelada quanto em batelada alimentada sem prejuízo para o sistema.

De forma análoga, verifica-se que o volume de metano gerado por ciclo (Tabela 3 e Figura 3), não sofreu alteração com a mudança da estratégia de alimentação, independente da concentração afluente.

Em todas as condições o reator se mostrou eficiente na remoção de carboidratos (Tabela 3 e Figura 3). A remoção de glicerina foi, praticamente total, o que é excelente para o processo (Tabela 3).

A composição de metano no biogás variou de 61 a 73% (na Tabela 3 e Figura 6), nas Condições C1 a C4, sendo esta mais elevada para as condições operadas com menor concentração afluente.

O rendimento, entre metano produzido e matéria orgânica removida (RMCR) apresentou diminuição com o aumento da concentração afluente para 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$ (Tabela 3). O maior valor foi obtido na Condição C1 (17,6 $molCH_4.kgDQO^{-1}$). Considerando a máxima produção teórica de metano por carga removida (1/64 $molCH_4.gDQO^{-1}$, que é igual a 15,6 $molCH_4.kgDQO^{-1}$ ou 350 $mLCH_4.gDQO^{-1}$) verifica-se que foram obtidos valores de rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida maiores que a máxima produção teórica de metano nas Condições C1, C2 e C4. A justificativa para este fato está relacionada ao valor ter sido obtido em relação à concentração de matéria orgânica para amostras filtradas, porém existe a possibilidade de compostos não dissolvidos terem contribuído para a formação de metano.

Conclusões

Os resultados obtidos na codigestão (soro/glicerina) em AnSBBR com agitação mecânica, em condições termofílicas (55^oC) permitiram verificar que:

O maior valor de eficiência remoção de matéria orgânica obtida foi de 88% na condição com 10,0 $gDQO \cdot L^{-1}$. O aumento da concentração afluente para 20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$, implicou em uma diminuição de eficiência de remoção de matéria orgânica, independente da estratégia de alimentação adotada. Houve remoção, praticamente, total de carboidratos e de glicerina em todas as condições.

Houve acúmulo de ácidos voláteis totais no efluente e consumo de alcalinidade do afluente em todas as condições. Houve maior consumo de alcalinidade e maior acúmulo de ácidos voláteis totais com o aumento da concentração afluente.

Os maiores valores de carga orgânica volumétrica removida (13,8 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ e de 12,4 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$) e de produtividade em metano (216,2 e de 223,4 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$), foram obtidos, respectivamente, na operação em batelada (B) e em batelada alimentada (BA), para o maior valor de concentração (20,0 $gDQO \cdot L^{-1}$).

Desta forma, estes resultados mostram a sensibilidade do sistema ao aumento da concentração afluente e a sua flexibilidade, o qual poderá operar tanto em batelada como em batelada alimentada na codigestão de soro/glicerina em condições termofílicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

Albanez, R.; Lovato, G.; Zaiat, M.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D. (2016) Optimization, Metabolic Pathways Modeling and Scale-Up Estimative of an AnSBBR Applied to Biohydrogen Production by Co-Digestion of Vinasse and Molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, **41**, 20473-20484.

Almeida, W.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat, M. (2017) AnSBBR Applied to Biomethane Production Treating Vinasse: Effects of Organic Loading, Feed Strategy and Temperature. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **34**, 759-773.

Bezerra, R.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Canto, C.S.A.; Zaiat, M. (2011) Effect of Organic Load on The Performance and Methane Production of an AnSBBr Treating Effluent from Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**, 347-368.

Bondioli, P.; Bella, L.D. (2005) An Alternative Spectrophotometric Method for the Determination of Free Glycerol in Biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 153-157.

Dubois, S.M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.L.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956) Colorimetric Methods for Determination of Sugar and Related Substance. *Analytical Chemistry*, **228**, 13-21.

Ferraz Júnior, A.D.N.; Koyama, M.H.; Araújo Júnior, M.M.; Zaiat, M. (2016) Thermophilic Anaerobic Digestion of Raw Sugarcane Vinasse. *Renewable Energy*, **89**, 245-252.

Lima, D.M.F.; Inoue, R.K.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat, M. (2016) Biohydrogen from Cheese Whey Treatment in an AnSBBR: Achieving Process Stability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33, 871-883.

Lovato, G.; Bezerra, R.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat,M. (2012) Effect of Feed Strategy on Methane Production and Performance of sn AnSBBR Treating Effluent from Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**, 2007-2029.

Lovato, G.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Zaiat, M. (2016) Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **178**, 126-143.

Malajovich, M.A. (2012) Biotecnologia 2011. Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT. Rio de Janeiro.

Mes, T.Z.D.; Stams, A.J.M.; Reith, J.H.; Zeeman, G. (2003) Methane Production by Anaerobic Digestion of Wastewater and Solid Wastes. In: Reith, J.H.; Wijffels, R.H.; Barten, H. (Eds.). *Bio-Methane e Bio-Hydrogen, Status and Perspectives of Biological Methane and Hydrogen Production*, Dutch Biological Hydrogen Foundation, Netherlands, 147-150.

Nguyen, D.; Gadhamshetty, V.; Nitayavardhana, S.; Khanal, S. K. (2015) Automatic Process Control in Anaerobic Digestion Technology: A Critical Review. *Bioresource Technology*, **193**, 513–522.

Ripley, L.E.; Boyle, W.C.; Converse, J.C. (1986) Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestor of High-Strength Wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **58**, 406-411.

Rivero, M.; Solera, R.; Perez, M. (2014) Anaerobic Mesophilic Co-Digestion of Sewage Sludge with Glycerol: Enhanced Biohydrogen Production. *International Journal Hydrogen Energy*, **39**, 2481-2488.

Silva, R.C.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Zaiat, M. (2013) Anaerobic Treatment of Industrial Biodiesel Wastewater by an ASBR for Methane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **170**, 105-118.

Song, Y.C.; Kwon, S.J.; Woo, J.H. (2004) Mesophilic and Thermophilic Temperature Co-Phase Anaerobic Digestion Compared with Single-Stage Mesophilic and Thermophilic Digestion of Sewage Sludge. *Water Research*, **38**, 1653-1662.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995) 19th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Tatara, M.; Yamazawa, A.; Ueno, Y.; Fukui, H.; Goto, M.; Sode, K. (2005) High-rate Thermophilic Methane Fermentation on Short-Chain Fatty Acids in s Down-Flow Anaerobic Packed-Bed Reactor. *Bioprocess Biosystem Engineering*, **27**, 105-113.

Ueno, Y.; Tatara, M.; Fukui H.; Makiuchi, T.; Goto, M.; Sode, K. (2007) Production of Hydrogen and Methane from Organic Solid Wastes by Phase-Separation of Anaerobic Process. *Bioresource Technology*, **98**, 1861-1865.

Yang, Y.; Tsukahara, K.; Sawayama, S. (2008) Biodegradation and Methane Production from Glycerol-Containing Synthetic Wastes With Fixed-Bed Bioreactor Under Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Conditions. *Process Biochemistry*, **43**, 362-367.

Zaiat, M.; Cabral, A.K.A.; Foresti, E. (1994) Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Sludge Reactor for Wastewater Treatment: Conception and Performance Evaluation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **11**, 33-42.

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO PELO TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS (SORO E GLICERINA) EM AnSBBR OPERADO EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA

Giovanna Lovato [1]; Isabela M. G. Augusto [1]; Marcelo Zaiat [2];
Suzana M. Ratusznei [3]; José Alberto D. Rodrigues [3]

[1] Pós-Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[2] Professor da Escola de Engenharia de São Carlos (EEM/EESC-USP);
[3] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *O hidrogênio (H_2) sobressai-se como promissor para a energia do futuro por seu alto poder calorífico e, mais importante, por só produzir água ao reagir com o oxigênio em células combustíveis. O H_2 pode ser gerado a partir da anaerobiose biológica de resíduos orgânicos num processo em que esses rejeitos se tornam matérias primas para a produção de biocombustíveis de alto valor agregado. O Brasil se destaca pela grande produção dos resíduos líquidos orgânicos soro e glicerina que apresentam potencial poluente se não forem destinados adequadamente e podem ser usados para a produção desse biogás. Sendo assim, o desafio desse projeto de pesquisa é estabelecer as bases para aplicar o conceito de biorrefinaria a uma estação de tratamento biológico de águas residuárias a base de soro ou glicerina com geração de biocombustíveis. Tal concepção se baseia no emprego de reatores anaeróbios operados de forma descontínua e/ou descontínua alimentada com biomassa imobilizada em suporte inerte (AnSBBR) como unidades principais da estação. Neste contexto, o projeto visa avaliar a aplicação de um AnSBBR no processo de produção de hidrogênio a partir de água residuária a base de soro ou glicerina. A estabilidade do processo, a eficiência de conversão do substrato, o rendimento entre hidrogênio produzido e substrato consumido, e a produtividade molar serão analisados em função da variação da carga orgânica, do tempo de enchimento e da temperatura. Além disso, os consórcios microbianos presentes nos reatores serão filogeneticamente caracterizados com o objetivo de entender a relação entre o efeito de diferentes parâmetros operacionais na estrutura da comunidade microbiana e no desempenho do processo.*

Introdução

A produção de energia por recursos renováveis e a utilização de processos com baixa demanda de energia tem um papel importante contra a mudança climática e na criação de um mundo sustentável. O biogás gerado na anaerobiose de vários substratos degradáveis serve como energia limpa, reduzindo efetivamente as emissões causadoras do efeito estufa pelo uso de energia fóssil. Além do biogás, o produto final da digestão anaeróbia (efluente líquido tratado) pode servir como fonte de nutrientes para a agricultura (Shah et al., 2015). Dentre os gases gerados pela anaerobiose, destacam-se o hidrogênio e o metano que podem ser usados como biocombustíveis. Seguindo essa linha, a substituição da energia proveniente de combustíveis fósseis por H_2 parece ser uma opção razoável para sustentar o contínuo crescimento da economia global e, ao mesmo tempo, amenizar a situação do agravamento do clima global (Guwy et al., 2011).

Diferentes águas residuárias têm sido utilizadas como substrato para a produção de hidrogênio em temperaturas mesofílicas, dentre as quais destacam-se dois dos principais resíduos agroindustriais brasileiros: soro de leite (ou queijo) gerado na indústria de laticínios e glicerina gerada na produção de biodiesel. Esses dois resíduos têm como característica comum sua composição orgânica, produção em larga escala e dificuldade de disposição no meio ambiente.

Nesse contexto, esse projeto tem como objetivo geral avaliar a aplicação do reator anaeróbio, operado de forma descontínua e/ou descontínua alimentada, com biomassa imobilizada em suporte inerte e agitação mecânica (AnSBBR), no processo de produção de hidrogênio a partir dos resíduos agroindustriais brasileiros soro e glicerina em condição termofílica. A estabilidade do processo, a eficiência de conversão de substrato, o fator de rendimento entre hidrogênio produzidos e substrato consumido, e a produtividade molar específica serão analisados em função da variação da carga orgânica imposta ao sistema, modificando-se a concentração afluente e o tempo de ciclo do reator, incluindo-se ainda a influência do tempo de enchimento/alimentação e da temperatura.

A justificativa para o uso do biorreator deste estudo se baseia na análise do comportamento desta tecnologia, denominada de "AnSBBR", relacionada ao controle operacional (etapas de alimentação, reação e descarga), à flexibilidade no modo de alimentação definida pelo tempo de enchimento (batelada / batelada alimentada), à adequação a diferentes volumes disponíveis e diferentes períodos de interrupção da produção, às principais limitações devido à possibilidade de sobrecarga e a consequente inibição e/ou seleção microbiana, e à menor produtividade pelo intrínseco comportamento transiente devido à necessidade de sequenciais operações de carga-descarga. Além disso, a possibilidade de caracterização dos consórcios microbianos presentes nos biorreatores nas diferentes etapas experimentais poderá fornecer subsídios para o entendimento do processo de uma maneira mais ampla.

A justificativa da produção de hidrogênio em condições termofílicas (55°C) se baseia nas evidências de que a fermentação termofílica oferece vantagens em relação à mesofílica, como maiores rendimentos, operação em maiores cargas orgânicas e melhor qualidade de gás (Kargi et al., 2012; Morimoto et al., 2004; Valdez-Vazquez et al., 2005); e ainda há a vantagem da glicerina sair de seu processo de produção a altas temperaturas (aproximadamente 60°C). Ademais, existem pouquíssimos estudos publicados na literatura internacional abordando o uso de soro para produção de hidrogênio em altas temperaturas (Azbar et al., 2009; Kargi et al., 2012; Ottaviano et al., 2017; Ramos and Silva, 2017) – e especificamente no caso da glicerina, não existe nenhum. Além disso, dos estudos que abordam esse conceito, nenhum utiliza reatores biológicos operados em bateladas sequencias. Nesse cenário, as informações de escopo científico e tecnológico obtidas nesse estudo em escala de laboratório fornecerão importantes subsídios para projetos desses reatores em escala plena.

Material e Métodos

AnSBBR

O reator, com capacidade para 2,0 L de meio líquido além do suporte inerte e biomassa, será constituído por um frasco de acrílico, cilíndrico, com as seguintes dimensões: 540 mm de altura, 100 mm de diâmetro externo e 3,5 mm de espessura de parede (volume total de 3,5 L). O sistema de recirculação será composto *(i)* por um reservatório lateral, o qual conterá um volume de meio de 1,5 L, constituído por um frasco de acrílico, cilíndrico, com as seguintes dimensões: 300 mm de altura, 100 mm de diâmetro externo e 3,5 mm de espessura de parede (volume total de 2,0 L); e *(ii)* de uma bomba peristáltica com capacidade de até 30 $L.h^{-1}$. Uma bureta de 100 mL será interligada ao sistema de recirculação para medidas da vazão de recirculação. O volume total de meio reacional, resultante da soma do volume de meio no reator (2,0 L) e no reservatório (1,5 L) será de 3,5 L. A alimentação e descarga serão realizadas por bombas tipo diafragma, auxiliadas por um sistema de automação.

O suporte de imobilização da biomassa será acondicionado entre telas de aço Inox – 314, dividindo a altura de 540 mm do reator em 4 estágios para evitar a compactação do leito. Na parte inferior do reator haverá um compartimento de 50 mm de altura destinado a

favorecer a distribuição da água residuária e, na parte superior, um compartimento com 50 mm de altura que funcionará como câmara coletora de biogás (H_2, CH_4 e CO_2).

A operação do reator será realizada da seguinte maneira: ao final de um ciclo, são descarregados 1,5 L de meio (em 10 min), sendo mantidos no reator mais 2,0 L (denominado volume residual), ou seja, o volume total de meio no sistema é de 3,5 L. Logo após essa descarga, um novo ciclo tem início com a alimentação (com vazão constante) de 1,5 L de meio em tempo variável conforme a condição estudada, e a simultânea recirculação da fase líquida. Ao término do ciclo, a recirculação é interrompida e, em seguida, inicia-se a descarga do reator. Assim, o ciclo é repetido, caracterizando as bateladas sequenciais.

Uma vez atingida a estabilidade nas condições experimentais, serão obtidos perfis ao longo do ciclo de operação de algumas das variáveis monitoradas. Nestes perfis serão retiradas amostras ao longo de um ciclo. As variáveis de interesse serão: concentrações de matéria orgânica na forma filtrada, de alcalinidade a bicarbonato, de ácidos voláteis totais, de metabólitos intermediários (ácidos voláteis e álcoois), de biogás (composição e produção), além do pH. Desta forma, é possível obter uma melhor compreensão das rotas metabólicas ao longo de um ciclo. As amostras retiradas para obtenção dos perfis anteriormente citados serão colhidas em intervalos de 30 a 60 min ao longo do ciclo. O volume total a ser retirado nas amostragens será de, no máximo, 350 mL, ou seja, 10% do volume de meio reacional do sistema. Após cada operação, amostras do lodo serão retiradas para análise microbiológica.

Dessa forma, uma nova condição experimental será implementada alterando-se alguma condição experimental (substratos, concentração afluente, tempo de ciclo, tempo de enchimento ou temperatura). Os resultados experimentais obtidos no monitoramento do sistema e nos perfis ao longo de um ciclo, em cada condição operacional, serão analisados considerando-se a influência das variáveis estudadas sobre a estabilidade, o desempenho (produtividade molar/volumétrica de hidrogênio em base volumétrica/específica), o fator de conversão (entre o hidrogênio produzido e a matéria orgânica consumida) e a relação entre hidrogênio e dióxido de carbono formados.

Águas Residuárias

Soro – O soro a ser utilizado será o desidratado em pó comercial, cuja composição é de 73,1% de carboidratos; 11,2% de proteínas; 2,0% de gorduras totais; 0,4% de cálcio; 0,7% de sódio; 7,6% de outros minerais e 5,0% de umidade. A água residuária será formulada a partir de sua dissolução com água de torneira.

Glicerina – A glicerina a ser utilizada será proveniente de uma Usina de Destilação de Glicerina localizada no estado de São Paulo, Brasil,

Inóculo, Suporte Inerte e Imobilização da Biomassa Anaeróbia

O inóculo a ser utilizado nos experimentos será proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando vinhaça de uma usina de açúcar e álcool. O material utilizado como suporte inerte no reator constará de grânulos de polietileno de baixa densidade (PEBD) com aproximadamente 3 mm de diâmetro, 6 mm de comprimento.

Análises Físico-Químicas

A monitoramento do reator (matéria orgânica, carboidratos e concentrações de glicerina, alcalinidade e ácidos voláteis totais e séries de sólidos) será realizado através da análise de amostras do afluente e do efluente de acordo com APHA/AWWA/WEF (2012), Ripley et al. (1986), Dubois et al. (1956) e Bondioli and Della Bella (2005). Os compostos intermediários do metabolismo anaeróbio e a composição do biogás serão analisados por cromatografia gasosa. A produção volumétrica de biogás será medida com um medidor de gás Ritter® modelo MilligasCounter. Para conter o crescimento da biomassa, será realizada uma "lavagem" semanal do reator, de acordo com Lima et al. (2015).

Estabilidade e Indicadores de Desempenho

Todos os indicadores de estabilidade e desempenho do sistema estão descritos nos trabalhos de Albanez et al. (2016) e Lima et al. (2015): eficiências de remoção de matéria orgânica, carboidratos e glicerina para amostras filtradas e não filtradas (ε_{ST} e ε_{CT}); cargas orgânicas volumétrica aplicada e removida (COVA e COVR - $kgDQO.m^{-3}.d^{-1}$), produtividade molar (MPr – $molH_2.m^{-3}.d^{-1}$); produtividade molar específica (PrME – $molH_2.kgSVT^{-1}.d^{-1}$); rendimento molar entre hidrogênio produzido e matéria orgânica aplicada na forma de DQO, carboidrato ou glicerina (RMCA – $molH_2.kgCOD^{-1}$, $molH_2.kgcarboidratos^{-1}$ ou $molH_2.kglicerina^{-1}$); e rendimento molar entre hidrogênio produzido e matéria orgânica removida na forma de DQO, carboidratos ou glicerina (RMCR – $molH_2.kgCOD^{-1}$, $molH_2.kgcarboidratos^{-1}$ ou $molH_2.kglicerina^{-1}$).

Modelo Cinético da Rota Metabólica Anaeróbia

Para fundamentar o embasamento teórico do projeto, será utilizado um modelo cinético que objetiva identificar quais rotas metabólicas serão favorecidas em cada condição experimental e qual o efeito que cada parâmetro operacional tem sobre as reações bioquímicas envolvidas no processo de digestão anaeróbia. O modelo cinético que será utilizado foi desenvolvido em Lovato et al. (2017).

Procedimento Experimental

Etapa 1 – Operação do sistema para avaliar a influência das variáveis operacionais tempo de ciclo (de 2 a 4 h), tempo de enchimento (2% e 50% do tempo de ciclo), temperatura (55°C), concentração afluente (desde 5000 $mgDQO.L^{-1}$ até concentração limite do reator) e carga orgânica volumétrica/específica aplicadas sobre os indicadores de desempenho (estabilidade, conversão de matéria orgânica, produtividade de hidrogênio, e rendimento molar de hidrogênio produzido e matéria orgânica consumida) utilizando o substrato soro.

Etapa 2 – Operação do sistema para avaliar a influência das variáveis operacionais tempo de ciclo (de 2 a 4 h), tempo de enchimento (2% e 50% do tempo de ciclo), temperatura (55°C), concentração afluente (desde 5000 $mgDQO.L^{-1}$ até concentração limite) e carga orgânica volumétrica/específica aplicadas sobre os indicadores de desempenho (estabilidade, conversão de matéria orgânica, produtividade de hidrogênio, e rendimento molar de hidrogênio produzido e matéria orgânica consumida) utilizando o substrato glicerina;

Resultados Esperados

O desenvolvimento desse estudo consistirá na avaliação da utilização do AnSBBR no tratamento dos resíduos agroindustriais para geração de hidrogênio, verificando quais parâmetros operacionais otimizam a produção desse biogás, cujos critérios serão baseados na estabilidade operacional, na produtividade de bioenergia, e no rendimento de conversão entre matéria orgânica consumida e bioenergia produzida:

- Avaliação da produtividade de hidrogênio em condições termofílicas;
- Avaliação da influência de diferentes condições operacionais definidas por fatores experimentais carga orgânica, concentração afluente, tempo de ciclo, tempo de enchimento, concentração de microrganismos, suplementação de alcalinidade/micronutrientes, e temperatura;
- Avaliação da influência do pré-tratamento do inóculo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

Albanez, R., Lovato, G., Zaiat, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2016. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. Int. J. Hydrogen Energy 41, 20473–20484. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.08.145

APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541. doi:ISBN 9780875532356

Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. Int. J. Hydrogen Energy 34, 7441–7447. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.04.032

Bondioli, P., Della Bella, L., 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 153–157. doi:10.1002/ejlt.200401054

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017

Guwy, A.J., Dinsdale, R.M., Kim, J.R., Massanet-Nicolau, J., Premier, G., 2011. Fermentative biohydrogen production systems integration. Bioresour. Technol. 102, 8534–8542. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.051

Kargi, F., Eren, N.S., Ozmihci, S., 2012. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. Int. J. Hydrogen Energy 37, 8338–8342. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.162

Lima, D.M.F., Inoue, R.K., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., 2015. Biohydrogen from cheese whey treatment in an ansbbr: Achieving process stability. Brazilian J. Chem. Eng. 32, 397–408. doi:10.1590/0104-6632.20150322s00003342

Lovato, G., Lazaro, C.Z., Zaiat, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2017. Biohydrogen production by co-digesting whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization. Biochem. Eng. J. 128, 93–105. doi:10.1016/j.bej.2017.09.011

Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A.A.Y., Ngan, M.A., Fakhru'l-Razi, A., Iyuke, S.E., Bakir, A.M., 2004. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. Int. J. Hydrogen Energy 29, 709–713. doi:10.1016/j.ijhydene.2003.09.009

Ottaviano, L.M., Ramos, L.R., Botta, L.S., Amâncio Varesche, M.B., Silva, E.L., 2017. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. Int. J. Hydrogen Energy 42, 4848–4860. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.11.168

Ramos, L.R., Silva, E.L., 2017. Continuous Hydrogen Production from Agricultural Wastewaters at Thermophilic and Hyperthermophilic Temperatures. Appl. Biochem. Biotechnol. 182, 846–869. doi:10.1007/s12010-016-2366-3

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. Water 58, 406–411. doi:10.1016/S0262-1762(99)80122-9

Shah, F.A., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I.A., Shah, M.M., 2015. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. Renew. Sustain. Energy Rev. doi:10.1016/j.rser.2014.10.053

Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., Poggi-Varaldo, H.M., 2005. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H 2 production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. Int. J. Hydrogen Energy 30, 1383–1391. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.09.016.

SUCROSE-DERIVED CARBOHYDRATES AS CO-SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF MCL-PHA WITH ENRICHED DOMINANT MONOMER CONTENT

Guilherme H. Duarte de Oliveira [1]; Marcelo Zaiat [2]; José Alberto D. Rodrigues [3]; Juliana Akit Ramsay [4]; Bruce Alexander Ramsay [4]

[1] Pós-Doutorando da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[2] Professor da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[3] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[4] Professor da Queen's University.

Abstract. *The production of short-chain-length polyhydroxyalkanoates (scl-PHAs) in a sugarcane biorefinery setting has been demonstrated to be an effective strategy to reduce production costs. This approach, however, is not yet established for the production of medium-chain-length PHAs (mcl-PHAs). In the present study, sucrose-derived carbohydrates were evaluated as co-substrates for the production of mcl-PHA with enriched dominant monomer content from decanoic acid. A β-oxidation knockout mutant of Pseudomonas putida KT2440 was evaluated as the production strain in carbon-limited, fed-batch fermentations. The experimental results demonstrated that an equimolar mixture of glucose and fructose is a suitable co-feed for mcl-PHA production, yielding equivalent results to those obtained with starch-derived glucose, a more traditional biotechnological feedstock for PHA production. The use of a β-oxidation-impaired strain was essential to attain high dominant monomer content. A near-homopolymeric mcl-PHA was produced by the mutant strain, containing 99 mol% of 3-hydroxydecanoate, compared to 78 mol% obtained using the unmodified parent strain under the same conditions. A total biomass concentration of 14.9 g L^{-1} containing 35% of near-homopolymeric PHA was produced under exponential feeding. Prolonging the run under a constant feed rate decreased the dominant monomer content to 95 mol%, denoting a trade-off between polymer composition and volumetric productivity.*

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolymers synthesized as intracellular reserves of carbon and energy by numerous bacterial groups. They are biodegradable and biocompatible polyesters that can be produced from renewable resources. Medium-chain-length PHAs (mcl-PHAs) are composed of monomeric units of six to fourteen carbon atoms. They exhibit thermoelastomeric properties, which makes them suitable for applications in which flexible materials are needed. Potential high value-added uses for mcl-PHA include adhesives, biomedical implants and drug delivery systems (Rai et al., 2011). To date, high production costs have prevented the commercialization of mcl-PHAs. Economically feasible production may be achieved by a combination of more efficient fermentation and downstream processing strategies and cheaper feedstocks. Additionally, the integration of PHA production with other industrial complexes, biorefineries in particular, is a promising opportunity for cost reduction (Koller et al., 2017). Sugarcane-based biorefineries have large quantities of carbohydrate feedstocks, such as sucrose, molasses and lignocellulosic hydrolysates, as well as surplus thermal and electric energy from bagasse. Moreover, by-products of bioethanol distillation are potential solvents for PHA extraction. These factors can contribute significantly to reduce the cost of PHA production (Nonato et al., 2001).

Different sucrose-related substrates that have been considered as carbon sources for mcl-PHA production include sugarcane molasses (Bengtsson et al., 2010), soy molasses (Solaiman et al., 2006) and glucose and fructose mixtures (Diniz et al., 2004; Urbina et al., 2018). However, mcl-PHA produced from non-structurally related carbon sources such as

carbohydrates consistently exhibit heterogeneous monomeric composition. C10 monomers typically account for approximately 70% of the total subunits, with C8, C12 and unsaturated C12 units making up the majority of the remaining fractions (Borrero-de Acuña et al., 2014; Poblete-Castro et al., 2014a, 2014b; Sharma et al., 2012). This heterogeneity of side-chain lengths decreases crystallinity (Abe et al., 2012), resulting in materials with poor mechanical properties, very low melting temperatures or even amorphous polymers, inadequate for most commercial applications. The crystallinity of mcl-PHAs, and consequently their thermal and mechanical properties, can be greatly improved by increasing dominant monomer content (Gao et al., 2018; Gopi et al., 2018; Jiang et al., 2012). Therefore, a production strategy that allows rigorous control of monomer composition is needed to allow the use of mcl-PHAs in demanding, high value-added applications.

Co-feeding of structurally unrelated and related carbon sources can reduce production costs while still allowing control of the polymer composition. The cheaper, unrelated substrates can sustain cell growth and maintenance, diverting the related substrates primarily to product formation. The co-feeding approach reduces the loss of structurally related substrates as a consequence of carbon catabolite repression of β-oxidation (Gao et al., 2016). This enhances PHA yield under both nutrient-limited (Sun et al., 2007a) and nutrient-sufficient conditions (Sun et al., 2009). If the co-feeding is performed under carbon-limited conditions, the PHA composition is determined by the related carbon source, as negligible amounts of mcl-PHA are produced from de novo fatty acid biosynthesis under carbon limitation (Sun et al., 2009). In this case, the dominant monomer content of the produced polymer can be increased by employing β-oxidation-impaired strains (Ouyang et al., 2007) or using chemical inhibitors of β-oxidation (Jiang et al., 2012).

Co-feeding has been successfully employed to produce near-homopolymeric polyhydroxydecanoate in a single, carbon-limited stage. Decanoic acid and glucose were co-fed to a β-oxidation knockout mutant of *Pseudomonas putida*, resulting in high-quality mcl-PHA and elevated volumetric productivities (Gao et al., 2018).

In the present study, we build on the work of Gao et al. (2018), envisioning mcl-PHA production in the context of a sugarcane biorefinery. An equimolar mixture of glucose and fructose was used as model substrate for enzymatically treated sucrose and was evaluated as a co-feed to produce mcl-PHAs with elevated dominant monomer content from decanoic acid. This approach has not been previously investigated. The PHA production was assessed in carbon-limited, fed-batch fermentations with a Δ*fadBA* β-oxidation knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2440.

Materials and Methods

Bacterial strains

A β-oxidation-impaired mutant (Δ*fadBA*) of *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC 47054), designated *P. putida* DBA-F1 (Gao et al., 2018) was evaluated as the mcl-PHA production strain. Experiments were also performed with the unmodified parent strain as an experimental control. The cultures were preserved on glycerol at -80^{o}C.

Growth media

The inoculum for the fed-batch fermentations was grown in three 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium, inoculated from cultures kept in glycerol at -80^{o}C. The cultures were incubated in an orbital shaker at 30 ± 1^{o}C and 200 rpm overnight before inoculation into the reactor. The inoculum medium contained (per liter): 6.36 g Na_2HPO_4, 2.70 g KH_2PO_4, 3.70 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.40 g $MgSO_4.7H_2O$, 1.00 g nutrient broth and 9.00 g glucose.

The initial fermentation medium contained (per liter): 6.36g of Na_2HPO_4, 2.70g of KH_2PO_4, 3.70g of $(NH_4)_2SO_4$, 0.40g of $MgSO_4.7H_2O$, and 6.67 mL of trace element solution.

The element solution contained (per Liter): 10 g $FeSO_4.7H_2O$, 3 g $CaCl_2.2H_2O$, 2.2 g $ZnSO_4.7H_2O$, 0.5 g $MnSO_4.4H_2O$, 0.3 g H_3BO_3, 0.2 g $CoCl_0 \cdot 6H_2O$, 0.15 g $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0.02 g $NiCl_2.6H_2O$ and 1.00 g $CuSO_4.5H_2O$.

During the fed-batch phase, the reactor was simultaneously fed with an equimolar mixture of glucose and fructose (G/F), and a fatty acid feed (DAA) composed of decanoic acid (DA) and acetic acid (HAc) in a mass ratio of 5:1 (w/w, DA:HAc). The addition of acetic acid was necessary to maintain decanoic acid as a liquid at room temperature, allowing the controlled addition of the mixture. An anti-foam agent (1% (v/v), Antifoam 204, Sigma-Aldrich) was added to the DAA. The G/F feed contained $MgSO_4.7H_2O$ at a ratio of 150:1 (w/w). The carbohydrate solution concentration was ~50% (w/w) to avoid crystallization. Control experiments were performed using a glucose (G) solution in place of the G/F mixture.

Bioreactor conditions and control

Fed-batch fermentations were performed in a 5-L Minifors stirred tank bioreactor (Infors HT, Bottmingen, Switzerland), with a 3-L working volume. The agitation speed and temperature were controlled at 700 rpm and at 30 ± 1°C, respectively. A 28% (w/v) NH_4OH solution was used to maintain the pH at 6.85 and also served as a nitrogen source. The dissolved oxygen concentration was measured with an Oxyferm FDA VP 225 (Hamilton, Switzerland) electrochemical probe and was controlled at 30% of air saturation or higher, by adjusting the mixture of air and oxygen via mass flow controllers with a total gas flow of 2 $L.min^{-1}$. The carbon dioxide content of the off-gas stream was continuously monitored with an infrared monitor (Guardian Plus, Topac Inc. Hingham, MA, USA).

The feed medium was continuously weighed on analytical balances and feeding was conducted by peristaltic pumps controlled according to the weight of the feed reservoirs.

An initial batch phase was conducted before starting the feeding phase. Glucose was the only carbon source supplied during the batch phase, at a concentration of 1.63 $g.L^{-1}$ to support biomass growth to 0.67 g $CDM.L^{-1}$, assuming a biomass yield from glucose ($Y_{X/G}$) of 0.41 $g.g^{-1}$ (Sun et al., 2006). The exponential feeding phase was automatically started when a decrease in carbon dioxide production rate was observed during the batch phase, indicating depletion of the initial carbon substrates.

Carbon-limited growth was achieved by exponentially feeding the carbon sources to support a specific growth rate of 0.15 h^{-1}. The fatty acid feed (DAA) and the carbohydrate substrates (G or G/F) were co-fed at a constant ratio of 1:4 (w/w, DAA:carbohydrate). The automated feeding strategy is described in detail by Sun et al. (2006). A linear feeding phase at a constant feeding rate of 5 $g.L^{-1}.h^{-1}$ was manually started when the pure oxygen supply accounted for 50% of the total gas supplied. This strategy delayed the onset of oxygen limitation and achieved high biomass concentrations. Data acquisition (DO, CO_2, feed media addition, air flow, pure O_2 flow) and reactor control were performed with LabVIEW 6.1 (National Instruments).

Analytical methods

Biomass concentration was measured gravimetrically as cell dry mass (CDM). Known volumes of broth samples were centrifuged at 13,000 × g for 15 min, washed once with distilled water and lyophilized to a constant mass. The supernatants were analyzed for phosphate concentration by the molybdenum blue method (APHA, 2005); for ammonium by the phenol-hypochlorite method (Weatherburn, 1967); for residual glucose and fructose by the alkaline 4-hydroxybenzoic hydrazide colorimetric method (Lever, 1972); and for residual mcl-fatty acid concentration by GC-FID analysis according to (Ramsay et al., 1991). The intracellular PHA content and composition was determined by GC-FID after methanolysis using benzoic acid as an internal standard, according to (Braunegg et al., 1978).

Results and Discussion

Fed-batch production of mcl-PHA with P. putida DBA-F1

The β-oxidation knockout mutant *P. putida* DBA-F1 was grown in carbon-limited, fed-batch cultivations. Decanoic acid (DA) was co-fed with an equimolar mixture of glucose and fructose (G/F) in an exponential feed phase, followed by a linear feeding phase (Figure 1).

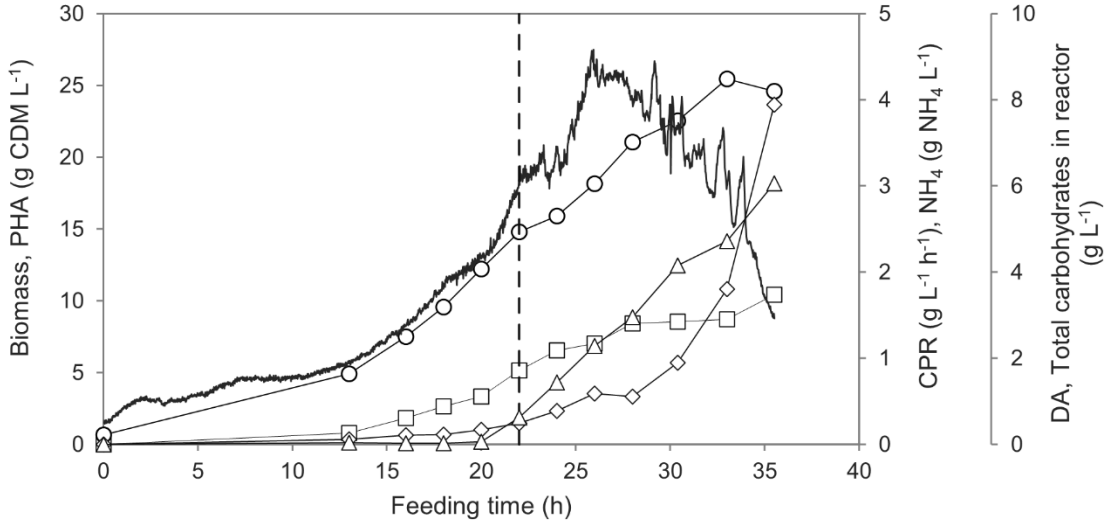


Figure 1. Fed-batch cultivation of Pseudomonas putida DBA-F1 for mcl=PHA production. Temporal profiles of biomass (○), PHA (□) and carbon dioxide production rate (CPR, continuous line). Decanoic acid (DA, ∆) was co-fed with an equimolar mixture of glucose and fructose (◇).The vertical dashed line marks a change in feeding regime, from exponential ($\mu = 0.15\ h^{-1}$) to constant feeding rate of 5 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

Exponential feeding was maintained for 22 h, after which point the linear feed phase was started, lasting for 13.5 h. The DBA-F1 strain was not able to sustain the imposed specific growth rate of 0.15 h^{-1} during the exponential feeding stage, which resulted in DA accumulation at the end of that phase. DA concentrations in the reactor continued to increase during linear feeding, culminating in excessive foaming and a sharp decrease in carbon dioxide production rate, which terminated the fermentation. The carbohydrate substrates also accumulated in the bioreactor. The concentration of hexoses increased continuously, closely following the trend observed for DA. At the end of the fermentation, a total concentration of 7.9 g L^{-1} of hexoses remained in the liquid phase, corresponding to 9.8% of the total carbohydrates fed. The ammonium and phosphate concentrations were at all times above 1.3 g L^{-1} and 3.1 g L^{-1}, respectively, demonstrating that these nutrient levels were not growth limiting during the fermentation.

The final biomass concentration of 25.5 g CDM L^{-1} contained 42% PHA. The mcl-PHA extracted from the final biomass was composed of 3-hydroxydecanoate and 3-hydroxyoctanoate monomers, in a relative proportion of 95:5 (C10:C8, %mol).

Influence of the carbohydrate co-feed

The fed-batch cultivation was repeated using only glucose (G) as the carbohydrate co-feed (Figure 2).

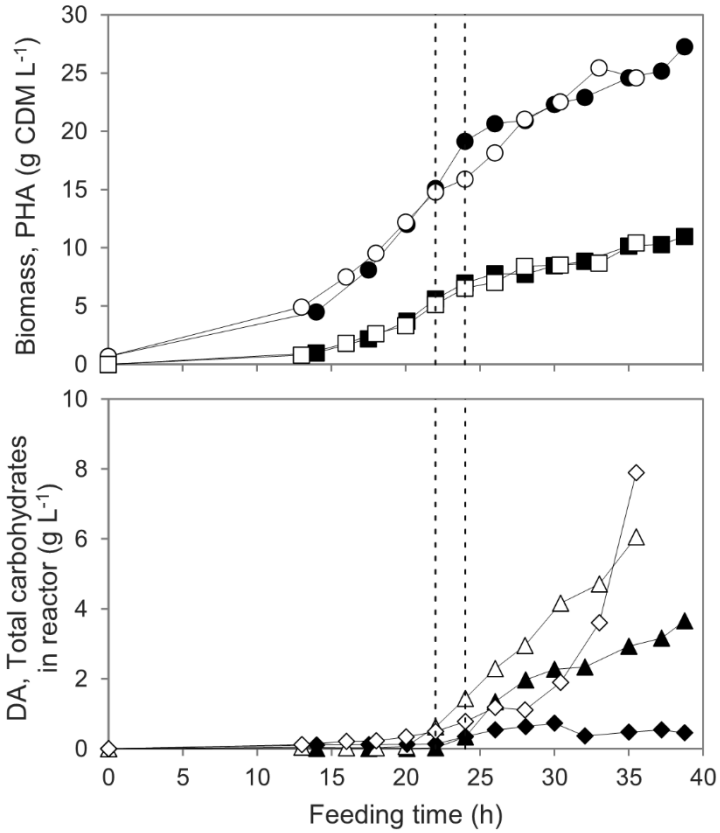


Figure 2. Fed-batch fermentations of Pseudomonas putida DBA-F1 for mcl-PHA production. An equimolar mixture of glucose and fructose (G/F, open symbols) and a glucose solution (G, filled symbols) were evaluated as carbohydrate co-feeds. Temporal profiles of biomass (○, ●), PHA (□, ■), decanoic acid (DA, △, ▲) and total carbohydrates (◇, ◆). The vertical dashed lines represent a change in feeding regime, from exponential (μ = 0.15 h^{-1}) to a constant feeding rate of 5 g L^{-1} h^{-1}. The shift was performed at 22 h for DBA-F1 (G/F), 24 h for DBA-F1 (G).

The exponential phase lasted 24 h and the linear feed phase was kept for 14.8 h. Although the overall fermentation was over three hours longer when G was the co-feed, the overall volumetric productivity was the same for both co-feeds, at 0.25 g L^{-1} h^{-1}, including the initial batch phase.

Equivalent performances were observed for both co-feeds. A maximum biomass production of 27.3 g CDM L^{-1} was achieved, which is 7% higher than that observed with G/F. The intracellular PHA content obtained was slightly lower with G co-feed, at 40%. The same PHA composition was observed for both co-feeds. DA and glucose also accumulated in the bioreactor with the G co-feed, although lower final concentrations were observed, 3.7 g L^{-1} and 0.5 g L^{-1}, respectively. Similarly, the ammonium, phosphate and CPR profiles were equivalent between both co-feeds (data not shown).

Influence of the production strain

The mcl-PHA production cultivations were replicated using the unmodified, parent strain *Pseudomonas putida* KT2440 under the same experimental conditions. Both carbohydrate co-feeds (G/F and G) were evaluated (Figure 3).

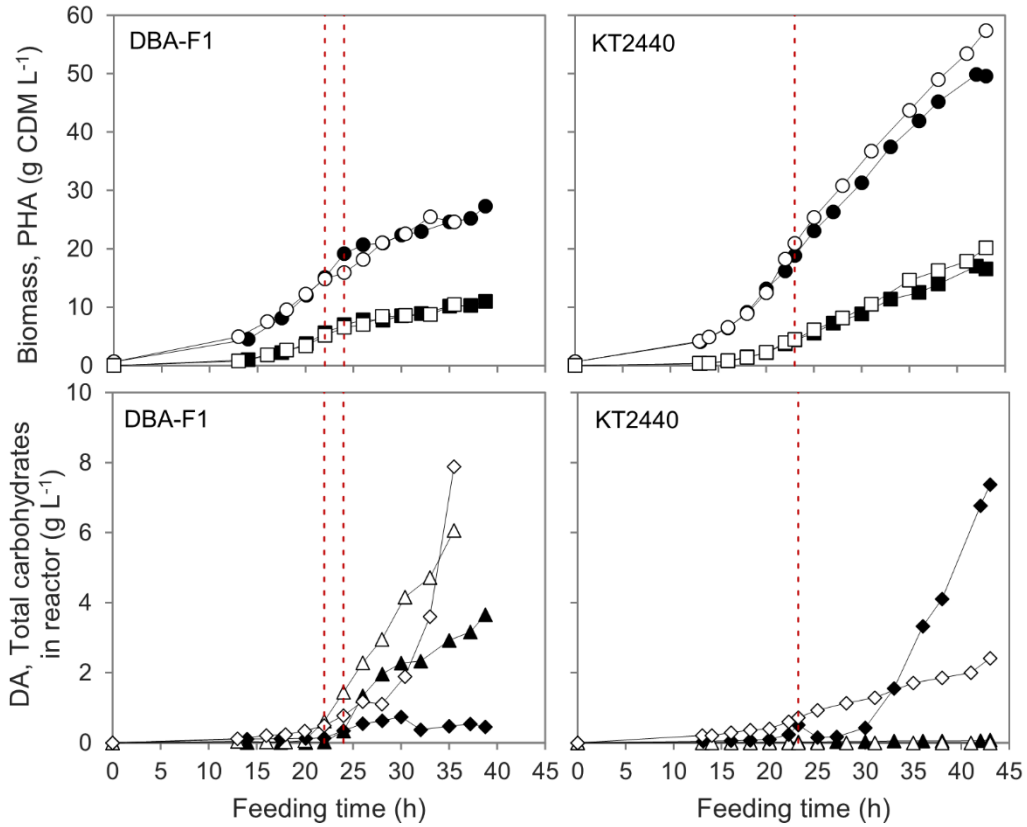


Figure 3. Fed-batch cultivations of *Pseudomonas putida* DBA-F1 and *P. putida* KT2440 for mcl-PHA production. An equimolar mixture of glucose and fructose (G/F, open symbols) and a glucose solution (G, filled symbols) were evaluated as carbohydrate co-feeds. Temporal profiles of biomass (○, ●), PHA (□, ■), decanoic acid (DA, △, ▲) and total carbohydrates (◇, ◆). The vertical dashed lines represent a change in feeding regime, from exponential (μ = 0.15 h^{-1}) to a constant feeding rate of 5 g L^{-1} h^{-1}. The shift was performed at 22 h for DBA-F1 (G/F), 24 h for DBA-F1 (G) and 23 h for KT2440 (G and G/F).

As observed for the mutant strain, no expressive differences could be discerned in PHA production by the KT2440 strain using the G and G/F co-feeds. A slightly higher biomass production was achieved with G/F, when a biomass concentration of 57.4 g CDM L^{-1} was observed, compared to 49.9 g CDM L^{-1} with the G co-feed. The maximum intracellular PHA contents were equivalent in both conditions with 34% (G) and 35% (G/F). Monomer compositions at the end of the cultivations were also equal, with relative proportions of 84:14:2 (C10:C8:C6, %mol). The main performance parameters of the performed fermentations are presented in Table 1. No DA accumulated in the experiments with the KT2440 strain, even though carbohydrate excess was observed for both co-feeds. When G/F was used, 2.4 g L^{-1} of hexoses remained in the liquid phase at end of the fermentation, while for the G co-feed, the remaining glucose concentration was 7.4 g L^{-1}.

The KT2440 strain is able to use the β-oxidation pathway to metabolize DA as energy and carbon for cellular functions other than PHA accumulation. As a result, the parent strain produced more biomass than the β-oxidation-impaired strain, at the cost of intracellular PHA content. A more active β-oxidation cycle also resulted in a more heterogeneous polymer, containing 3-hydroxyhexanoate monomers, which were not detected when DBA-F1 was the production strain.

Table 1. Summary of performance parameters

	Producing strain (co-feed)			
	DBA-F1 (G)	DBA-F1 (G/F)	KT2440 (G)	KT2440 (G/F)
Exponential Phase				
Duration [*h*]	24	22	23	23
$\bar{\mu}$ [h^{-1}]	0.142	0.143	0.147	0.150
$\bar{\mu}_{Xr}$ [h^{-1}]	0.122	0.125	0.135	0.139
PHA yield on DA [$g\ C\ g\ C^{-1}$]	0.92	0.86	0.58	0.58
PHA composition [*C10:C8:C6, %mol*]	99:1:0	99:1:0	78:20:2	75:23:2
PHA content [%CDM]	36%	35%	23%	21%
Overall volumetric productivity [$g\ L^{-1}\ h^{-1}$] [a]	0.24	0.19	0.17	0.17
Exponential + Linear Phase				
Duration [*h*]	39	36	43	43
PHA composition [*C10:C8:C6, %mol*]	95:5:0	95:5:0	84:14:2	84:14:2
PHA content [%CDM]	40%	42%	33%	35%
Overall volumetric productivity [$g\ L^{-1}\ h^{-1}$] [a]	0.25	0.25	0.36	0.43

[a] batch phase included.

Discussion

Equimolar mixtures of glucose and fructose can be economically obtained from sucrose through acid hydrolysis or ionic exchange in the context of a sugarcane biorefinery (Rossell et al., 2006), making it a potential alternative to starch-derived glucose as a feedstock for mcl-PHA production. However, the substitution of glucose by a substrate mixture may have undesired ramifications for certain biotechnological applications. In *Pseudomonas putida*, glucose and fructose are assimilated through distinct metabolic routes (Chavarría et al., 2016). This results in markedly distinct growth rates when each hexose is supplied as the sole carbon source (Diniz et al., 2004; Kim et al., 2013). When both hexoses are provided in excess, *P. putida* exhibits preferential consumption of glucose (Diniz et al., 2004; Urbina et al., 2018). However, the carbon catabolite repression effects responsible for the hierarchical consumption of substrates are not expected to be present at growth-limiting concentrations (Rojo, 2010).

In the carbon-limited fermentations conducted in the present work, accumulation of carbohydrates was observed to some extent in all experimental conditions assayed. For the mutant DBA-F1 strain, carbohydrate excess was expressively higher when the culture was co-fed with G/F. With the wild-type strain, however, an opposite result was observed, with more carbohydrate accumulation occurring when the culture was co-fed with G. In either case, the fate of the carbohydrate fraction was not determinant in the performance of the fermentations, as equivalent mcl-PHA production was achieved for both G and G/F co-feeds. The PHA composition showed no influence from the composition of the carbohydrate co-feed.

The KT2440 strain grew to a higher biomass concentration when G/F was employed. This was in agreement with the results of Diniz et al. (2004) and Escapa et al. (2013), who observed higher biomass yields with fructose than with glucose in *P. putida* strains. These observations indicate that sucrose-derived carbohydrates can be successfully employed as co-substrates for mcl-PHA production in carbon-limited fermentations with the conservative specific growth rates employed in the present study.

The mcl-PHA production strategy adopted in the present work allowed the production of PHA with increased content of the dominant C10 monomer. This, however, came with a trade-off on intracellular polymer content and productivity, as a very conservative co-feed

ratio of 1:4 (w/w, DAA:carbohydrate) and low specific growth rates were necessary to inhibit β-oxidation of the supplied alkanoic acid. Under exponential feeding, the DBA-F1 mutant strain accumulated a maximum of 36% CDM of near-homopolymeric PHD (99% C10, %mol), at a volumetric productivity of 0.24 g L^{-1} h^{-1}. Although this productivity is low when compared to mcl-PHA heteropolymers, it is much higher than others previously reported for near or homopolymeric PHD by β-oxidation-impaired *Pseudomonas* strains (Liu et al., 2011; Wang et al., 2017), which were performed at shake flask scale.

The PHD production in the present work was inferior to that of Gao et al. (2018), even though our experiments reproduced the same experimental conditions and employed the same producing strain. Using the same co-feed ratio, the authors of that study observed mcl-PHA production higher than the theoretical maximum, considering the amount of decanoic acid that was fed. This result was attributed to the diversion of unrelated carbon sources (glucose and acetic acid) to PHA synthesis. No evidence for that phenomenon could be found in the present work. It is unlikely that *de novo* fatty acid biosynthesis contributed to mcl-PHA production under carbon limitation, as functional expression of *phaG*, the key link between fatty acid biosynthesis and PHA production, has been shown to be dependent on nutrient limitation (Beckers et al., 2016; Wang et al., 2012).

When applied to the unmodified KT2440 strain, the same production strategy resulted in a maximum dominant monomer content of 84% (C10, %mol), at a 35% CDM intracellular accumulation and a volumetric productivity of 0.43 g L^{-1} h^{-1}. This C10 content is considerably higher than what has been achieved with unmodified *Pseudomonas* strains fed with DA (Cerrone et al., 2014; Gao et al., 2016; Liu et al., 2011; Ouyang et al., 2007; Sharma et al., 2012), although at a low overall volumetric productivity.

It has been observed that, out of a series of mcl-PHA with different C10 contents, only near-homopolymeric PHD (98%, %mol) exhibited crystallization, which improved considerably the thermal properties of the material (Gopi et al., 2018). Thus, the C10 content in the mcl-PHA produced by the wild-type KT2440 strain is likely not high enough to result in an improvement of polymer properties that would offset the low volumetric productivities attained. This demonstrates that the co-feeding strategy alone is not enough to ensure high-quality mcl-PHA production, and that the use of β-oxidation-impaired strains is necessary.

Conclusions

The evaluated equimolar mixture of glucose and fructose was demonstrated to be a suitable carbohydrate co-feed for the production of mcl-PHA from DA. Fermentations performed with this mixture presented equivalent results to those in which glucose was the only carbohydrate feedstock. Co-feeding structurally unrelated and related carbon sources reduced β-oxidation of DA, but was insufficient to completely impede it. The use of a β-oxidation-impaired strain was necessary to produce near-homopolymeric mcl-PHA. Polyhydroxydecanoate with 99% (%mol) of C10 monomers was produced by the mutant strain DBA-F1 under exponential feeding. When glucose and fructose were used, 14.9 g L^{-1} of cell dry mass was produced, containing 35% of PHA, resulting in a cumulative volumetric productivity of 0.19 g L^{-1} h^{-1}.

References

Abe, H., Ishii, N., Sato, S., Tsuge, T., 2012. Thermal properties and crystallization behaviors of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate)s. Polymer. 53, 3026–3034.

APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, 2005.

Beckers, V., Poblete-Castro, I., Tomasch, J., Wittmann, C., 2016. Integrated analysis of gene expression and metabolic fluxes in PHA-producing Pseudomonas putida grown on glycerol. Microb. Cell Fact. 15, 73.

Bengtsson, S., Pisco, A.R., Reis, M.A.M., Lemos, P.C., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. J. Biotechnol. 145, 253–263.

Borrero-de Acuña, J.M., Bielecka, A., Häussler, S., Schobert, M., Jahn, M., Wittmann, C., Jahn, D., Poblete-Castro, I., 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized Pseudomonas putida. Microb. Cell Fact. 13, 88.

Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M., 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6, 29–37.

Cerrone, F., Duane, G., Casey, E., Davis, R., Belton, I., Kenny, S.T., Guzik, M.W., Woods, T., Babu, R.P., O'Connor, K., 2014. Fed-batch strategies using butyrate for high cell density cultivation of Pseudomonas putida and its use as a biocatalyst. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 9217–9228.

Chavarría, M., Goñi-Moreno, Á., de Lorenzo, V., Nikel, P.I., 2016. A Metabolic Widget Adjusts the Phosphoenolpyruvate-Dependent Fructose Influx in *Pseudomonas putida*. mSystems 1, 1–15.

Diniz, S.C., Taciro, M.K., Gomez, J.G., da Cruz Pradella, J.G., 2004. High-cell-density cultivation of Pseudomonas putida IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. Appl Biochem Biotechnol 119, 51–70.

Escapa, I.F., del Cerro, C., García, J.L., Prieto, M.A., 2013. The role of GlpR repressor in Pseudomonas putida KT2440 growth and PHA production from glycerol. Environ. Microbiol. 15, 93–110.

Gao, J., Ramsay, J.A., Ramsay, B.A., 2016. Fed-batch production of poly-3-hydroxydecanoate from decanoic acid. J. Biotechnol. 218, 102–107.

Gao, J., Vo, M.T., Ramsay, J.A., Ramsay, B.A., 2018. Overproduction of MCL-PHA with high 3-hydroxydecanoate Content. Biotechnol. Bioeng. 115, 390–400.

Gopi, S., Kontopoulou, M., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., 2018. Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics. Int. J. Biol. Macromol. 119, 1248–1255.

Jiang, X., Sun, Z., Marchessault, R.H., Ramsay, J.A., Ramsay, B.A., 2012. Biosynthesis and properties of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates with enriched content of the dominant monomer. Biomacromolecules 13, 2926–2932.

Kim, J., Oliveros, J.C., Nikel, P.I., de Lorenzo, V., Silva-Rocha, R., 2013. Transcriptomic fingerprinting of Pseudomonas putida under alternative physiological regimes. Environ. Microbiol. Rep. 5, 883–891.

Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M.M., Braunegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. N. Biotechnol. 37, 24–38.

Lever, M., 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. 47, 273–279.

Liu, Q., Luo, G., Zhou, X.R., Chen, G.Q., 2011. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by b-oxidation pathway inhibited Pseudomonas putida. Metab. Eng. 13, 11–17.

Nonato, R. V., Mantelatto, P.E., Rossell, C.E. V, 2001. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 1–5.

Ouyang, S.P., Luo, R.C., Chen, S.S., Liu, Q., Chung, A., Wu, Q., Chen, G.Q., 2007. Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by fadB anf fadA knockout mutant of pseudomonas putida KT2442. Biomacromolecules 8, 2504–2511.

Poblete-Castro, I., Binger, D., Oehlert, R., Rohde, M., 2014a. Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different Pseudomonas putida strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions. BMC Biotechnol. 14, 962.

Poblete-Castro, I., Rodriguez, A.L., Chi Lam, C.M., Kessler, W., 2014b. Improved production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in glucose-based fed-batch cultivations of metabolically engineered Pseudomonas putida strains. J. Microbiol. Biotechnol. 24, 59–69.

Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., Roy, I., 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. Mater. Sci. Eng. R Reports 72, 29–47.

Ramsay, B.A., Saracovan, I., Ramsay, J.A., Marchessault, R.H., 1991. Continuous Production of Long-Side-Chain Poly-3-Hydroxyalkanoates by Pseudomonas oleovorans. Appl. Environ. Microbiol. 57, 625–629.

Rojo, F., 2010. Carbon catabolite repression in Pseudomonas: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. FEMS Microbiol. Rev. 34, 658–684.

Rossell, C.E.V., Mantelatto, P.E., Agnelli, J. a. M., Nascimento, J., 2006. Sugar-based Biorefinery – Technology for Integrated Production of Poly (3-hydroxybutyrate), Sugar , and Ethanol. Biorefineries - Ind. Process. Prod. 1, 209–226.

Sharma, P.K., Fu, J., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D.B., 2012. Kinetics of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by a novel isolate of Pseudomonas putida LS46. Can. J. Microbiol. 58, 982–989.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Hotchkiss, A.T., Foglia, T.A., 2006. Biosynthesis of medium-chain-length Poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol. Lett. 28, 157–162.

Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., Ramsay, B.A., 2006. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of Pseudomonas putida KT2440. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 423–431.

Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., Ramsay, B., 2007a. Increasing the yield of MCL-PHA from nonanoic acid by co-feeding glucose during the PHA accumulation stage in two-stage fed-batch fermentations of Pseudomonas putida KT2440. J. Biotechnol. 132, 280–282.

Sun, Z., Ramsay, J., Guay, M., Ramsay, B., 2009. Enhanced yield of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by co-feeding glucose in carbon-limited, fed-batch culture. J. Biotechnol. 143, 262–267.

Urbina, L., Wongsirichot, P., Corcuera, M.Á., Gabilondo, N., Eceiza, A., Winterburn, J., Retegi, A., 2018. Application of cider by-products for medium chain length polyhydroxyalkanoate production by Pseudomonas putida KT2440. Eur. Polym. J. 108, 1–9.

Wang, Y., Chung, A., Chen, G.Q., 2017. Synthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymers, Random Copolymers, and Block Copolymers by an Engineered Strain of Pseudomonas entomophila. Adv. Healthc. Mater. 6, 1–10.

Wang, Q., Tappel, R.C., Zhu, C., Nomura, C.T., 2012. Development of a New Strategy for Production of Medium-Chain- Length Polyhydroxyalkanoates by Recombinant Escherichia coli via Inexpensive Non-Fatty Acid Feedstocks. Appl. Environ. Microbiol. 78, 519–527.

Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39, 971–974.

EFFECTS OF THE ORGANIC LOADING RATE ON POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCTION FROM SUGARCANE STILLAGE BY MIXED MICROBIAL CULTURES

Guilherme H. Duarte de Oliveira [1]; Mirian Yasmine Krasupenhar Niz [2]; Marcelo Zaiat [3]; José Alberto D. Rodrigues [4]

[1] Pós-Doutorando da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[2] Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[3] Professor da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[4] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Abstract. *Stillage is an abundant wastewater from the sugarcane ethanol industry. It is rich in fermentable substrates and presents low nutrient content, constituting a promising substrate for polyhydroxyalkanoate (PHA) production by mixed microbial cultures (MMC). This work assessed the enrichment of a PHA-accumulating MMC from acidified sugarcane stillage in a sequencing batch reactor under increasing organic loading rates (OLR) and no external nutrient supplementation. The OLR was increased from 1.0 kg COD.m^{-3}.d^{-1} to 7.1 kg COD.m^{-3}.d^{-1} in four steps. A PHA-producing MMC with high storage response was selected in all experimental conditions. The volumetric biomass productivity and the maximal PHA storage capacity increased continuously with the OLR, reaching 0.061 g VSS.L^{-1} h^{-1} and 0.49 g PHA.g VSS^{-1}, respectively. The highest observed PHA storage yield (0.60 g COD$_{PHA}$.g COD^{-1}) was obtained for the OLR of 4.5 kg COD.m^{-3}.d^{-1}. The PHA produced was a co-polymer of 3-hydroxybutyrate (86-77 %mol) and 3-hydroxyvalerate (14-23 %mol). The performance of the biomass enrichment was comparable to those attained with other agro-industrial wastewaters, indicating the potential of acidified sugarcane stillage as a feedstock for MMC PHA production.*

Introduction

The production of microbial biopolymers has drawn the attention of the scientific community due to the possibility of using renewable resources as feedstock, providing an alternative to oil-based polymers. Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers synthesized as intracellular carbon and energy reserves by various microbial groups with potential to substitute conventional plastics in specific applications. Although successful full-scale production has been achieved since the 1980s (Chen, 2009), the widespread use of PHA is still hindered by elevated production costs. The traditional approach for PHA production is based on pure-culture fermentations, fed with well-defined feedstocks. Under these conditions, the cost of the carbon substrates have considerable impact on overall production costs (Leong et al., 2017). This has motivated the development of alternative production strategies, enabling the use of cheaper raw materials such as agro-industrial waste streams. Mixed microbial cultures (MMC) are better suited for PHA production from complex substrates such as wastewaters, as the consortium can adapt to fluctuations in substrate composition (Serafim et al., 2004; Duque et al., 2014). MMC PHA production from wastewaters does not require aseptic conditions and has the additional benefit of avoided wastewater treatment, further reducing production costs (Fernández-Dacosta et al., 2015).

Typically, the MMC is enriched in PHA-accumulating organisms by exposing the biomass to alternating periods of carbon substrate excess (feast) and limitation (famine) in an aerobic sequencing batch reactor (SBR). This strategy, known as feast-famine (or aerobic dynamic feeding), provides high selective pressure for PHA storage (Albuquerque et al., 2011). The performance of MMC PHA production from waste streams is dependent on the characteristics of the substrate. Suitable carbon feedstocks should be rich in easily

biodegradable organic compounds, particularly volatile fatty acids (VFA), as these are efficiently converted into PHA. An acidogenic fermentation step is often desirable to increase the VFA-to-COD ratio of the wastewater, ensuring high PHA conversion (Valentino et al. 2017) and efficient biomass selection (Korkakaki et al., 2016). MMC PHA production has been investigated using numerous of agro-industrial waste streams following an acidogenic fermentation step, such as sugarcane molasses (Bengtsson et al., 2010), paper mill effluent (Jiang et al., 2012), olive oil mill effluent (Beccari et al., 2009), cheese whey (Oliveira et al., 2017) and organic solid waste (Amulya et al., 2015).

Sugarcane stillage (or vinasse) is the main waste stream from the ethanol industry. It is an acidic wastewater resulting from the distillation of ethanol after the fermentation of carbohydrates. Stillage is produced in high volumes. In average, 10 to 15 L are generated for each liter of ethanol produced (Cavalett et al., 2012). It presents an elevated organic matter content, most of which is easily fermentable, such as carbohydrates, ethanol, glycerol and organic acids (Fuess et al., 2018). Dark fermentation of stillage is often proposed for biohydrogen production, yielding an effluent stream rich in volatile fatty acids, a prospective substrate for MMC PHA production. When compared to other agro-industrial waste streams considered for PHA production, stillage has the peculiarity of being produced at high temperatures. It leaves the distillation process at about 90^{o}C, which allows conducting the acidogenic fermentation step in thermophilic or extremely thermophilic conditions without additional costs. This translates to more stable fermentation conditions, higher reaction rates and higher acidogenic potential (Akutsu et al., 2009). Furthermore, embedding the PHA production process in a sugarcane biorefinery has the added economic advantages of an already stablished infrastructure, reduced transportations costs, in-house availability of thermal and electric energy (from bagasse burning) and the possibility of using distillation by-products (fusel alcohols) as PHA extraction solvents (Koller et al., 2017).

This study aimed at exploring the potential of acidified sugarcane stillage as a feedstock for PHA production by mixed microbial cultures. A PHA-producing microbial consortium was selected in an SBR operated under aerobic dynamic feeding and no external nutrient supplementation. The performance of the cultivation was evaluated in terms of biomass productivity and storage response of the enriched culture following step increases in applied organic loading rate (OLR). PHA production was characterized according to the monomeric composition, storage yield, and maximum intracellular content achieved in the enrichment reactor.

Materials e Methods

Sugarcane stillage

Raw sugarcane stillage was collected from a full-scale sugar and ethanol biorefinery (Usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo). A thorough characterization of the stillage produced in this biorefinery can be found in Fuess et al. (2018). The stillage samples were kept at -15^{o}C prior to use to avoid degradation.

Acidogenic reactor

A bench-scale (3 L of working volume) acidogenic anaerobic structured-bed reactor (ASTBR) was used to treat the raw sugarcane stillage. The ASTBR was filled with polyethylene rings arranged in an orderly fashion as the support material. The reactor was operated in continuous, upflow mode under extreme thermophilic conditions (70°C) with a hydraulic retention time (HRT) of 19 h and an organic loading rate (OLR) of 42 kg COD.m^{-3}.d^{-1}. The acidogenic inoculum for the ASTBR was obtained through natural fermentation of the stillage after exposure to ambient conditions. The ASTBR was fed with raw stillage following pH correction to 6.5 using a NaOH solution (50%, w/v).

Sequencing batch reactor (SBR)

The selection of a PHA-accumulating consortium was performed in a 5-L stirred tank reactor with a 3-L working volume. The SBR was maintained at 30°C in a temperature-controlled chamber. The SBR was mechanically stirred by a two-blade flat paddle impeller, with an impeller-to-tank-diameter ratio of 0.6. The stirring rate was kept at 70 rpm. Aeration was performed with a membrane compressor and a ceramic diffusor. The air flowrate was manually adjusted as needed to maintain a minimum dissolved oxygen (DO) concentration of 1.0 mg L^{-1} throughout the operation cycles.

The reactor was inoculated with 1.5 L of concentrated activated sludge from a full-scale plant treating domestic sewage, presenting a biomass content of 7.8 ± 0.5 g VSS L^{-1}. The reactor feed consisted of acidified stillage diluted with tap water to achieve the intended organic load in each experimental condition. Allylthiourea (20 mg L^{-1}) was added to the feed to prevent nitrification.

The SBR was operated with 8-h cycles consisting of 7 min of filling, 465 min of reaction and 8 min of withdrawal. Feeding and withdrawal were performed with diaphragm pumps controlled by timer relays. The mechanical agitation was turned off in the last 15 minutes of each cycle, but the aeration was kept on continuously. Biomass concentration was measured during the reaction cycle and in the withdrawn volume, allowing the determination of the sludge retention time (SRT), which was maintained at 2.0 ± 0.3 d throughout the operation. The volume exchange ratio, defined as the quotient between the volume filled per cycle and the total reaction volume was set as 1/3, resulting in an equivalent HRT of 24 h.

The reactor was evaluated in four experimental conditions in which the applied OLR was the main operational variable. OLR of 1, 2, 4.5 and 7 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$ were achieved through dilution of the influent feed. The SBR was monitored through end of cycle samples for biomass, measured as volatile suspended solids (VSS), total chemical oxygen demand (COD), pH, PHA and VFA. DO concentration was measured online throughout the cycle. Full cycle temporal profiles were followed after the reactor had been operated for at least 5 SRTs. The profiles were performed in duplicates, at least three cycles apart.

Analytical methods

The physico-chemical analysis of pH, COD and VSS were performed according to the *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Total carbohydrate concentrations were measured using the phenol-sulphuric method (Dubois et al., 1956). Ammonium concentration was determined by the phenol-hypochlorite method (Weatherburn, 1967). The organic acids: acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric and caproic acids, and alcohols (methanol, ethanol and n-butanol) were determined by headspace gas chromatography analysis (Adorno et al., 2014). DO concentrations were acquired continuously by a Hach HQ40D portable meter equipped with a luminescent dissolved oxygen probe (Intellical LDO101). PHA analysis was performed by methylester gas chromatography after acid methanolysis (Braunegg et al., 1978). Benzoic acid was used as an internal standard and a commercial copolymer of PHB-co-HV (Sigma-Aldrich) was used as the external standard.

Data processing

Total biomass concentration (X) was approximated by the VSS concentration of the reactor medium. The intracellular PHA content of the biomass (%PHA) was calculated as a percentage of the VSS on a mass basis (%PHA = g PHA.g VSS^{-1}). Residual (or active) biomass (Xr) was calculated as PHA-free biomass (Xr = X – PHA). The PHA storage yield (Y) was calculated considering both total COD removed (Y_{COD}) and total VFA removed (Y_{VFA}), on a COD basis. The yield was calculated as the ratio of the maximal PHA production rate by the maximal COD removal rate (for Y_{COD}) and the maximal VFA removal rate (for Y_{VFA}). The maximal production or removal rates were calculated by linear regressions of the

temporal profiles of COD, VFA and PHA in the first hours of the cycle, where the slopes were fairly constant. PHA concentrations were converted to COD equivalents considering the oxidation stoichiometry for each PHA monomer: 1.67 mg COD.mg 3-hydroxybutirate (HB) monomer^{-1} and 1.92 mg COD.mg 3-hydroxyvalerate (HV) monomer^{-1} (Beccari et al., 2009). The specific rates were calculated respective of the initial residual biomass concentration in each cycle profile. Biomass concentration values were converted to COD equivalents considering an average contribution of 1.42 g COD.gVSS^{-1} (Beccari et al., 2009).

The volumetric biomass productivity in the enrichment reactor (in g X per L of reactor volume per h) was calculated from the definition of the SRT, as the ratio between the average biomass concentration in the SBR when full, and the SRT. The duration of the feast phase was calculated based on the DO profile in each cycle, with a sharp increase in DO concentration marking the end of the feast phase. The feast-to-famine (F/F) ratio was calculated from the duration of the feast phase (F) and the total cycle length (C), as (F/F) = F/(C-F).

Results and Discussion

Acidified sugarcane stillage

The main organic constituents of the acidified sugarcane stillage were evaluated in terms of their contribution to the total COD of the wastewater (Table 1). The acidified stillage presented an average total COD content of 29.5 ± 1.8 g COD.L^{-1}, which was mostly (83%, 24.6 ± 1.5 g COD.L^{-1}) in the soluble phase. Volatile fatty acids accounted for 34% and 41% and of the total and soluble COD, respectively. Acetic, propionic and butyric acids were the main VFA observed, making up 31%, 19% and 39% of the total VFA on a COD basis, respectively. Negligible amounts (< 1%) of alcohols and a residual carbohydrate content equivalent to 4.3 ± 0.3 g COD.L^{-1} were also detected in the acidified wastewater. The evaluated constituents accounted for 49% of the total COD in the acidified stillage, indicating a considerable presence of unidentified compounds.

Table 1: Characterization of main COD fractions in acidified sugarcane stillage.

Organic constituent	COD (gCOD.L^{-1})	Fraction of total COD (%)
Total COD	29.5 ± 1.8	100
Soluble COD	24.6 ± 1.5	83.3
Total VFA	10.2 ± 2.7	34.4
Acetic acid	3.2 ± 0.7	10.7
Propionic acid	1.9 ± 0.6	6.6
Butyric acid	4.0 ± 1.5	13.5
Valeric acid	0.6 ± 0.4	2.0
Caproic acid	0.1 ± 0.1	0.4
Ethanol	0.1 ± 0.1	0.5
Methanol	0.2 ± 0.1	0.8
Carbohydrates	4.3 ± 0.3	14.6

The contribution of VFA to the soluble COD observed in the present work is comparable to previously reported values for acidified sugarcane stillage from the same biorefinery. The VFA/COD ratios ranged between 34% (Fuess et al., 2016) and 44% (Ferraz Jr. et al., 2015) for thermophilic (55°C) acidogenesis under an OLR of 84.2 kg COD.m^{-3}.d^{-1}. Other fermented agro-industrial wastewaters considered for MMC PHA production typically present similar VFA/COD ratios. Values of 60% have been reported for fermented paper mill wastewater (Jiang et al., 2012), 32% for acidified olive oil mill wastewater (Beccari et al., 2009) and 47% for acidified cheese whey (Oliveira et al., 2017).

Butyric acid was the main VFA present in the acidified stillage. This is beneficial for PHA production, as it is a preferential substrate for PHA synthesis, when compared to acetic and propionic acids (Marang et al., 2013). The efficiency of the acidogenic step is central to the performance of MMC PHA production processes, as VFA are PHA precursors and the presence of non-VFA substrates select for side populations not capable of PHA synthesis, reducing the efficiency of the enrichment stage (Korkakaki et al., 2016).

Biomass selection in an SBR under increasing organic loading rates

The aerobic SBR for the enrichment of a PHA-producing biomass was operated for 70 days through four step increases in the OLR (Figure 1). Each experimental condition was maintained until a stability period in terms of biomass production, COD removal efficiency and effluent pH was observed.

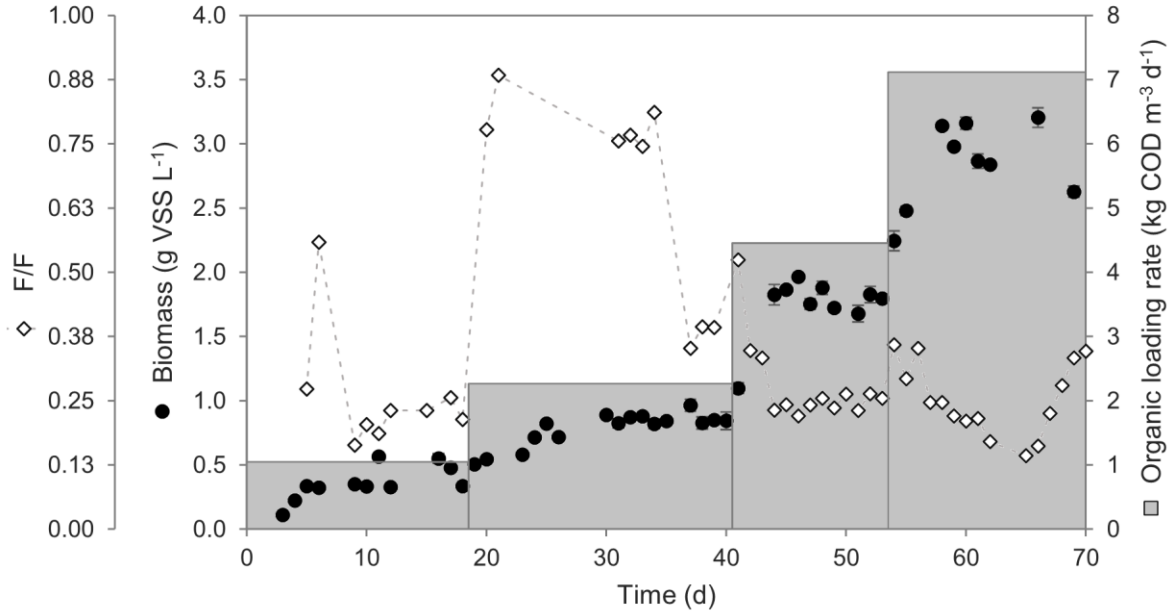


Figure 1. Temporal profile of end-of-cycle biomass concentration (●) and the feast-to-famine (F/F) ratio (◇) according to the organic lading rates applied to the SBR reactor

The F/F ratio presented accentuated variations when an increase in OLR was performed, but ultimately returned to low levels in all experimental conditions. The F/F ratio observed during the stability periods did not increase significantly after OLR increases of up to 7.1 kg COD $m^{-3}.d^{-1}$, indicating that the selective pressure for a PHA-producing biomass was maintained throughout the operation. During the stability periods, the F/F ratio was below 0.4 in all experimental conditions, within the range recommended to enrich a consortium with high storage capacity (Dionisi et al., 2006). A more stable F/F ratio was observed for the OLR of 4.5 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$. When the OLR was increased to 7.1 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$ the F/F fluctuated, although it remained in the desired low range. Total COD removal efficiency remained stable during the operation (Table 2) and an average of 72 ± 4% was observed over the entire period.

Biomass production was directly proportional to the applied OLR. A maximum biomass concentration of 2.95 ± 0.22 g $VSS.L^{-1}$ was achieved for the highest OLR applied. As PHA are accumulated intracellularly, the biopolymer productivity is directly proportional to biomass production. Therefore, the enrichment stage should not only select for a consortium with high storage response, but must also ensure sufficient biomass output. Since the selection pressure is obtained by keeping the mixed culture under carbon starvation for long periods, the biomass concentrations in the enrichment SBRs are usually low. Applying high OLRs can increase biomass production but that can also extend the duration of the feast phase, reducing

selective pressure (Valentino et al., 2014). Hence, the enrichment stage is optimally run at the highest possible OLR that still results in a stable operation and low F/F ratios, without resulting in substrate inhibition or oxygen limitation.

Table 2: SBR performance parameters according to the applied organic loading rate in four experimental conditions.

Experimental Condition	Duration (d)	OLR (kg COD.m^{-3}.d^{-1})	COD removal (%)	Biomass (g VSS.L^{-1})
C1	18	1.0 ± 0.1	67 ± 2	0.42 ± 0.11
C2	22	2.3 ± 0.1	68 ± 2	0.86 ± 0.04
C3	13	4.5 ± 0.2	74 ± 1	1.81 ± 0.09
C4	17	7.1 ± 0.4	74 ± 1	2.95 ± 0.22

A typical full cycle profile is presented in Figure 2 for the experimental condition C4. It shows that most of the COD removal occurred within the first 3 hours of cycle and a residual COD content was observed. Well defined feast and famine phases were obtained, as denoted by the sharp changes in DO profiles. The increase in DO concentration at the end of the feast phase occurred in two distinct steps. This is indicative of preferential uptake of different substrates and typically observed in MMC enrichments with complex wastewaters (Tamis et al., 2014). The first increase in DO marks the depletion of VFA and the second one indicates the slower consumption of the remaining substrates.

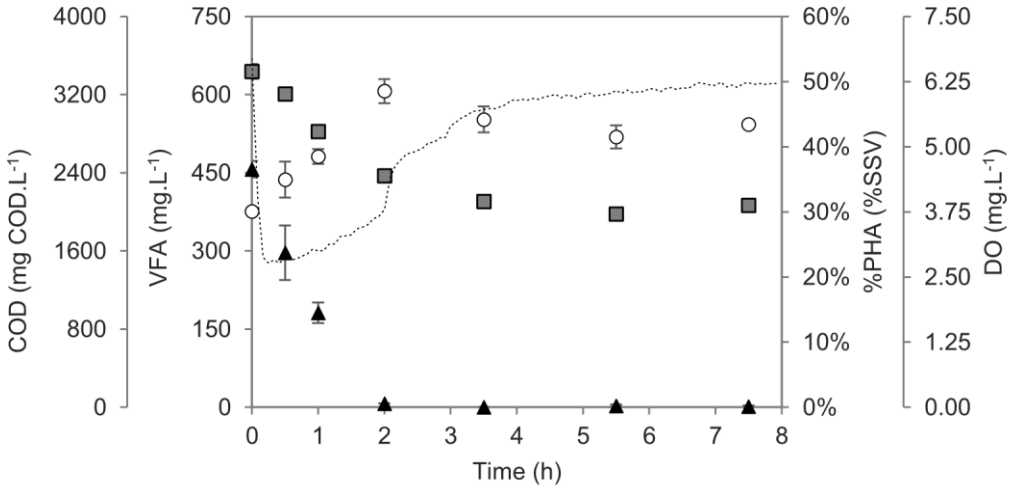


Figure 2. Cycle profile of total COD (■), volatile fatty acids (VFA, ▲), intracellular PHA content (○) and dissolved oxygen (DO, dotted line) in the SBR reactor for the experimental condition C4, relative to an OLR of 7.1 kg COD.m^{-3}.d^{-1}.

The VFA were rapidly consumed during the feast phase, concomitantly to an increase in PHA content. Preferential consumption of butyrate was observed in all experimental conditions, with higher substrate uptake rates being measured for butyrate when compared to acetate and propionate. The produced PHA was partially consumed during the famine phase. The high baseline PHA content in the biomass indicates that it could not use the stored PHA for growth during the famine phase due to nutrient limitation. In all experimental conditions, ammonia concentration was depleted within the first hour of cycle, before the VFA were completely taken up, indicating that the culture was nitrogen-limited.

The maximum PHA content in the end of the feast phase was directly proportional to the applied OLR (Figure 3). PHA concentrations in the reactor reached a maximum of 1.44

g.L^{-1} for the highest OLR, corresponding to an intracellular content of 49% of the biomass. The PHA storage yield also increased with increasing OLR, but it was highest for the OLR of 4.5 kg COD.m^{-3}.d^{-1} and showed a slight decrease when the OLR was raised to 7.1 kg COD m^{-3}.d^{-1}. A maximum storage yield of 0.60 g COD_{PHA}.g $COD_{consumed}^{-1}$ was obtained for the OLR of 4.5 kg COD.m^{-3}.d^{-1}. This shows that the majority of the COD removed was directed towards polymer production, indicating a strong selection of a PHA-accumulating consortium. The decrease in PHA storage yield and storage rate at the last experimental condition indicates a slight decrease in the storage response of the selected culture. However, the increased PHA content and biomass production demonstrates that the highest OLR evaluated resulted in higher overall PHA productivity. The OLRs evaluated in the present work are far from that of the undiluted acidified stillage, and could be further increased, with possible gains in process productivity. However, severe loss of storage response and instable PHA production under high OLR have been observed for fermented waste activated sludge and an OLR of 12 kg COD.m^{-3}.d^{-1} (Morgan-Sagastume et al., 2010) and sugarcane molasses (Albuquerque et al., 2007).

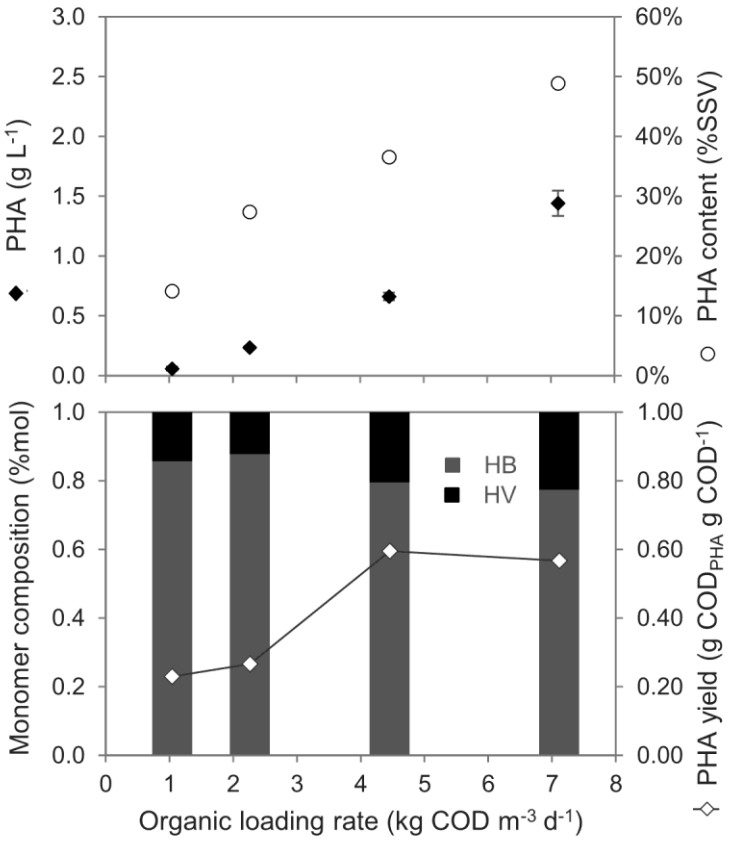


Figure 3. PHA concentration (◆) and intracellular content (○) at the end of the feast phase, average monomer composition and PHA storage yield (◇) from total COD consumed according to the applied organic loading rate in the SBR.

The monomeric composition of the produced PHA was also shown to be dependent on the applied OLR. A higher proportion of HV monomers was observed at higher OLRs, increasing from 14% (on a molar basis) to 23% when the OLR was increased from 1.0 kg COD m^{-3}.d^{-1} to 7.1 kg COD m^{-3}.d^{-1}. The preferential incorporation of HV monomers indicates a shift in the MMC behavior induced by the changes in OLR, as the relative composition of the fermented wastewater, and thus the availability of HB and HV precursors, was maintained constant during the entire operational period. It has been observed that HB precursors are preferentially channeled to cell maintenance functions, while HV precursors are mainly

directed to polymer production (Duque et al., 2014). Consequently, a higher storage yield of HV is observed compared to the storage yield of HB, when precursors for both monomers are supplied (Silva et al., 2017). This behavior has implications for the potential applications of the produced PHA, as it is well stablished that HV content influences the thermomechanical properties of the polymer Laycock et al. (2014).

The performance of the biomass enrichment with acidified sugarcane stillage was compared with those performed with aerobic dynamic feeding of real fermented wastewaters (Table 3). The biomass productivity achieved in the present work is comparable to most previous researches, even though no external nutrient supplementation was performed. The storage response of the enriched culture, as denoted by the PHA storage yield was also similar to what was previously obtained. The higher PHA storage observed in the works of Jiang et al. (2012) and Tamis et al. (2014) are associated to higher VFA contents of the acidified wastewaters (of over 60% on a COD basis), which likely contributed to a more efficient selection of the MMC.

Table 3: Comparison of the main performance parameteres of biomass enrichments performed with real acidified wastewaters (WW).

Wastewater	SRT (d)	Biomass Prod. ($g\ VSS.L^{-1}.h^{-1}$)	Max. PHA Storage ($g_{PHA}.g_{VSS}^{-1}$)	Reference
Sugarcane molasses	10	0.018	0.30	Albuquerque et al. (2007)
Sugarcane molasses	10	0.033	0.58	Oehmen et al. (2014)
Olive Oil Mill WW	1	0.155	-.-	Beccari et al. (2009)
Paper Mill WW	7	0.035	0.53	Bengtsson et al. (2008)
Paper Mill WW	2	0.026	0.77	Jiang et al. (2012)
Candy Factory WW	1	0.063	0.70	Tamis et al. (2014)
Sugarcane Stillage	2	0.061	0.49	This work

Accumulation experiments are needed to determine the saturation of the PHA storage capacity of the MMC enriched with acidified stillage. Nevertheless, the highest storage observed in the end of the feast phase (0.49 g PHA.g VSS^{-1}) is comparable to the maximum storage capacities achieved in accumulation experiments with acidified sugarcane molasses. Within the context of a sugarcane biorefinery, as long as process productivities are similar, stillage is preferable to molasses as a substrate for PHA production, as its use would not compete with ethanol production. Preferably, the final intracellular PHA content should be maximized to reduce downstream processing costs. However, the content achieved in the enrichment reactor is already above the suggested inferior threshold for commercially viable recovery of 0.4 g PHA.g VSS^{-1} (Valentino et al., 2017).

Conclusions

The present work evaluated the potential of MMC PHA production from acidified sugarcane stillage. A biomass with high PHA storage response was selected using a feast-famine strategy without external nutrient supplementation. Step increases in applied OLR were performed from 1.0 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$ to 7.1 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$. F/F ratios below 0.4 were obtained in the stability periods, indicating that adequate selective pressure was maintained throughout the operation. A maximal PHA storage yield of 0.6 g $COD_{PHA}.g\ COD^{-1}$ was obtained for an OLR of 4.5 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$. However, biomass production and intracellular PHA content increased continuously with increasing OLR, and optimal productivity results were obtained for the OLR of 7.1 kg $COD.m^{-3}.d^{-1}$, with a biomass concentration of 2.95 g $VSS.L^{-1}$ containing 0.49 g PHA.g VSS^{-1}. The HV monomer content of the produced PHA

increased with increasing OLR, and a maximum HV content of 23%mol was achieved for the highest applied OLR.

References

Adorno, M.A.T., Hirasawa, J.S., Varesche, M.B.A., 2014. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). Am. J. Anal. Chem. 5(7), 406–414.

Akutsu, Y., Li, Y.Y., Harada, H., Yu, H.Q., 2009. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. Int. J. Hydrogen Energ. 34(6), 2558–2566.

Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. J. Biotechnol. 130(4), 411–421.

Albuquerque, M.G.E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., Reis, M.A.M., 2011. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. J. Biotechnol. 151(1), 66–76.

Amulya, K., Jukuri, S., Venkata Mohan, S., 2015. Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: Process integration for up-scaling. Bioresource Technol. 188, 231–239.

Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Villano, M., 2009. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. J. Chem. Technol. Biot. 84(6), 901–908.

Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T., 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresource Technol. 99(3), 509–516.

Bengtsson, S., Pisco, A.R., Reis, M.A.M., Lemos, P.C., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. J. Biotechnol. 145(3), 253–263.

Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M., 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. Eur. J. Appl. Microbiol. 6(1), 29–37.

Cavalett, O., Junqueira, T.L., Dias, M.O.S., Jesus, C.D.F., Mantelatto, P.E., Cunha, M.P., Bonomi, A., 2012. Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. Clean Technol. Envir. 14(3), 399–410.

Chen, G.-Q., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. Chem. Soc. Rev. 38(8), 2434-2446.

Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., Beccari, M., 2006. Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. Biotechnol.Bioeng. 93(1), 76–88.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28(3), 350–356.

Duque, A.F., Oliveira, C.S.S., Carmo, I.T.D., Gouveia, A.R., Pardelha, F., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2014. Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition. New Biotechnol. 31(4), 276–288.

Fernández-Dacosta, C., Posada, J.A., Kleerebezem, R., Cuellar, M.C., Ramirez, A., 2015. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. Bioresource Technol. 185, 368–377.

Ferraz Jr, A.D.N., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2015. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. Bioresource Technol. 186, 81–88.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energ. 41(19), 8132–8145.

Fuess, L.T., Garcia, M.L., Zaiat, M. (2018). Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. Sci. Total Environ. 634, 29–40.

Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. Wat. Res. 46(17), 5517–5530.

Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M.M., Braunegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. New Biotechnol. 37, 24–38.

Korkakaki, E., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2016. Survival of the fastest: Selective removal of the side population for enhanced PHA production in a mixed substrate enrichment. Bioresource Technol. 216, 1022–1029.

Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., Lant, P., 2014. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. Prog. Polym. Sci. 39(2), 397–442.

Leong, Y.K., Show, P.L., Lan, J.C.-W., Loh, H.-S., Lam, H.L., Ling, T.C., 2017. Economic and environmental analysis of PHAs production process. Clean Technol. Envir. 19(7), 1941–1953.

Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2013. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. Bioresource Technol. 142, 232–239.

Morgan-Sagastume, F., Karlsson, A., Johansson, P., Pratt, S., Boon, N., Lant, P., Werker, A., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. Wat. Res. 44(18), 5196–5211.

Oehmen, A., Pinto, F.V., Silva, V., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2014. The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses. Eng. Life Sci. 14(2), 143–152.

Oliveira, C.S.S., Silva, C.E., Carvalho, G., Reis, M.A.M., 2017. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. New Biotechnol. 37, 69–79.

Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. Biotechnol. Bioeng. 87(2), 145–160.

Silva, F., Campanari, S., Matteo, S., Valentino, F., Majone, M., Villano, M., 2017. Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. New Biotechnol. 37, 90–98.

Tamis, J., Lužkov, K., Jiang, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Kleerebezem, R., 2014. Enrichment of Plasticicumulans acidivorans at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. J. Biotechnol, 192, 161–169.

Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G., Majone, M., 2014. Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. New Biotechnol. 31(4), 264–275.

Valentino, F., Morgan-Sagastume, F., Campanari, S., Villano, M., Werker, A., Majone, M., 2017. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. New Biotechnol. 37, 9–23.

Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39(8), 971–974.

EFEITO DA COMPOSIÇÃO AFLUENTE E DA ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELO TRATAMENTO DE SORO E GLICERINA EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA

Juliane N. Albuquerque [1]; Ana Paula Paulinetti [2];
Suzana M. Ratusznei [3]; José Alberto D. Rodrigues [3]

[1] Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[2] Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[3] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Neste trabalho foi avaliada a produção de metano pela codigestão de soro/glicerina, em condições termofílicas (55°C), em reator anaeróbio, operado em batelada (B) e batelada alimentada (BA) sequenciais, com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica (80 rpm). Inicialmente, houve um período de adaptação da biomassa, na qual adotou-se a estratégia de submeter a biomassa ao aumento gradual da concentração de substrato (soro de leite), de 1000 a 5000 mgDQO·L^{-1}, e da temperatura (35 a 55^{o}C). Esta estratégia foi efetiva, uma vez que, após 11 dias de operação, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 82% e a eficiência de remoção de carboidratos foi praticamente total. Na sequência, o desempenho do AnSBBR (5,6 L) foi avaliado em função do aumento da proporção de glicerina no afluente (25%, 50% e 75%) para a mesma carga orgânica volumétrica aplicada (COVA) de 5,3 gDQO·L^{-1}·d^{-1} e a mesma temperatura de 55^{o}C. Por fim, para o afluente com 25% de soro e 75% de glicerina, manteve-se a COVA e a temperatura e alterou-se a estratégia de alimentação para batelada alimentada. Verificou-se alta eficiência de remoção de matéria orgânica, carboidratos e glicerina no AnSBBR nas proporções de glicerina de 25%, 50% e 75% no afluente. A concentração de ácidos voláteis totais no efluente diminuiu com o aumento da proporção de glicerina. Os valores de produtividade em metano foram muito próximos, com pequena vantagem para a condição de operação em batelada com 75% de glicerina, na qual obteve-se 68,0 molCH$_4$·m^{-3}·d^{-1}, com 96% de remoção de matéria orgânica, e biogás com 72% de metano. Esses valores foram próximos aos obtidos quando houve alteração da estratégia de alimentação para batelada alimentada, mantendo-se a COVA e a proporção do cosubstrato no afluente.*

Introdução

O metano é um dos principais gases causadores do efeito estufa. Pode ser originado de diversas fontes como a agricultura, os processos biológicos e o uso de combustíveis fósseis. A necessidade em reduzir a emissão deste gás para a atmosfera, aliada a busca por alternativas de energia limpa e sustentável impulsionou o desenvolvimento de formas mais viáveis de recuperação de recursos dos efluentes, como por exemplo a produção de energia pelo produto da digestão anaeróbia, biogás. O biogás é um composto gasoso, constituído em média por 59% de gás metano (CH_4), 40% de gás carbônico (CO_2) e 1% de gases traço (gases restantes), entre eles o gás sulfídrico (H_2S). O biogás resulta da degradação anaeróbia (em ausência de oxigênio) da matéria orgânica, realizada por microrganismos (Bley Jr., 2015). A tecnologia de digestão anaeróbia foi empregada com sucesso para amenizar uma variedade de resíduos (Nguyen *et al*., 2015). O processo de biodigestão se desenvolve com resíduos rurais (esterco), agroindustriais (vinhaça, efluentes das indústrias de laticínios e dos matadouros), domésticos ou comunitários (lama de esgotos) e, também, sobre plantas (aguapé) (Malajovich, 2012). Sobre este contexto, se destaca a codigestão do soro e glicerina. O soro é um subproduto da indústria de laticínios, obtido durante a produção de queijo. Consiste em 80-90% do volume do leite utilizado para a produção de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou (Bezerra *et al*., 2009 e Lima *et al*., 2016). O soro é considerado um efluente

altamente poluente devido à sua elevada carga orgânica e volume gerado, o que representa um impacto ambiental significativo para a indústria de laticínios. Por isso, o soro é utilizado em reatores acidogênicos e metanogênicos como substrato para a digestão anaeróbia. Porém, sua alta biodegradabilidade pode causar o aumento repentino de ácidos que causam a instabilidade do processo. Em vista disso, o uso de um cosubstrato com a capacidade tamponante no tratamento do soro ajudará na melhoria do processo (Rivero *et al*., 2014). Em vista disso, utiliza-se a glicerina, que possui capacidade tamponante, como um cosubstrato para o soro do leite. A glicerina, ou glicerol, é o maior subproduto da indústria de biodiesel. Para cada 100 kg de biodiesel produzidos, cerca de 10 kg de glicerol bruto são gerados. Ademais, a glicerina é uma substância muito biodegradável, apresenta um pH que condiz com as condições da digestão anaeróbia e há uma grande variedade de microrganismos anaeróbios que utilizam a glicerina como fonte de carbono (Song *et al*., 2004; Tatara *et al*., 2005; Ueno *et al*., 2007; Yang *et al*., 2008; Ferraz Júnior *et al*., 2016).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho consiste na aplicação do reator anaeróbio operado em batelada sequencial com agitação mecânica, 80 rpm, e biomassa imobilizada em suporte inerte (AnSBBR), aplicado à produção de metano pela codigestão de glicerol (efluente do processo de produção de biodiesel) e soro de leite (efluente da produção de laticínios) em condições termofílicas (55^{o}C). Por se tratar de resíduos que saem do processo produtivo à altas temperaturas, torna-se adequada a aplicação do referido biorreator em condições termofílicas. O desempenho do biorreator foi avaliado por indicadores de desempenho relacionados à remoção de matéria orgânica (na forma de DQO e carboidratos), estabilidade operacional (compostos intermediários do metabolismo anaeróbio), produtividade/composição do biogás (geração de metano), e do rendimento entre metano gerado e matéria orgânica consumida.

Material e Métodos

A Figura 1 apresenta o esquema do biorreator com agitação mecânica utilizado (BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co.) constituído por um frasco de vidro de 20 cm de diâmetro e de altura, com capacidade total de 6 L e capacidade útil de 5,6 L.

O material suporte foi confinado em um cesto de aço Inoxidável-316 e também na parte inferior do reator, entre a base do reator e o cesto. O cesto era perfurado com as seguintes dimensões: 18 cm de altura, 7 cm e 17,5 cm de diâmetro interno e externo, respectivamente. A parte inferior do cilindro interno do cesto foi coberta por uma tela de aço inoxidável, de modo a reter o biofilme preso na parte inferior do reator. A agitação foi de 80 rpm, realizada por motor acoplado aos 2 impelidores tipo turbina de 6 cm de diâmetro constituído por seis lâminas planas (padrão Rushton) e instalados a 8 e 16 cm do fundo do tanque.

A alimentação e descarga foram realizadas por bombas tipo diafragma marca Prominent modelos β e Concept, respectivamente. Um sistema de automação composto por temporizadores foi responsável pelo acionamento/parada das bombas e do agitador, de modo a implementar as etapas da operação em batelada sequencial. A temperatura foi controlada pela circulação de água destilada pela jaqueta da parte inferior do reator, ligada a um banho ultratermostático (marca Marconi modelo MA-184).

O inóculo (26,9 $gST \cdot L^{-1}$ e 16,5 $gSVT \cdot L^{-1}$) utilizado foi proveniente do sistema de tratamento termofílico (UASB) de vinhaça da Usina de São Martinho (Pradópolis, SP). O material utilizado como suporte inerte para imobilização da biomassa foi espuma de poliuretano na forma de cubos de 1,0 cm de aresta, com densidade aparente de 23 $kg \cdot m^{-3}$ e porosidade próxima a 95%. O lodo anaeróbio termofílico foi imobilizado conforme metodologia proposta por Zaiat *et al.* (1994).

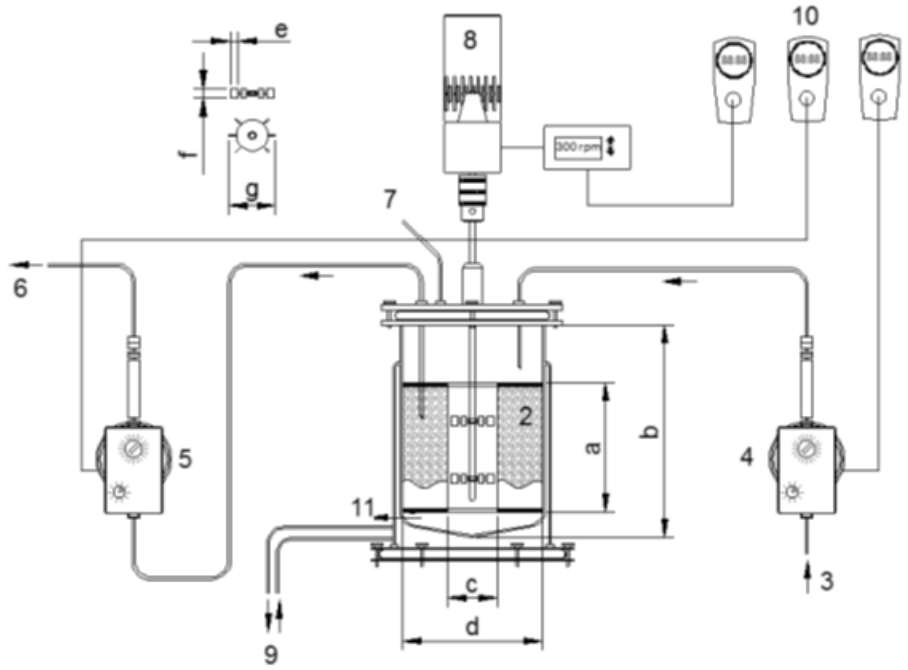


Figura 1: Representação esquemática do reator anaeróbio operado em batelada sequencial com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica

[Notação: (a) Reator: 1 – Biorreator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co.) com capacidade de 6 L (b = 29,5 cm; d = 18,0 cm); 2 – Cesto de retenção e material suporte de biomassa (a = 18,0 cm; c = 7,0 cm); 3 – Afluente; 4 – Bomba de alimentação; 5 – Bomba de descarga; 6 – Efluente; 7 – Saída de biogás; 8 – Sistema de agitação; 9 – Sistema de controle de temperatura (banho ultratermostático); 10- Sistema de automação; 11 – Espaço entre a base do reator e o cesto para retenção de biomassa. (b) Detalhes dos impelidores: Dois impelidores tipo turbina com seis pás planas
e = 2 cm; f = 1,5 cm; g = 6 cm)].

A água residuária alimentada ao AnSBBR visando à produção de biometano foi formulada a base de soro de leite e glicerina (Tabela 1), variando a porcentagem de cada um desses componentes de acordo com a condição experimental proposta.

A glicerina foi obtida de uma usina de produção de biodiesel. O soro comercial é obtido como efluente do processo de produção de laticínios. Foi utilizada a forma desidratada em pó (composição: 73% carboidratos, 11 % proteínas, 2% gordura, minerais 9%, umidade 5%), cuja água residuária foi obtida a partir da dissolução com água de torneira. Foi necessária a suplementação de alcalinidade pela adição de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) em função das características da água residuária.

Na Tabela 1 é apresentada a composição da água residuária, ressaltando-se que se tem as seguintes relações teóricas: 1000 mgDQO é igual a 787,6 mg de glicerina e igual a 897,0 mg de lactose.

Tabela 1: Composição da água residuária.

Composto	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Soro de leite	897,0
Glicerina	787,6
Bicarbonato de sódio	16

Análises físico-químicas

O monitoramento foi efetuado por análises em amostras do afluente e do efluente, realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1995), considerando também o método de Ripley *et al.* (1986) na determinação da alcalinidade e de Dubois *et al.* (1956) na determinação de carboidratos, além do método

adaptado de Bondioli e Bella (2005), para a determinação de glicerina total. Os compostos intermediários do metabolismo anaeróbio e a composição do biogás foram analisados por cromatografia em fase gasosa. O volume acumulado de biogás produzido foi aferido por medidor de gás Ritter modelo MilligasCounter.

Procedimento experimental da operação do reator

Na Tabela 2 são apresentadas as condições de operação implementadas (Condições AD e 1 a 4) no AnSBBR, na qual B refere-se à operação em batelada; BA refere-se à operação em batelada alimentada; C_{SAFL} é a concentração do afluente e t_F é o tempo de alimentação. O tempo de ciclo foi de 8 h, a frequência do agitador foi de 80 rpm e volume alimentado/descarregado foi de 1,0 L.

Tabela 2: Resumo das condições experimentais implementadas.

Etapa	Condição	Operação	Soro/Glicerina (%)	C_{SAFL} ($gDQO \cdot L^{-1}$)	t_F (min)	T (°C)
Adaptação	AD	B	100/0	1,0	10	35
				2,0		40
				3,0		45
				4,0		50
				5,0		55
Proporção	1	B	75/25	5,0	10	55
	2		50/50			
	3		25/75			
Estratégia de Alimentação	4	BA	25/75	5,0	240	55

O procedimento de operação do AnSBBR foi executado da seguinte forma: o primeiro ciclo foi realizado de maneira distinta, em que 2,5 L de água residuária foram alimentados durante 20 minutos. Após a alimentação, a agitação foi iniciada e permaneceu ligada durante o tempo de ciclo de 8 horas. No final desse tempo, a agitação foi desligada e descarregou-se 1,0 L de meio em 10 minutos. Imediatamente, após o final deste primeiro ciclo, foi alimentado 1,0 L de meio, também em 10 minutos, e um novo ciclo teve início.

No período de Adaptação, o AnSBBR foi preenchido com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano e foi operado em batelada (B) em ciclos de 8 h, com afluente composto por soro de leite somente. Este período teve duração de 11 dias, nos quais o aumento da concentração do afluente e da temperatura foram graduais, conforme descrito a seguir: (i) inicialmente, o AnSBBR foi operado durante 2 dias, a 35°C e com concentração afluente 1000 $mgDQO \cdot L^{-1}$; (ii) na sequência foi operado por um dia com 2000 $mgDQO \cdot L^{-1}$ a 40ºC; (iii) a seguir foi operado por 4 dias a 45ºC, com 3000 $mgDQO \cdot L^{-1}$; (iv) a seguir foi operado por 2 dias a 50ºC, com 4000 $mgDQO \cdot L^{-1}$, e finalmente foi operado a 55°C por 2 dias, com 5000 $mgDQO \cdot L^{-1}$.

Nas Condições 1, 2 e 3, o AnSBBR foi operado em batelada (B) nas mesmas condições de temperatura, concentração afluente, tempo de ciclo, porém aumentou-se a proporção de glicerina no afluente, para 25%, 50% e 75%, respectivamente.

Na etapa de Estratégia de Alimentação, foi mantida a concentração afluente em 5 $gDQO \cdot L^{-1}$, e o AnSBBR foi operado em batelada alimentada (BA) na Condição 4. O tempo de alimentação (t_F) foi de 50% em relação ao tempo de ciclo.

Em todos os ensaios realizados no AnSBBR, se mantiveram constantes o volume de alimentação (1,0 L), o tempo de ciclo (8 horas), a temperatura (55ºC) e a agitação (80 rpm), valores estes sugeridos a partir da experiência de utilização deste sistema em trabalhos anteriores para a produção de metano (Bezerra *et al*., 2011; Lovato *et al*., 2012; Silva *et al*., 2013; Albanez *et al*., 2016; Almeida *et al*., 2017). Uma vez atingida a estabilidade nas

condições experimentais, foram obtidos os perfis de algumas variáveis, cujas amostras foram colhidas ao longo do ciclo em intervalos de tempo de 30 a 60 min, sendo que o volume retirado foi de no máximo 300 mL. Desta forma, poderá se obter uma melhor compreensão das vias metabólicas ao longo de um ciclo.

Resultados e Discussão

Na Etapa de Adaptação (AD), houve aumento gradual da concentração afluente de 1000 a 5000 mgDQO·L^{-1} e da temperatura de 35 a 55 °C. Obteve-se a eficiência de remoção de matéria orgânica de 82% e de carboidratos de 99% em 11 dias de operação, indicando, desta forma, que os microrganismos já estavam adaptados ao afluente.

Na Tabela 3 e nas Figuras 2 a 6 são apresentados os resultados obtidos, nas quais COVA é a carga orgânica volumétrica aplicada, COVR é a carga orgânica volumétrica removida, Va é o volume alimentado/descarregado por ciclo, AVT é a concentração de ácidos voláteis totais, AB, alcalinidade à bicarbonato, ε_{SF} é a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO para amostras filtradas, ε_{CF} é a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de carboidratos para amostras filtradas, ε_{GF} é a eficiência de remoção de glicerina para amostras filtradas, PrM é a produtividade molar, RMCR é o rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida, V_{CH4} é o volume de metano produzido por ciclo e CH_4 é a porcentagem de metano no biogás.

Tabela 3: Principais resultados e índices de desempenho das Condições 1 a 4

	Condição							
	1		2		3		4	
Parâ-metro	S(75%)/G(25%)/B		S(50%)/G(50%)/B		S(25%)/G(75%)/B		S(25%)/G(75%)/BA	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
COVA	5,3	–	5,3	–	5,3	–	5,4	–
COVR	–	4,9	–	5,0	–	5,1	–	5,1
V_A	1,0 ± 0,1	–	1,0 ± 0,1	–	1,0 ± 0,1	–	1,1 ± 0,1	–
AVT	110 ± 8,7	95 ± 32	87 ± 14	84 ± 29	46 ± 6	51 ± 38	48 ± 3	64 ± 21
AB	764 ± 15	737 ± 38	600 ± 14	653 ± 47	883 ± 156	788 ± 165	1219 ± 36	1242 ± 22
pH	8,2 ± 0,1	7,2 ± 0,2	8,1 ± 0,1	7,1 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,0 ± 0,3	8,3 ± 0,1	7,2 ± 0,1
C_S	5029 ± 164	464 ± 198	5079 ± 214	312 ± 52	5000 ± 242	246 ± 118	4901 ± 120	380 ± 130
ε_{SF}	–	93 ± 3	–	95 ± 1	–	96 ± 2	–	94 ± 2
C_C	3096 ± 296	32 ± 9	2172 ± 232	24 ± 6	990 ± 67	36 ± 19	1012 ± 51	53 ± 19
ε_{CF}	–	99 ± 0	–	99 ± 0	–	98 ± 1	–	97 ± 1
C_G	1049 ± 50	3 ± 1	2177 ± 309	3 ± 1	2959 ± 378	4 ± 1	2526 ± 213	3 ± 1
ε_{GF}	–	100 ± 0	–	100 ± 0	–	100 ± 0	–	100 ± 0
PrM	–	67,3	–	62,2	–	68,0	–	65,8
RMCR	–	15,6	–	13,8	–	16,4	–	17,0
V_{CH4}	–	1452 ± 110	–	1339 ± 98	–	1479 ± 77	–	1461 ± 455
CH_4	–	71	–	72	–	72	–	73

COVA/COVR (gDQO.L^{-1}·d^{-1}); V_A (L); AVT (mgHAc.L^{-1}); AB (mg$CaCO^3$.L^{-1}); pH (u); C_S (mgDQO.L^{-1}); C_C (mgCarboidrato.L^{-1}); C_G (mgGlicerina.L^{-1}); ε_{ST}/ ε_{CT}/ ε_{GF} (%); PrM (molCH_4.m^{-3}.d^{-1}); RMCR (molCH_4·kgDQO^{-1}); V_{CH4} (mL.ciclo^{-1}); CH_4 (%).

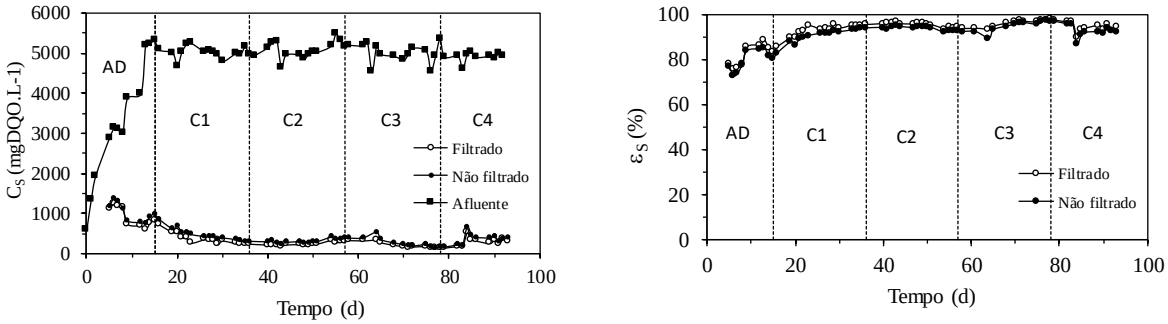


Figura 2: Concentração de matéria orgânica (C_S) no afluente e no efluente e eficiência de remoção (ε_S) na etapa de Adaptação dos microrganismos (AD) e nas Condições 1 a 4 (C1, C2, C3 e C4)

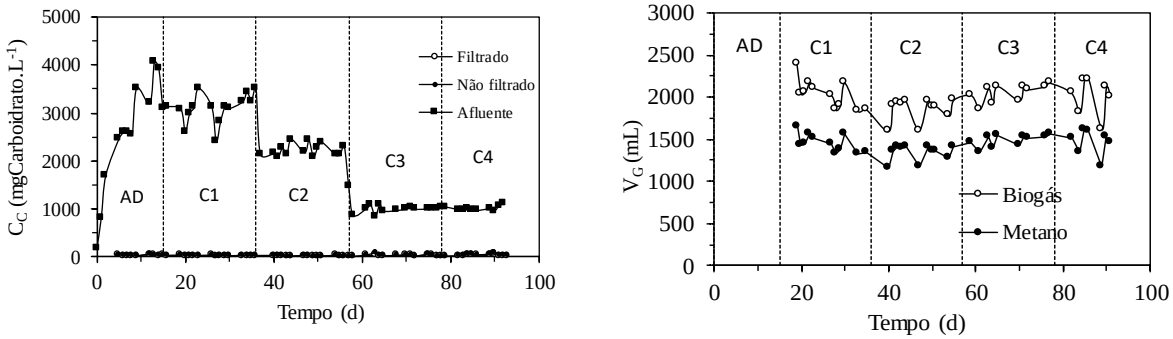


Figura 3: Concentração de carboidratos (C_C) no afluente e no efluente e volume de biogás produzido (V_G) na etapa de Adaptação (AD) e nas Condições 1 a 4 (C1, C2, C3 e C4)

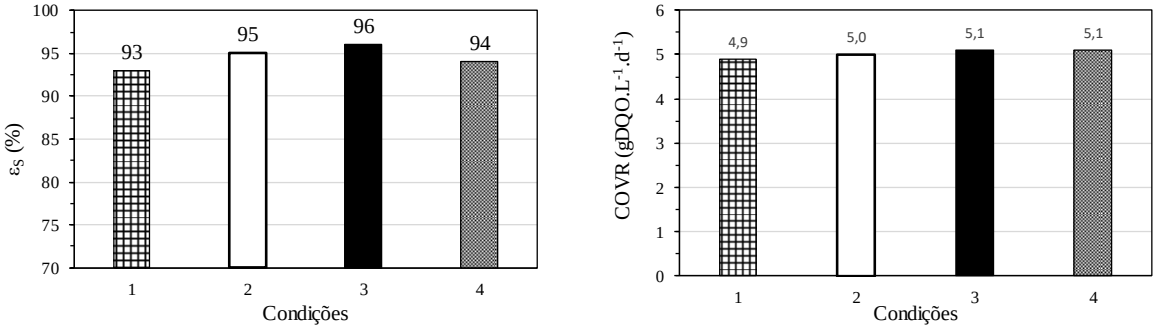


Figura 4: Eficiência de remoção de matéria orgânica para amostras filtradas (ε_S) e carga orgânica volumétrica removida (COVR) nas Condições 1 a 4

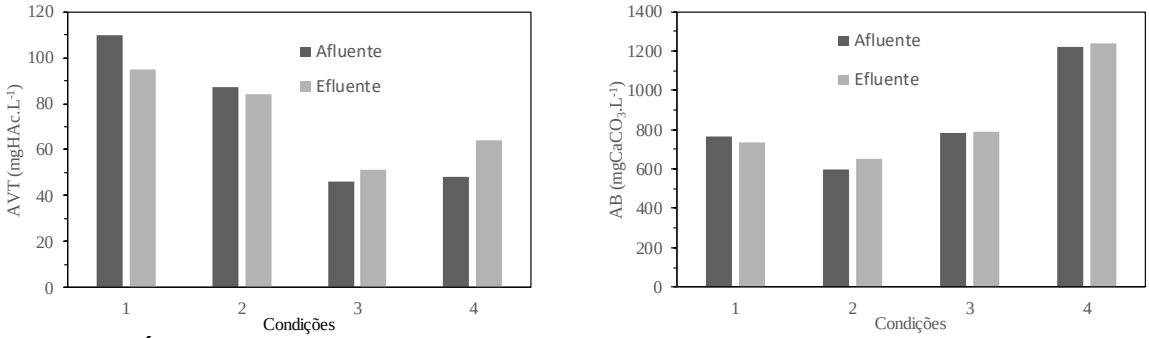


Figura 5: Ácidos voláteis totais (AVT) e alcalinidade à bicarbonato (AB) no afluente e no efluente nas Condições 1 a 4

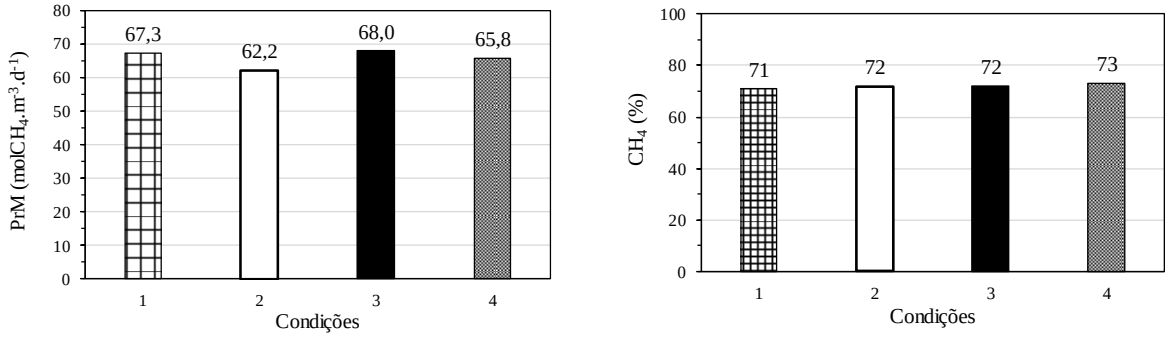


Figura 6: Produtividade em metano (PrM) e porcentagem de metano no biogás (CH_4 %) nas Condições 1 a 4

Analisando os valores de eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 3 e Figuras 2 e 4) verifica-se que o aumento da proporção de glicerol, de 25% para 75%, não implicou em diminuição de eficiência de remoção de matéria orgânica. Os valores foram próximos com pequena vantagem para a Condição 3, na qual obteve-se 96%.

Ainda com relação ao aumento da proporção de glicerol, de 25% para 75%, verifica-se que os menores valores de concentração de ácidos voláteis totais no efluente (Tabela 3 e Figura 5) foram obtidos na Condição 3. Quanto a alcalinidade à bicarbonato (Tabela 3 e Figura 5), os maiores valores foram obtidos na Condição 3. Desta forma não houve acúmulo de ácidos com a aumento da porcentagem de glicerina no afluente.

Os valores de alcalinidade à bicarbonato, no afluente e no efluente, foram um pouco superiores na Condição 3 em relação à Condição 1 (Tabela 3 e Figura 5). A Condição 2 apresentou os menores valores no efluente, porém os valores foram menores no afluente. De uma forma geral, os resultados de concentração de ácidos voláteis e de alcalinidade no efluente indicam um equilíbrio entre geração e consumo dos mesmos.

Os valores experimentais de COVA foram de 5,3 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ e os valores de COVR foram de 4,9; 5,0 e 5,1 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, nas Condições 1, 2 e 3 (Tabela 3 e Figura 4), o que indica uma ótima remoção de matéria orgânica, apresentando um rendimento de 93; 95 e 96%, respectivamente.

Quanto à produtividade em metano (Tabela 3 e Figura 6), verifica-se que o aumento da proporção de glicerol, de 25% para 75%, implicou em queda nos valores para a proporção intermediaria (soro50%/glicerina50%), porém houve aumento da produtividade com o aumento para 75%. O maior valor, de 68,0 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$, foi obtido na Condição 3.

Em relação à produção de metano no biogás, verifica-se que o volume de metano gerado por ciclo na Condição 1 (1452 ± 110 $mL.ciclo^{-1}$) foi similar ao volume gerado na Condição 3 (1479 ± 77 $mL.ciclo^{-1}$), Tabela 3 e Figura 3, com uma pequena diminuição na Condição 2 (1339 ± 98 $mL.ciclo^{-1}$).

Como os resultados das Condições 1, 2 e 3 foram semelhantes, porém com pequena vantagem para a Condição 3, na qual a proporção de glicerol era maior (75%), optou-se, na continuidade do trabalho, por manter os parâmetros operacionais da Condição 3, alterando-se somente a estratégia de alimentação para batelada alimentada (BA).

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que houve uma pequena queda nos valores de eficiência de remoção de 96% (Condição 3) para 94% (Condição 4) (Tabela 3 e Figura 4).

Os valores de concentração de ácidos voláteis no afluente foram próximos, Tabela 3 e Figura 5, enquanto os valores dessa concentração no efluente foram um pouco superiores na Condição 4 (64 ± 21 $mgHAc \cdot L^{-1}$) em relação aos da Condição 3 (51 ± 38 $mgHAc \cdot L^{-1}$).

Os valores de alcalinidade à bicarbonato foram superiores no efluente na Condição 4 (1242 ± 22 $mgCaCO_3 \cdot L^{-1}$) em função dos maiores valores no afluente (1219 ± 36 $mgCaCO_3 \cdot L^{-1}$) (Tabela 3 e Figura 5).

Os valores experimentais de COVA foram de 5,3 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (Condição 3) e 5,4 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (Condição 4) e os valores de COVR foram de 5,1 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, em ambas condições, o que indica uma ótima remoção de matéria orgânica, apresentando rendimentos de 96% e 94%, respectivamente.

Quanto à produtividade em metano verifica-se que a alteração na estratégia de alimentação para batelada alimentada, implicou em uma pequena queda nos valores para 65,8 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ (Tabela 3 e Figura 6).

Em relação à produção de metano no biogás, verifica-se que o volume de metano gerado por ciclo, Tabela 3 e Figura 3, não sofreu alteração com a mudança da estratégia de alimentação para a mesma composição afluente, indicando assim, uma estabilidade do AnSBBR.

Comparando-se as Condições 1, 2 e 3, cuja diferença está relacionada ao aumento da proporção de glicerina no afluente, verifica-se que houve redução na concentração de ácidos voláteis totais no efluente com o aumento na proporção de glicerina (Tabela 3 e Figura 5). Dessa forma, foi possível reduzir a suplementação de alcalinidade ao afluente em cerca de 13%.

Em todas as condições o reator se mostrou eficiente na remoção de carboidratos (Tabela 3 e Figura 3). A remoção de glicerina foi, praticamente total, o que é excelente para o processo (Tabela 3).

A composição do biogás gerado foi de 71 a 73% conforme verifica-se na Tabela 3 e na Figura 6, nas Condições 1 a 4.

O rendimento, entre metano produzido e matéria orgânica removida (RMCR) apresentou tendência de aumento com o aumento da proporção de glicerina para 75% (Tabela 2). O maior valor foi obtido na Condição 4 (17,0 $molCH_4.kgDQO^{-1}$). Considerando a máxima produção teórica de metano por carga removida (1/64 $molCH_4.gDQO^{-1}$, que é igual a 15,6 $molCH_4.kgDQO^{-1}$ ou 350 $mLCH_4.gDQO^{-1}$) verifica-se que foram obtidos valores de rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida maiores que a máxima produção teórica de metano nas Condições 3 e 4. A justificativa para este fato está relacionada ao valor ter sido obtido em relação à concentração de matéria orgânica para amostras filtradas, porém existe a possibilidade de compostos não dissolvidos terem contribuído para a formação de metano.

Conclusões

Os resultados obtidos na codigestão (soro/glicerina) em AnSBBR com agitação mecânica, em condições termofílicas (55^{o}C) permitiu concluir que:

A estratégia de aumento gradual da concentração afluente, soro de leite, e da temperatura, foi eficiente para adaptação dos microrganismos em curto intervalo de tempo.

Para carga orgânica volumétrica aplicada de 5,3 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, o aumento da proporção de glicerina no afluente, de 25% para 50% e para 75% não implicou em queda de desempenho do AnSBBR.

A condição com maior proporção de glicerina (75%) apresentou ligeira vantagem em relação ao desempenho em termos de eficiência de remoção (96%), carga orgânica volumétrica removida (5,1 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$) e produtividade em metano (68 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$).

Houve remoção, praticamente, total de carboidratos e de glicerina.

A alteração da estratégia de alimentação para batelada alimentada, mantendo-se a carga orgânica volumétrica e a proporção de glicerina no afluente em 75%, não implicou em queda de desempenho do biorreator.

Desta forma, estes resultados mostram a flexibilidade do sistema o qual poderá operar em batelada ou batelada alimentada na codigestão de soro/glicerina em condições termofílicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

Albanez, R.; Lovato, G.; Zaiat, M.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D. (2016) Optimization, Metabolic Pathways Modeling and Scale-Up Estimative of an AnSBBR Applied to Biohydrogen Production by Co-Digestion of Vinasse and Molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, **41**, 20473-20484.

Almeida, W.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat, M. (2017) AnSBBR Applied to Biomethane Production Treating Vinasse: Effects of Organic Loading, Feed Strategy and Temperature. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **34**, 759-773.

Bezerra, R.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Canto, C.S.A.; Zaiat, M. (2011) Effect of Organic Load on The Performance and Methane Production of an AnSBBr Treating Effluent from Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**, 347-368.

Bley Jr., C. Biogás- A energia invisível. 2a ed. Revista e Ampliada. São Paulo: CIBiogás: Foz do Iguaçu: ITAIPU Binacional, 2015.

Bondioli, P.; Bella, L.D. (2005) An Alternative Spectrophotometric Method for the Determination of Free Glycerol in Biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 153-157.

Dubois, S.M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.L.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956) Colorimetric Methods for Determination of Sugar and Related Substance. *Analytical Chemistry*, **228**, 13-21.

Ferraz Júnior, A.D.N.; Koyama, M.H.; Araújo Júnior, M.M.; Zaiat, M. (2016) Thermophilic Anaerobic Digestion of Raw Sugarcane Vinasse. *Renewable Energy*, **89**, 245-252.

Lima, D.M.F.; Inoue, R.K.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat, M. (2016) Biohydrogen from Cheese Whey Treatment in an AnSBBR: Achieving Process Stability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33, 871-883.

Lovato, G.; Bezerra, R.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat,M. (2012) Effect of Feed Strategy on Methane Production and Performance of sn AnSBBR Treating Effluent from Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**, 2007-2029.

Lovato, G.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Zaiat, M. (2016) Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **178**, 126-143.

Malajovich, M. A. Biotecnologia 2011. Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT. Rio de Janeiro, 2012.

Nguyen, D.; Gadhamshetty, V.; Nitayavardhana, S.; Khanal, S. K. Automatic process control in anaerobic digestion technology: A critical review. Bioresource Technology, v. 193, p. 513–522, 2015.

Ripley, L.E.; Boyle, W.C.; Converse, J.C. (1986) Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestor of High-Strength Wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **58**, 406-411.

Rivero, M.; Solera, R.; Perez, M. (2014) Anaerobic Mesophilic Co-Digestion of Sewage Sludge with Glycerol: Enhanced Biohydrogen Production. *International Journal Hydrogen Energy*, 39, 2481-2488.

Silva, R.C.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Zaiat, M. (2013) Anaerobic Treatment of Industrial Biodiesel Wastewater by an ASBR for Methane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **170**, 105-118.

Song, Y.C.; Kwon, S.J.; Woo, J.H. (2004) Mesophilic and Thermophilic Temperature Co-Phase Anaerobic Digestion Compared with Single-Stage Mesophilic and Thermophilic Digestion of Sewage Sludge. *Water Research*, **38**, 1653-1662.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995) 19th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Tatara, M.; Yamazawa, A.; Ueno, Y.; Fukui, H.; Goto, M.; Sode, K. (2005) High-rate Thermophilic Methane Fermentation on Short-Chain Fatty Acids in s Down-Flow Anaerobic Packed-Bed Reactor. *Bioprocess Biosystem Engineering*, **27**, 105-113.

Ueno, Y.; Tatara, M.; Fukui H.; Makiuchi, T.; Goto, M.; Sode, K. (2007) Production of Hydrogen and Methane from Organic Solid Wastes by Phase-Separation of Anaerobic Process. *Bioresource Technology*, **98**, 1861-1865.

Yang, Y.; Tsukahara, K.; Sawayama, S. (2008) Biodegradation and Methane Production from Glycerol-Containing Synthetic Wastes With Fixed-Bed Bioreactor Under Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Conditions. *Process Biochemistry*, **43**, 362-367.

Zaiat, M.; Cabral, A.K.A.; Foresti, E. (1994) Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Sludge Reactor for Wastewater Treatment: Conception and Performance Evaluation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **11**, 33-42.

PRODUÇÃO DE BIOCELULOSE UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO

Pedro Victor Maciel Pozzani [1]; Leticia Giuliani Yashiki [1];
José Alberto Domingues Rodrigues [2]; Suzana Maria Ratusznei [2]

[1] Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[2] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Neste trabalho avaliou-se a influência das condições de cultivo na produção de biocelulose por* Gluconacetobacter hansenii *(ATCC 23769) utilizando resíduos agroindustriais. Inicialmente foram realizados cultivos estáticos nos meios: soro de leite (S), melaço (M) e vinhaça/soro (V/S), em batelada (B) e em batelada alimentada (BA), em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios de cultivo. Na operação em batelada alimentada (BA) o período entre alimentações foi de três dias, adicionando-se, de forma não asséptica, substrato sobre as películas formadas. Na sequência, foram realizados cultivos estáticos em meio soro de leite (S) em batelada alimentada (BA), em biorreatores contendo de 640 a 750 mL, nos quais a alimentação foi realizada de forma asséptica. Na Condição S/BA/750 foram efetuadas cinco alimentações de substrato sobre as películas formadas, o que resultou na formação de novas películas. As alimentações foram realizadas próximas às paredes do biorreator o que implicou acúmulo de meio nessa região, fazendo com que parte da película submergisse. Esse cultivo com duração de 30 dias resultou em massa de biocelulose por área disponível para crescimento de 1,59 mg/cm². Na Condição S/BA/640 realizaram-se 8 alimentações, que resultavam na formação de novas películas. A alimentação foi feita próxima ao centro do biorreator o que permitiu uma distribuição mais uniforme do substrato, evitando o acúmulo de líquido e submersão de partes das películas formadas, resultando em menor tempo de crescimento das novas películas. Após 41 dias de cultivo, a massa de biocelulose por área disponível para crescimento foi de 2,31 mg/cm². Comparando-se esses valores com os obtidos para a operação em batelada (0,20 a 1,20 mg/cm²) verifica-se ser possível aumentar de forma significativa a massa de biocelulose na operação com alimentações sucessivas de substrato sobre as películas formadas, devido à melhoria da disponibilidade do substrato aos microrganismos.*

Introdução

Atualmente, existem diversos subprodutos da agroindústria que têm potencial para serem reaproveitados em outros cenários. Segundo Tsouko *et al*. (2015), o potencial apresentado por esses resíduos agroindustriais está relacionado com suas características que os tornam ótimos substratos para os processos biotecnológicos. Assim, em função do grande volume gerado, do conteúdo de matéria orgânica, e de nutrientes tem-se a possibilidade de utilização por vários grupos de microrganismos, os quais os convertem, por diversas rotas metabólicas, em produtos com agregado valor comercial.

Os setores industriais estão cada vez mais focados no desenvolvimento de processos que utilizam recursos renováveis e fornecem produtos competitivos para satisfazer as necessidades do mercado. Um tópico que chama a atenção nesse sentido é a produção de biomateriais. Esses biomateriais são provenientes de sistemas orgânicos vivos, como culturas agrícolas, e fornecem benefícios interessantes, como a adequação ambiental, menores custos de produção, entre outros. Desses biomateriais destaca-se a biocelulose, ou celulose bacteriana, com propriedades estruturais e mecânicas únicas (Al-Abdallah e Dahman, 2013). Esse biomaterial tem ampla utilização em diversos setores industriais: indústrias de alimentos nas embalagens, nos produtos farmacêuticos atuando como curativos para a pele, na área de eletroeletrônicos, fones de ouvido, e como base para compósitos pela inserção de prata,

fosfato, pectina, amido, termoplásticos, ouro em condutividade elétrica, sílica, entre outras aplicações (De Souza e Garcia-Cruz, 2004; Domini *et al*., 2010).

Apesar do seu potencial para aplicações, o alto custo da produção da celulose bacteriana e sua baixa produtividade são as principais desvantagens, o que dificulta a implementação industrial. Recentemente, muitos estudos têm sido realizados buscando o desenvolvimento de meios de fermentação econômicos para sua produção, incentivando a utilização de resíduos e subprodutos industriais, como substrato, podendo melhorar a competitividade do custo da produção da biocelulose. Nesse sentido, os subprodutos/resíduos agroindustriais têm potencial para serem utilizados na produção de biocelulose, dentre os quais se destacam o soro de leite, o melaço e a vinhaça (Tsouko *et al*., 2015).

O soro de leite é produzido durante a coagulação da caseína do leite numa das etapas de produção do queijo. Como é produzido em grandes quantidades (9 kg de soro/kg de queijo) e tem alta carga poluidora (30 a 50 gDBO/L), pode representar um problema ambiental significativo. No entanto, este mantém muitos dos nutrientes do leite, incluindo proteínas funcionais, peptídeos, lipídios, lactose, vitaminas e minerais. Por isso possui vasto potencial em processos biológicos (Guimarães *et al*., 2010).

O melaço é um subproduto da agroindústria açucareira disponível a um custo relativamente baixo. Ele apresenta um ótimo potencial como fonte de carbono para o metabolismo microbiano, devido à presença de grande quantidade de açúcares fermentescíveis e minerais, tais como o manganês, o zinco, o potássio, o sódio, o fósforo, entre outros (Feltrin *et al*., 2000).

A vinhaça é um resíduo da indústria de produção de etanol que também pode ser utilizada como substrato em processos microbiológicos. Sua riqueza nutricional está ligada à origem do mosto (Rossetto, 1987). A sua demanda química de oxigênio (DQO) pode variar de 80-130 g/L dependendo da matéria-prima e do processo produtivo do etanol, sendo gerada na proporção de 12 a 15 litros para cada litro de etanol produzido (Rossetto, 1987).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo utilizar subprodutos/resíduos agroindustriais (soro de leite, melaço e vinhaça) como substratos alternativos visando diminuir os custos de produção de biocelulose. Além disso, verificar a influência da estratégia de alimentação, batelada e batelada alimentada, na produção de biocelulose, por *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769).

Material e Métodos

Equipamentos

A produção de biocelulose foi realizada em: (i) *erlenmeyers*; (ii) biorreator BIOFLO 2000 da "New Brunswick Scientific" com capacidade de 10 L, diâmetro de 20 cm e área superficial de 314 cm², e (iii) biorreator BIOLAFITE da "New Brunswick Scientific" com capacidade de 1,85 L, diâmetro de 12 cm e área superficial de 113 cm².

Inóculo

O inóculo era composto de cultura pura de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769), adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia – SP, e foi preservada em geladeira (4 °C), em tubos de ensaio contendo meio cultura sólido Manitol inclinado.

Meios de Cultivo

O meio Manitol, utilizado para a preservação do *G. hansenii*, era composto de: D-manitol: 25,0 g/L; bacto-peptona: 3,0 g/L; extrato de levedura: 5,0 g/L; ágar: 15,0 g/L.

O meio Hestrin e Schramm (HS) (Hestrin e Schramm, 1954), utilizado no preparo do inóculo e também como meio-padrão para a produção da biocelulose, era composto de

glicose: 20,0 g/L; bacto-peptona: 5,0 g/L; extrato de levedura: 5,0 g/L; ácido cítrico: 1,15,0 g/L e Na_2HPO_4: 2,7 g/L.

Os meios melaço (M), soro de leite (S), vinhaça e soro de leite (V/S) tinham a mesma composição do meio HS, alterando-se somente a fonte de carbono glicose por, respectivamente, melaço, soro de leite, e vinhaça (75 %) e soro de leite (25 %).

Ressalta-se que foi utilizado soro de leite industrial desidratado (ELEGÊ BRASIL FOODS S.A, 2018) com teor de umidade de 2 % com a seguinte composição: proteínas (11%); glicídios (76%); lipídeos (1%) e outros (12%), cuja dissolução foi feita com água de torneira. O melaço e a vinhaça foram provenientes de uma usina de açúcar e álcool, cuja diluição foi feita com água de torneira.

Os meios de cultivo, após seu preparo, foram autoclavados (autoclave modelo Fabre Primar Industrial LTDA-103) por 15 minutos a 121 °C e 1 kgf/cm².

Análises Físico-Químicas

A determinação da concentração de matéria orgânica foi realizada através da demanda química de oxigênio (DQO), de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1995). Na determinação da concentração de carboidratos foi utilizado o método do fenol e ácido sulfúrico (Dubois *et al*., 1956).

Procedimento Experimental

Preparo do Inóculo e Inoculação

O inóculo foi preparado com *G. hansenii* (ATCC 23769) propagado em meio ágar manitol sólido inclinado. Com o auxílio de uma alça de platina, retiraram-se três alçadas de microrganismo, o qual foi transferido para 50 mL de meio HS contido em *erlenmeyer* de 250 mL, sendo cultivado por 24 h a 30 °C e 150 rpm.

Os meios de cultivo contido nos *erlenmeyers* e nos biorreatores foram inoculados, de forma asséptica, respectivamente com 10,0 mL e 200 mL da suspensão de *G. hansenii* pré-cultivado por 24 h a 30 °C e 150 rpm.

Produção de celulose bacteriana

Na Tabela 1 são apresentadas as condições de cultivo estático da celulose bacteriana realizada em batelada (B) e em alimentada (BA) nos meios de cultivo, S, M e V/S, na qual se têm, também, as concentrações iniciais de substrato (C_{S0}), o volume de meio (V_{meio}), o volume de reator (V_{reator}) e tempo total de cultivo (t). O cultivo foi realizado de modo estático, em temperatura ambiente descrito a seguir:

(i) em batelada (B) (Condições S/B/50; M/B/50 e VS/B/50) e em batelada alimentada (BA) (Condições S/BA/50; M/BA/50 e VS/BA/50) em *erlenmeyers* de 250 mL (V_{reator}), com diâmetro de 8 cm e área superficial de 50,27 cm², contendo 50 mL (V_{meio}). Para as condições em batelada alimentada, o volume alimentado (V_A) foi de 3,0 mL e o período entre as alimentações (PEA) foi de três dias;

(ii) em batelada alimentada (BA) em biorreator BIOFLO 2000 de 10 L contendo 750 mL (V_{meio}). O volume alimentado (V_A) foi de 8,75 mL; o período entre as alimentações (PEA), de 4,75 dias e a vazão de alimentação, de 2,0 mL/min (Condição S/BA/750);

(iii) em batelada alimentada (BA) em biorreator BIOLAFITE de 1,85 L contendo 560 mL (V_{meio}). O volume alimentado (V_A) foi de 7,62 mL; o período entre as alimentações (PEA) foi de 4,0 dias e a vazão de alimentação, de 3,65 mL/min (Condição S/BA/640).

Tratamento da Celulose Bacteriana

Após o cultivo, as películas de biocelulose foram removidas do meio e lavadas com água. A seguir, foram imersas em solução de NaOH (0,3 N) por 24 h (Park *et al*., 2003; Jung *et al*., 2005; Shezad *et al*., 2009; Shah *et al*., 2010). Na sequência, foram lavadas novamente

com água, até que todo o NaOH fosse removido e foram secas em estufa por 5 h a 105 °C.

Além disso, após a remoção das películas de biocelulose, amostras do meio de cultivo residual foram retiradas para análise das concentrações de matéria orgânica (na forma de DQO) e de carboidratos.

Tabela 1: Condições do cultivo estático de biocelulose em todas as condições

Condição	Meio	C_{S0} (g/L)	V_A (mL)	PEA (d)	t (d)	Operação	V_{meio}(mL)/ V_{reator}(mL)	Reator
S/B/50	Soro	10	-	-	30	B	50/250	Erlenmeyer
M/B/50	Melaço	40	-	-	30			
VS/B/50	Vinhaça-Soro	20	-	-	30			
S/BA/50	Soro	10	3,0	3	30	BA		
VS/BA/50	Vinhaça-Soro	20	3,0	3	30			
S/BA/750	Soro	10	8,75	2-3-5-9	30		750/10000	BIOFLO 2000
S/BA/640	Soro	10	7,62	2-3-5-6	41		640/1850	BIOLAFITE

Resultados e Discussão

A Tabela 2 e as Figuras 1 e 2 apresentam os resultados de massa de biocelulose (MC) e de massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA) em função: (i) do meio de cultivo, ou seja, soro de leite (S), melaço (M) e vinhaça/soro (VS); (ii) da estratégia de alimentação, ou seja, batelada (B) ou batelada alimentada (BA); (iii) do volume de meio de cultivo, ou seja, 50; 100; 640 ou 750 mL; (iv) do período entre as alimentações (PEA) e (v) do tempo de cultivo (t).

Tabela 2: Massa de biocelulose (MC) e de massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA) para o cultivo realizado em diferentes condições

Condição	MC (g)	MCA (mg/cm²)	PEA (d)	t (d)	Referência
S/B/50	0,03	0,66	-	30	presente trabalho
M/B/50	0,06	1,28	-	30	
VS/B/50	0,04	0,73	-	30	
S/B/100	0,02	0,30	-	20	Daneliczen *et al.*, 2017
S/BA/50	0,09	1,77	1	30	presente trabalho
S/BA/750	0,50	1,59	2-3-5-9	30	
S/BA/640	0,26	2,31	2-3-5-6	41	
VS/BA/50	0,08	1,62	3	30	

A Figura 3(a) e a Figura 3(b) apresentam as películas de biocelulose obtidas na Condição S/BA/750. A Figura 3(c) e a Figura 3(d) apresentam as películas de biocelulose obtidas na Condição S/BA/640 e a Figura 3(e) e a Figura 3(f) apresentam as películas obtidas na Condição S/B/100 (Daneliczen *et al*., 2017).

Comparando-se os valores de massa de biocelulose (MC) e de massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA) para o cultivo em batelada (B) para diferentes meios de cultivo (S, M ou VS) e volume de meio (50 e 100 mL), verifica-se que os valores obtidos foram próximos, com vantagem para a Condição M/B/50, ou seja, meio melaço e

volume de 50 mL. Comparando-se os valores de massa de biocelulose (MC) e de massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA) para o cultivo em batelada (B) para o meio soro de leite (S) e volumes de meio de 50 e 100 mL, verifica-se que os valores obtidos foram próximos, com vantagem para a Condição S/B/50 (presente trabalho) em relação a S/B/100 (Daneliczen *et al.*, 2017). Daneliczen *et al.* (2017) utilizaram *erlenmeyers* de 500 mL (V_{reator}), com diâmetro de 9,5 cm e área superficial de 70,88 cm², contendo 100 mL (V_{meio}) de meio soro de leite (S).

Figura 1: Massa de biocelulose (MC) para o cultivo realizado em diferentes condições

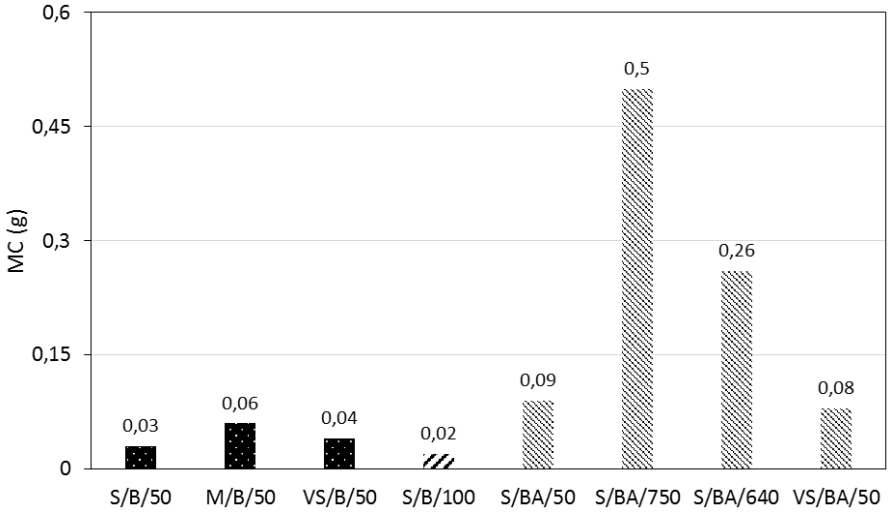
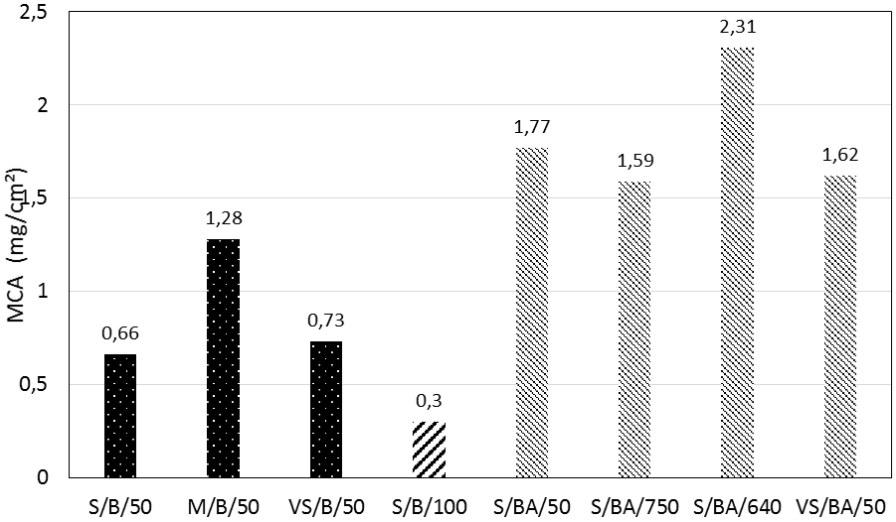


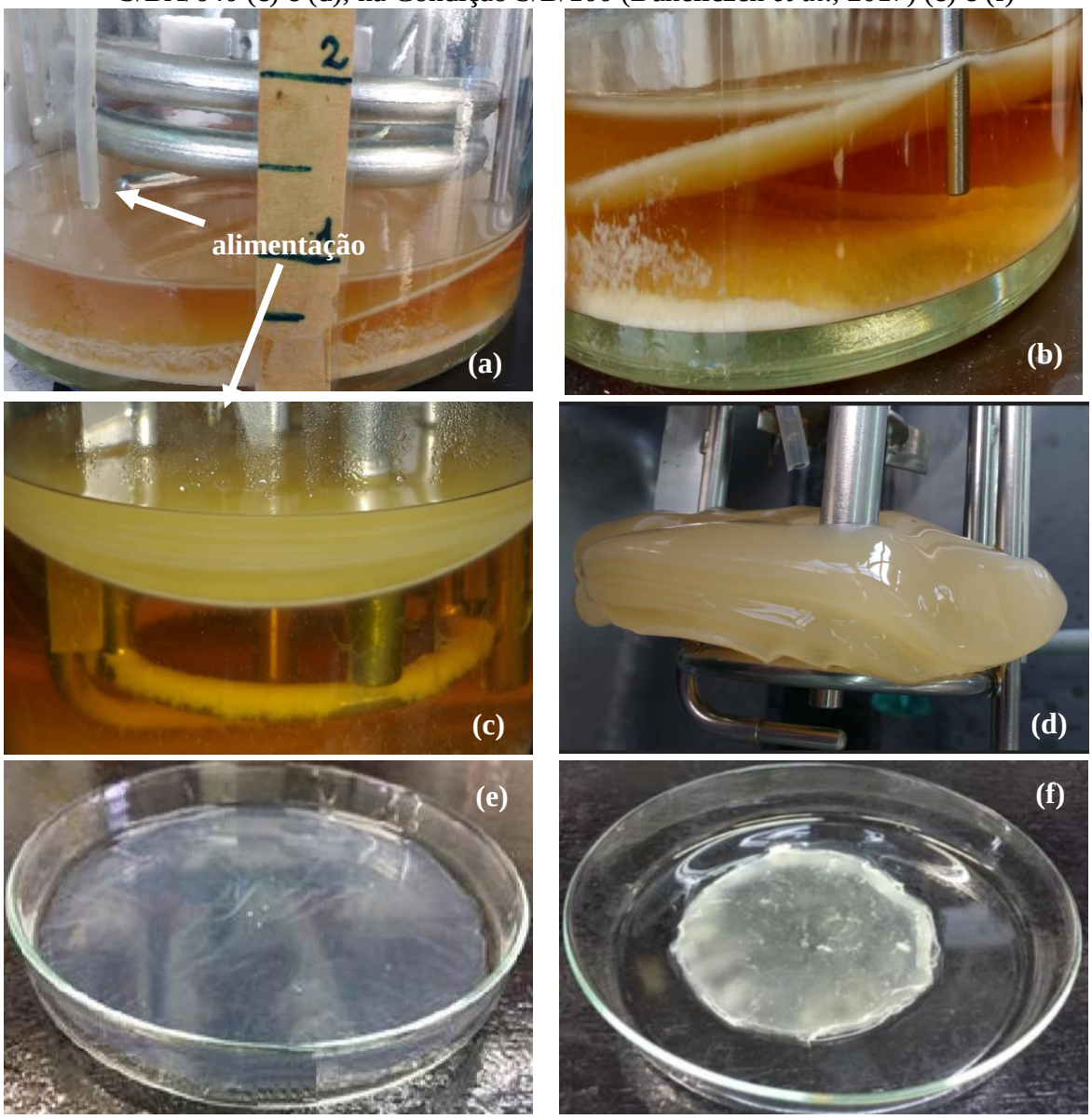
Figura 2: Massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA) para o cultivo realizado em diferentes condições



Comparando-se os valores de massa de biocelulose (MC) para o cultivo em batelada (B) e em batelada alimentada (BA), para diferentes meios de cultivo (S, M ou VS) e volume de meio (50, 100, 640 e 750 mL), verifica-se que o melhor valor obtido foi para a Condição S/BA/750, ou seja, para o meio soro de leite, com volume de 750 mL. Esse melhor resultado foi decorrente de uma área disponível para crescimento maior, ou seja, uma disponibilidade maior de área para contato com o oxigênio para o *G. hansenii*. Além disso, a operação em batelada alimentada possibilitou uma maior disponibilidade de substrato, ao *G. hansenii*, em relação à operação em batelada, na qual era necessária a difusão de substrato pela membrana de biocelulose, para que ele fosse disponibilizado ao microrganismo. Ressalta-se que esses

fatores implicaram a formação de novas películas num tempo reduzido, se comparado à operação em batelada.

Figura 3: Películas de biocelulose obtidas na Condição S/BA/750 (a) e (b); na Condição S/BA/640 (c) e (d); na Condição S/B/100 (Daneliczen *et al*., 2017) (e) e (f)



A massa total de celulose (MC) obtida, após 30 dias de cultivo, foi de 0,4995 g e a massa de celulose por área disponível para o crescimento (MCA), de 1,59 mg/cm^2 (Tabela 2). Essas massas correspondem às massas de várias películas de biocelulose individuais conforme é possível verificar-se nas Figuras 3(a) e 3(b). Comparando-se os valores de massa de biocelulose obtida (0,4995 g) com os valores para os ensaios realizados em batelada (0,01 a 0,06 g), verifica-se que houve um aumento expressivo. Esse aumento é decorrente da maior área disponível para o crescimento, além das sucessivas alimentações de substrato na operação em batelada alimentada, o que favoreceu a formação de novas películas de biocelulose. Enfatiza-se que a alimentação em batelada alimentada foi realizada na superfície da película já formada, o que favoreceu a formação de novas películas em menor tempo, em função da disponibilidade de substrato (Hsieha *et al*., 2016). O substrato disponível deve difundir pela membrana de biocelulose à medida que é formada, para o microrganismo ter acesso àquele. À medida que a espessura da película aumenta, a difusão do substrato é mais

lenta, o que dificulta a formação subsequente de biocelulose, mesmo aumentando-se o tempo de cultivo (Hsieha *et al*., 2016).

Fazendo a mesma análise, porém em relação aos valores de massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA), verifica-se que o melhor valor obtido foi para a Condição S/BA/640, ou seja, para o meio soro de leite com volume de 640 mL. Daneliczen *et al*. (2017) observaram que, no caso do meio soro de leite, a formação da película de biocelulose é função também da área para ancoragem da película. Ou seja, numa área menor há mais pontos para ancoragem. Dessa forma, uma área menor favoreceu a formação de película mais homogênea e menos susceptível à submersão, o que implicou maior valor de massa de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA). A massa total de celulose (MC) obtida, após 41 dias de cultivo, foi de 0,2615 g e a massa de celulose por área disponível para o crescimento (MCA), de 2,31 mg/cm^2 (Tabela 2). Essas massas correspondem às massas de várias películas de biocelulose individuais como se pode verificar nas Figuras 3(c) e 3(d).

Na Condição S/BA/640, a alimentação em batelada alimentada foi realizada na superfície da película já formada, conforme procedimento realizado na Condição S/BA/750. Houve, porém, uma modificação na localização da tubulação que permitia as referidas alimentações. A tubulação foi posicionada no centro do biorreator, conforme se apresenta na Figura 3(c), visando a uma distribuição mais uniforme do substrato, evitando o acúmulo de líquido em determinadas regiões do biorreator o que implicava submersão de partes das primeiras películas formadas na Condição S/BA/750. Esse procedimento foi efetivo, conforme se verifica na Figura 3(c), em que se pode observar as películas formadas sem submersão até a base do biorreator, como no caso da Condição S/BA/750 [Figuras 3(a) e 3(b)]. A alimentação na região central do biorreator implicou menor perturbação nas películas formadas, o que resultou num menor tempo de crescimento das novas películas. O período médio entre as alimentações foi de quatro dias - tempo menor, quando comparado ao da Condição S/BA/750.

Frisa-se que, além de a menor área possibilitar um acesso maior às paredes, a presença das tubulações (necessárias para alimentação, descarga, medidas de temperatura, serpentina para aquecimento e resfriamento) e placas defletoras presentes no biorreator também implicaram maiores pontos para ancoragem das películas, o que contribuiu para a obtenção de maior número delas e, consequentemente, maior massa. Comparando-se os valores obtidos nas condições S/BA/640 e S/BA/750, verifica-se que foram bastante superiores ao obtido por Daneliczen *et al*., 2017. Obteve-se aumento de 2500 % (S/BA/750) e 1300 % (S/BA/640) para as massas de biocelulose (MC) e de 530% (S/BA/750) e 770% (S/BA/640) para as massas de biocelulose por área disponível para crescimento (MCA).

Quanto ao consumo de matéria orgânica e de carboidratos, para os ensaios realizados em *erlenmeyers* (S/B/50; M/B/50; VS/B/50; S/BA/50 e VS/BA/50) não foi possível verificar alterações significativas na concentração final deles, o que poderia indicar um baixo consumo. Deve se levar em consideração, porém, a duração dos ensaios de 30 dias, o que leva a uma perda significativa de água por evaporação e implica alteração na concentração final. Dessa forma, a perda de água dos meios por evaporação impossibilitou a obtenção de valores efetivos de concentração de matéria orgânica e de carboidratos. A Tabela 3 e as Figuras 4 e 5 apresentam os resultados de concentração de matéria orgânica (C_{MO}), de carboidratos (C_C), o tempo de cultivo (t) e o período entre as alimentações (PEA) nas Condições S/BA750 e S/BA/640 nas Etapas I (B), II (BA) e (III) (B).

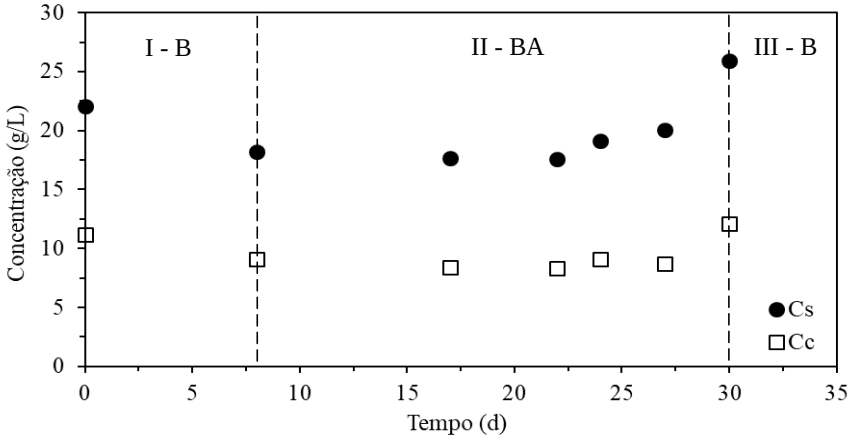
Na Condição S/BA/750, após a inoculação (t = 0 h), só foi possível verificar o início da formação da película no quarto dia de cultivo. Do quarto ao oitavo dia de cultivo, a película tornou-se mais homogênea e espessa, recobrindo toda a superfície do meio de cultivo. Assim, no oitavo dia houve a retirada de amostra para análise da concentração de matéria orgânica e de carboidratos. Após a retirada dessa amostra, houve a primeira alimentação de

substrato em batelada alimentada. O período, desde a inoculação até a primeira alimentação, consistiu na Etapa I, e o sistema foi operado em batelada (B).

Tabela 3: Concentração de matéria orgânica (CMO), de carboidratos (CC), o tempo de cultivo (t) e o período entre as alimentações (PEA) para o cultivo realizado em diferentes condições

Condição									
S/BA/640					S/BA/750				
Etapa	t (d)	PEA (d)	C_S (gDQO/L)	C_C (g/L)	Etapa	t (d)	PEA (d)	C_S (gDQO/L)	C_C (g/L)
I	0	-	18,17	9,78	I	0	-	22,94	12,66
	8	0	21,19	9,92		8	0	18,24	9,06
II	10	2	20,82	9,22	II	17	9	17,65	8,38
	13	3	21,79	9,61		22	5	17,57	8,30
	16	3	20,73	9,82		24	2	19,16	9,10
	22	6	19,09	10,18		27	3	20,05	8,7
	28	6	19,06	9,83		-	-	-	-
	31	3	18,74	9,62		-	-	-	-
	36	5	18,68	9,71		-	-	-	-
III	41	-	17,86	9,36	III	30	-	25,95	12,11

Figura 4: Perfil de concentração de matéria orgânica (C_S) e carboidratos (C_C) para S/BA750

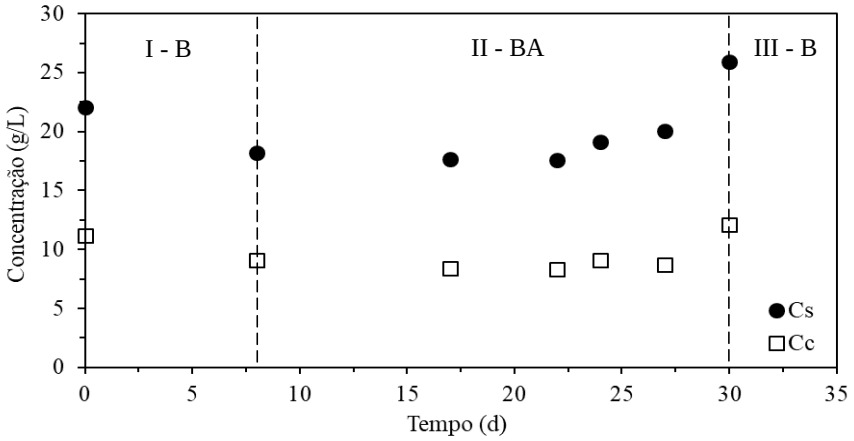


Na Etapa II, o sistema foi operado em batelada (BA). Houve quatro alimentações sucessivas de substrato, as quais foram realizadas à medida que uma nova película era formada. Assim, o período entre as alimentações (PEA) foi de 9, 5, 2 e 3 dias. Antes das alimentações, eram retiradas amostras para análise da concentração de substrato. Nas Figuras 3(a) e 3(B) é possível se verificarem as películas formadas. A Etapa III, realizada em batelada (B), consistiu de três dias e ocorreu em sequência à última alimentação, feita após 27 dias de cultivo. As medidas de concentrações de substrato foram realizadas antes das alimentações, no caso da Etapa II, cuja operação se deu em batelada alimentada (BA).

Na Condição S/BA/640, após a inoculação do meio (t = 0 h), só foi possível verificar o início da formação da película no quarto dia de cultivo. Do quarto ao oitavo dia de cultivo, a película tornou-se mais homogênea e espessa, recobrindo toda a superfície do meio de cultivo. A operação foi análoga à da Condição S/BA/750, com diferença apenas na Etapa II, na qual foram realizadas sete alimentações sucessivas de substrato com período entre as alimentações

(PEA) de 2, 3, 5 e 6 dias. Em sequência à última alimentação, após 36 dias de cultivo, iniciou-se a Etapa III, realizada em batelada (B).

Figura 5: Perfil de concentração de matéria orgânica (C_S) e carboidratos (C_C) para S/BA/640



Ressalta-se que a alimentação realizada na região central do biorreator, implicou menor perturbação nas películas formadas, o que resultou em menor tempo de crescimento das novas películas. O período médio entre as alimentações foi de quatro dias, menor quando comparado ao da Condição S/BA/750. Evidencia-se, também, que as películas formadas eram mais homogêneas, comparadas às obtidas nos ensaios anteriores.

Nas condições S/BA/750 e S/BA/640, nas Etapas I, II e III, a análise do consumo de substrato foi dificultada uma vez que: (i) houve alimentação de substrato; (ii) houve evaporação de água durante o cultivo; (iii) houve retirada de amostras, aproximadamente 4 mL nas duas primeiras alimentações, e 10 mL nas demais e (iv) o sistema não era homogeneizado para não perturbar a película. Dessa forma, todos esses fatores dificultaram a obtenção dos valores efetivos de concentração de substrato. As concentrações de matéria orgânica e de carboidratos não apresentaram variação considerável, já que o consumo de substrato foi baixo.

Conclusões

No estudo da influência das condições de produção de biocelulose, utilizando-se resíduos agroindustriais (melaço, soro de leite e vinhaça), foi possível verificar que se obtiveram os maiores valores de massa de biocelulose para cultivo estático, na operação em batelada alimentada, na qual se conseguiram películas de 0,4995 g e de 0,2615 g para volumes de meio de cultivo de 750 e 640 mL, respectivamente, em meio soro de leite. Esses resultados estão relacionados com uma área maior disponível para o crescimento à maior disponibilidade de substrato, o que favoreceu a formação de novas películas em menor tempo. Dessa forma, verifica-se que foi possível aumentar de forma significativa a massa de biocelulose em relação à obtida na operação em batelada, mostrando que a estratégia de alimentação, além da área disponível para o crescimento, pode impactar consideravelmente a produção da biocelulose.

O melhor valor de massa de biocelulose por área disponível para crescimento foi de 2,31 mg/cm^2, para a condição em batelada alimentada com volume de meio de 640 mL, e meio soro. Nesse caso, houve influência tanto das condições de cultivo quanto da superfície para a ancoragem da película de celulose. O comportamento irregular do crescimento da película foi amenizado no biorreator de menor área pela maior possibilidade de acesso às paredes do biorreator para fixação do biofilme. Com relação ao consumo de substrato, não foi possível se obterem valores efetivos de concentração devido à evaporação durante o cultivo, das retiradas de amostras e da não homogeneidade do sistema por ser estático.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

AL-ABDALLAH, W.; DAHMAN, Y. (2013) Production of green biocellulose nanofibers by Gluconacetobacter xylinus through utilizaing the renewable resources of agriculture residues. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**, 1735-1743.

DANELICZEN, F.; FARIA, G.M.; DA SILVA, L.I.C.; UEDA, L.K. (2017) Produção de Celulose Bacteriana Utilizando Resíduos Agroindustriais. Trabalho de Conclusão de Curso, Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, SP.

DE SOUZA, D.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. (2004) Fermentative production of exocellular polysaccharides by bacteria. *Semina: Ciências Agrárias*, **25**, 331-340.

DONINI, I.A.; DE SALVI, D.T.B.; FUKUMOTO, F.K.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H.S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L (2010) Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química*, **35**, 165-178.

DUBOIS, S.M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.L.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric Methods for Determination of Sugar and Related Substance. *Analytical Chemistry*, **228**, 13-21.

FELTRIN, V.P. *et al.* (2000) Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **43**.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, **28**, 375-384.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. (1954). Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochemistry Journal, **58**, 345-352.

HORNUNG, M.; LUDWIG, M.; SCHMAUDER H.P. (2007) Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture, Part III: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle, *Engeenering Life Science*, **7**, 35-41.

HSIEHA, J.; WANGB, M.; LAIC, J.; LIUA, H. (2016) A Novel Static Cultivation Of Bacterial Cellulose Production By Intermittent Feeding Strategy. *Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **63,** 46-5.

JUNG, J.Y.; PARK, J.K.; CHANG, H.N. (2005) Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 347-354.

PARK, J.K.; PARK, Y.H.; JUNG, J.Y. (2003) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **8**, 83-88.

ROSSETTO, A.J. (1987) Utilização agronômica dos subprodutos e resíduos. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. 435-504.

SHAH, N.; HA, J. H.; PARK, J. K. (2010) Effect of Reactor Surface on Production of Bacterial Cellulose and Water-Soluble Oligosaccharides by *Gluconacetobacter hansenii* PJK. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15**, 110-118.

SHEZAD, O.; KHAN, S.; KHAN, T.; PARK, J.K. (2009) Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. *Korean Journal of chemistry Engineering*, **26**, 1689-1692.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995) 19th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, USA.

TSOUKO, E.; KOURMENTZA, C.; LADAKIS, D.; KOPSAHELIS, N.; MANDALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; PALOUKIS, F.; ALVES, V.; KOUTINAS, A. (2015) Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 14832-14849.

PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELA CO-DIGESTÃO DE VINHAÇA E SORO

Sandro P. Sousa [1]; Suzana Maria Ratusznei [2]; José Alberto D. Rodrigues [2]

[1] Mestrando da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[2] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *O objetivo deste trabalho foi avaliar a codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo para a produção de metano em um reator anaeróbio operado em batelada sequencial com biomassa imobilizada em suporte inerte (AnSBBR) com recirculação da fase líquida (volume reacional de 3 L). O reator foi operado por 186 dias e foi submetido a 9 ensaios, variando os aspectos operacionais de estratégia de alimentação (batelada ou batelada alimenta/batelada), interação entre tempo de ciclo (4, 6 ou 8 h) e concentração afluente (2500, 3750 ou 5000 mg.L^{-1}), carga orgânica volumétrica aplicada (5, 7,5, 10 e 15 g.L^{-1}.d^{-1}) e temperatura (25, 30 e 35ºC). Durante todos os ensaios foram obtidas altas eficiências de remoção de DQO (78-93%) e o pH foi mantido entre 7,4-8,0. O melhor desempenho foi alcançado a uma carga aplicada de 15,27 gDQO.L^{-1}.d^{-1}, tempo de ciclo de 8 horas, operação em batelada alimentada e temperatura de 30 ºC. Nessas condições, o sistema atingiu remoção de DQO solúvel de 89 %, produtividade de metano de 208,5 molCH_4.m^{-3}.d^{-1} (equivalente a 4672 CNTP-mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}), rendimento de metano por DQO removida de 15,76 mmolCH_4.gDQO^{-1} e composição de metano de 72% no biogás.*

Introdução

Durante a produção de etanol, uma grande quantidade de resíduos é gerada, principalmente a vinhaça, uma água residuária com alta carga orgânica, baixo pH, gerada a uma alta temperatura e com grande quantidade de nutrientes (Pant e Adholeya, 2007). No Brasil, a maior parte do etanol produzido é proveniente da cana-de-açúcar, e para cada litro produzido, é gerado em média 13 L de vinhaça (España-Gamboa et al., 2011). As composições de vinhaça encontradas na literatura relatam altas concentrações de ácidos orgânicos, tais como ácido lático, acético, succínico, málico, iso-butírico e propiônico, níveis consideráveis de etanol e carboidratos, além de altas concentrações de nutrientes, como nitrogênio, fósforo, potássio, sulfato, cálcio e magnésio (Fuess et al., 2018; Janke et al., 2016)

A digestão anaeróbia é uma atraente tecnologia de tratamento da vinhaça uma vez que converte grande parte da matéria orgânica a biogás, possibilitando a adequação ambiental do resíduo e a recuperação de energia (Wilkie et al., 2000). Entretanto, a vinhaça pode conter compostos refratários ou nutrientes em quantidades não desejáveis a ponto de inibir a digestão anaeróbia (Mohana et al., 2009). A codigestão é uma boa alternativa para contornar esse cenário e fornecer melhores condições de meio para a produção de metano. A codigestão pode oferecer benefícios como: (i) diluição de substâncias tóxicas; (ii) equilíbrio de nutrientes; (iii) aumento do conteúdo orgânico biodegradável; (iv) e por consequência um maior rendimento de metano (Shah et al., 2015).

Um possível co-substrato para a vinhaça vem a ser o soro de queijo (Lovato et al., 2018). O soro é o maior subproduto da indústria de laticínios, porém nem sempre é reutilizado no processo industrial, sendo descartado como resíduo (Rico et al., 2015). É composto de 5-8% de sólidos, sendo estes formados de 60-80% de lactose, 10-20% de proteínas, sendo o restante vitaminas, gorduras, ácido lático e elementos traço (Rico et al., 2015). Ao ponto de vista da codigestão, sua alta carga orgânica aliado à sua alta biodegradabilidade o tornam um potencial co-substrato para a vinhaça na produção de metano, podendo vir ainda a diluir compostos tóxicos, melhorar sua relação C/N e balancear nutrientes para os microrganismos.

Nesse contexto, esse trabalho pretende analisar a produção de metano em um AnSBBR a partir da codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo. A avaliação é apresentada com base na influência de condições operacionais sobre estabilidade e desempenho do reator quanto à adequação ambiental e produção de metano. O aspectos operacionais avaliados foram: estratégia de alimentação (batelada ou batelada alimenta/batelada), interação entre tempo de ciclo (4, 6 ou 8 h) e concentração afluente (2500, 3750 ou 5000 $mg.L^{-1}$), carga orgânica volumétrica aplicada (5, 7,5, 10 e 15 $g.L^{-1}.d^{-1}$) e temperatura (25, 30 e 35 ºC).

Material e Métodos

Reator e inóculo

O AnSBBR com recirculação da fase líquida utilizado (Figura 1) foi constituído por um frasco de acrílico cilíndrico com 540 mm de altura, 100 mm de diâmetro externo e 3,5 mm de espessura de parede. A parte inferior do reator foi composta por um compartimento de 65 mm de altura destinado a favorecer a distribuição da água residuária e, na parte superior, um compartimento com 70 mm de altura que foi utilizado como câmara coletora de biogás. O sistema de recirculação foi composto por: um reservatório lateral constituído por um frasco de acrílico cilíndrico com 440 mm de altura, 100 mm de diâmetro externo e 3,5 mm de espessura de parede; e uma bomba diafragma marca Prominent®, modelo Concept/0223 (com capacidade de até 23 $L.h^{-1}$), sendo utilizada vazão de recirculação de 20 $L.h^{-1}$ (velocidade de recirculação de 0,2 $cm.s^{-1}$).

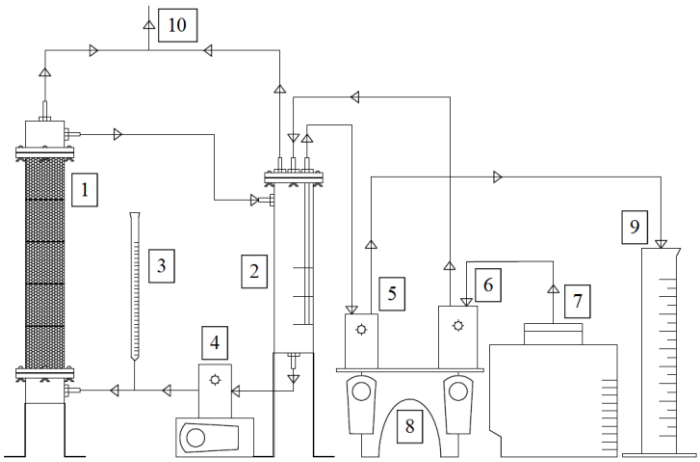


Figura 1: Esquema do AnSBBR com recirculação de fase líquida

[Notação: 1 – reator contendo biomassa imobilizada; 2 – reservatório lateral; 3 – medidor de vazão; 4 – bomba de recirculação; 5 – bomba de descarga; 6 – bomba de alimentação; 7 – reservatório de água residuária; 8 – unidades de controle; 9 - Proveta de coleta do efluente; 10 – saída do biogás]

Uma unidade de controle foi utilizada para automatizar as operações de carga, descarga e recirculação. A alimentação e descarga foram realizadas por bombas tipo diafragma marca Prominent®, modelos Beta/5 (com capacidade de até 30 $L.h^{-1}$ para a operação e batelada) ou Beta/4 (com capacidade de até 2,1 $L.h^{-1}$ para a batelada alimentada), e Concept/0223 (com capacidade de até 23 $L.h^{-1}$), respectivamente, auxiliadas por um sistema de automação composto por temporizadores marca Coel®, modelo RTST/20. Um tubo graduado de 50 mL foi interligado ao sistema de recirculação para medidas da vazão de recirculação.

O reator foi mantido em uma câmara mantida a 30±1ºC, na qual a manutenção da temperatura foi realizada por um sistema composto de sensor, controlador (Novus®, modelo N480), ventilador e resistência elétrica.

O suporte de imobilização da biomassa utilizado foi espuma de poliuretano na forma de cubos de 0,5 cm de lado, com densidade aparente de 23 $kg.m^{-3}$ e porosidade próxima a 95% (produzida pela empresa Edmil Indústria e Comércio – Elói Mendes, MG) confeccionada sem adição de corante. As espumas foram acondicionadas entre telas de aço Inox – 314, revestidas na parte superior por telas de PVC, dividindo a altura de 540 mm do reator em 5 estágios para evitar a compactação do leito e a passagem das partículas de suporte entre os estágios.

O inóculo utilizado nos experimentos foi coletado de um reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando água residuária de um abatedouro de aves (Dacar Industrial S.A.), sediado em Tietê, SP. O inóculo apresentou uma concentração de sólidos totais (ST) e de sólidos voláteis totais (SVT) de 62 e 51 $g.L^{-1}$, respectivamente. O lodo foi imobilizado nas partículas de espuma de poliuretano, conforme metodologia proposta por Zaiat et al. (1994). O volume de lodo mais suporte utilizado foi de 2 L, deixando o reator com um volume de meio de 3 L (1,5 L no reator e 1,5 L no reservatório lateral).

Água residuária

A água residuária alimentada no AnSBBR para produção de metano foi formulada a base de vinhaça e soro, com uma respectiva composição de 75 e 25% com relação à concentração de DQO da mistura. A vinhaça foi obtida da Usina Furlan, produtora de etanol e açúcar, em Santa Barbara, SP, Brasil e apresentou DQO média de 25,15 $g.L^{-1}$. A vinhaça foi estocada em refrigerador e diluída em água de torneira conforme concentração desejada por condição experimental. O soro utilizado foi na forma desidratada em pó (0,9 $gDQO.g^{-1}$ e composição de 73% carboidratos, 11 % proteínas, 2% gordura, minerais 9%, umidade 5%) com a dissolução em água de torneira conforme concentração desejada por condição experimental. O meio de alimentação foi suplementado com bicarbonato de sódio a 1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$, sendo essa razão posteriormente reduzida em função dos resultados.

Análises físico-químicas

A performance do reator foi monitorada por análises de amostras afluentes e efluentes. Foram realizadas análises de DQO total (C_{ST}) e solúvel (C_{SF}), sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SVT), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) e pH, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 1995), carboidratos totais (DuBois et al., 1956), alcalinidade total (AT), alcalinidade à bicarbonato (AB) (Ripley et al., 1986) e ácidos voláteis totais (AVT) (DiLallo e Albertson, 1961), além da medição do volume de meio alimentado/descarregado. Esses parâmetros foram monitorados com uma frequência de cinco vezes por semana, exceto os sólidos, duas vezes por semana. Ao final de cada ensaio, a biomassa do reator (M_{SVT}) foi estimada conforme o método abordado por Lovato et al. (2016).

Os compostos intermediários do metabolismo anaeróbio (ácido acético, propiônico e butírico) foram analisados por cromatografia em fase gasosa, pelo método *head-space*, utilizando um cromatógrafo Agilent Technologies® modelo 7890 GC System, equipado com detector de ionização de chama. A composição do biogás formado pelo metabolismo anaeróbio foi analisada por cromatografia em fase gasosa utilizando-se um cromatógrafo Agilent Technologies® modelo 7890 GC System equipado com detector de condutividade térmica. O volume produzido foi aferido por meio de medidor de gás Rittter modelo MilligasCounter.

Procedimento experimental da operação do reator

O AnSBBR foi operado por 186 dias, sendo esse período dividido em nove ensaios (Tabela 1). No primeiro ciclo foram alimentados 3,0 L de meio ao sistema em 20 min. Após o término da alimentação, a vazão de recirculação foi ligada. No final do ciclo a recirculação foi desligada e foram descarregados 1,0 L de meio em 10 min, sendo que 2,0 L de volume

residual foram mantidos no sistema (1,5 L no reator e 0,5 L no reservatório). Logo após essa descarga, um novo ciclo teve início com a alimentação de 1,0 L de meio. No ensaio em batelada, a recirculação era iniciada somente após a alimentação e nos demais ensaios, em batelada alimentada, a recirculação era iniciada simultaneamente com a alimentação. Ao final de cada ciclo a recirculação era desligada e eram descarregados novamente 1.0 L de meio em 10 min. Logo após essa descarga, um novo ciclo era iniciado, com a alimentação de 1.0 L de meio, igual ao volume descarregado, caracterizando as bateladas ou as bateladas alimentadas sequenciais. Uma vez que as variáveis monitoradas apresentaram valores aproximadamente constantes, foi considerado que o sistema atingiu estabilidade e foram obtidos os perfis ao longo de um ciclo de operação dessas variáveis.

Tabela 1: Resumo das condições experimentais

Ensaios	Operação	C_{ST} ($mgDQO.L^{-1}$)	t_C (h)	t_F (min)	COVA ($gDQO.L^{-1}.d^{-1}$)	T (°C)	Período (d)
1	B	5000	8,0	10	5,0	30	19
2	BA	5000	8,0	240	5,0	30	20
3	BA	3750	6,0	180	5,0	30	21
4	BA	2500	4,0	120	5,0	30	21
5	BA	7500	8,0	240	7,5	30	19
6	BA	10000	8,0	240	10,0	30	23
7	BA	15000	8,0	240	15,0	30	20
8	BA	15000	8,0	240	15,0	25	25
9	BA	15000	8,0	240	15,0	35	18

B = Batelada; BA = Batelada alimentada; t_c = tempo de ciclo; t_f = tempo de alimentação

Resultados e Discussão

Influência da estratégia de alimentação (Ensaios 1 e 2)

A estratégia de alimentação não apresentou forte influência sobre o processo. Ambos os ensaios 1 (batelada) e 2 (batelada alimentada) apresentaram resultados similares de desempenho, tanto no que tange à adequação ambiental quanto à recuperação de energia na forma de metano (Tabela 2). Os Ensaios 1 e 2 apresentaram remoção de DQO total, 92 e 90%, e solúvel, 93 e 92%, respectivamente. Apesar da variação do pH afluente, devido à redução da relação $NaHCO_3$/DQO (Figura 2), o pH efluente se manteve próximo a 8 em ambos os ensaios, se mantendo dessa forma sob a faixa ideal para microrganismos metanogênicos, 6,5-8,2 (Speece, 1996). A redução do bicarbonato afluente reduziu também a alcalinidade a bicarbonato no efluente, mas não a ponto de desestabilizar o sistema, visto que a quantidade de ácidos presente no efluente se manteve similar para ambos os casos, 58 e 72 $mgHac.L^{-1}$, para os Ensaios 1 e 2, respectivamente. O aumento do tempo de alimentação resultou na diminuição dos ácidos intermediários no efluente, tal que o mesmo vale para o pico desses ácidos durante o ciclo.

Apesar da pior composição de metano no biogás do Ensaio 1, a melhor remoção de DQO aliada ao melhor rendimento de metano, acarretou em uma ligeira maior produtividade. Desse modo, os Ensaios 1 e 2 apresentaram, respectivamente, rendimentos de metano de 10,56 e 10,52 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$, composições de metano no biogás de 77,9 e 80,2%, e produtividades de 49,9 e 49,3 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$.

Visto que a ideia de se utilizar um maior tempo de alimentação se justifica no amortecimento de altas cargas orgânicas afluentes e de elevadas concentrações de compostos tóxicos e inibidores (Bagley e Brodkorb, 1999), os resultados similares sugerem, portanto, que a relação de quantidade de substrato por microrganismos (F/M), presente nos momentos

iniciais do ciclo da condição em batelada, não foi agravante a ponto de inibir os microrganismos metanogênicos, via acúmulo de ácidos gerados durante o ciclo de 8 horas. É importante ressaltar que essa inferência refere-se a uma carga de 5 $g.L^{-1}.d^{-1}$, podendo o resultado ser diferente com o aumento da carga, e consequente aumento dos ácidos, assim como é destacado por Bezerra et al. (2009). Em função dessa possível tendência, a operação das outras condições foi adotada como batelada alimentada.

Tabela 2: Parâmetros de performance para os Ensaios 1, 2, 3 e 4

Parâmetro	Unidade	1	2	3	4
COVA	($gDQO.L^{-1}.d^{-1}$)	5,13	5,15	4,96	5,05
COVR	($gDQO.L^{-1}.d^{-1}$)	4,72	4,69	4,51	4,41
C_{ST}	($mgDQO.L^{-1}$)	5043 ± 399	5090 ± 262	3722 ± 123	2544 ± 99
ε_{ST}	(%)	92 ± 1,0	91 ± 0,6	91 ± 0,8	88 ± 1,1
ε_{SF}	(%)	93 ± 0,9	92 ± 0,5	92 ± 0,6	91 ± 0,9
ε_{CT}	(%)	97 ± 0,3	97 ± 0,3	97 ± 0,4	96 ± 0,3
pH_{Afl}		7,3 ± 0,2	6,3 ± 0,2	6,2 ± 0,4	6,5 ± 0,2
pH_{Efl}		8,0 ± 0,2	7,8 ± 0,2	8,0 ± 0,2	7,4 ± 0,2
AB_{Afl}	($mgCaCO_3.L^{-1}$)	165 ± 57	0 ± 0	2 ± 5	21 ± 10
AB_{Efl}	($mgCaCO_3.L^{-1}$)	1698 ± 67	1093 ± 36	1004 ± 101	747 ± 56
AVT_{Afl}	($mgHAc.L^{-1}$)	936 ± 41	877 ± 86	746 ± 32	484 ± 28
AVT_{Efl}	($mgHAc.L^{-1}$)	58 ± 18	72 ± 21	68 ± 28	46 ± 19
EtOH	($mmol.L^{-1}$)	0,00	0,00	0,00	0,00
HAc	($mmol.L^{-1}$)	1,65	0,95	0,64	0,38
HPr	($mmol.L^{-1}$)	1,04	0,26	0,21	0,14
HBut	($mmol.L^{-1}$)	0,36	0,12	0,08	0,06
SVT	($mg.L^{-1}$)	1681 ± 262	1495 ± 228	1115 ± 86	1072 ± 148
SSV	($mg.L^{-1}$)	82 ± 62	57 ± 17	76 ± 53	60 ± 11
M_{SVT}	(g)	96	96	97	107
V_{CH4}	($mLCH_4.ciclo^{-1}$)	1128 ± 61	1112 ± 102	716 ± 122	422 ± 108
PrM	($molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$)	49,9	49,3	42,6	37,8
PrME	($molCH_4.kgSVT^{-1}.d^{-1}$)	1,57	1,55	1,32	1,05
RMCA	($mmolCH_4.gDQO^{-1}$)	9,73	9,57	8,59	7,49
RMCR	($mmolCH_4.gDQO^{-1}$)	10,56	10,52	9,45	8,56
$\%CH_4$	(%)	77,9 ± 0,2	80,2 ± 0,3	79,4 ± 0,3	77,1 ± 0,1

Influência da concentração afluente e tempo de ciclo (Ensaios 2, 3 e 4)

A redução da relação entre o tempo de ciclo e concentração afluente não apresentou resultados intensos no que tange à adequação ambiental, porém reduziu os parâmetros de desempenho de produção de metano (Tabela 2). A redução da relação do Ensaio 2 (8 horas de ciclo) para o Ensaio 3 (6 horas de ciclo) forneceu resultados iguais de eficiência de remoção de DQO total e solúvel com valores de, respectivamente, 91 e 92%. A redução seguinte da relação no Ensaio 4 (4 horas de ciclo) reduziu essas eficiências, respectivamente, para 88 e 91%. O ciclo de 6 horas apresentou um pequeno aumento do pH efluente, para o valor 8.0, porém esse fato foi atribuído ao leve aumento da relação $NaHCO_3$/DQO (Figura 2). O ensaio com ciclo de 4 horas, por outro lado, apesar da maior proporção de alcalinizante, utilizada por todo o período do ensaio, apresentou queda do pH para o valor de 7,4. Em função da menor concentração de substrato afluente, os ensaios com menores concentrações afluentes proporcionaram também menores concentrações efluentes de ácidos intermediários.

A composição de metano no biogás no Ensaio 2 foi de 80,2%, porém caiu para 79,4% nos ciclos de 6 horas, e para 77,1% nos ciclos de 4 horas. Similarmente os rendimentos de metano também decresceram, respectivamente, de 10,52 para 9,45 e posteriormente para 8,56 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$. Deste modo a produtividade também decresceu com a diminuição dos tempos de ciclo e concentrações afluentes, para valores de 49,3, 42,6 e 37,8 $molCH_4.d^{-1}$.

Os resultados indicam, portanto, que nos tempos de ciclos menores, mesmo que mantendo menores proporções de concentrações afluentes, os microrganismos metanogênicos não foram favorecidos. O mesmo padrão foi observado por Lovato *et al*. (2017) na codigestão de soro e glicerina para a produção de metano.

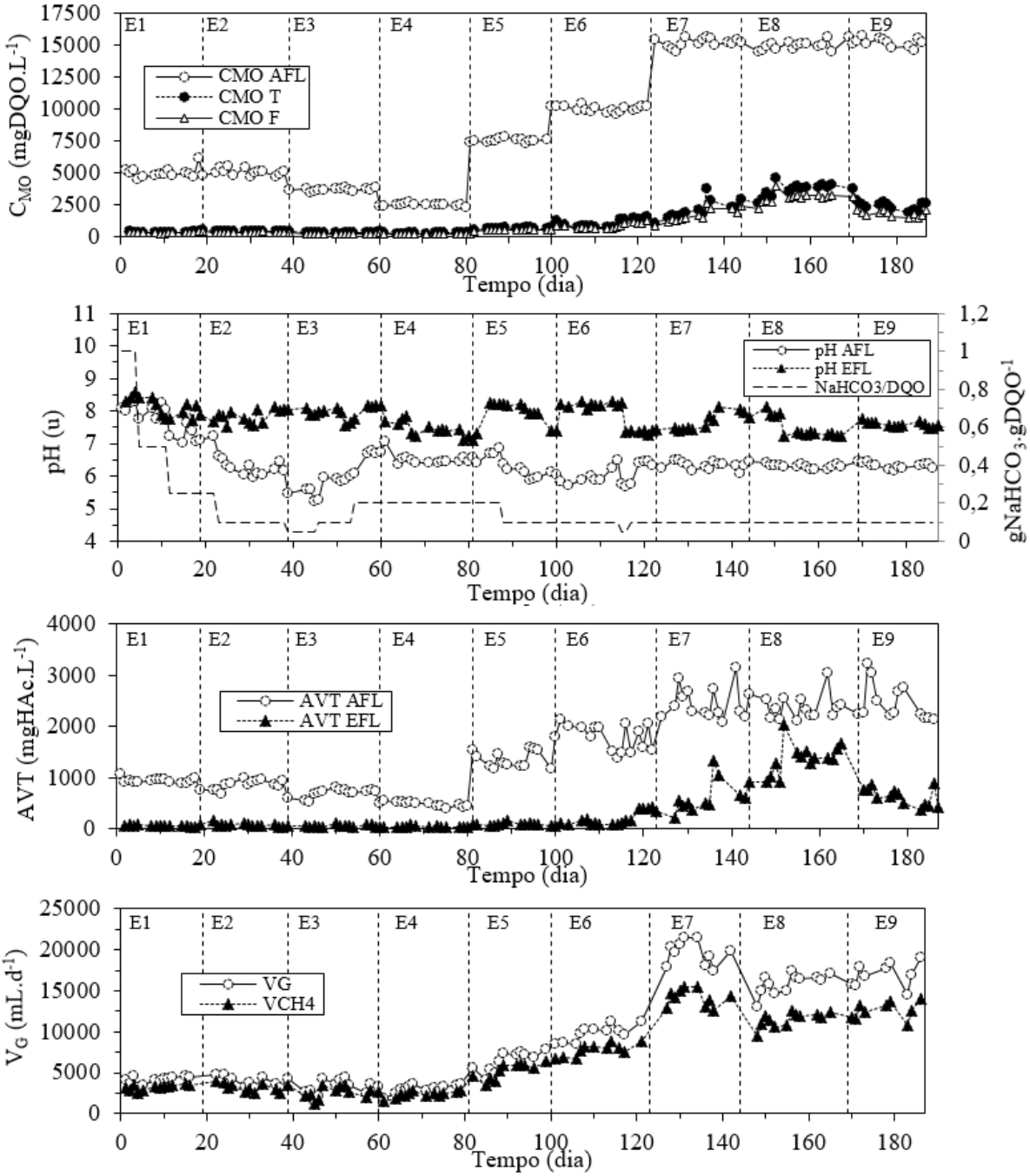


Figura 2: Monitoramento dos dados de DQO, pH, AVT e biogás.

Influência da carga orgânica (Ensaios 2, 5, 6 e 7)

O aumento da carga orgânica, apesar de reduzir aspectos de remoção de DQO, se mostrou benéfica para os parâmetros de produção de metano (Tabela 3). O aumento da carga de 5 para 7,5 gDQO.L^{-1}.d^{-1} não resultou em alteração significativa da eficiência de remoção de DQO total e solúvel, de modo que os Ensaios 2 e 5 apresentaram valores iguais, de 91 e 92%, respectivamente. O aumento para 10 e para 15 gDQO.L^{-1}.d^{-1}, no entanto, apresentou uma pequena redução desses parâmetros de modo que o Ensaio 6 apresentou eficiência de remoção total e solúvel de 89 e 91% e o Ensaio 7, de 87 e 89%, respectivamente. Apesar do

aumento da carga, o pH efluente apresentou baixa variação, se mantendo próximo a 7,9. O aumento da carga, e consequente menor diluição da vinhaça no afluente, resultou em maior entrada de sólidos no reator, levando a um pequeno acúmulo de SVT dentro do reator (Tabela 3). O aumento da carga resultou no aumento da alcalinidade a bicarbonato do meio, tal que os Ensaios 2, 5, 6 e 7 apresentaram valores de 1093, 1665, 1996 e 2855 $mgCaCO_3.L^{-1}$, respectivamente, no entanto, também ocorreu aumento dos ácidos no efluente com valores médios de 72, 95, 199 e 515 $mgHAc.L^{-1}$. O mesmo padrão de redução da eficiência de remoção de DQO conforme o aumento da carga também foi relatado por Bezerra et al. (2009)

Tabela 3: Parâmetros de performance para os Ensaios 5, 6, 7, 8 e 9

Parâmetro	Unidade	5	6	7	8	9
COVA	$(gDQO.L^{-1}.d^{-1})$	7,69	10,14	15,27	14,89	14,82
COVR	$(gDQO.L^{-1}.d^{-1})$	6,96	9,02	13,22	10,99	12,45
C_{ST}	$(mgDQO.L^{-1})$	7572 ± 124	10043 ± 238	15213 ± 316	15006 ± 342	15262 ± 320
ε_{ST}	(%)	91 ± 0,7	89 ± 3,0	87 ± 2,4	74 ± 5,4	84 ± 1,8
ε_{SF}	(%)	92 ± 0,6	91 ± 1,9	89 ± 2,1	78 ± 4,4	88 ± 1,5
ε_{CT}	(%)	97 ± 0,2	97 ± 0,8	97 ± 0,6	94 ± 1,2	95 ± 0,9
pH_{Afl}		6,1 ± 0,2	6,1 ± 0,3	6,3 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,3 ± 0,1
pH_{Efl}		7,9 ± 0,3	7,9 ± 0,4	7,6 ± 0,3	7,5 ± 0,4	7,6 ± 0,1
AB_{Afl}	$(mgCaCO_3.L^{-1})$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	35 ± 0	0 ± 0
AB_{Efl}	$(mgCaCO_3.L^{-1})$	1665 ± 98	1996 ± 303	2855 ± 121	2075 ± 423	2927 ± 150
AVT_{Afl}	$(mgHAc.L^{-1})$	1355 ± 177	1842 ± 314	2472 ± 323	2382 ± 191	2458 ± 365
AVT_{Efl}	$(mgHAc.L^{-1})$	95 ± 28	199 ± 131	515 ± 91	1426 ± 335	576 ± 164
EtOH	$(mmol.L^{-1})$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HAc	$(mmol.L^{-1})$	1,04	2,19	4,79	9,67	4,15
HPr	$(mmol.L^{-1})$	0,32	0,68	1,83	3,53	1,77
HBut	$(mmol.L^{-1})$	0,15	0,30	0,60	1,19	0,50
SVT	$(mg.L^{-1})$	1407 ± 26	1638 ± 103	2367 ± 239	3309 ± 182	3032 ± 327
SSV	$(mg.L^{-1})$	88 ± 16	177 ± 164	220 ± 88	483 ± 198	442 ± 182
M_{SVT}	(g)	123	124	130	134	115
V_{CH4}	$(mLCH_4.ciclo^{-1})$	1944 ± 117	2756 ± 138	4682 ± 346	3939 ± 313	4272 ± 366
PrM	$(molCH_4.m^{-3}.d^{-1})$	86,1	122,4	208,5	176,4	193,4
PrME	$(molCH_4.kgSVT^{-1}.d^{-1})$	2,11	2,96	4,81	3,94	4,98
RMCA	$(mmolCH_4.gDQO^{-1})$	11,19	12,07	13,65	11,84	13,05
RMCR	$(mmolCH_4.gDQO^{-1})$	12,36	13,57	15,76	16,05	15,53
$\%CH_4$	(%)	81,1 ± 0,2	78,9 ± 1,0	72,0 ± 0,7	72,2 ± 0,4	74,1 ± 0,4

O aumento da carga se mostrou benéfico não apenas com relação à produção diária de metano (Figura 2), o que já era de se esperar devido ao aumento do substrato, mas também com relação à eficiência de conversão do processo. Os Ensaios 2, 5, 6 e 7 apresentaram rendimentos de 10,52, 12,36, 13,57 e 15,76 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$, respectivamente. O discreto acréscimo do rendimento do Ensaio 7 com relação ao valor teórico de 15,63 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$, foi creditado à provável conversão de uma pequena parcela de sólidos retidos no reator, apesar das lavagens ao meio e final/início de cada ensaio. Os maiores rendimentos dos ensaios com maiores cargas acarretaram em melhores produtividades, de modo que os Ensaios 5, 6 e 7 apresentaram produtividades de 86,1, 122,4 e 208,5 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$, respectivamente.

Efeitos similares foram observados por Albanez et al. (2016), que observaram o aumento da carga de 1.18 a 5.54 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$ no tratamento de vinhaça em um AnSBBR a 30ºC. Os melhores resultados foram produtividade de metano de 43.43 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$, valor similar ao encontrado neste trabalho para o Ensaio 2 (carga de 5 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$). No entanto o melhor rendimento foi encontrado à carga de 4.41 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$. Padrão similar foi relatado por Almeida et al. (2017). Os autores analisaram o aumento da carga, de 1.09 a 10.07 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$, na digestão da vinhaça em um AnSBBR operado a 30 ºC. A maior

produtividade (123 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$) foi relatada na maior carga testada, porém o melhor rendimento e composição de metano no biogás foram encontrados a uma carga de 8.18 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$. Siqueira et al. (2013) também verificaram a influência do aumento da carga, de 3.33 a 26.19 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$, na digestão da vinhaça em um reator anaeróbio de leito fluidizado (AFBR) operado a 30 ºC. Apesar da carga de 19.87 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$ ter apresentado a melhor eficiência de remoção de matéria orgânica, a maior carga testada apresentou a melhor produtividade de metano (5.37 $m^3CH_4.m^{-3}.d^{-1}$). Nesse cenário é possível inferir, portanto, que apesar do aumento da carga aumentar a produção de biogás, devido ao aumento do substrato, há um limite em que aumento da carga além dessa capacidade do reator, tende a diminuir o rendimento do processo e, apesar da queda do rendimento possa, inicialmente, ser compensada pelo aumento da produtividade, é provável que em certo ponto a produtividade também comece a cair, atingido um ponto ótimo de produção de metano.

Influência da temperatura (Ensaios 7, 8 e 9)

A redução da temperatura de 30 para 25 ºC resultou em uma queda da eficiência de remoção de DQO próxima a 10%. O aumento para 35 ºC não resultou em uma queda tão brusca, tal que para as temperaturas de 30, 25 e 35 ºC as eficiências de remoção de DQO total foram de 87, 74 e 84%, e de 89, 78 e 88 %, para DQO solúvel, respectivamente. A variação da temperatura apresentou pouco efeito sobre pH efluente, o qual apresentou valores médios de 7,7, 7,5 e 7,6, para as temperaturas de 30, 25 e 25 ºC, respectivamente. A redução da temperatura de 30 para 25 ºC resultou no aumento dos ácidos voláteis totais no efluente, 1426 $mgHAc.L^{-1}$, quase três vezes o valor apresentado a 30 ºC. Por outro lado, o aumento de 25 para 35 ºC, retornou valores similares de alcalinidade e ácidos apresentados a 30 ºC, alcançando ainda em uma média ligeiramente menor de ácidos (576 $mgHAc.L^{-1}$) e maior de alcalinidade a bicarbonato (2927 $mgCaCO_3.L^{-1}$) do que as observadas a 30 ºC. A variação da temperatura resultou no aumento de sólidos suspensos voláteis no efluente do reator (Tabela 3), quase o dobro do valor apresentado a 30 ºC, sugerindo um pequeno carreamento da biomassa do reator.

A operação a 25 ºC não afetou a composição de metano no biogás, a qual se manteve em 72%, no entanto, devido à menor carga removida, a produtividade foi reduzida para 176,4 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$. O rendimento de metano, 16,05 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$, ficou acima do valor teórico, o que destaca o acúmulo de sólidos apresentado durante o aumento da carga, e retidos no reator, tal que acarretou na conversão de parte desses sólidos e, também, neste caso, da biomassa desprendida devido à mudança de temperatura. Por outro lado, o aumento da temperatura para 35 ºC aumentou a composição de metano no biogás para 74% e retornou valores de rendimento (15,53 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$) e de produtividade (193,4 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$) de metano, próximos aos valores encontrados a 30 ºC (15,76 $mmolCH_4.gDQO^{-1}$ e 208,5 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$).

Kalyuzhnyi et al. (1997) analisaram o tratamento de soro em reator UASB para as temperaturas de 35 e 20-30 ºC. Para 35 ºC foram obtidas eficiências de remoção de matéria orgânica de 95 a 99% para cargas de 1 a 28.5 $gCOD.L^{-1}.d^{-1}$, enquanto que para 20-30 ºC foram obtidas eficiências de 90 a 94%. Padrão similar foi reportado por Bergland et al. (2015) que analisaram o efeito da variação da temperatura (25, 30 e 35 ºC) na digestão anaeróbia de esterco de vaca. Foram relatadas melhores velocidades de produção de metano para a operação em 35 ºC, em seguida para 30 ºC, equivalente a 92% da produção a 35 ºC, e por último para 25 ºC, equivalente a 77% da produção a 35 ºC. Os resultados relatados nesse trabalho juntos aos encontrados na literatura estudada sugerem, portanto, que, na faixa mesofílica, temperaturas abaixo de 30 ºC desfavoreçam a digestão anaeróbia.

Conclusões

O reator alcançou resultados satisfatórios de remoção de matéria orgânica e produção de metano (Tabelas 2 e 3), principalmente levando em conta a baixa suplementação de alcalinidade utilizada. Os melhores resultados foram encontrados no Ensaio 7, no qual a uma carga de 15.27 gCOD L^{-1} d^{-1} o AnSBBR atingiu remoção de COD solúvel de 89 %, produtividade de metano de 208.5 molCH_4 m^{-3} d^{-1} (equivalente a 4672 CNTP-mLCH_4.L^{-1}.d^{-1}) e rendimento de metano de 15.76 mmolCH_4.gCOD^{-1}. A variação da estratégia de alimentação, à carga de 5 gCOD L^{-1} d^{-1}, não exerceu influência sobre o desempenho do processo, alterando de forma expressiva apenas os picos de concentrações dos ácidos durante o ciclo. A redução do tempo de ciclo e da concentração afluente, a uma mesma carga, sugeriu uma limitação no processo resultando na queda da produção de metano. O aumento da carga orgânica volumétrica aplicada, de 5 para 15 gCOD.L^{-1}.d^{-1} favoreceu a produção de metano, elevando o rendimento e a produtividade, apesar da pequena redução na eficiência de remoção de COD. O sistema demonstrou preferência, e até mesmo flexibilidade, pela operação às temperaturas de 30 e 35 ºC, porém na operação a 25ºC houve queda na eficiência de remoção de COD e no desempenho de produção de metano.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

Albanez, R., Chiaranda, B.C., Ferreira, R.G., França, A.L.P., Honório, C.D., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., 2016. Anaerobic Biological Treatment of Vinasse for Environmental Compliance and Methane Production. Appl. Biochem. Biotechnol. 178, 21–43. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1856-z

Almeida, W.A., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., Rodrigues, J.A.D., 2017. AnSBBR applied to biomethane production for vinasse treatment: effects of organic loading, feed strategy and temperature. Brazilian J. Chem. Eng. 34, 759–773. https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150584

APHA, AWWA, WEF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19ª. ed. American Public Health Association., Washington, DC.

Bagley, D.M., Brodkorb, T.S., 1999. Modeling Microbial Kinetics in an Anaerobic Sequencing Batch Reactor: Model Development and Experimental Validation. Water Environ. Res. 71, 1320–1332.

Bergland, W.H., Dinamarca, C., Bakke, R., 2015. Temperature effects in anaerobic digestion modeling, in: Proceedings of the 56th Conference on Simulation and Modelling (SIMS 56), October, 7-9, 2015, Linköping University, Sweden. Linköping University Electronic Press, pp. 261–269. https://doi.org/10.3384/ecp15119261

Bezerra, R.A., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., Foresti, E., 2009. Effects of Feed Time, Organic Loading and Shock Loads in Anaerobic Whey Treatment by an AnSBBR with Circulation. Appl. Biochem. Biotechnol. 157, 140–158. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8371-4

DiLallo, R., Albertson, O.E., 1961. Volatile Acids by Direct Titration. J. (Water Pollut. Control Fed. 33, 356–365.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zárate, G., Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and treatments. Waste Manag Res 29, 1235–1250.

https://doi.org/10.1177/0734242X10387313

Fuess, L.T., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2018. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. Sci. Total Environ. 634, 29–40. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326

Janke, L., Leite, A.F., Batista, K., Silva, W., Nikolausz, M., Nelles, M., Stinner, W., 2016. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. Bioresour. Technol. 217, 10–20. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.110

Kalyuzhnyi, S. V, Martinez, E.P., Martinez, J.R., 1997. Anaerobic treatment of high-strength cheese-whey wastewaters in laboratory and pilot UASB-reactors. Bioresour. Technol. 60, 59–65. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00176-9

Lovato, G., Albanez, R., Albuquerque, J.N., Cola, P., Celestino, R.S., Vogel, S.E., Fukuyama, M., Hirata, F.E., Saito, F.H., Ratusznei, S., Rodrigues, J.A.D., 2017. Novel insights into the co-digestion of whey with glycerin in an AnSBBR: Influent composition and concentration, cycle length and feed strategy effect. Adv. Environ. Res. 161–182.

Lovato, G., Albanez, R., Triveloni, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2018. Methane Production by Co-Digesting Vinasse and Whey in an AnSBBR: Effect of Mixture Ratio and Feed Strategy. Appl. Biochem. Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s12010-018-2802-7

Lovato, G., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M., 2016. Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. Appl. Biochem. Biotechnol. 178, 126–143. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1863-0

Mohana, S., Acharya, B.K., Madamwar, D., 2009. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. J. Hazard. Mater. 163, 12–25. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.079

Pant, D., Adholeya, A., 2007. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. Bioresour. Technol. 98, 2321–2334. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.027

Rico, C., Muñoz, N., Fernández, J., Rico, J.L., 2015. High-load anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: Limits in co-substrates ratio and organic loading rate. Chem. Eng. J. 262, 794–802. https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.050

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. J. (Water Pollut. Control Fed. 58, 406–411.

Shah, F.A., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I.A., Shah, M.M., 2015. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. Renew. Sustain. Energy Rev. 42, 627–642. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.053

Siqueira, L.M., Damiano, E.S.G., Silva, E.L., 2013. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. J. Environ. Sci. Heal. Part A 48, 1707–1716. https://doi.org/10.1080/10934529.2013.815535

Speece, R.E., 1996. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press, Nashville, Tenn.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass and Bioenergy 19, 63–102. https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9

Zaiat, M., Cabral, A.K.A., Foresti, E., 1994. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. Rev. Bras. Eng. Eng. Química 11, 33–42.

EFEITO DA ESTRATÉGIA DE ALIMENTAÇÃO E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE METANO EM AnSBBR PELO TRATAMENTO DE SORO E GLICERINA EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA

Juliane N. Albuquerque [1]; Juliane Ventura [2];
Suzana M. Ratusznei [3]; José Alberto D. Rodrigues [3]

[1] Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[2] Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);
[3] Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Neste trabalho foi avaliado o efeito da estratégia de alimentação e da temperatura na produção de metano pela codigestão de soro (25%) e glicerina (75%), em reator anaeróbio, operado em batelada (B) e batelada alimentada (BA) sequenciais, com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica (80 rpm). Inicialmente, houve um período de adaptação da biomassa, na qual adotou-se a estratégia de submeter a biomassa ao aumento gradual da concentração de substrato (soro de leite), de 1000 a 5000 mgDQO·L^{-1}, e da temperatura (35 a 55^{o}C), visando adequação dos microrganismos. Na sequência, o desempenho do AnSBBR (5,6 L) foi avaliado em função da estratégia de alimentação (batelada ou batelada alimentada) e da temperatura de operação (50°C e 55°C) para a mesma proporção de glicerina (75%) e a mesma concentração de substrato 15 gDQO·L^{-1}·d^{-1}. Os valores mais elevados de eficiência de remoção (76%) e de produtividade molar em metano (189 molCH$_4$·m^{-3}·d^{-1}) com composição do biogás com 65% de metano, foram obtidos na condição em batelada alimentada a 55°C. Em geral, esses valores foram próximos aos obtidos na operação em batelada na mesma temperatura. O sistema foi mais sensível à variação de temperatura do que em relação à alteração na estratégia de alimentação.*

Introdução

A digestão anaeróbia consiste de um processo biológico natural que ocorre na ausência de oxigênio molecular, no qual diferentes microrganismos promovem a transformação de compostos orgânicos complexos, como proteínas, carboidratos e lipídeos, em produtos mais simples como metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2) (Mosey,1983).

A produção de biogás por digestão anaeróbia oferece vantagens significativas sobre outras formas de tratamento. Requer investimentos mais baixos e condições operacionais mais simples em comparação com tecnologias de pré-processamento mais sofisticadas, o que o torna ideal para aplicações locais. Menos lodo é produzido em comparação com outras tecnologias de tratamento. O lodo digerido pode ser utilizado como nutriente melhorado em termos de disponibilidade para plantas e reologia (Kolesarova *et al*., 2011).

Os reatores anaeróbios operados em batelada sequencial com biomassa imobilizada (AnSBBR) permitem o metabolismo anaeróbio biológico típico, do consumo de substrato à produção de metano e dióxido de carbono e operar de acordo com as seguintes etapas cíclicas: alimentação, reação e descarga. A etapa de alimentação pode ter o tempo de enchimento variável, compreendendo a operação em batelada, quando o tempo de enchimento é desprezível em relação ao tempo total de ciclo, e a operação em batelada alimentada, quando o tempo de enchimento é significativo em relação ao tempo total de ciclo. Na etapa de reação ocorre o tratamento propriamente dito, por meio das biotransformações dos constituintes do esgoto por microrganismos. Na etapa de descarga, ocorre a retirada do líquido tratado e clarificado. As principais vantagens deste tipo de operação são a simplicidade, o bom controle de qualidade dos efluentes e a possibilidade de aplicar esse tipo de tratamento a uma ampla gama de águas residuárias (Lovato *et al*., 2015).

A estratégia de alimentação é um dos fatores que afetam o desempenho dos reatores anaeróbios operados em batelada sequencial, assim como a agitação, a razão inicial das concentrações de substrato e biomassa (F/M) e a configuração geométrica do reator (Zaiat *et al*., 2001). Em reatores operados em batelada ou batelada alimentada esta variável exerce forte influência, já que está relacionada com a razão F/M aplicada e com a retenção de sólidos. Segundo Angenent e Dague (1995), o aumento do tempo de alimentação causaria uma diminuição da quantidade ácidos voláteis totais, aumentando o desempenho do processo. Com o fornecimento do substrato em um tempo maior, haveria uma menor disponibilidade do mesmo para os microrganismos ocasionando um menor acúmulo de ácidos no interior do reator.

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes na digestão anaeróbia uma vez que afeta os processos biológicos de diferentes maneiras. Dentre os principais efeitos da temperatura incluem-se as alterações na velocidade do metabolismo dos microrganismos, no equilíbrio iônico e na solubilidade dos substratos, principalmente de lipídios (Speece, 1996; Van Haandell e Lettinga, 1994; Benefields e Handal, 1980).

A produção de CH_4 a partir de uma variedade de resíduos biológicos por digestão anaeróbia está crescendo globalmente, já que é uma tecnologia consolidada e seu teor de energia é de 55,6 $kJ \cdot g^{-1}$, o que representa um aumento de 17% em relação ao teor da gasolina (47,5 $kJ \cdot g^{-1}$). Além disso, os benefícios cruciais oferecidos pelo uso de biogás ao invés do gás natural são: (i) é produzido por fontes renováveis; (ii) é produzido localmente e sem dependência de óleo importado ou reservas de gás natural; (iii) ajuda a reduzir a poluição produzida por resíduos orgânicos, o que é responsável pela maior parte da poluição das águas naturais; e (iv) ajuda a retardar os problemas de gerenciamento de resíduos (Chandra et al., 2012).

Dentre os substratos utilizados pelos microrganismos na digestão aneróbia, destaca-se o potencial do soro, um subproduto da indústria de laticínios. Sobre este contexto, se salienta a codigestão do soro e glicerina. O soro, ou soro de queijo, ou de leite é a parte aquosa que é separada no processo de fabricação de queijo. É o maior subproduto da indústria, consiste em 80-90% do volume do leite utilizado para a produção de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou (Bezerra *et al*., 2009 e Lima *et al*., 2016). Devido à sua alta carga orgânica, possui alto potencial poluidor, podendo causar depleção da concentração de oxigênio se disposto de maneira direta em corpos hídricos (Lovato *et al*., 2016). Por ser uma água residuária rica em matéria orgânica, o soro tem alto potencial para geração de metano pela atividade biológica anaeróbia. Porém, sua alta biodegradabilidade pode causar o aumento repentino de ácidos que causam a instabilidade do processo. Em vista disso, o uso de um cosubstrato com a capacidade tamponante no tratamento do soro ajudará na melhoria do processo (Rivero *et al*., 2014). Em vista disso, utiliza-se a glicerina, que possui capacidade tamponante, como um cosubstrato para o soro do leite. A glicerina, ou glicerol, é o maior subproduto da indústria de biodiesel. Para cada 100 kg de biodiesel produzidos, cerca de 10 kg de glicerol bruto são gerados. Ademais, a glicerina é uma substância muito biodegradável, apresenta um pH que condiz com as condições da digestão anaeróbia e há uma grande variedade de microrganismos anaeróbios que utilizam a glicerina como fonte de carbono (Song *et al*., 2004; Tatara *et al*., 2005; Ueno *et al*., 2007; Yang *et al*., 2008; Ferraz Júnior *et al*., 2016).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho consistiu na aplicação do reator anaeróbio operado em batelada sequencial com agitação mecânica e biomassa imobilizada em suporte inerte (AnSBBR), aplicado à produção de metano pela codigestão de glicerol (efluente do processo de produção de biodiesel) e soro de leite (efluente da produção de laticínios). O desempenho do biorreator foi avaliado em função do efeito da estratégia de alimentação e da temperatura na produção de metano pela codigestão de soro e glicerina.

Material e Métodos

A Figura 1 apresenta o esquema do biorreator com agitação mecânica utilizado (BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co.) constituído por um frasco de vidro de 20 cm de diâmetro e de altura, com capacidade total de 6 L e capacidade útil de 5,6 L.

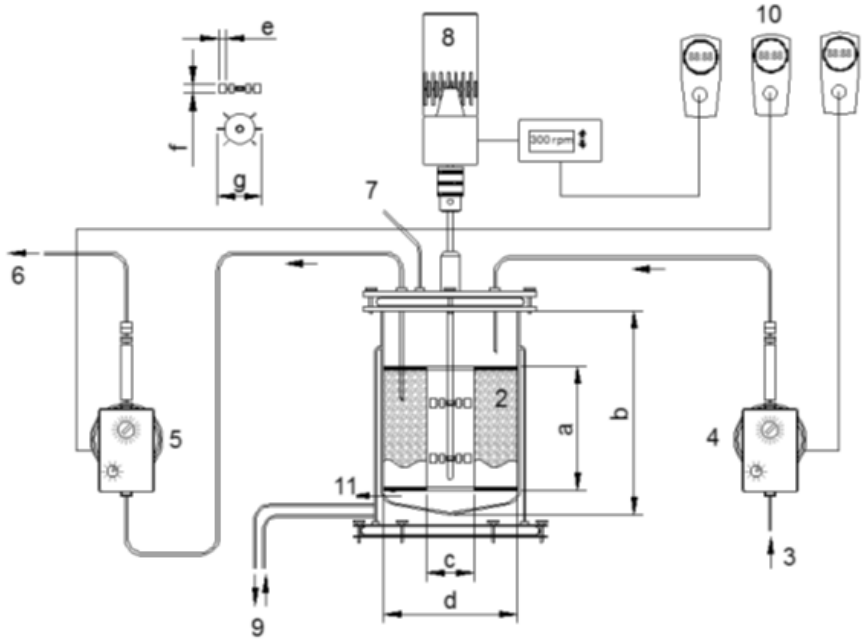


Figura 1: Representação esquemática do reator anaeróbio operado em batelada sequencial com biomassa imobilizada (AnSBBR) e agitação mecânica

[Notação: (a) Reator: 1 – Biorreator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co.) com capacidade de 6 L (b = 29,5 cm; d = 18,0 cm); 2 – Cesto de retenção e material suporte de biomassa (a = 18,0 cm; c = 7,0 cm); 3 – Afluente; 4 – Bomba de alimentação; 5 – Bomba de descarga; 6 – Efluente; 7 – Saída de biogás; 8 – Sistema de agitação; 9 – Sistema de controle de temperatura (banho ultratermostático); 10- Sistema de automação; 11 – Espaço entre a base do reator e o cesto para retenção de biomassa. (b) Detalhes dos impelidores: Dois impelidores tipo turbina com seis pás planas (e = 2 cm; f = 1,5 cm; g = 6 cm)].

O material suporte foi confinado em um cesto de aço Inoxidável-316 e também na parte inferior do reator, entre a base do reator e o cesto. O cesto era perfurado apresentando as seguintes dimensões: 18 cm de altura, 7 cm e 17,5 cm de diâmetro interno e externo, respectivamente. A parte inferior do cilindro interno do cesto foi coberta por uma tela de aço inoxidável, de modo a reter o biofilme preso na parte inferior do reator. A agitação foi de 80 rpm, realizada por motor acoplado aos 2 impelidores tipo turbina de 6 cm de diâmetro constituído por seis lâminas planas (padrão Rushton) e instalados a 8 e 16 cm do fundo do tanque.

A alimentação e descarga foram realizadas por bombas tipo diafragma marca Prominent modelos β e Concept, respectivamente. Um sistema de automação composto por temporizadores foi responsável pelo acionamento/parada das bombas e do agitador, de modo a implementar as etapas da operação em batelada sequencial. A temperatura foi controlada pela circulação de água destilada pela jaqueta da parte inferior do reator, ligada a um banho ultratermostático (marca Marconi modelo MA-184).

O inóculo (26,9 $gST \cdot L^{-1}$ e 16,5 $gSVT \cdot L^{-1}$) utilizado foi proveniente do sistema de tratamento termofílico (UASB) de vinhaça da Usina de São Martinho (Pradópolis, SP). O material utilizado como suporte inerte para imobilização da biomassa foi espuma de poliuretano na forma de cubos de 1,0 cm de aresta, com densidade aparente de 23 $kg \cdot m^{-3}$ e porosidade próxima a 95%. O lodo anaeróbio termofílico foi imobilizado conforme metodologia proposta por Zaiat *et al.* (1994).

Na Tabela 1 é apresentada a composição da água residuária, ressaltando-se que se tem as seguintes relações teóricas: 1000 mgDQO é igual a 787,6 mg de glicerina e igual a 897,0 mg de lactose.

Tabela 1: Composição da água residuária.

Composto	Concentração ($mg \cdot L^{-1}$)
Soro de leite	897,0
Glicerina	787,6
Bicarbonato de sódio	16

A água residuária alimentada ao AnSBBR visando à produção de biometano foi formulada a base de soro de leite (25%) e glicerina (75%). A glicerina foi obtida de uma usina de produção de biodiesel. O soro comercial é obtido como efluente do processo de produção de laticínios. Foi utilizada a forma desidratada em pó (composição: 73% carboidratos, 11 % proteínas, 2% gordura, minerais 9%, umidade 5%), cuja água residuária foi obtida a partir da dissolução com água de torneira. Foi necessária a suplementação de alcalinidade pela adição de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) em função das características da água residuária.

Análises físico-químicas

O monitoramento foi efetuado por análises em amostras do afluente e do efluente, realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1995), considerando também o método de Ripley *et al.* (1986) na determinação da alcalinidade e de Dubois *et al.* (1956) na determinação de carboidratos, além do método adaptado de Bondioli e Bella (2005), para a determinação de glicerina total. Os compostos intermediários do metabolismo anaeróbio e a composição do biogás foram analisados por cromatografia em fase gasosa. O volume acumulado de biogás produzido foi aferido por medidor de gás Ritter modelo MilligasCounter.

Procedimento experimental da operação do reator

Na Tabela 2 são apresentadas as condições de operação implementadas (C1 a C3) no AnSBBR, na qual (B) refere-se à operação em batelada; (BA) refere-se à operação em batelada alimentada; C_{SAFL} é a concentração do afluente e t_F é o tempo de alimentação (10 e 240 min). O tempo de ciclo foi de 8 h, a frequência do agitador foi de 80 rpm e volume alimentado/descarregado foi de 1,0 L. A proporção de glicerina no afluente foi mantida em 75% para todas as condições.

Tabela 2: Resumo das condições experimentais implementadas.

Condição	Operação	Soro/Glicerina	C_{SAFL} ($gDQO \cdot L^{-1}$)	t_F (min)	T (°C)
C1	B	25/75	15	10	55
C2	BA			240	
C3	BA	25/75	15	240	50

O procedimento de operação do AnSBBR foi executado da seguinte forma: o primeiro ciclo foi realizado de maneira distinta, em que 2,5 L de água residuária foram alimentados durante 20 minutos. Após a alimentação, a agitação foi iniciada e permaneceu ligada durante o tempo de ciclo de 8 horas. No final desse tempo, a agitação foi desligada e descarregou-se 1,0 L de meio em 10 minutos. Imediatamente, após o final deste primeiro ciclo, foi alimentado 1,0 L de meio, em 10 minutos para a operação em batelada, e 4 h (50% do tempo

total de ciclo) para a operação em batelada alimentada. Dessa forma, nas condições em batelada alimentada, nos 50% iniciais de ciclo, o sistema funcionou em batelada alimentada (reação e alimentação) e nos 50% restantes em batelada (reação sem alimentação).

Em seguida, deu-se início a um período de adaptação, visando a adequação dos microrganismos ao meio. O AnSBBR foi preenchido com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano e foi operado em batelada (B) em ciclos de 8 h, com afluente composto por soro de leite somente. Este período teve duração de 11 dias, nos quais houve aumento gradual da concentração afluente de 1000 a 5000 mgDQO·L^{-1} e da temperatura de 35 a 55 °C. Obteve-se uma boa eficiência de remoção de matéria orgânica e de carboidratos, indicando que os microrganismos já estavam adaptados ao afluente. Após esta etapa, iniciou-se a codigestão por meio da adição de 75% de glicerina (G) ao soro (S).

Nas três etapas, manteve-se a concentração afluente em 15 gDQO·L^{-1}. O AnSBBR foi operado em batelada (B) na Condição C1, com tempo de alimentação (t_F) de 10 min, e em batelada alimentada (BA) nas Condições C2 e C3, com tempo de alimentação (t_F) de 240 min. Nas Condições C1 e C2 a temperatura foi de 55°C enquanto na Condição C3 diminui-se a temperatura para 50°C.

Em todos os ensaios realizados no AnSBBR, mantiveram-se constantes: o volume de alimentação (1,0 L), o tempo de ciclo (8 horas), a concentração de matéria orgânica (15 gDQO·L^{-1}) e a agitação (80 rpm), valores estes sugeridos a partir da experiência de utilização deste sistema em trabalhos anteriores para a produção de metano (Bezerra *et al*., 2011; Lovato *et al*., 2012; Silva *et al*., 2013; Albanez *et al*., 2016; Almeida *et al*., 2017).

Resultados e Discussão

Na Tabela 3 e nas Figuras 2 a 6 são apresentados os resultados obtidos na Condições C1, C2 e C3, nas quais COVA é a carga orgânica volumétrica aplicada, COVR é a carga orgânica volumétrica removida, Va é o volume alimentado/descarregado por ciclo, AVT é a concentração de ácidos voláteis totais, AB, alcalinidade à bicarbonato, ε_{SF} é a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO para amostras filtradas, ε_{CF} é a eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de carboidratos para amostras filtradas, ε_{GF} é a eficiência de remoção de glicerina para amostras filtradas, PrM é a produtividade molar, RMCR é o rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida, V_{CH4} é o volume de metano produzido por ciclo e CH_4 é a porcentagem de metano no biogás.

A alteração na estratégia de alimentação para batelada alimentada na Condição C2 implicou em aumento na eficiência de remoção de matéria orgânica (Tabela 3 e Figuras 2 e 4). Porém a diminuição na temperatura, de 55°C para 50°C, implicou em uma diminuição de eficiência de remoção de matéria orgânica, independente da estratégia de alimentação adotada. O maior valor de eficiência de remoção foi obtido na Condição C2, na qual obteve-se 76% ± 2. A eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de carboidratos foi de, praticamente, 100 % em todas as condições.

Os maiores valores de carga orgânica volumétrica removida foram obtidos nas Condições C1 (11,1 gDQO·L^{-1}·d^{-1}) e C2 (12,4 gDQO·L^{-1}·d^{-1}), na qual a temperatura de operação foi maior, ou seja 55°C (Tabela 3 e Figura 4). A alteração na estratégia de alimentação para batelada alimentada implicou em aumento na carga orgânica volumétrica removida.

Quanto à concentração de ácidos voláteis totais em todas a s condições houve acúmulo no efluente. Os menores valores de concentração de ácidos voláteis totais no efluente (Tabela 3 e Figura 5) foram obtidos nas Condição C1 e C2, nas quais a temperatura foi de 55°C. A diminuição para 50°C, implicou em maior acúmulo de ácidos no efluente. Em todas as condições os valores de alcalinidade no efluente foram inferiores aos valores do afluente (Tabela 3 e Figura 5). Houve maior consumo de alcalinidade do afluente na Condição C3, ou seja, na menor temperatura.

Em relação à produção de metano no biogás (V_G) (Tabela 3 e Figura 3), verifica-se que o volume de metano gerado por ciclo na Condição C1 (3650 ± 198 mL·ciclo^{-1}) foi ligeiramente menor ao gerado na Condição C2 (4182 ± 88 mL·ciclo^{-1}). Em contrapartida, o volume de metano gerado por ciclo na Condição C3 (2709 ± 548 mL·ciclo^{-1}) foi inferior em relação aos demais. Assim, houve um decréscimo no volume de metano gerado com a diminuição da temperatura. Além disso, houve uma leve diminuição na porcentagem de metano na composição do biogás com a diminuição da temperatura.

Tabela 3: Principais resultados e índices de desempenho das Condições C1 a C3

Parâmetro	Condição					
	C1		C2		C3	
	B/55ºC		BA/55ºC		BA/50ºC	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
COVA	15,3	–	16,2	–	15,3	–
COVR	–	11,1	–	12,4	–	9,6
V_A	1,0 ± 0	–	1,1 ± 0	–	1,0 ± 0	–
AVT	127 ± 16	2712 ± 187	114 ± 13	2315 ± 267	115 ± 7	4052 ± 665
AB	4915 ± 368	2674 ± 361	4369 ± 88	2330 ± 271	5383 ± 39	1898 ± 735
pH	8,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
C_S	14794 ± 194	4081 ± 142	14797 ± 415	3478 ± 276	14892 ± 329	5554 ± 661
ε_{SF}	–	72 ± 1	–	76 ± 2	–	63 ± 4
C_C	3089 ± 169	67 ± 22	3077 ± 152	71 ± 11	3069 ± 241	66 ± 31
ε_{CF}	–	98 ± 1	–	98 ± 0	–	98 ± 1
C_G	8158 ± 906	11 ± 3	7830 ± 234	9 ± 6	8487 ± 673	11 ± 2
ε_{GF}	–	98 ± 2	–	100 ± 0	–	100 ± 0
PrM	–	170,0	–	189,4	–	126,9
RMCR	–	14,7	–	16,0	–	10,8
n_{CH4}	–	0,5	–	0,6	–	0,4
V_{CH4}	–	3650 ± 198	–	4182 ± 88	–	2709 ± 548
CH_4	–	63	–	65	–	59

COVA/COVR (gDQO·L^{-1}·d^{-1}); V_A (L); AVT (mgHAc·L^{-1}); AB (mgCaCO^3·L^{-1}); pH (u); C_S (mgDQO·L^{-1}); C_C (mgCarboidrato·L^{-1}); C_G (mgGlicerina·L^{-1}); ε_{ST}/ ε_{CT}/ ε_{GF} (%); PrM (molCH$_4$·m^{-3}·d^{-1}); RMCR (molCH$_4$·kgDQO^{-1}); V_{CH4} (mL·ciclo^{-1}); nCH$_4$ (mmolCH$_4$·d^{-1}); CH$_4$ (%).

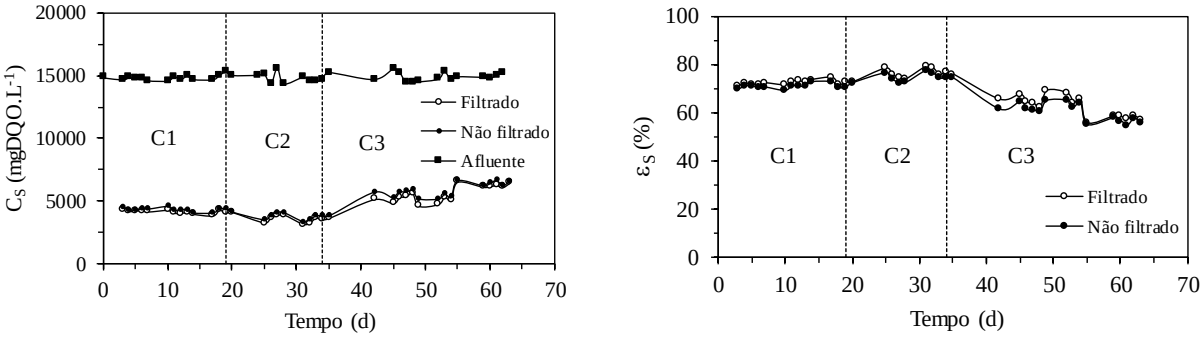


Figura 2: Concentração de matéria orgânica (C_S) no afluente e no efluente e eficiência de remoção (ε_S) nas Condições 1 a 3 (C1, C2 e C3)

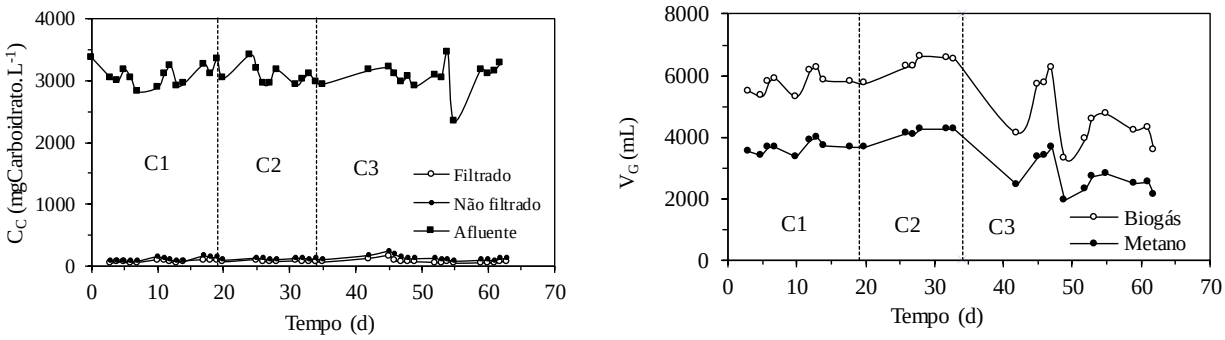


Figura 3: Concentração de carboidratos (C_C) no afluente e no efluente e volume de biogás produzido (V_G) nas Condições C1 a C3

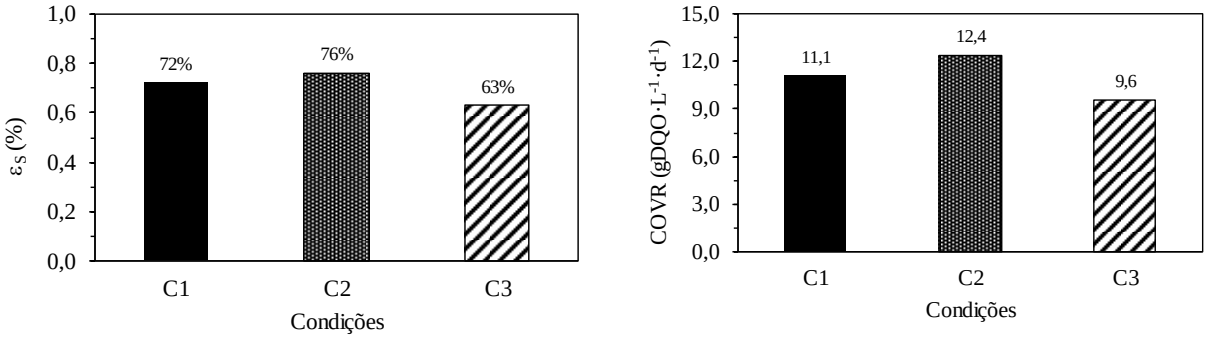


Figura 4: Eficiência de remoção de matéria orgânica para amostras filtradas (ε_S) e carga orgânica volumétrica removida (COVR) nas Condições C1 a C3

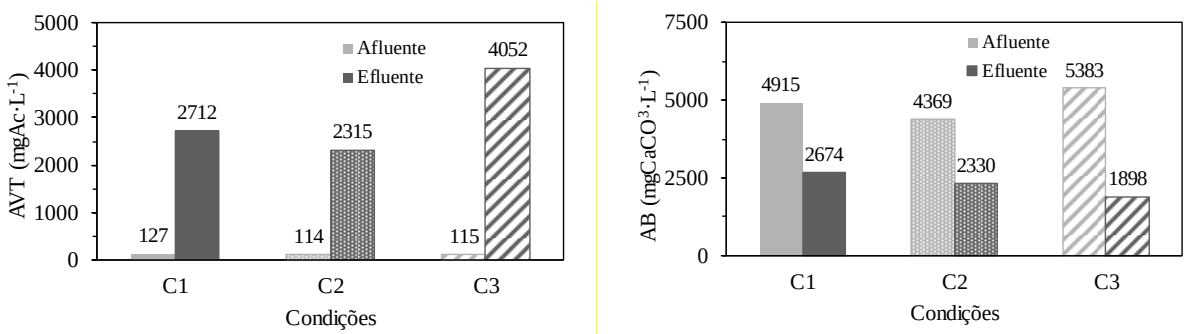


Figura 5: Ácidos voláteis totais (AVT) e alcalinidade à bicarbonato (AB) no afluente e no efluente nas Condições C1 a C3

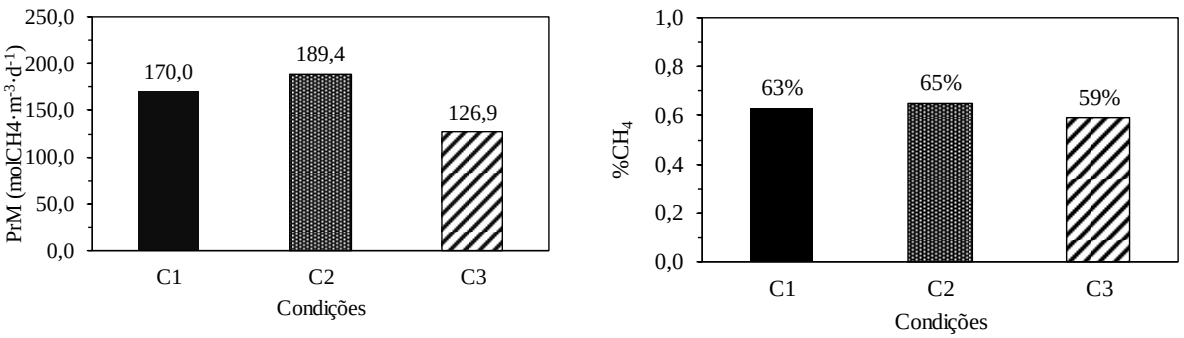


Figura 6: Produtividade em metano (PrM) e porcentagem de metano no biogás (CH_4 %) nas Condições C1 a C3

Quanto à produtividade em metano (Tabela 3 e Figura 6), verifica-se que a houve aumento na produtividade de 170,0 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ (Condição C1) para 189,4 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$

(Condição C3), quando alterou-se a estratégia de alimentação para batelada alimentada. Porém quando se manteve a operação em batelada alimentada e diminuiu-se a temperatura, de 55 para 50°C, houve diminuição da produtividade para 126,9 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$.

Em relação à porcentagem de metano no biogás (Tabela 3 e Figura 6), verifica-se que os valores foram próximos, variando de 59% a 65%, para todas as condições com vantagem para a Condição C2, na qual a operação foi realizada em batelada alimentada a 55ºC.

Comparando-se a influência das estratégias de operação em batelada (B) e em batelada alimentada (BA) verifica-se que não influenciou significativamente no acúmulo de ácidos voláteis totais, e no consumo de alcalinidade a bicarbonato (AB), nos valores de carga orgânica volumétrica removida (COVR) e de na produtividade em metano (PrM). Desta forma, o AnSBBR poderá ser operado, na temperatura de 55°C, tanto em batelada quanto em batelada alimentada sem prejuízo para o sistema.

De forma análoga, verifica-se que o volume de metano gerado por ciclo (V_G) (Tabela 3 e Figura 3), sofreu pouca alteração com a mudança da estratégia de alimentação.

O rendimento, entre metano produzido e matéria orgânica removida (RMCR) apresentou diminuição com o decréscimo da temperatura para 55°C (Tabela 3). O maior valor foi obtido na Condição C2 (16,0 $molCH_4 \cdot kgDQO^{-1}$). Considerando a máxima produção teórica de metano por carga removida (1/64 $molCH_4 \cdot gDQO^{-1}$, que é igual a 15,6 $molCH_4 \cdot kgDQO^{-1}$ ou 350 $mLCH_4 \cdot gDQO^{-1}$) verifica-se que foram obtidos valores de rendimento entre metano produzido e matéria orgânica removida maiores que a máxima produção teórica de metano na Condição C2. A justificativa para este fato está relacionada ao valor ter sido obtido em relação à concentração de matéria orgânica para amostras filtradas, porém existe a possibilidade de compostos não dissolvidos terem contribuído para a formação de metano.

Conclusões

Os resultados obtidos na codigestão (soro/glicerina) em AnSBBR com agitação mecânica (55ºC) permitiram verificar que:

A operação em batelada alimentada a 55ºC permitiu melhores valores de eficiência de remoção de matéria orgânica (76%), menores valores de concentração de ácidos voláteis no efluente e menor consumo de alcalinidade do afluente.

Houve remoção, praticamente, total de carboidratos e de glicerina em todas as condições.

Os maiores valores de carga orgânica volumétrica removida (11,1 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ e de 12,4 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$) e de produtividade em metano (170,0 e de 189,4 $molCH_4 \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$), foram obtidos, respectivamente, na operação em batelada (B) e em batelada alimentada (BA), para o maior valor de temperatura (55°C).

Os resultados mostraram que o sistema foi mais sensível à diminuição da temperatura de 55 para 50ºC, do que em relação à alteração na estratégia de alimentação. Desta forma, a codigestão de soro/glicerina a 55ºC pode ser realizada no AnSBBR tanto em batelada quanto em batelada alimentada com desempenho semelhante, o que mostra a flexibilidade desta configuração.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

Albanez, R.; Lovato, G.; Zaiat, M.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D. (2016) Optimization, Metabolic Pathways Modeling and Scale-Up Estimative of an AnSBBR Applied to Biohydrogen Production by Co-Digestion of Vinasse and Molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, **41**, 20473-20484.

Almeida, W.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat, M. (2017) AnSBBR Applied to Biomethane Production Treating Vinasse: Effects of Organic Loading, Feed Strategy and Temperature. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **34**, 759-773.

Angenent, L.T.; Dague, R.R. (1995). A Laboratory-Scale Comparison of the UASB and ASBR Processes. In: *50th Purdue Industrial. Wastewater Conference Proceedings*, Ann Arbor Press, Chelsea, pp. 365-377.

Benefield, C.D.; Randall, C.W. (1980). *Biological Process Design for Wastewater Treatment*. Prentice- Hall, Inc. Englewood Cliffs, 526p.

Bezerra, R.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Canto, C.S.A.; Zaiat, M. (2011) Effect of Organic Load on The Performance and Methane Production of an AnSBBr Treating Effluent from Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**, 347-368.

Bondioli, P.; Bella, L.D. (2005) An Alternative Spectrophotometric Method for the Determination of Free Glycerol in Biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 153-157.

Chandra, R.; Takeuchi, H.; Hasegawa, T. (2012) Methane Production from Lignocellulosic Agricultural Crop Wastes: A Review in Context to Second Generation of Biofuel Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 1462-1476.

Dubois, S.M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.L.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956) Colorimetric Methods for Determination of Sugar and Related Substance. *Analytical Chemistry*, **228**, 13-21.

Ferraz Júnior, A.D.N.; Koyama, M.H.; Araújo Júnior, M.M.; Zaiat, M. (2016) Thermophilic Anaerobic Digestion of Raw Sugarcane Vinasse. *Renewable Energy*, **89**, 245-252.

Kolesarova, N.; Hutňan, M.; Bodik, I.; Spalkova, V. (2011) Utilization of Biodiesel By-Products for Biogas Production. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Art no 126798.

Lima, D.M.F.; Inoue, R.K.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat, M. (2016) Biohydrogen from Cheese Whey Treatment in an AnSBBR: Achieving Process Stability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **33**, 871-883.

Lovato, G.; Bezerra, R.A.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Zaiat,M. (2012) Effect of Feed Strategy on Methane Production and Performance of sn AnSBBR Treating Effluent from Biodiesel Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**, 2007-2029.

Lovato, G.; Albanez, R.; Lima, D. M. F.; Bravo, I. S. M.; Almeida, W. A.; Ratusznei, S. M.; Rodrigues, J. A. D. (2015) *Application and Environmental Compliance of Anaerobic Sequencing Batch Reactors Applied to Hydrogen/Methane Bioenergy Production*. Wastewater Treatment: Processes, Management Strategies and Environmental/Health Impacts, 1st Edition, Chapter 5, Nova Science Publishers, 111-161.

Lovato, G.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Zaiat, M. (2016) Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **178**, 126-143.

Mosey, F.E. (1983). Mathematical Modeling of the Anaerobic Process: Regulatory Mechanisms for the Formation of Short-Chain Volatile Acids from Glucose. *Water Science and Technology*, **15**, 209-232.

Ripley, L.E.; Boyle, W.C.; Converse, J.C. (1986) Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestor of High-Strength Wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **58**, 406-411.

Rivero, M.; Solera, R.; Perez, M. (2014) Anaerobic Mesophilic Co-Digestion of Sewage Sludge with Glycerol: Enhanced Biohydrogen Production. *International Journal Hydrogen Energy*, 39, 2481-2488.

Silva, R.C.; Ratusznei, S.M.; Rodrigues, J.A.D.; Zaiat, M. (2013) Anaerobic Treatment of Industrial Biodiesel Wastewater by an ASBR for Methane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **170**, 105-118.

Song, Y.C.; Kwon, S.J.; Woo, J.H. (2004) Mesophilic and Thermophilic Temperature Co-Phase Anaerobic Digestion Compared with Single-Stage Mesophilic and Thermophilic Digestion of Sewage Sludge. *Water Research*, **38**, 1653-1662.

Speece, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater Treatment*. Ed. Archae Press, Nashville, 394p.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995) 19th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Tatara, M.; Yamazawa, A.; Ueno, Y.; Fukui, H.; Goto, M.; Sode, K. (2005) High-rate Thermophilic Methane Fermentation on Short-Chain Fatty Acids in s Down-Flow Anaerobic Packed-Bed Reactor. *Bioprocess Biosystem Engineering*, **27**, 105-113.

Ueno, Y.; Tatara, M.; Fukui H.; Makiuchi, T.; Goto, M.; Sode, K. (2007) Production of Hydrogen and Methane from Organic Solid Wastes by Phase-Separation of Anaerobic Process. *Bioresource Technology*, **98**, 1861-1865.

Van Haandell, A.C.; Lettinga, G. (1994) *Tratamento Anaeróbio de Esgotos. Um Manual para Regiões de Clima Quente*. UFPB, Campina Grande, 232p.

Yang, Y.; Tsukahara, K.; Sawayama, S. (2008) Biodegradation and Methane Production from Glycerol-Containing Synthetic Wastes With Fixed-Bed Bioreactor Under Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Conditions. *Process Biochemistry*, **43**, 362-367.

Zaiat, M.; Cabral, A.K.A.; Foresti, E. (1994) Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Sludge Reactor for Wastewater Treatment: Conception and Performance Evaluation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **11**, 33-42.

Zaiat, M.; Rodrigues, J.A.D.; Ratusznei, S.M.; Camargo, E.F.M.; Borzani, W. (2001). Anaerobic Sequencing Batch Reactors for Wastewater Treatment: A Developing Technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 29-35.

PRODUÇÃO DE METANO EM REATOR ANSBBR TERMOFÍLICO A PARTIR DA CO-DIGESTÃO DE GLICERINA E VINHAÇA

Juliane N. Albuquerque [1]; Suzana M. Ratusznei [2]; José Alberto D. Rodrigues [2]

[1] Doutoranda da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP);
[2] Professor da Escola de Engenharia de São Carlos (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Este trabalho tem como propósito avaliar a aplicação de um reator anaeróbio termofílico (55 ºC) operado em batelada sequencial, contendo biomassa imobilizada em suporte inerte e agitação mecânica (AnSBBR) adequação ambiental e a produção de metano a partir da codigestão de efluentes gerados da indústria de biodiesel (glicerina) e de etanol (vinhaça). Os ensaios foram realizados em etapas através da (i) variação da composição da água residuária variando a proporção de Glicerina e Vinhaça (75%G:25%V; 50%G:50%V e 25%S:75%V); (ii) alterando a estratégia de alimentação para batelada alimentada (BA5); (iii) modificando a carga orgânica através da concentração afluente (7 gDQO.L^{-1}); e (iv) modificando a composição para 12,5G:87,5V para realizar o aumento da concentração afluente (7 e 10 gDQO.L^{-1}). Os melhores resultados foram alcançados foi na condição de 12,5 % Glicerina e 87,5 % Vinhaça, com concentração afluente de 10 gDQO.L^{-1} e a estratégia de alimentação em batelada alimentada: o pH se manteve na faixa de 7,6, a produtividade de metano foi de 72 molCH$_4$.m^{-3}.d^{-1} e o rendimento de metano produzido por matéria orgânica removida foi de 210 mLCH4.gDQO^{-1}). O modelo cinético ajustado aos dados experimentais indicou que a produção de metano se deu preferencialmente pela rota metanogênica hidrogenotrófica.*

Introdução

Nos últimos anos foram intensificadas as pesquisas voltadas a produção de bioenergia (hidrogênio e/ou metano) através da digestão anaeróbia de resíduos industriais outrora considerados como rejeito do processo, como é o caso dos resíduos sólidos e efluentes líquidos. Alguns efluentes industriais apresentam característica e composição que podem comprometer a realização da digestão anaeróbia, devido ao elevado potencial poluidor, sua própria composição, falta de nutrientes, entre outros. Dessa maneira, a codigestão anaeróbia permite tratar em um único processo águas residuárias (efluentes) que se complementam, contornando os problemas se tratados de maneira separada (Mata-Alvarez et al., 2014). Na indústria dos biocombustíveis, por exemplo, é possível realizar a co-digestão dos principais subprodutos. Na produção do biodiesel a glicerina gerada no processo corresponde de 10 a 18 %, em massa, sendo um composto com elevada concentração de matéria orgânica, de fácil degradação e com elevada relação de C:N (Astals et al., 2013). Na indústria do etanol o volume de vinhaça gerado pode variar de 10 a 13 L por litro de etanol produzido, sendo um composto de elevado potencial poluidor, com característica rica em nutrientes, mas de difícil degradação (Ferraz Júnior et al., 2016). Portanto, a codigestão dos subprodutos oriundos da produção do biodiesel e do etanol pode ser vantajosa. E por se tratar de resíduos que saem do processo produtivo a altas temperaturas, torna-se adequada a aplicação do reator anaeróbio em condições termofílicas pela potencial melhoria da produtividade de metano e fator de rendimento entre metano gerado e substrato consumido (Yang et al., 2008; Ferraz Júnior et al., 2016).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho é estudar a viabilidade tecnológica da aplicação de um reator anaeróbio termofílico operado em batelada alimentada com agitação mecânica e biomassa imobilizada em suporte inerte, aplicado à produção de metano a partir do tratamento de efluentes do processo de produção de biodiesel

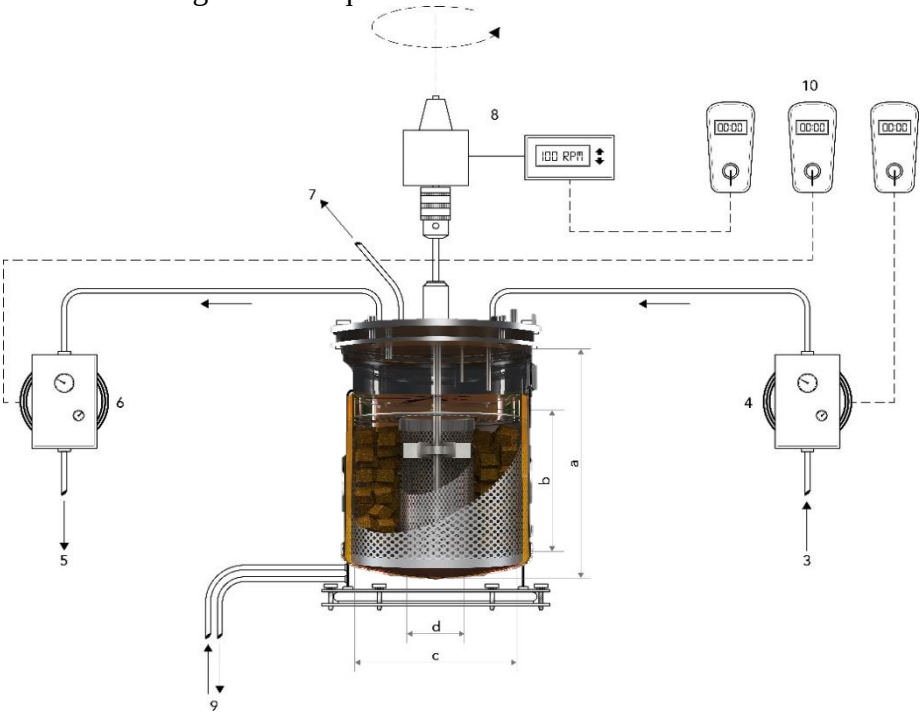
(glicerina) e de etanol (vinhaça), em que será avaliada a influência da codigestão dos substratos glicerina-vinhaça (fração mássica da mistura), da carga orgânica e da estratégia de alimentação sobre a estabilidade, o desempenho (produtividade de metano) e o fator de conversão (entre metano produzido e matéria orgânica consumida).

Material e Métodos

A Figura 1 apresenta o esquema do biorreator com agitação mecânica utilizado nos experimentos (modelo Bioflo III®, fabricado pela New Brunswick Scientific Co.), formado por um frasco de vidro de 20 cm de diâmetro e de altura, com capacidade total de 6,0 L e capacidade útil de 5,6 L. O material suporte foi confinado em um cesto de aço Inox-316 perfurado de 18,0 cm de altura, 7,0 cm de diâmetro interno e 17,5 cm de diâmetro externo. A parte inferior do cilindro interno foi coberta por uma tela de aço Inox de malha fina (1 mm) de modo a reter o meio de suporte imobilizado. A agitação foi fixada em 100 rpm e implementada por motor acoplado aos 2 impelidores tipo turbina de 6,0 cm de diâmetro constituído por seis lâminas planas (padrão Rushton) e instalados a 8,0 e 16,0 cm do fundo do tanque (Michelan, Zimmer, et al., 2009).

A alimentação e descarga foram realizadas por bombas tipo diafragma marca Prominent modelos β e Concept, respectivamente. Um sistema de automação composto por temporizadores foi responsável pelo acionamento/parada das bombas e do agitador, de modo a programar as etapas da operação em batelada sequencial: alimentação, reação e descarga. A temperatura de 55 ºC foi controlada pela circulação de água na dupla parede externa do reator, cuja temperatura foi regulada por um banho ultratermostatizado (marca Marconi modelo MA-184).

Figura 1 – Esquema do AnSBBR utilizado.



[Notação: 1 – Reator modelo BIOFLO III; 2 – Cesto de inox; 3 – Entrada do afluente; 4 – Bomba de alimentação; 5 – Saída do efluente; 6 – Bomba de descarga; 7 – Saída do biogás; 8 – Sistema de agitação; 9 – Controle de temperatura; 10 – Sistema de automação das bombas.]

Inóculo e suporte para a biomassa

O inóculo utilizado foi proveniente do reator UASB termofílico da usina de açúcar e álcool São Martinho, sediada no município de Pradópolis, SP. O material utilizado como

suporte inerte para a imobilização da biomassa foi espuma de poliuretano cortada na forma de cubos de 1,0 cm de aresta, porosidade próxima a 95% e isenta de aditivos e corantes. A metodologia seguida para a imobilização da biomassa na espuma de poliuretano é a proposta por Zaiat et al. (1994), pela qual a espuma foi coberta com o lodo anaeróbio por duas horas, homogeneizando até que este esteja em contato com todo o material suporte. Após o período de contato, deverá ser feita a lavagem dos sólidos fracamente aderidos e da inserção do material suporte com biomassa aderida no meio a ser utilizado nos experimentos. Após este procedimento, o material suporte deverá ser inserido no cesto do reator.

Água residuária

A água residuária utilizada no projeto era composta de glicerina e vinhaça, variando a porcentagem de cada substrato. A vinhaça industrial foi obtida da Usina São Manoel, sediada no município de São Manual, SP, cuja concentração foi de aproximadamente 21,4 ± 2,0 gDQO.L^{-1} (4,9 ± 0,9 gCarboidrato.L^{-1}, 3,2±0,2 gGlicerina.L^{-1}, 0,3 g.L^{-1} etanol e 0,3 mg.L^{-1} de ácido acético). A glicerina bidestilada industrial, cuja relação teórica era de 0,82 g-Glicerina.gDQO^{-1}, apresentou 69 % de glicerol, 56 mg-Ca.L^{-1}, 14.6 mg-NTK.L^{-1}, 5.2 mg-Metanol.L^{-1}, 0.5 mg-K.L^{-1}, 0.4 mg-P.L^{-1}. Foi utilizada água da torneira para diluir a concentração da água residuária e adicionado bicarbonato de sódio para corrigir a alcalinidade (1,0 – 0,4 g$NaHCO_3$.gQDO^{-1}). A Tabela 1 apresenta a composição da água residuária, considerando a concentração de 1000 mgDQO.L^{-1}.

Tabela 1 - Composição da água residuária utilizada nos ensaios de co-digestão de glicerina e vinhaça.

Composto	**Quantidade (relação teórica para 1000 mgDQO.L^{-1})**
Composição: 75 % Glicerina e 25 % Vinhaça	
Glicerina (827 mg de glicerina = 1000 mgDQO)	621 mg.L^{-1}
Vinhaça*	11,7 mL.L^{-1}
Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$)	800 – 1000 mg.L^{-1}
Composição 50 % Vinhaça e 50 % Soro	
Glicerina	414 mg.L^{-1}
Vinhaça*	23,4 mL.L^{-1}
$NaHCO_3$	800 – 650 mg.L^{-1}
Composição 75 % Vinhaça e 25 % Soro	
Glicerina	207 mg.L^{-1}
Vinhaça*	35,0 mL.L^{-1}
$NaHCO_3$	600 – 450 mg.L^{-1}

*Foi utilizado o valor médio da concentração da vinhaça, sendo esse valor variável por condição.

Análises físico-químicas

O monitoramento do reator foi realizado em amostras do afluente e do efluente medindo a concentração de matéria orgânica nas formas não filtrada (C_T) e filtrada (C_F - amostra filtrada em membrana de microfibra de vidro com 0,45 μm de diâmetro nominal de abertura) como demanda química de oxigênio (DQO - C_{MO}), carboidrato (C_C) e glicerina (C_G), série de sólidos, pH, alcalinidade parcial (AP), alcalinidade intermediária (AI) e ácidos voláteis totais (AVT), além da medida do volume de meio alimentado/descarregado. Todas as análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2012), considerando também o método modificado por Ripley et al., (1986) na determinação da alcalinidade e o método adaptado por Lovato et al. (2016) para a determinação de glicerol. A produção total do biogás durante o ciclo (V_G) foi analisada por medidor de gás Ritter modelo MilligasCounter. Foram utilizados como indicadores de estabilidade e desempenho a eficiência de remoção de matéria orgânica em amostras filtradas ($Ɛ_F$), carga orgânica

volumétrica aplicada (COVA) e removida (COVR), a produtividade molar (PrM) e produtividade volumétrica (PrV) e o fator de metano gerado por matéria orgânica removida (Y_{MO}), descritos em Almeida et al., (2017).

A quantificação da biomassa aderida no suporte inerte foi realizada ao final de cada condição experimental, da seguinte forma: Primeiro foi feita a drenagem do sistema, medindo-se o volume de meio líquido do reator (V_R), em seguida, todo o suporte inerte junto com a biomassa imobilizada foi pesado (massa total do suporte inerte e biomassa no interior do reator), esse material foi homogeneizado e, assim, pesado uma amostra do suporte inerte com biomassa (massa da amostra) e então foi realizada uma "lavagem" com água destilada desta porção, dividindo a amostra em duas partes, uma fase sólida apenas com a espuma e uma fase líquida contendo a biomassa no reator. Na fase sólida foi realizada a análise de sólidos totais e na fase líquida as análises de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT). A partir da quantidade de ST das espumas e a quantidade de SVT da amostra, foi possível estimar a quantidade de biomassa do reator (M_{SVT}).

Modelo cinético

O modelo cinético da rota metabólica proposto neste trabalho foi adaptado de Lovato et al., (2016) e Albuquerque et al., (2019). No modelo adotado, os processos anaeróbios foram simplificados em 10 etapas. Nas quatro primeiras etapas paralelas (hidrólise e acidogênese – Eq. 1 a 4) o substrato (S, considerado sacarose e glicose) é convertido a ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr), ácido butírico (HBu) e ácido valérico (HVa), nas quatro etapas seguintes (Eq. 5 a 8) foi considerada a acetogênese (formação de Hac, HBu e HVa) e nas duas etapas finais (Eq. 9 e 10) a metanogênese pelas rotas acetoclástica e hidrogenotrófica. Em todas as etapas, as reações de conversão são consideradas como sendo de primeira ordem.

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 2\ C_3H_8O_3 + 5\ H_2O \xrightarrow{k_1} 7\ CH_3COOH + 4\ CO_2 + 10\ H_2 \quad (1)$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} + C_3H_8O_3 + 4\ H_2 \xrightarrow{k_2} 5\ CH_3CH_2COOH + 4\ H_2O \quad (2)$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 3\ C_3H_8O_3 + 4\ H_2O \xrightarrow{k_3} 3\ CH_3CH_2CH_2COOH + 9\ CO_2 + 15\ H_2 \quad (3)$$

$$8\ C_{12}H_{22}O_{11} + 8\ C_3H_8O_3 \xrightarrow{k_4} 16\ CH_3CH_2CH_2CH_2COOH + 40CO_2 + 40H_2 \quad (4)$$

$$CH_3CH_2COOH + 2\ H_2O \xrightarrow{k_5} CH_3COOH + CO_2 + 3\ H_2 \quad (5)$$

$$CH_3CH_2CH_2COOH + 2\ H_2O \xrightarrow{k_6} CH_3CH_2COOH + CO_2 + 3\ H_2 \quad (6)$$

$$CH_3CH_2CH_2CH_2COOH + 2\ H_2O \xrightarrow{k_7} CH_3CH_2CH_2COOH + CO_2 + 3\ H_2 \quad (7)$$

$$CH_3CH_2OH + H_2O \xrightarrow{k_8} CH_3COOH + 2\ H_2 \quad (8)$$

$$CH_3COOH \xrightarrow{k_9} CH_4 + CO_2 \quad (9)$$

$$4\ H_2 + CO_2 \xrightarrow{k_{10}} CH_4 + 2\ H_2O \quad (10)$$

As Equações de (10) a (18) apresentam as equações de velocidade de reação para o consumo do substrato (r_S), formação e consumo do ácido acético (r_{HAc}), ácido propiônico (r_{HPr}), ácido butírico (r_{HBu}), ácido valérico (r_{HVa}), hidrogênio (r_H), no consumo de etanol (r_{EtOH}) e formação de metano (r_M), sendo que k_{1S}, k_{2S}, k_{3S}, k_{4S}, k_{1HAc}, k_{5HAc}, k_{8HAc}, k_{9HAc}, k_{2HPr}, k_{5HPr}, k_{6HPr}, k_{3HBu}, k_{6HBu}, k_{7HBu}, k_{4HVa}, k_{7HVa}, k_{8EtOH}, k_{1H}, k_{2H}, k_{3H}, k_{4H}, k_{5H}, k_{6H}, k_{7H}, k_{8H}, k_{10H}, k_{9M} e k_{10M} são os mesmos parâmetros cinéticos aparentes, só que associados ao consumo de substrato, formação e consumo de ácidos voláteis e formação de metano. O parâmetro cinético "k" é relacionado com a velocidade de reação, indicando uma relação com o tempo que é necessário para a concentração (S, HAc, HPr, HBu, HVa, EtOH, H e M) atingir um valor residual de acordo com a hipótese do modelo cinético. Os índices "1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e10" estão relacionados com as reações. Os índices "S, HAc, HPr, HBu, HVa, EtOH, H e M" estão relacionados com os valores experimentais usados para calcular esses parâmetros.

$$r_S = -(k_{1S} + k_{2S} + k_{3S} + k_{4S}) \cdot C_S = - \ k'_{1S} \cdot C_S \quad (11)$$

$$r_{HAc} = k_{1HAc} \cdot C_S + k_{5HAc} \cdot C_{HPr} + k_{8HAc} \cdot C_{EtOH} - k_{9HAc} \cdot C_{HAc} \quad (12)$$

$$r_{HPr} = k_{2HPr} \cdot C_S - k_{5HPr} \cdot C_{HPr} + k_{6HPr} \cdot C_{HBu} \quad (13)$$

$$r_{HBu} = k_{3HBu} \cdot C_S - k_{6HBu} \cdot C_{HBu} + k_{7HBu} \cdot C_{HVa} \quad (14)$$

$$r_{HVa} = k_{4HVa} \cdot C_S - k_{7HVa} \cdot C_{HVa} \quad (15)$$

$$r_{EtOH} = - k_{8HAc} \cdot C_{EtOH} \quad (16)$$

$$r_H = (k_{1H} - k_{2H} + k_{3H} \cdot + k_{4H}) C_S + k_{5H} \cdot C_{HPr} + k_{6H} \cdot C_{HBu} + k_{7H} \cdot C_{HVa} + k_{8H} \cdot C_{EtOH} - k_{10H} \cdot C_H \quad (17)$$

$$r_M = k_{9M} \cdot C_{HAc} + k_{10M} \cdot C_H \quad (18)$$

As Equações de (19) a (27) apresentam o balanço de massa do reator no modo batelada-alimentada com o modelo cinético (substrato, ácidos voláteis e metano). Essas equações foram usadas para determinar os parâmetros cinéticos do modelo. Os índices "INF" estão relacionados com as concentrações dos compostos no afluente.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (19)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{S\,INF} - C_{SF}) + r_S \quad (20)$$

$$\frac{dC_{HAc}}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{HAc\,INF} - C_{HAc}) + r_{HAc} \quad (21)$$

$$\frac{dC_{HPr}}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{HPr\,INF} - C_{HPr}) + r_{HPr} \quad (22)$$

$$\frac{dC_{HBu}}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{HBu\,INF} - C_{HBu}) + r_{HBu} \quad (23)$$

$$\frac{dC_{HVa}}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{HVa\,INF} - C_{HVa}) + r_{HVa} \quad (24)$$

$$\frac{dC_{EtOH}}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{EtOH\,INF} - C_{EtOH}) + r_{EtOH} \quad (25)$$

$$\frac{dC_H}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (C_{H\,INF} - C_H) + r_H \quad (26)$$

$$\frac{dC_M}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot (C_M) + r_M \quad (27)$$

Por se tratarem de equações diferenciais, foi utilizado o método de integração de *Euler* implantado em planilha do *software* Excel®, com a determinação dos parâmetros cinéticos por meio da ferramenta Solver do *software* Excel®, utilizando como critério de otimização a minimização da somatória dos erros (entre valores experimentais e calculados pelo modelo cinético) ao quadrado.

Procedimento experimental

O procedimento referente à realização dos experimentos. No primeiro ciclo foi alimentado no reator 2,5 L de água residuária durante 20 min. Após a alimentação, a agitação mecânica foi iniciada e o tempo de ciclo de 8 h se completou. No final desse tempo, a agitação foi desligada e foi descarregado 1,0 L de efluente em 10 min, mantendo-se assim 1,6 L no reator (volume residual). Imediatamente após o final deste primeiro ciclo, foi alimentado 1,0 L de água residuária e, assim, um novo ciclo teve início. Na operação em batelada sequencial o tempo de enchimento foi de 10 min, caracterizando uma razão de 2 % entre o tempo de enchimento e o tempo total de ciclo e na operação em

batelada alimentada esta razão foi de 50 %. Em todos os ensaios realizados no AnSBBR, mantiveram-se constantes a temperatura de 55 ºC, o volume de alimentação (1,0 L), o tempo de ciclo (8 h) e a agitação (100 rpm), valores estes sugeridos a partir da experiência de utilização deste sistema em trabalhos anteriores para a produção de metano (Albuquerque et al., 2019, Silva et al. 2013)

Uma vez obtida a estabilidade na condição experimental em estudo (estabilidade definida quando os valores monitorados atingiram um desvio menor que 10%) foi obtido um perfil ao longo do ciclo. As variáveis de interesse nos perfis foram: matéria orgânica filtrada (DQO, carboidratos e glicerina), pH, alcalinidade à bicarbonato, ácidos voláteis totais, metabólitos intermediários (ácidos voláteis e álcoois) e biogás (composição e produção). As amostras foram colhidas ao longo do ciclo nos intervalos de tempo de 0h, 0,5h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 5h e 8h, sendo que o volume retirado foi de no máximo 250 mL, ou seja, 10% do volume de meio reacional do reator.

Os ensaios foram divididos em três etapas: A Etapa I teve como finalidade analisar qual a razão dos substratos é mais adequada para realizar a codigestão. O reator foi operado em condição termofílica (55 ºC) sob diferentes proporções de substratos, glicerina (G) e vinhaça (V), na água residuária (75%G - 25%V; 50%G - 50%V; 25%G - 75%V), permanecendo constante a concentração afluente de 5 $gDQO.L^{-1}$ e o tempo de ciclo (8h). Após definir a melhor composição de cada substrato (Etapa I finalizada), foi iniciada a Etapa II a estratégia de alimentação foi modificada para batelada alimentada (BA5), de forma a avaliar a influência deste parâmetro operacional na estabilidade e produção de metano, mantendo constantes a composição da água residuária, a carga orgânica, o tempo de ciclo e a temperatura. Na Etapa III foi realizado o aumento da carga orgânica volumétrica aplicada, modificando a concentração afluente para 7 $gDQO.L^{-1}$ (BA7) para verificada a influência da COVA no desempenho e estabilidade do reator. Para dar continuidade nesta etapa, foi necessário alterar a composição da água residuária para 12,5%G – 87,5% V, contornando assim os efeitos de inibição encontrados ao elevar a concentração do afluente. Portanto, na Etapa IV o reator foi operado com a composição da água residuária de 12,5%G – 87,5% V e concentração afluente de 7 e 10 $gDQO.L^{-1}$.

Resultados e Discussão

Os valores médios dos parâmetros monitorados nos ensaios realizados estão apresentados na Tabela 1. Na Etapa I em que foi estudada a composição da água residuária, o reator em batelada sequencial com agitação fixada em 100 rpm, temperatura de 55 ºC foi operado por 63 dias (21 dias ou 63 ciclos por condição), a carga orgânica se manteve constante com concentração afluente de 5 $gDQO.L^{-1}$. Durante todos os ensaios, o pH se manteve entre 7,4 e 7,7. A concentração de ácidos voláteis totais (AVT) no efluente reduziu aproximadamente 88 % (1,15 para 0,14 g) conforme adicionada vinhaça no meio, este comportamento se manteve mesmo diminuindo a suplementação com bicarbonato de 1,0 $g.L^{-1}$ (75G:25V) para 0,45 $g.L^{-1}$ (25G:75V). Outro indicador que comprova esta melhoria é a remoção de DQO, cuja eficiência aumentou de 59 % (75G:25V) para 88 % (25G:75V), ressaltando que em relação a remoção de carboidratos e glicerina a eficiência foi acima de 85 % e 96 % em todas as condições. Além da qualidade do biogás que obteve 66 % de metano em sua composição e a produtividade de metano, que foi de 49 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$. Ademais, foi possível identificar menor concentração dos ácidos intermediários medidos no efluente, indicando uma melhor interação entre as comunidades microbianas e, consequentemente, uma maior eficiência na conversão da matéria orgânica para metano. Portanto, a relação dos substratos que se mostrou mais adequada para a co-digestão foi de 25 % de glicerina e 75 % de vinhaça.

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros monitorados e índice de desempenho

Parâmetro	75G-25V	50G-50V	25G-75V	BA 5	BA 7	BA7 12,5G-87,5V	BA10 12,5G-87,5V
$COVA_{MO}$	5,9	5,6	5,6	5,9	7,8	8,0	11,1
$COVR_{MO}$	3,3	4,1	4,9	4,9	5,4	5,8	7,7
C_{MOAFL}	5,1±0,1 (9)	4,9±0,2 (9)	5,0±0,1 (9)	5,1±0,2 (9)	7,0±0,1 (9)	7,2±0,1 (9)	10,1±0,1 (8)
ε_{MOF}	59±3 (9)	74±2 (8)	88±1 (5)	84±2 (6)	71±1 (7)	75±1 (9)	72±2 (8)
C_{CAFL}	0,2±0,01 (9)	0,4±0,03 (9)	0,5±0,05 (9)	0,9±0,08 (8)	1,2±0,10 (9)	1,7±0,07 (5)	2,2±0,14 (9)
ε_{CF}	85±1 (9)	89±1 (8)	90±1 (9)	91±1 (6)	90±0 (6)	91±2 (9)	92±1 (8)
C_{GAFL}	3,4±0,2 (9)	2,6±0,1 (8)	1,8±0,1 (8)	1,4±0,1 (9)	2,1±0,1 (6)	1,5±0,1 (9)	2,3±0,2 (8)
ε_{GT}	96±0,4 (8)	99±9,0 (6)	99±0,1 (8)	99±0,1 (9)	99±0,1 (9)	99±0,1 (9)	98,7±0,1 (8)
pH_{AFL}	8,1±0,1 (5)	7,8±0,2 (7)	7,3±0,1 (5)	7,4±0,1 (9)	7,6±0,1 (4)	7,3±0,1 (4)	7,3±0,1 (4)
pH_{EFL}	7,4±0,1 (5)	7,5±0,1 (5)	7,7±0,2 (6)	7,5±0,1 (5)	7,7±0,1 (7)	7,6±0,1 (6)	7,6±0,1 (6)
AVT_{AFL}	0,1±0,01 (5)	0,5±0,03 (7)	0,8±0,04 (5)	0,6±0,02 (9)	0,9±0,08 (4)	1,0±0,02 (4)	1,4±0,10 (4)
AVT_{EFL}	1,2±0,11 (5)	0,7±0,06 (5)	0,1±0,01 (6)	0,2±0,02 (5)	1,2±0,08 (7)	0,8±0,03 (6)	1,4±0,12 (6)
AB_{AFL}	2,8±0,23 (5)	1,8±0,15 (7)	0,9±0,06 (5)	0,9±0,02 (9)	2,6±0,07 (4)	1,6±0,05 (4)	1,8±0,18 (4)
AB_{EFL}	2,0±0,19 (5)	2,0±0,02 (5)	2,0±0,16 (6)	1,7±0,13 (5)	3,0±0,29 (7)	2,6±0,25 (6)	2,4±0,19 (6)
HAc_{EFL}	0,43	0,32	0,06	0,14	0,60	0,51	0,80
HPr_{EFL}	0,21	0,14	0,03	0,03	0,15	0,09	0,13
HBu_{EFL}	0,16	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
HVa_{EFL}	0,08	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
M_{SVT}	42,6	53,1	73,1	54,0	62,0	69,1	54,1
PrM	36	41	49	44	55	52	72
n_{CH4}	0,10	0,11	0,13	0,12	0,15	0,14	0,20
X_{CH4}	54	62	66	67	58	61	56
Y_{MO}	246	228	226	201	228	199	210

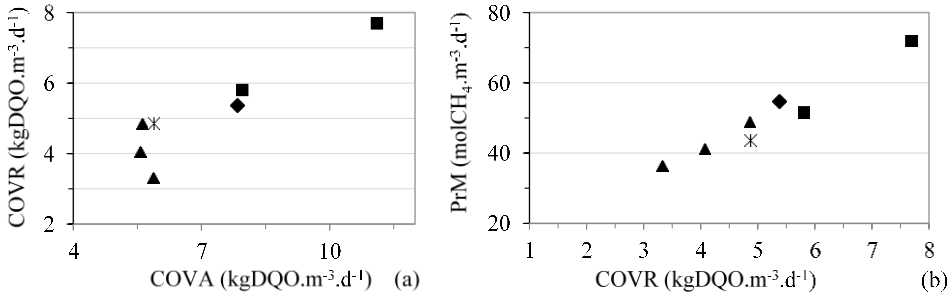
Na Etapa II foi estudada a estratégia de alimentação. O reator foi operado por 18 dias (54 ciclos), mantendo as mesmas configurações da condição anterior (25G:75V) modificando somente a alimentação para batelada alimentada (BA5). Os resultados obtidos foram similares aos encontrados quando o reator foi operado em batelada. Baseado nesses resultados e em experiência com estudos anteriores, optou-se em dar prosseguimento com os estudos operando o reator em batelada alimentada.

Na Etapa III foi realizada o aumento da carga orgânica volumétrica aplicada (COVA), por meio da concentração de matéria orgânica. Inicialmente a tentativa foi de aumentar para 10 $gDQO.L^{-1}$, mas o reator não atingiu estabilidade e apresentou característica de inibição, portanto optou-se por realizar o aumento até 7 gDQO.L-1, em que o reator foi operado por 20 dias (60 ciclos), mantendo as mesmas configurações da condição BA 5. O reator manteve o pH estável em 7,7 no efluente, mas a concentração de AVT foi 6 vezes maior se comparado com a condição BA 5. A eficiência de remoção da DQO também foi afetada, caindo para 71 %. Por outro lado, o aumento da COVA não prejudicou a remoção de carboidratos e glicerina, que se mantiveram em 90 % e 99 %, respectivamente. Outro aspecto foi a composição do biogás, que apresentou 58 % de metano, quase 10 % menor que na condição BA5, mesmo assim, a produtividade e o rendimento de metano foram melhorados.

Para dar continuidade ao aumento da COVA foi necessário alterar a composição da água residuária para 12,5G:87,5V, considerando assim uma nova etapa experimental. Na Etapa IV foram feitos o ensaios com concentração afluente de 7 e 10 $gDQO.L^{-1}$. O reator foi operado por 40 dias (20 dias ou 60 ciclos cada condição). O sistema permaneceu estável durante todos os ensaios, com o pH do efluente em 7,6 e AVT de 0,8 e 1,4 $gHAc.L^{-1,}$ respectivamente. Em comparação a condição BA7, a estratégia de mudança na composição para o aumento da carga favoreceu tanto a remoção da matéria orgânica

medida como DQO, como na produtividade de metano. A condição BA 10-12,5G:87,5V manteve praticamente os mesmos valores de remoção de DQO, carboidratos e glicerina da condição BA7. A Figura 1 mostra a relação entre a carga orgânica volumétrica aplicada (COVA) e a carga orgânica volumétrica removida (COVR) e a relação da produtividade de metano pela COVR, indicando que a modificação da composição da água residuária favoreceu o desempenho do reator, que alcançou um melhor desempenho com concentração mais alta (10 gDQO.L^{-1}). Na Figura 2 é possível acompanhar o comportamento do reator ao longo do ciclo, em que os dados experimentais são representados pelos marcadores.

Figura 1 - Relação entre carga orgânica volumétrica aplicada – COVA e removida – COVR (a) e relação de produtividade de metano por COVR (b) nas condições de composição (▲ B5), estratégia de alimentação (ж – BA5), de aumento de carga (♦ - BA7) e de mudança da composição (■ – 12,5G:87,5V)

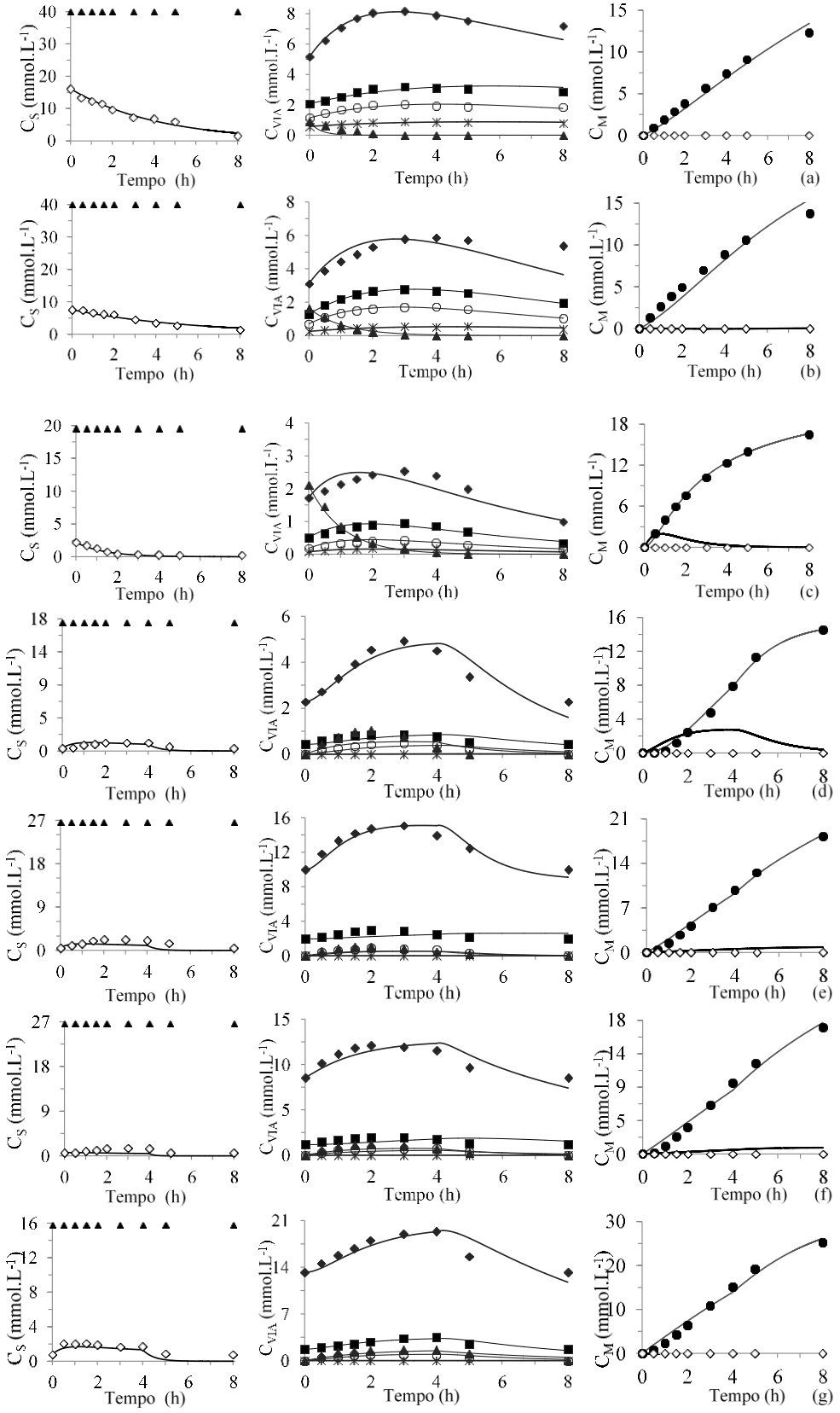


Em relação ao modelo cinético, a Tabela 2 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos calculados de todas as etapas experimentais estudadas. É possível identificar que a formação de metano nos experimentos BA 7 e BA7-12,5G:87,5V apresentou maior velocidade de reação pela rota metanogênica acetoclástica (k_{9M}) e que na BA7-12,5G:87,5V foi pela rota metanogênica hidrogenotrófica (k_{10M}), mostrando que houve uma adaptação entre a comunidade microbiana durante a condição do aumento de carga. A Figura 2 mostra que os valores calculados (linhas) pelo modelo cinético da rota metabólica foi bem ajustado aos dados experimentais (marcadores).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos calculados pelo modelo da rota metabólica

Fase	Parâmetro (h^{-1})	75G-25V	50G-50V	25G-75V	BA5	BA7	BA7 12,5G:87,5V	BA10 12,5G:87,5V
Hidrólise e Acidogênese	k'_{1S}	0,24	0,17	0,72	1,83	2,37	4,53	2,71
	k_{1HAc}	0,25	0,46	0,39	1,94	6,53	6,93	6,39
	k_{2HPr}	0,04	0,21	0,32	0,33	0,32	0,50	0,24
	k_{3HBu}	0,04	0,16	0,19	0,22	0,37	0,55	0,98
	k_{4HVa}	0,01	0,03	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00
Acetogênese	k_{5HAc}	0,73	0,10	0,39	0,23	2,90	0,89	3,84
	k_{8HAc}	0,18	0,21	0,38	0,20	0,00	0,00	0,00
	k_{9HAc}	0,53	0,42	0,33	0,39	0,86	0,31	0,81
	k_{5HPr}	0,09	0,38	0,22	0,23	0,00	0,17	0,00
	k_{6HPr}	0,07	0,10	0,06	0,00	0,00	0,73	0,03
	k_{6HBu}	0,17	0,44	0,24	0,40	0,71	0,36	0,99
	k_{7HBu}	0,10	0,00	0,05	0,08	0,07	0,08	0,08
	k_{7HVa}	0,05	0,18	0,18	0,05	0,10	0,12	0,43
	k_{8EtOH}	2,99	0,91	0,93	0,63	0,71	0,55	0,57
Metanogênese	k_{9M}	0,23	0,39	0,61	0,00	0,20	0,23	0,04
	k_{10M}	0,01	0,00	1,54	1,19	0,00	0,00	0,99

Figura 2 – Modelo cinético ajustado aos dados experimentais das condições 75G:25V (a), 50G:50V (b), 25G:75V (c), BA5 (d), BA7 (e), BA7-12,5G:87,5V (f) e BA7-12,5G:87,5V (g)



Conclusões

O reator AnSBBR em condição termofílica mostrou bom potencial para produção de metano através da codigestão de glicerina e vinhaça. A melhor proporção dos substratos foi de 25G:75V e em batelada alimentada que apresentou eficiência de remoção de 84 % e produtividade de metano de 44 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$, mas para realizar o aumento de carga orgânica acima de 8,0 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ (7 $gDQO.L^{-1}$) foi necessário modificar a composição do afluente para 12,5G:87,5V. Os melhores resultados foram obtidos com o reator operando em batelada alimentada, composição afluente de 12,5G:87,5V e carga orgânica de 11,1 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ (10 $gDQO.L^{-1}$), no qual a eficiência de remoção da DQO foi de 72 %, a produtividade molar de metano de 72 $molCH_4.m^{-3}.d^{-1}$ e o rendimento de metano gerado por DQO consumida foi de 210 $mLCH_4.gDQO^{-1}$).

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (#15/06.246-7), ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

Albuquerque, J. N. de, Orellana, M. R., Ratusznei, S. M., and Rodrigues, J. A. D. (2019) Thermophilic biomethane production by vinasse in an AnSBBR: Start-up strategy and performance optimization. Brazilian Journal of Chemical Engineering (accept).

Almeida, W. A., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., and Rodrigues, J. A. D. (2017) AnSBBR applied to biomethane production for vinasse treatment: effects of organic loading, feed strategy and temperature. Brazilian Journal of Chemical Engineering, **34**, 759–773.

APHA, AWWA, W. (2012) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, [online] http://www.astm.org/Standards/D6234.htm.

Astals, S., Nolla-Ardèvol, V., and Mata-Alvarez, J. (2013) Thermophilic co-digestion of pig manure and crude glycerol: Process performance and digestate stability. Journal of Biotechnology, **166**(3), 97–104. [online] http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.004.

Ferraz Júnior, A. D. N., Koyama, M. H., de Araújo Júnior, M. M., and Zaiat, M. (2016) Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. Renewable Energy, **89**, 245–252.

Lovato, G., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D., and Zaiat, M. (2016) Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. Applied Biochemistry and Biotechnology, **178**(1), 126–143.

Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., and Astals, S. (2014) A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. Renewable and Sustainable Energy Reviews, **36**, 412–427. [online] http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039.

Michelan, R., Zimmer, T. R., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., de Moraes, D., Zaiat, M., and Foresti, E. (2009) Effect of impeller type and mechanical agitation on the mass transfer and power consumption aspects of ASBR operation treating synthetic wastewater. Journal of Environmental Management, **90**(3), 1357–1364.

Ripley, L., Boyle, W., and Converse, J. (1986) Alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strength wastes. Journal of Water Pollution Control Federation, **58**(5), 406–411.

Silva, R. C., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., and Zaiat, M. (2013) Anaerobic treatment of industrial biodiesel wastewater by an ASBR for methane production. Applied Biochemistry and Biotechnology, **170**(1), 105–118.

CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE SORO DE QUEIJO E GLICEROL EM PROCESSO DOIS ESTÁGIOS UTILIZANDO REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO (RALF)

Priscilla de Souza Almeida [1]; Edson Luiz Silva [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química do PPGEQ UFSCar;

Resumo. *A digestão anaeróbia realizada em dois estágios pode trazer benefícios para o processo, como incrementos na remoção de matéria orgânica, rendimento e produtividade de metano. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo estudar a digestão anaeróbia em dois estágios aplicando a co-digestão de soro de queijo e glicerol em RALF, utilizando reator acidogênico termofílico (RA-T) com concentração de 10.000 mgDQO.L^{-1} e TDH de 4 h, reator metanogênico termofílico de fase única (RM-T), reator sequencial termofílico (RS-T) e sequencial mesofílico (RS-M), todos com TDH de 24 h e concentrações variando em 2.000 – 10.000 mgDQO.L^{-1}. O RM-T forneceu rendimento e produtividade volumétrica de metano equivalentes a 253,0 mL de CH_4.gDQO^{-1} e 7,4 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1}, ambos na concentração de 10.000 mgDQO.L^{-1}, exibindo remoção de DQO de 87,7%. O desempenho do processo sequencial se mostrou superior ao de um estágio, com a operação termofílica sobressaindo a mesofílica. O RS-T obteve rendimento de metano de 276,5 mL de CH_4.gDQO^{-1}, a 7.500 mgDQO.L^{-1}, e produtividade de 7,5 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1}, com 95,3% de remoção de DQO em 10.000 mgDQO.L^{-1}. O RA-T forneceu o afluente para o processo sequencial e obteve rendimento e produtividade de hidrogênio de 1,0 mmol de H_2.gDQO^{-1} e 3,9 L de H_2.L^{-1}.d^{-1}.*

Introdução

A digestão anaeróbia em dois estágios, onde a fase acidogênica e metanogênica são separadas em reatores distintos, tem sido aplicada em virtude dos acréscimos na produção de biogás e remoção de matéria orgânica ocasionados pela otimização das fases em cada reator (Cheng et al., 2016; Ding et al., 2016). Deste modo, no primeiro estágio tem-se a produção de H_2, ocasionada pela atividade de microrganismos acidogênicos, e no segundo estágio é realizada a metanogênese, produzindo CH_4 e CO_2.

Dentre os reatores utilizados na digestão anaeróbia, seja em fase única ou em sistema de duas fases, o reator anaeróbio de leito fluidizado possibilita tratamento eficiente de materiais solúveis ou suspensos que são altamente biodegradáveis, com altas taxas de carregamento orgânico, devido as elevadas taxas de transferência de massa que proporciona e a imobilização da biomassa realizada nas partículas de inertes presentes dentro do reator (Mao et al., 2015). No entanto, o uso da configuração em dois estágios neste reator ainda é uma área pouco explorada, não sendo observado na literatura muitos trabalhos a respeito.

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios que devido a elevada carga orgânica que possui (0,6 – 102 kg.m^{-3}) e suas propriedades físico-químicas, como por exemplo o pH variável (3,3 – 9,0), pode ser tratado como um resíduo prejudicial ao meio ambiente caso não ocorra o seu aproveitamento e sua destinação final seja o descarte (Prazeres et al., 2012). Composto por matéria orgânica altamente biodegradável e por se tratar de um resíduo rico em carboidratos (0,18 – 60 kg.m^{-3} de lactose), sua aplicação na produção de hidrogênio e metano vem sendo estudada por diversos autores (Najafpour e Komeili, 2010; Perna et al., 2013). No entanto, o soro de queijo apresenta razão C/N/P de aproximadamente 200/3,5/1, valor este que pode ser considerado como deficiente em nitrogênio para processos biológicos (Prazeres et al., 2012). Além disso, a baixa alcalinidade deste resíduo acarreta problemas na operação devido ao acúmulo de ácidos orgânicos voláteis produzidos na etapa de acidogênese. Sendo assim, o uso da co-digestão do soro de queijo com outros substratos

tem sido empregado frequentemente com o objetivo de contornar essas questões (Dareioti e Kornaros, 2015).

O glicerol bruto é o principal resíduo da reação de transesterificação de óleos para produção de biodiesel. Devido as impurezas presentes neste subproduto, como álcoois, catalisadores, cinzas, água e ácidos graxos, seu emprego no setor farmacêutico e alimentício não é viável, e seu descarte no ambiente sem um tratamento prévio não é adequado (Rodrigues, 2016). Devido a sua capacidade de tamponamento e alto conteúdo de C, o glicerol pode atuar como adequado co-substrato controlando o pH do meio e aumentando a razão C/N, impedindo que inibições pelo excesso de N ocorram (Lovato et al., 2016). Por este motivo, a co-digestão do glicerol com outros resíduos vem sendo estudada, comprovando os benefícios de sua utilização como co-substrato nos rendimentos e produção de H_2 e CH_4 (Rivero et al., 2014; Silvestre et al., 2015). Como atestado por Lovato et al. (2016) na investigação da produção de CH_4 e por Lovato et al. (2017) estudando a produção de H_2, a co-digestão do soro de queijo com o glicerol é uma estratégia interessante do ponto de vista energético já que incrementos na produção desses biocombustíveis foram observados.

A aplicação do soro de queijo e do glicerol em reatores anaeróbios tem sido recorrente. Porém, a adoção do leito fluidizado para estes substratos não é muito observada na literatura, sendo poucos as pesquisas que abordam a conversão do soro e do glicerol em biocombustíveis utilizando este reator, apesar de já comprovada sua eficiência (Costa, 2017; Rosa, 2014). Dentre os poucos trabalhos que utilizam estes materiais em reatores anaeróbios de leito fluidizado, verifica-se um direcionamento para a produção de H_2, indicando que ainda há muito a ser explorado neste campo.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de H_2 e CH_4 em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) por meio da co-digestão do soro de queijo e glicerol em dois estágios e determinar as melhores condições quanto a concentração, temperatura e estratégia de operação, com ou sem separação de fase, para produção de biocombustíveis. Pretende-se comparar a produção obtida em uma fase com a produção obtida em duas fases, já que será utilizado um reator operando em fase única e reatores trabalhando em modo sequencial, e dessa forma, verificar qual a melhor configuração para aplicação da co-digestão.

Materiais e Métodos

Substratos e inóculo

O soro de queijo em pó utilizado neste trabalho foi da marca LeiteSol® da empresa argentina Mastellone Hermanos S.A. Segundo a empresa, o soro de queijo foi composto por aproximadamente 76,5% de carboidratos. O glicerol empregado na co-digestão com o soro de queijo foi comercializado pela Biobrotas Oleoquímica, localizada na cidade de Brotas – SP. Este glicerol também pode ser denominado glicerina pura devido ao grau de pureza que apresenta, cerca de 99,5% de glicerol. Junto a mistura afluente foi adicionado meio nutricional proposto por Del Nery (1987) para suplementação de macro e micronutrientes.

Nesta pesquisa foram utilizados dois lodos anaeróbios diferentes dependendo da temperatura imposta nos reatores. Assim, os reatores termofílicos foram inoculados com lodo granular anaeróbio termofílico de reator UASB utilizado para tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar da Usina São Martinho, localizada no munícipio de Pradópolis, em São Paulo. No reator mesofílico o inóculo consistiu no lodo anaeróbio mesofílico de reator UASB do tratamento de águas residuárias do abatedouro da avícola Dacar S/A, localizada no munícipio Tietê, em São Paulo. O lodo inoculado no reator acidogênico foi submetido a um tratamento térmico de acordo com a metodologia proposta por Kim et al. (2006) para inibição das arqueias metanogênicas.

Operação dos reatores

Foram utilizados quatro reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF), sendo um reator metanogênico termofílico (RM-T), empregado para realização da co-digestão anaeróbia em uma fase, um reator acidogênico termofílico (RA-T), um reator sequencial termofílico (RS-T) e um reator sequencial mesofílico (RS-M). O efluente do RA-T fornecia o afluente do RS-T e do RS-M, sendo o efluente diluído quando necessário para adequação da concentração inicial pretendida.

Optou-se pelo uso de dois reatores no segundo estágio para verificar como a temperatura influencia na produção sequencial de metano. A temperatura dos reatores termofílicos foi mantida em 55°C com o auxílio de banho termostático, enquanto o RS-M foi operado em temperatura ambiente.

Para garantir a fluidização do leito utilizou-se velocidade de recirculação 30% acima da velocidade de mínima fluidização para cada material suporte escolhido.

Os materiais suporte adotados foram selecionados baseando-se em trabalhos realizados pelo LCAII (Barros et al., 2010; Costa, 2017). Dessa maneira, cinasita (argila expandida) foi usada no reator acidogênico e pneu triturado nos reatores metanogênicos.

Durante a operação do RA-T observou-se que acima de pH 4,5 o reator não produzia H_2, dessa forma, o pH foi ajustado com solução de NaOH 6 M, adentrando o reator com pH acima de 9.

Antes de ser iniciado o processo contínuo, a alimentação foi recirculada em sistema fechado para a adaptação da biomassa até que parâmetros como remoção de matéria orgânica fossem estabilizados. O barrilete utilizado para adaptação da biomassa foi formado por 2.000 $mgDQO.L^{-1}$, com composição de 50% m/m de soro de queijo e 50% m/m de glicerol, meio nutricional Del Nery (1987) e inóculo na concentração de 10% v/v. Para assegurar o meio anaeróbio, N_2 foi inserido no barrilete e no *head space* por cerca de 10 min.

Após o período de adaptação, o sistema foi posto em modo contínuo com a alimentação contendo a co-digestão com concentração afluente de acordo com a exibida na Tabela 1, meio nutricional Del Nery (1987) e bicarbonato de sódio na razão 0,5 – 1 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}.L^{-1}$ para auxiliar a capacidade de tamponamento da mistura.

O TDH e a concentração adotados para o reator acidogênico foram baseados nos resultados observados em estudos anteriores que empregaram o soro de queijo e o glicerol em condições termofílicas (Costa, 2017; Ramos, 2016). Dessa maneira, o reator acidogênico foi submetido ao TDH de 4 h e concentração de 10.000 $mgDQO.L^{-1}$. Os reatores metanogênicos foram operados no TDH fixo de 24 h, enquanto a concentração afluente de substrato variou em 2.000, 5.000, 7.500 e 10.000 $mgDQO.L^{-1}$. A alimentação dos reatores consistiu em 50% m/m de soro de queijo e 50% m/m de glicerol.

Tabela 1 – Condições operacionais aplicadas nos reatores

Condições operacionais dos reatores						
	RM-T, RS-T e RS-M			**RA-T**		
Fase	Concentração de substratos ($mgDQO.L^{-1}$)	TDH (h)	TCO ($mgDQO.L^{-1}.d^{-1}$)	Concentração de substratos ($mgDQO.L^{-1}$)	TDH (h)	TCO ($mgDQO.L^{-1}.d^{-1}$)
1	2.000	24	2.000	10.000	4	60.000
2	5.000		5.000			
3	7.500		7.500			
4	10.000		10.000			

Métodos analíticos

As análises de DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e pH foram realizadas de acordo com o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998). A quantificação de lactose foi determinada de

acordo com o método colorimétrico proposto por DuBois et al. (1956) e a concentração de glicerol segundo o método colorimétrico proposto por Bondioli e Bella (2005).

A produção volumétrica de biogás foi determinada de acordo com o método empregado por Walker et al. (2009), no qual o volume de gás produzido foi medido de acordo com o volume de solução salina acidificada (pH 2) expulso da proveta invertida.

A composição do biogás produzido foi analisada em cromatógrafo da marca Shimadzu modelo GC-2010 equipado com detector de condutividade térmica, composto por uma coluna capilar Sigma-Aldrich modelo Carboxen 1010 Plot, com gás argônio como gás de arraste. Foi inserido no equipamento 1 mL de amostra de biogás retirado pelo uso de uma seringa *gas tigh*.

Resultados e Discussão

Co-digestão anaeróbia em um estágio

O RM-T apresentou um pH efluente de 7,5 – 8,2, sendo observadas algumas instabilidades durante a operação do reator, com acréscimos na produção de ácidos (produções de 89 a 668 $mg.L^{-1}$). Porém, tais instabilidades não afetaram a produção média de CH_4. O TDH pretendido para os reatores metanogênicos foi de 24 h, entretanto, os reatores foram operados com desvios de até 20% desse valor.

Os dados referentes a concentração afluente e remoção de DQO, carboidrato e glicerol no RM-T encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração afluente e remoção de DQO, carboidrato e glicerol no RM-T

Reator metanogênico termofílico – RM-T						
Fase	Concentração afluente de DQO ($mgDQO.L^{-1}$)	Remoção de DQO (%)	Concentração afluente de carboidrato ($mg.L^{-1}$)	Remoção de carboidrato (%)	Concentração afluente de glicerol ($mg.L^{-1}$)	Remoção de glicerol (%)
1	2.465,5 ± 281,7	64,3 ± 15,9	777,5 ± 77,5	96,9 ± 1,1	1.026,2 ± 173,9	95,6 ± 1,2
2	5.283,2 ± 1.070,6	79,6 ± 10,8	1.984,7 ± 391,2	98,0 ± 0,8	2.213,1 ± 237,5	98,0 ± 0,3
3	7.634,8 ± 874,2	85,4 ± 14,6	2.765,0 ± 369,2	97,8 ± 1,3	3.216,3 ± 374,0	98,5 ± 0,2
4	11.467,3 ± 2.113,4	87,7 ± 2,8	3.531,3 ± 386,7	95,6 ± 0,9	5.026,3 ± 1291,1	98,7 ± 0,3

A remoção máxima de DQO ocorreu na fase 4 onde a maior DQO foi aplicada no reator. Assim, na DQO afluente de 11.467,3 $mgDQO.L^{-1}$ a remoção foi de 87,7%. Observou-se uma tendência ao crescimento do consumo da matéria orgânica como consequência do aumento da concentração de substratos.

O mesmo comportamento não foi observado com relação ao consumo de carboidratos, uma vez que com acréscimos na concentração verificou-se uma pequena diminuição na porcentagem de carboidratos consumidos, sendo o máximo de consumo (98%) ocorrido na fase 2, com 1.984,7 $mg.L^{-1}$. Entretanto, em todas as concentrações impostas obteve-se uma alta remoção de carboidratos. A única fonte de carboidratos da alimentação do reator provém do soro de queijo, e, sabe-se que, a lactose (principal carboidrato do soro de queijo) é facilmente digerida pelos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, e, portanto, permite elevadas conversões de carboidrato em produtos e subprodutos do processo.

A adição de glicerol a alimentação contendo soro de queijo não prejudicou a atividade dos microrganismos com relação ao consumo de carboidratos, como pode ser visto anteriormente devido aos altos consumos mencionados.

O RM-T também apresentou elevados consumos de glicerol, todos superiores a 95%, com acréscimos na remoção à medida que maiores quantidades de glicerol foram inseridas no reator. Na concentração de 5.026,3 mg.L^{-1} de glicerol (fase 4) o reator forneceu a máxima remoção correspondendo a 98,7%. Assim como ocorreu com o consumo de carboidrato, por ser tratar de um substrato de fácil conversão e adaptação dos microrganismos, foi possível atingir com o glicerol uma alta conversão em todas as concentrações avaliadas.

O rendimento médio de metano de cada reator nas fases estudadas foi calculado com base no volume de CH_4 produzido por unidade de massa de DQO consumida. Em todos os reatores, o biogás produzido foi composto por CH_4 e CO_2.

O menor rendimento, 167,1 mL de CH_4.$gDQO^{-1}$ foi consequente da menor TCO, 2.000 mgDQO.L^{-1}.d^{-1}, enquanto o maior rendimento de 253,0 mL de CH_4.$gDQO^{-1}$ foi resultado da maior TCO, 10.000 mgDQO.L^{-1}.d^{-1}. Todavia, para a composição de biogás, comportamento inversamente proporcional foi observado, ou seja, as maiores TCO resultaram em menores conteúdos de CH_4, com o valor mínimo igual a 65,8% ocorrido na fase 4. O conteúdo e rendimento de CH_4 para todas as fases do RM-T podem ser visualizados na Figura 1.

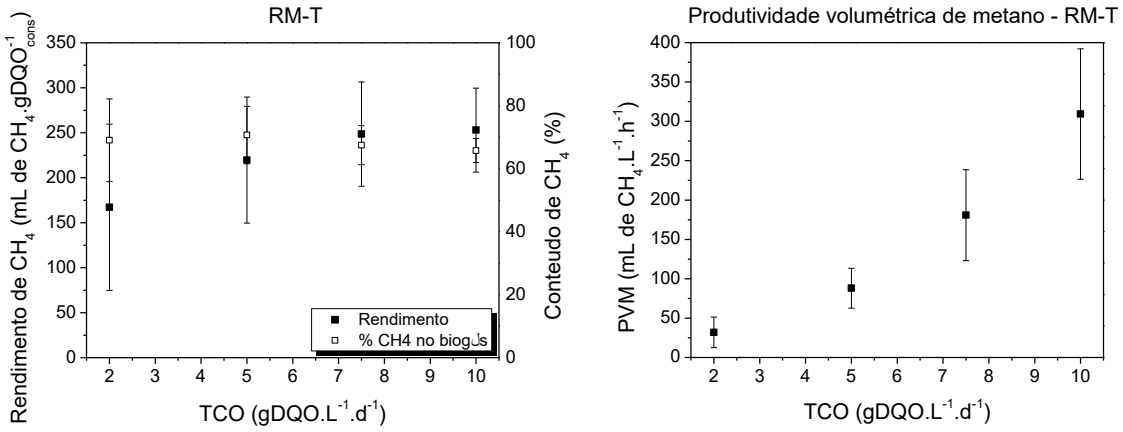


Figura 1 – Rendimento, conteúdo e produtividade volumétrica de metano no reator metanogênico de uma fase

Realizando o processo em fase única, Lovato et al. (2019) obtiveram rendimento de 11,3 mol de CH_4.$kgDQO^{-1}$ utilizando soro de queijo e de 10,3 mol de CH_4.$kgDQO^{-1}$ na co-digestão de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar. Ao aplicarem a co-digestão de soro de queijo e glicerol, Lovato et al. (2016) alcançaram 13,3 mol de CH_4.$kgDQO^{-1}$. Estes resultados, embora superiores, foram próximos ao valor encontrado neste estudo com a co-digestão do soro de queijo e glicerol em fase única (253,0 mL de CH_4.$gDQO^{-1}$ ou 9,4 mol de CH_4.$kgDQO^{-1}$).

Na Figura 1 também é apresentada a produção volumétrica de metano (PVM) obtida na co-digestão do soro de queijo e glicerol em fase única. Observa-se que a PVM apresentou um crescimento contínuo com o aumento da carga orgânica de substratos, atingindo 309,3 mL de CH_4.L^{-1}.h^{-1} ou 7,4 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1} na TCO de 10.000 mgDQO.L^{-1}.d^{-1}. Costa (2017) aplicando reator anaeróbio de leito fluidizado na digestão anaeróbia de glicerol em temperatura termofílica obteve produtividade de 4,27 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1}, alcançada na TCO de 7,0 gDQO.L^{-1}.d^{-1} (concentração de 7 gDQO.L^{-1} e TDH de 24 h). Ao aumentar a concentração menores PVM foram obtidas. Dessa forma, pode concluir que a co-digestão com o soro de queijo favoreceu a produção de metano.

Co-digestão anaeróbia em dois estágios

O pH efluente do RA-T foi igual a 4,1 ± 0,1. Como dito anteriormente, acima de pH 4,5 o reator apresentou dificuldades na produção de hidrogênio, sendo, portanto, controlado o

pH efluente com adição de NaOH no afluente.

Nas análises de composição do biogás gerado no RA-T não foi detectado produção de metano, o que indica que o pré-tratamento térmico realizado no lodo termofílico inserido no reator foi bem-sucedido. Outro fator que colaborou para inibição das arqueas metanogênicas é o fato do pH no reator ser um pH ácido inapropriado para a atividade desses microrganismos.

Como no reator acidogênico os produtos gerados são ácidos orgânicos, álcoois, H_2 e CO_2, não há uma considerável retirada da matéria orgânica do meio, pois esta se encontra presente na forma dos produtos líquidos. Em consequência, no RA-T não houve consumo considerável de DQO, com remoção de aproximadamente 5,1%. Assim, a média da DQO afluente foi 11.198,3 $mgDQO.L^{-1}$ e a DQO efluente média correspondeu a 10.618,9 $mgDQO.L^{-1}$. Antonopoulou et al. (2008) também verificaram baixas remoções da DQO na fermentação de soro de queijo em reator acidogênico do tipo CSTR mesofílico no TDH de 24 h, removendo em torno de 5%, sugerindo a adoção de uma segunda etapa para consumo da matéria orgânica.

A concentração média de carboidrato no afluente do RA-T foi 3.644,1 $mg.L^{-1}$ e a concentração efluente foi 1.900,7 $mg.L^{-1}$. A conversão de carboidratos totais atingiu 47,8%. Com relação ao glicerol, a concentração afluente no RA-T foi 4.249,9 $mg.L^{-1}$ e a concentração efluente foi 4.021,3 $mg.L^{-1}$, fornecendo assim conversão de glicerol equivalente a 5,4%.

As baixas conversões de carboidrato e glicerol apresentadas neste trabalho podem ter ocorrido devido ao baixo TDH adotado, o qual pode não ter sido suficiente para que ocorresse um consumo adequado dos substratos ao utilizá-los em conjunto.

O rendimento de hidrogênio obtido foi 1,0 ± 0,363 mmol de $H_2.gDQO^{-1}_{aplicada}$ ou 27 mL de $H_2.gDQO^{-1}$ e a taxa de produção volumétrica de H_2 correspondeu a 162,6 ± 56,1 mL de $H_2.L^{-1}.h^{-1}$ ou 3,9 L de $H_2.L^{-1}.d^{-1}$. Lopes et al. (2017) obtiveram menor rendimento e produtividade de hidrogênio do que o observado neste trabalho ao aplicar a co-digestão do soro de queijo e glicerol sob temperatura mesofílica com proporção 5 soro de queijo: 1 glicerol, atingindo 0,120 mmol de $H_2.gDQO^{-1}$ e 0,276 L de $H_2.L^{-1}.d^{-1}$. Os autores observaram uma competição entre a produção de hidrogênio e ácido propiônico (HPr), sendo a produção de HPr favorecida a medida que maiores quantidades de glicerol eram inseridas no reator. O reator empregado por Lopes et al. (2017) foi do tipo EGSB, o que também pode ter colaborado para os menores resultados ao comparar com este trabalho que utilizou reator RALF.

O pH efluente dos reatores sequenciais permaneceu entre 7,6 – 8,3. Assim como ocorreu no reator de um estágio, o RS-T apresentou remoção máxima de DQO na fase 4. A concentração afluente e remoção de DQO nesta fase corresponderam a 10.404,1 $mgDQO.L^{-1}$ e 95,3%. No RS-M a maior remoção foi na fase 3 com concentração afluente de 7.400,8 $mgDQO.L^{-1}$ e 97,9% de consumo de DQO. Nos dois reatores observou-se um crescimento da remoção decorrente do aumento da DQO. As demais concentrações de DQO e remoção são apresentadas na Tabela 3.

A remoção de carboidrato e glicerol apresentaram comportamento divergente. À medida que a concentração de carboidratos aumentava, a remoção diminuía, assim a máxima remoção para ambos os reatores ocorreu nas menores concentrações. Já para o glicerol, os maiores consumos foram observados nas maiores concentrações. Entretanto, em todas as fases os reatores apresentaram uma boa performance com relação ao consumo de carboidrato e glicerol, fornecendo consumos acima de 95%, como pode ser observado na Tabela 3.

Como os dois reatores apresentaram altas porcentagens de conversão, conclui-se que a temperatura não interferiu na atividade dos microrganismos com relação ao consumo dos substratos.

Tabela 3 – Concentração afluente e remoção de DQO, carboidrato e glicerol no RS-T e RS-M

Reator sequencial termofílico – RS-T						
Fase	Concentração afluente de DQO ($mgDQO.L^{-1}$)	Remoção de DQO (%)	Concentração afluente de carboidrato ($mg.L^{-1}$)	Remoção de carboidrato (%)	Concentração afluente de glicerol ($mg.L^{-1}$)	Remoção de glicerol (%)
1	2.361,1 ± 300,8	89,4 ± 9,6	732,9 ± 93,4	97,4 ± 1,2	930,3 ± 211,7	95,3 ± 1,2
2	5.176,0 ± 629,9	95,2 ± 3,3	1.141,4 ± 357,0	97,6 ± 0,8	1.986,3 ± 260,0	97,9 ± 0,3
3	7.296,1 ± 951,9	93,9 ± 2,0	1.375,6 ± 532,7	95,3 ± 3,5	3.071,0 ± 280,0	98,5 ± 0,2
4	10.404,1 ± 816,7	95,3 ± 1,2	1.519,9 ± 637,9	95,1 ± 1,7	3.962,0 ± 417,3	98,9 ± 0,1
Reator sequencial mesofílico – RS-M						
Fase	Concentração afluente de DQO ($mgDQO.L^{-1}$)	Remoção de DQO (%)	Concentração afluente de carboidrato ($mg.L^{-1}$)	Remoção de carboidrato (%)	Concentração afluente de glicerol ($mg.L^{-1}$)	Remoção de glicerol (%)
1	2.378,9 ± 314,2	85,5 ± 14,6	743,7 ± 114,4	97,2 ± 1,3	964,9 ± 206,2	95,3 ± 1,4
2	5.043,4 ± 659,2	94,4 ± 6,4	1.118,6 ± 358,5	97,1 ± 1,5	2.014,1 ± 262,5	97,8 ± 0,4
3	7.400,8 ± 868,9	97,9 ± 1,1	1.384,4 ± 606,8	97,2 ± 1,3	3.091,6 ± 386,6	98,7 ± 0,2
4	10.355,7 ± 920,9	97,4 ± 3,3	1.464,9 ± 688,2	95,7 ± 2,7	3.909,3 ± 449,0	99,0 ± 0,2

O rendimento de metano juntamente com o conteúdo de CH_4 no biogás, obtidos nas diferentes TCO aplicadas no RS-T e RS-M estão expostos na Figura 2. No RS-T o aumento da TCO ocorreu de maneira adequada e favoreceu o rendimento de metano, porém, o máximo rendimento médio ocorreu na TCO de 7.500 $mgDQO.L^{-1}.d^{-1}$ correspondendo a 276,5 mL de $CH_4.gDQO^{-1}_{cons}$. A respeito do conteúdo de CH_4 no biogás, comportamento contrário ao do rendimento foi observado. Dessa forma, conforme acréscimos na TCO foram realizados, menor tornava-se a parcela de metano no biogás. Assim, a porcentagem de CH_4 decaiu de 71,5% para 65,5% quando a TCO passou de 2 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$ para 7,5 $gDQO.L^{-1}.d^{-1}$.

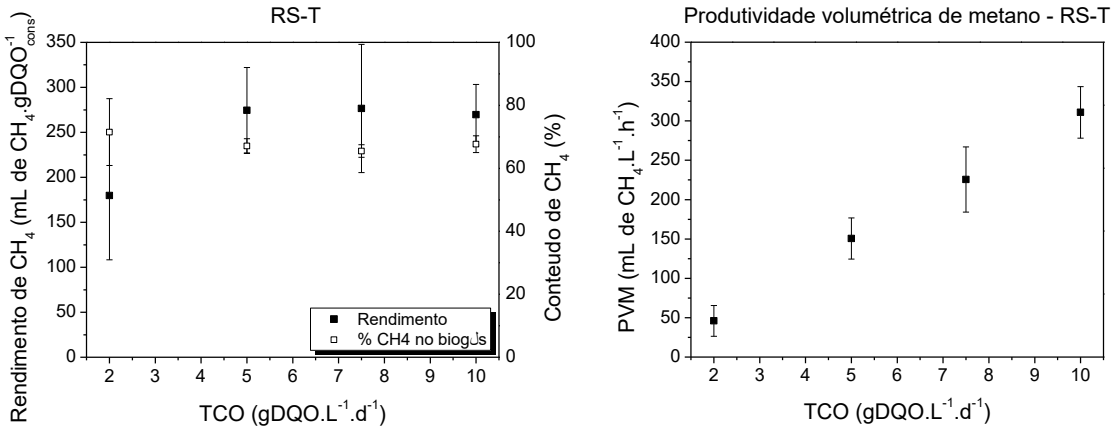
Comportamento similar foi observado no RS-M, com o maior rendimento obtido na TCO de 7.500 $mgDQO.L^{-1}.d^{-1}$ fornecendo 263,1 mL de $CH_4.gDQO^{-1}_{cons}$ e apresentando decréscimos na porcentagem de metano presente no biogás com o aumento da TCO. Assim, o conteúdo de metano no biogás passou de 78,2% para 68,3%. Ao comparar os resultados obtidos nos reatores sequenciais verificou-se que os dois reatores apresentaram atuação semelhante e os valores de rendimento e conteúdo de metano também foram bem próximos.

A produção volumétrica de metano também foi analisada, com os valores correspondentes a cada reator sequencial nas diferentes fases estudadas apresentados na Figuras 2.

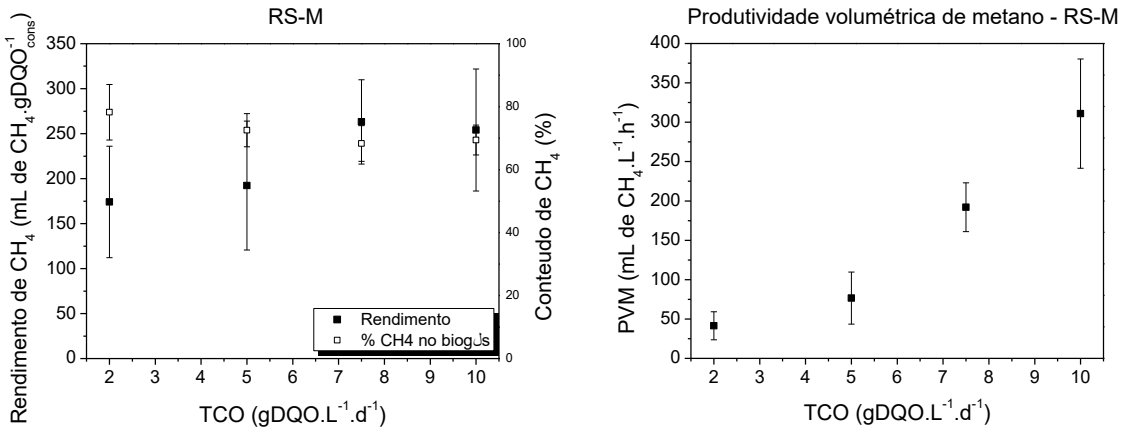
Como pode ser visto na Figura 2, os reatores se comportaram de forma semelhante em resposta ao aumento da TCO, exibindo maiores produções volumétricas de CH_4 quanto mais elevada fosse a carga orgânica imposta. Tal fato ocorreu devido a maior disponibilidade de fontes de carbonos para os microrganismos realizarem suas atividades metabólicas.

Assim, na TCO de 10.000 $mgDQO.L^{-1}.d^{-1}$ a produtividade volumétrica de metano no RS-T e RS-M foram, respectivamente, 310,9 ± 32,8 mL de $CH_4.L^{-1}.h^{-1}$ e 310,9 ± 69,3 mL de $CH_4.L^{-1}.h^{-1}$ ou 7,46 L de $CH_4.L^{-1}.d^{-1}$.

Rivero et al. (2014) realizando a operação em duas fases com uma mistura de lodo de esgoto e glicerol bruto obtiveram rendimentos semelhantes aos observados neste trabalho (27 mL de H_2.gDQO^{-1} e 276,5 mL de CH_4.gDQO^{-1}), fornecendo 26 mL de H_2.gDQO^{-1} e 290 mL de CH_4.gDQO^{-1} obtidos em TCO 7,82 gDQO.L^{-1}.d^{-1}, similar a TCO empregada nesta pesquisa (7,5 gDQO.L^{-1}.d^{-1}). A produção volumétrica de hidrogênio e metano apresentada pelos autores foram iguais a 0,07-0,09 L de H_2.L^{-1}.d^{-1} e 1,55-1,78 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1}. Os resultados alcançados nas melhores condições neste trabalho foram 3,9 L de H_2.L^{-1}.d^{-1} e 7,46 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1}, realizados na temperatura termofílica, como já dito anteriormente. Os resultados de Rivero et al. (2014) com relação a produção volumétrica são muito inferiores aos obtidos na co-digestão de soro de queijo e glicerol, apesar da TCO aplicada ser similar. Entretanto, o reator utilizado foi do tipo CSTR enquanto neste estudo utilizou-se reator RALF, dessa forma, tal fato pode ter influenciado a produtividade do processo devido ao grau de mistura e transferência de massa apresentados pelo RALF.



a)



b)

Figura 2 – Rendimento, conteúdo e produtividade volumétrica de metano no reator sequencial a) termofílico b) mesofílico

Conclusões

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que a co-digestão do soro de queijo com o glicerol é uma alternativa viável para o tratamento e recuperação energética desses subprodutos, oferecendo bom rendimento e produtividade de H_2 e CH_4 ao comparar com resultados da literatura. Além disso, pode-se confirmar as vantagens dos processos em dois estágios com a produção simultânea de H_2 e CH_4 obtendo rendimento de 27 mL de H_2.gDQO^{-1} e produtividade de 3,90 L de H_2.L^{-1}.d^{-1} no reator acidogênico

termofílico e rendimento de 276,5 mL de CH_4.gDQO^{-1} e produtividade de 7,46 L de CH_4.L^{-1}.d^{-1} no reator sequencial termofílico. Ao comparar o rendimento de metano obtido na operação em dois estágios com a operação em estágio único, o reator sequencial termofílico foi o reator que apresentou o maior desempenho de rendimento de CH_4, sendo este 11% e 5,1% maior do que os obtidos nos reatores metanogênico de um estágio e sequencial mesofílico. Verifica-se que além de ser mais eficiente para recuperação energética de H_2 e CH_4, a operação em dois estágios também promoveu um tratamento mais eficaz da matéria orgânica, com maiores remoções de DQO do que o alcançado no processo em estágio único. Assim, a remoção total obtida no processo sequencial ao considerar o reator acidogênico e o reator sequencial torna-se 94,2%, enquanto o reator metanogênico de um estágio consumiu 87,7% nas melhores condições.

Referências Bibliográficas

Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2008. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. Ind. Eng. Chem. Res. 47, 5227–5233.

Barros, A.R., Amorim, E.L.C., Reis, C.M., Shida, G.M., Silva, E.L., 2010. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. Int. J. Hydrogen Energy 35, 3379–3388.

Bondioli, P., Bella, L. Della, 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 153–157.

Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Yue, L., Liu, J., Zhou, J., Cen, K., 2016. Fermentative biohydrogen and biomethane co-production from mixture of food waste and sewage sludge: Effects of physiochemical properties and mix ratios on fermentation performance. Appl. Energy 184, 1–8.

Costa, T.B., 2017. Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol bruto e cultura mista em reatores anaeróbios de leio fluidizado termofílicos. Universidade Federal de São Carlos.

Dareioti, M.A., Kornaros, M., 2015. Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a two-stage CSTR system: Effect of hydraulic retention time Margarita. Bioresour. Technol. 175, 553–562.

Del Nery, V., 1987. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Universidade de São Paulo.

Ding, L., Cheng, J., Xia, A., Jacob, A., Voelklein, M., Murphy, J.D., 2016. Co-generation of biohydrogen and biomethane through two-stage batch co-fermentation of macro- and micro-algal biomass. Bioresour. Technol. 218, 224–231.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Fountoulakis, M.S., Petousi, I., Manios, T., 2010. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. Waste Manag. 30, 1849–1853.

Kim, S.-H., Han, S.-K., Shin, H.-S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochem. 41, 199–207.

Lopes, H.J.S., Ramos, L.R., Silva, E.L., 2017. Co-fermentation of cheese whey and crude glycerol in EGSB reactor as a strategy to enhance continuous hydrogen and propionic acid production. Appl. Biochem. Biotechnol. 183, 712–728.

Lovato, G., Albanez, R., Stracieri, L., Zaiat, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2017. Design study of an AnSBBR for hydrogen production by co-digestion of whey with glycerin: Interaction effects of organic load, cycle time and feed strategy. Int. J. Hydrogen Energy 42, 9567–9576.

Lovato, G., Albanez, R., Triveloni, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2019. Methane Production by co-digesting vinasse and whey in an AnSBBR: Effect of mixture ratio and feed strategy. Appl Biochem Biotechnol 187, 28–46.

Lovato, G., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., Zaiat, M., 2016. Co-digestion of whey with glycerin in an AnSBBR for biomethane production. Appl. Biochem. Biotechnol. 178, 126–143.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renew. Sustain. Energy Rev. 45, 540–555.

Najafpour, G., Komeili, M., 2010. Bioconversion of cheese whey to methane in an upflow anaerobic packed bed bioreactor. Chem. Biochem. Eng. 24, 111–117.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy 38, 54–62.

Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. J. Environ. Manage. 110, 48–68.

Ramos, L.R., 2016. Aplicação de biorreatores anaeróbios em diferentes temperaturas para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias agroindustriais. Universidade Federal de São Carlos.

Rivero, M., Solera, R., Perez, M., 2014. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy 39, 2481–2488.

Rodrigues, C.V., 2016. Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel. Universidade Estadual Paulista.

Rosa, P.R.F., 2014. Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação acidogênica de águas residuárias agroindustriais em reator anaeróbio de leito fluidizado. Universidade Federal de São Carlos.

Silvestre, G., Fernández, B., Bonmatí, A., 2015. Addition of crude glycerine as strategy to balance the C/N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. Bioresour. Technol. 193, 377–385.

Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2009. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. Bioresour. Technol. 100, 3713–3717.

Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresour. Technol. 100, 6339–6346.

PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE BIOCOMBUSTÍVEIS EM REATORES ANAERÓBIOS EM BATELADA, A PARTIR DO GLICEROL BRUTO E DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ

Andreza Borba da Silva [1]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [2]; Edson Luiz Silva [3]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *O glicerol bruto, pode ser utilizado como matéria prima renovável e de baixo custo para a produção de compostos com alto valor agregado, como o butanol. O hidrogênio também é considerado um candidato favorável a substituto para os combustíveis fósseis. O projeto consistirá em dois estudos que serão desenvolvidos separadamente. O primeiro deles compreende na produção fermentativa de butanol, a partir do glicerol bruto. O outro objetiva a produção fermentativa de hidrogênio, aplicando casca de café como substrato. Ambos serão realizados em reatores em batelada, com diferentes concentrações de substratos, para a produção de butanol será 15, 25 e 35 g.L^{-1} de glicerol bruto, a temperatura também será variada, dentro da faixa termofilica (45, 55 e 65°C) e o pH (4.5, 5.5 e 6.5). Para a produção de hidrogênio será realizada uma co-digestão, utilizando as concentrações de 2, 6 e 10 g.L^{-1} de casca de café e 10, 20 e 30 g DQO L^{-1} de água residuária, variando também o pH (5.5, 6.5 e 7.5) e a presença de extrato de levedura nos reatores, com intuito de verificar a influência desses fatores e estabelecer as melhores condições para a produção dos compostos de interesse desta pesquisa.*

Introdução

A maior parte da energia global é produzida a partir de combustíveis fósseis, resultando em mudanças climáticas devido a emissão de CO_2 na atmosfera. A utilização frequente de fontes não renováveis favorece o esgotamento de fontes naturais de energia. Em contrapartida, a demanda energética está em ascensão devido ao crescimento exponencial da população. Com a utilização de energias renováveis, os problemas relacionados com combustíveis fósseis podem ser reduzidos e a produção mundial de energia pode aumentar. Neste contexto, o aproveitamento de subprodutos e biomassa vegetal para produção fermentativa de biocombustíveis é uma alternativa promissora.

O butanol é um biocombustível alternativo e renovável que se tornou atrativo devido às suas propriedades vantajosas como combustível e por possuir mais semelhanças com a gasolina quando comparado com outros biocombustíveis, como o etanol (Shorgani et al. 2016). Além disso, segundo Yadav et al. (2014), o butanol apresenta um alto teor de energia, baixa pressão de vapor, é menos corrosivo e pode ser usado diretamente ou misturado com a gasolina. Porém, os custos de produção de butanol artificial estão diretamente relacionados ao mercado de propileno e são sensíveis ao preço do petróleo bruto. Com isso, processos biológicos como a fermentação anaeróbia pode ser uma alternativa atraente para atender a demanda global de butanol.

Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol, uma vez que o mercado atual não é suficiente para consumir a grande produção dessa substância, e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário buscar alternativas para utilização desse resíduo, de modo a estabilizar o preço e a oferta do biodiesel e do seu subproduto (Leoneti et al., 2012).

De acordo com Taconi, Venkataramanan e Johnson (2009), o glicerol bruto, subproduto da produção de biodiesel, pode ser utilizado como matéria prima renovável e de baixo custo para a produção de compostos com alto valor agregado, como o butanol. A

conversão de glicerol em vários compostos pode ser realizada por processos químicos e biológicos. A conversão biológica se sobressai quando comparada à conversão química devido ao maior rendimento e seletividade, condições normais de reação e uso de catalisadores biológicos de menor custo (Khanna, et al. 2012). A via de fermentação anaeróbia de glicerol pode resultar na produção de vários produtos, incluindo 1,3-propanodiol, ácido acético, ácido butírico, ácido lático, butanol e etanol (Taconi, Venkataramanan e Johnson, 2009).

Embora o glicerol seja estruturalmente semelhante aos açúcares, o carbono no glicerol está em um maior estado reduzido. Comparado com a glicose, a fermentação de glicerol gera o dobro de redução equivalentes que devem ser oxidados, resultando em maiores rendimentos de compostos mais reduzidos, como butanol, etanol e 1,3-propanodiol (Taconi, Venkataramanan e Johnson, 2009).

Além do butanol, o hidrogênio é considerado um candidato favorável a substituto para os combustíveis fósseis. Assim como foi citado anteriormente na conversão de glicerol, os processos biológicos são considerados mais atrativos, quando comparados com os processos químicos, por serem uma alternativa ecológica para satisfazer às futuras demandas de hidrogênio.

Segundo Guo et al. (2010), a produção de biohidrogênio a partir de resíduos agrícolas é vantajosa, tendo em vista que esses resíduos são abundantes, baratos, renováveis e altamente biodegradáveis. Além disso, considerando-se que os resíduos agrícolas são substratos complexos e podem ser degradados biologicamente, a produção de hidrogênio a partir de resíduos de culturas, resíduos da pecuária e resíduos da indústria de alimentos é uma boa alternativa.

A indústria do café é uma das maiores do mundo e gera águas residuárias com grande quantidade de compostos orgânicos de alta resistência, como consequência desse mercado, milhões de toneladas de resíduos são gerados por ano durante o processamento de grãos de café. Esse resíduo ainda não possui uma aplicação especifica, sendo principalmente queimado ou lançado no meio ambiente. No entanto, contêm vários componentes que podem ser de valor para aplicação em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. O interesse em reutilizar esses resíduos aumentou nos últimos anos, devido as preocupações com os fatores ambientais (Conde e Mussatto, 2016). Devido ao alto conteúdo energético, esse resíduo é ideal para recuperar bioenergia, especialmente para a produção de hidrogênio, durante o processo de tratamento (Jung, Kim e Shin, 2010).

O resíduo sólido, gerado no processamento do café, é composto por carboidratos (35 – 85%), celulose (16 - 43%), hemicelulose (7 - 29%) e lignina (9 - 28,3%) (Bondesson, 2015; Gouvea et al., 2009). Durante a digestão anaeróbia desse resíduo podem ser observada algumas limitações durante a fase hidrolítica, tendo em vista que a lignocelulose é um substrato complexo composto por lignina, carboidratos, pectina, proteínas, cinzas, sais e minerais que requere da atividade de uma ampla variedade de enzimas agindo sinergicamente para sua hidrólise (Van Dyk e Pletschke, 2012). Nesse caso, se faz necessária a aplicação de pré-tratamentos físicos e químicos para facilitar acesso aos polissacarídeos fermentáveis, uma vez que contribuem a redução da cristalinidade, desestruturação da lignina e hemicelulose e redução do tamanho da partícula (Van Dyk e Pletschke, 2012).

Na etapa de pré-tratamento é realizada a ruptura da lignina e da estrutura cristalina da celulose, facilitando o acesso das enzimas durante a hidrólise (Behera et al., 2014). Os pré-tratamentos podem ser classificados como físicos (moagem e irradiação), químicos (ácido, básico, agentes oxidantes e solventes orgânicos) físico-químicos (explosão a vapor, hidrotérmico e oxidação úmida) e biológicos (utilizando consórcios microbianos ou fungos degradadores da lignina) (Ahmad et al., 2018; Behera et al., 2014).

Além da casca, a água residuária do processamento de café possui um elevado teor de carboidratos (Gómez et al., 2011), principal substrato para as bactérias fermentativas, e

material lignocelulósico, como a celulose, hemicelulose e lignina, que podem ser degradados por microrganismos anaeróbios (Quéméneur et al., 2012; Nissilä et al., 2014).

Em virtude destas considerações, o projeto consistirá em dois estudos que serão desenvolvidos de forma distinta. O primeiro deles compreende na produção fermentativa de butanol, a partir do glicerol bruto. O outro objetiva a produção fermentativa de hidrogênio, aplicando casca e água residuária do café como substrato. Ambos serão realizados em reatores em batelada.

Material e Métodos

Na primeira etapa do experimento, os ensaios serão realizados visando a produção de butanol, a partir do glicerol bruto e, em seguida, na segunda etapa da pesquisa, será analisada a produção de hidrogênio, utilizando o resíduo do processamento do café como substrato.

O substrato que será utilizado nesta pesquisa, para a produção de butanol, é o glicerol bruto bidestilado, proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada na cidade de Brotas/SP. A casca e água residuária do café, que serão utilizadas para a produção fermentativa de hidrogênio, foram coletadas na fazenda "Da lagoa" (Pedregulho, São Paulo) no início da temporada de safra (Maio/2019), após o processamento via úmida dos grãos de café. A água residuária foi coletada e armazenada em frascos plásticos, transferida para o laboratório e será mantida em freezer a -10 °C até o seu uso. Antes de ser utilizada, a casca de café será moída até atingir tamanho de partícula entre 0,05 e 1,2 mm, utilizando moinho de facas e, em seguida, serão testadas hidrólises com ácido, base e peróxido de hidrogênio, como pré-tratamento.

A fonte de inóculo que será utilizada nos reatores em batelada para a produção de butanol será proveniente de lodo granulado de reator anaeróbio termofílico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB‑lodo fermentativo-metanogênico) localizado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), para o tratamento de vinhaça. A fim de se obter comunidades produtoras de hidrogênio o lodo será submetido a um pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia adaptada de Kim et al. (2006). Para a produção de hidrogênio, será utilizado um consórcio microbiano autóctone, obtido mediante simulação do processamento do café por via úmida, para isso será utilizada a água residuária e o resíduo de polpa e casca in natura.

Serão utilizados reatores em batelada, em frascos Duran de 2 litros, contendo 50% de headspace (1L) preenchido com nitrogênio (100%), e 50% (1L) de volume reacional. Em todos os ensaios, os reatores serão colocados sob agitação rotatória de 150 rpm (Domingues, 2001).

Para a produção de butanol serão utilizadas as concentrações de 15, 25 e 35 $g.L^{-1}$ de glicerol bruto. Além da concentração, a temperatura também será variada, dentro da faixa termofilica (45, 55 e 65°C) e o pH (4.5, 5.5 e 6.5). Para a produção de hidrogênio será realizada uma co-digestão, utilizando a casca e a água residuária do processamento do café, serão testadas as concentrações de 2, 6 e 10 $g.L^{-1}$ de casca de café e 10, 20 e 30 g DQO L^{-1} de água residuária, variando também o pH (5.5, 6.5 e 7.5) e a presença de extrato de levedura nos reatores, com intuito de verificar a influência desses fatores e estabelecer as melhores condições para a produção dos compostos de interesse desta pesquisa.

Para a produção fermentativa de butanol, a partir do glicerol bruto, o meio nutricional utilizado como referência será o de Khanna, Goval e Moholkar (2012), e para a produção fermentativa de hidrogênio, a casca de café será enriquecida com algumas soluções de nutrientes (Del Nery, 1987) prévio à fermentação natural, como fonte de macro e micronutrientes.

Para realização das análises será utilizada a metodologia descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater da APHA (2012). Serão avaliados os parâmetros: pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais e voláteis (SST/SSV). A concentração de carboidratos totais e de glicerol das amostras serão determinadas por meio

dos métodos colorimétricos descrito por Dubois et al. (1956) e Bondioli e Della Bella (2005), respectivamente.

A produção volumétrica do biogás gerado será realizada de acordo com a metodologia proposta por Walker et al. (2009). A análise de composição do biogás produzido será feita por cromatografia gasosa. As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, e capróico) e álcoois (etanol, metanol e n-butanol) será avaliada por técnica de cromatografia líquida utilizando HPLC Shimadzu (Rosa et al. 2014).

Referências Bibliográficas

Ahmad, F., Silva, E.L., Varesche, A.M.B., 2018. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion – A review. Renew. Sustain. Energy Rev, v. 98, p. 108–124.

Akutsu, Y., Li, Y.Y., Harada, H., Yu, H.Q., 2009. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. International Journal of Hydrogen Energy, v.34, p. 2558-2566.

Al- Shorgani, N. K. N., Shukor, H., Abdeshahian,P., Kalil, M. S., Yusoff, W. M. W., Hamid, A. A.; 2016. Enhanced butanol production by optimization of médium parameters using clostridium acetobutylicum ym1. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 25, p. 1308-1321.

APHA, AWWA, WPCF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition, American Public Health Association, Washington.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renew. Sustain. Energy Rev. v. 36, p. 91–106.

Bondioli, P., Della Bella, L., 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Technol, v. 107, p. 153 – 157.

Bondesson, E., 2015. A nutritional analysis on the by- product coffee husk and its potential utilization in food production. Universidade Sueca de Ciências Agrárias.

Conde, T., Mussatto, S., 2016. Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment, Preparative Biochemistry and Biotechnology, v. 46:4, p. 406-409.

Del Nery, V., 1987. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Universidade de São Paulo.

Domingues, M.R, 2001. Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas. Universidade de São Paulo.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem, v. 28, p. 350–356.

Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M.E., Escapa, A., Morán, A., 2011. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. Bioresour. Technol, v., 102, p. 8621–8627.

Guo, X.M.; Trably, E.; Latrille, E.; Carre`re, H.; Steyer, J, P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 10660-10673.

Gouvea, B.M., Torres, C., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Oliveira, E.S., 2009. Feasibility of ethanol production from coffee husks. Biotechnol. Lett, v. 31, p. 1315–1319

Jung, K., Kim, D., Shin, H., 2010. Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 13370-13378.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochemistry, v. 41, n. 1, p.199-207.

Khanna, S., Goyal A., Moholkar V., 2012. Bioconversion of Biodiesel Derived Crude Glycerol by Immobilized Clostridium pasteurianum: Effect of Temperature. International Journal of Chemical and Biological Engineering, v. 6, p. 289-292.

Nissilä, M.E., Lay, C.H., Puhakka, J.A., 2014. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. Biomass and Bioenergy, v. 67, p. 145–159.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrre, H., Trably, E., 2012. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. Int. J. Hydrogen Energy, v. 37, p. 3150–3159

Rosa, P.R.F., Santos, S.C., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014. Hydrogen Production from Cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of Hydraulic Retention Time on the Microbial Community Compositon, International Journal of Hydrogen Energy, v. 161, p. 10-19.

Taconi, K. A., Venkataramanan, K. P., Johnson, D. T., 2009. Growth and Solvent ProductionVby Clostridium pasteurianum ATCC 6013TM Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. Environmental Progress & Sustainable Energy, v.28 n-1, p- 100-110.

Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. Biotechnol, v. 30, p. 1458–1480.

Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresour. Technol, v.100, p. 6339 – 6346.

Yadav, S., Rawat, G., Tripathi, P., Saxena R.K., 2014. A novel approach for biobutanol production by clostridium acetobutylicum using glycerol: a low cost substrate. Renewable Energy, v.71, p. 37-42.

PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE BIOGÁS UTILIZANDO SORO DE QUEIJO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO

Schayanna C. de A. Macário [1]; Edson Luiz Silva [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *A produção sequencial de hidrogênio e metano a partir do soro de queijo foi estudada em temperatura mesofílica e termofílica. Para o alcance desse objetivo, quatro reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF) foram operados de forma contínua, sendo: um metanogênico de fase única (RMT), um acidogênico (RAT) e dois metanogênicos sequenciais (um termofílico = RST; e um mesofílico = RSM). Nos reatores metanogênicos a concentração afluente de soro variou de 2 a 10 g* L^{-1} *e o tempo de detenção hidráulica (TDH) foi fixado em 24 h. Enquanto que no RAT a concentração adotada foi 10 g DQO* L^{-1}*, o TDH foi mantido em 4 h e a taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO) foi 60 g DQO* $L^{-1}d^{-1}$*. A máxima produtividade volumétrica 7,0 L de* CH_4 d^{-1} L^{-1}*, o maior rendimento 247,8 mL de* CH_4 *g* DQO^{-1} *e o maior conteúdo de* CH_4 *na composição do biogás 67,9% foram alcançados na TCO de 10,0 g* $DQO.L^{-1}d^{-1}$ *pelo RMT. A aplicação de elevada TCO se mostrou favorável para produção de metano. No RAT o conteúdo máximo de* H_2 *no biogás foi 61,5% e o rendimento médio máximo obtido foi 5,4 mol de* $H_2.mol.carb^{-1}$.

Introdução

A busca por fontes de energia limpa é um dos grandes desafios ambientais da atualidade. Dentro desse cenário, o hidrogênio pode ser considerado como uma alternativa promissora para solução dessa problemática. Isto porque sua combustão gera água como produto e, concomitantemente, apresenta uma densidade energética de aproximadamente 122 kJ g^{-1}, o que representa cerca de 2,75 vezes mais que a energia obtida por hidrocarbonetos (Lay et al., 1999). Outro aspecto favorável do gás hidrogênio é o fato dele poder ser obtido a partir de fontes renováveis, tais como, utilizando águas residuárias agroindustriais em processos anaeróbios.

O soro de queijo é um dos diferentes tipos de resíduos que podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de biogás (Rosa, 2014). Ele é um subproduto do leite, obtido durante a produção de queijo ou de caseína e apresenta uma potencialidade de aplicação em processos anaeróbios elevada, devido a sua alta capacidade de degradação. E apesar de ser um considerado um subproduto da indústria de laticínios, existe um grande excedente de soro que não é utilizado. Em escala mundial, por exemplo, estima-se que apenas 50% do soro de queijo produzido é reaproveitado (Carvalho et al., 2013). Este número reduz ainda mais nas unidades produtoras de pequeno e médio porte. Portanto, a utilização desse composto para a produção de hidrogênio é uma alternativa bastante conveniente por aliar produção de bioenergia à adequação ambiental do resíduo (Lima, 2016).

No entanto, o principal problema relativo ao potencial poluidor dos efluentes, geralmente não é resolvido no estágio de produção de hidrogênio, uma vez que a remoção de matéria orgânica é muito baixa durante o processo (Van Ginkel et al., 2005).

Por outro lado, a geração de metano envolve necessariamente remoções significativas de matéria orgânica, porque os ácidos e outros produtos remanescentes gerados durante a produção de hidrogênio constituem os principais substratos para produção desse gás. Deste modo, um processo de produção sequencial torna-se interessante, pois a produção de hidrogênio e metano poderá ocorrer acoplada com a redução do potencial poluidor da água residuária utilizada (Peixoto, 2011).

Diversos trabalhos avaliaram a produção de hidrogênio a partir do soro de queijo (Silva et al., 2019; Castelló et al., 2018; Ottaviano et al., 2017; Lima et al., 2015; Rosa et al., 2014; Ottaviano, 2014; Gioannis et al., 2014; Perna et al., 2013; Azbar et al., 2009; Davila-Vazquez et al., 2008) e comprovaram o potencial desse substrato na geração de bioenergia. No entanto, a maior parte dos estudos já realizados não investigaram o potencial desse substrato num sistema fermentativo de duas fases, utilizando reatores contínuos em diferentes faixas de temperatura. Logo, a inexistência de pesquisas com esse tema dificulta avanços comparativos nessa área específica de conhecimento.

Portanto, diante de tudo que foi exposto o presente trabalho busca avaliar a produção sequencial de hidrogênio e metano utilizando o soro de queijo, em reatores anaeróbios de leito fluidizado. Propondo também a investigação da influência da temperatura no sistema.

Material e Métodos

Reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF)

O aparato experimental possui quatro reatores anaeróbio de leito fluidizado, sendo três reatores com a finalidade de produzir CH_4 e um reator com o objetivo de produzir H_2.

Um reator metanogênico foi operado separado dos demais, por isso foi chamado de reator de fase única. Já a instalação dos outros reatores foi realizada de modo estratégico para que fosse possível operar um reator acidogênico e na sequência dois reatores metanogênicos, sendo um mesofílico e outro termofílico. Foi definida a seguinte nomenclatura dos reatores:

Tabela 1 – Nomenclatura dos reatores desta pesquisa

Reator	**Nome**
Metanogênico fase única termofílico	RMT
Acidogênico termofílico	RAT
Metanogênico Sequencial Termofílico	RST
Metanogênico Sequencial Mesofílico	RSM

Substrato

O reator metanogênico fase única foi alimentado com solução de soro diluído para as concentrações de 2g a 10g DQO.L^{-1} que foram variando no decorrer das fases. Foi adicionado bicarbonato de sódio para o controle do pH efluente entre a faixa de 7,50 a 8,50 e um complemento nutricional de acordo com Del Nery (1987). A mesma alimentação foi realizada inicialmente nos metanogênicos sequenciais, porém, após período de estabilização eles passaram a ser alimentados apenas com o efluente do acidogênico e bicarbonato.

O reator acidogênico foi alimentado com água residuária sintética de soro de queijo diluída para concentração de 10g DQO L^{-1}, suplementado com Del Nery e foi adicionado NaOH para o controle do pH efluente entre a faixa de 4,0 a 4,4.

O soro de queijo em pó utilizado como substrato nesta pesquisa foi fornecido pela empresa Leitesol®, que funciona em Bragança Paulista - SP. As informações nutricionais do soro são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Informação nutricional do soro de queijo

Valor energético	**375Kcal (1591 kj)**
Carboidratos	76,5 g
Proteínas	11,0 g
Gorduras Totais	1,5 g
Gorduras Saturadas	0,72 g
Gorduras Trans	0,03 g
Fibra Alimentar	0 g
Sódio	450,0 mg

Inóculo e material suporte

O lodo de um reator UASB da Avícola Dakar S/A (Tietê/SP) foi utilizado como inóculo do reator sequencial mesofílico. Enquanto que na partida dos reatores termofílicos foi utilizado o lodo granular produzido num reator UASB termofílico, operados para o tratamento de vinhaça na Usina São Martinho, localizada em Pradópolis - SP. No entanto, antes de inocular no reator acidogênico foi realizado um pré tratamento térmico do inóculo supracitado conforme a metodologia aplicada por Kim et al. (2006).

Como material suporte foram utilizados a argila expandida e o pneu triturado, sendo o primeiro para o acidogênico e o segundo para os metanogênicos. As características principais da argila expandida utilizada são: dimensão entre 2,8 – 3,35mm; densidade de 1,06 $g.cm^{-3}$ e porosidade de 23% (Amorim et al., 2009). Os pneus triturados tinham dimensão de aproximadamente 3-5 mm e antes de serem colocados nos reatores as partículas foram mergulhadas em solução sulfocrômica por 40 minutos, posteriormente foram lavadas com água, secas e mergulhadas em ácido nítrico concentrado por 50 minutos. Em seguida passaram por mais uma lavagem e foram secadas em estufa à 40º C, para aumentar a rugosidade das partículas. Este procedimento foi realizado três vezes conforme Barros (2009).

Análises para monitoramento

As análises do pH foram realizadas em conformidade com a metodologia do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998) bem como a Demanda Química de oxigênio (DQO).

Enquanto que a quantificação de lactose fora determinada pelo método colorimétrico proposto por DuBois et al. (1956). E as medidas de ácidos voláteis totais e alcalinidade total por bicarbonato seguiram a metodologia proposta por Dillalo e Albertson (1961).

As determinações dos ácidos orgânicos e álcoois foram feitas de acordo com Moraes et al. (2000). Para tanto, foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu GC-17A com detector de ionização de chama e coluna Nukol (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme).

Resultados e Discussão

Reatores metanogênicos

As características das fases operacionais bem como os resultados obtidos de conversão de carboidrato, remoção de DQO e Produtividade Volumétrica de Metano dos reatores metanogênicos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Conversão de carboidrato, remoção de DQO e PVM por fase.

Fase	TDH (h)	TCO ($g.DQO.L^{-1}.d^{-1}$)	Conversão de carboidrato (%)	Remoção de DQO (%)	PVM (L de $CH_4.d^{-1}.L^{-1}$)
RMT					
1	24	2	98,0 ± 1,4	82,7 ± 16,9	0,3 ± 0,1
2	24	5	97,9 ± 1,1	87,4 ± 5,4	1,3 ± 0,8
3	24	7,5	98,2 ± 0,5	82,7 ± 4,9	4,9 ± 2,0
4	24	10	95,1 ± 2,1	79,1 ± 7,5	7,0 ± 2,3
RST					
1	24	2	97,0 ± 0,7	68,5 ± 3,8	0,3 ± 0,2
2	24	5	97,3 ± 0,7	83,0 ± 10,1	1,3 ± 0,7
3	24	7,5	97,2 ± 2,3	91,1 ± 3,0	3,3 ± 1,5
4	24	10	96,9 ± 1,7	93,3 ± 3,9	5,2 ± 2,3
RSM					
1	24	2	96,5 ± 1,0	82,3 ± 14,3	0,2 ± 0,2
2	24	5	98,2 ± 0,7	87,3 ± 6,0	3,2 ± 2,5
3	24	7,5	97,8 ± 0,9	93,3 ± 4,4	4,9 ± 2,2
4	24	10	97,4 ± 1,67	96,5 ± 2,4	5,3 ± 2,4

Conforme apresentado na Tabela 3, ocorreu uma pequena redução (82,7% para 79,1%) na média da remoção de DQO do RMT com o aumento da TCO aplicada. O contrário ocorreu nos reatores RST e RSM (sequenciais), os quais aumentaram sua eficiência média de remoção de DQO no decorrer da operação de 68,5% para 93,3% e 82,3% para 96,5%, respectivamente.

Ainda sobre a DQO, ressalta-se que a remoção realizada pelos reatores sequenciais foi maior do que a observada no reator metanogênico de fase única. Tal desempenho pode ser justificado pelo fato de que os reatores sequenciais foram alimentados com o efluente do acidogênico, e, portanto, seu alimento já havia passado por um tratamento prévio.

Na análise dos resultados obtidos da conversão de carboidratos foi observada uma similaridade na conversão dos três reatores metanogênicos, obtendo valores acima de 96,5% ao longo de todas as fases. O que comprova a fácil degradação da lactose, bem com a viabilidade do tratamento anaeróbio para esse tipo de substrato (neste estudo, o soro de leite foi composto por 76,5% de carboidratos de acordo com o fabricante LeiteSol®).

O aumento da PVM nos reatores RMT, RST e RSM mediante o acréscimo da TCO aplicada também foi evidenciado na Tabela 3. O que indica que o processo não foi inibido mesmo com o aumento da concentração de substrato.

Outro ponto analisado foi o fato de que RMT apresentou uma produtividade maior (7,0 L de $CH_4.d^{-1}L^{-1}$) do que os reatores RST e RSM (± 5,2 L de $CH_4.d^{-1}L^{-1}$).

Os resultados dos rendimentos de CH_4 dos reatores metanogênicos e o conteúdo de CH_4 no biogás observados neste trabalho são apresentados a seguir nas Figura 1, 2 e 3.

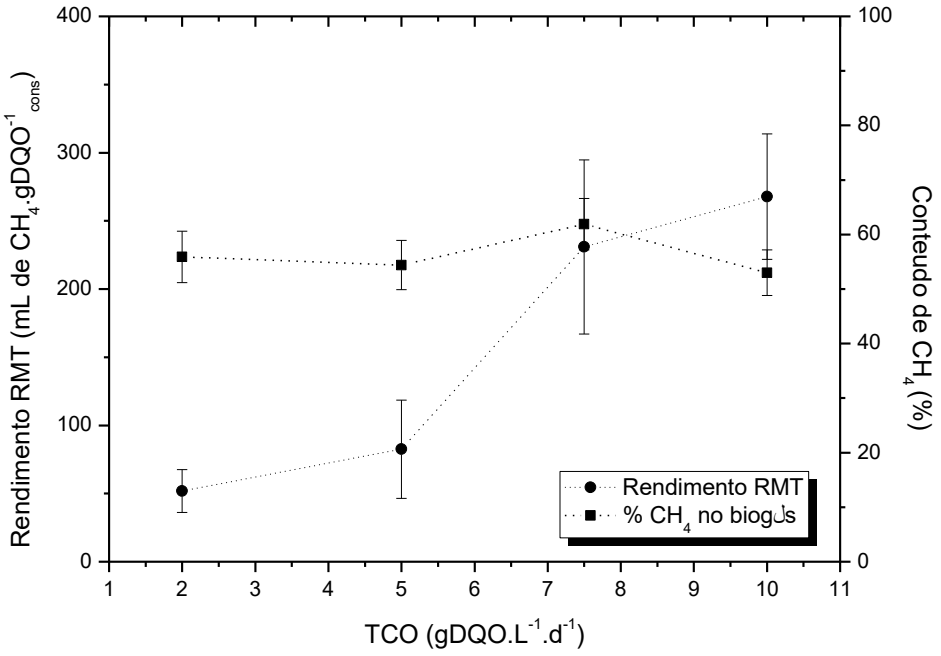


Figura 1 – Rendimento e conteúdo de metano no reator metanogênico termofílico de fase única (RMT)

O rendimento médio de CH_4 observado na Figura 1 no RMT, apresentou um crescimento conforme o aumento da TCO, variando de 51,9 a 267,8 mL de CH_4 $gDQO^{-1}$ ao aumentar a TCO de 2,0 para 10,0 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$. Verificou-se ainda, pequena variação dos valores do conteúdo de CH_4 na composição do biogás ao longo desse período (entre 53,0 e 61,9%).

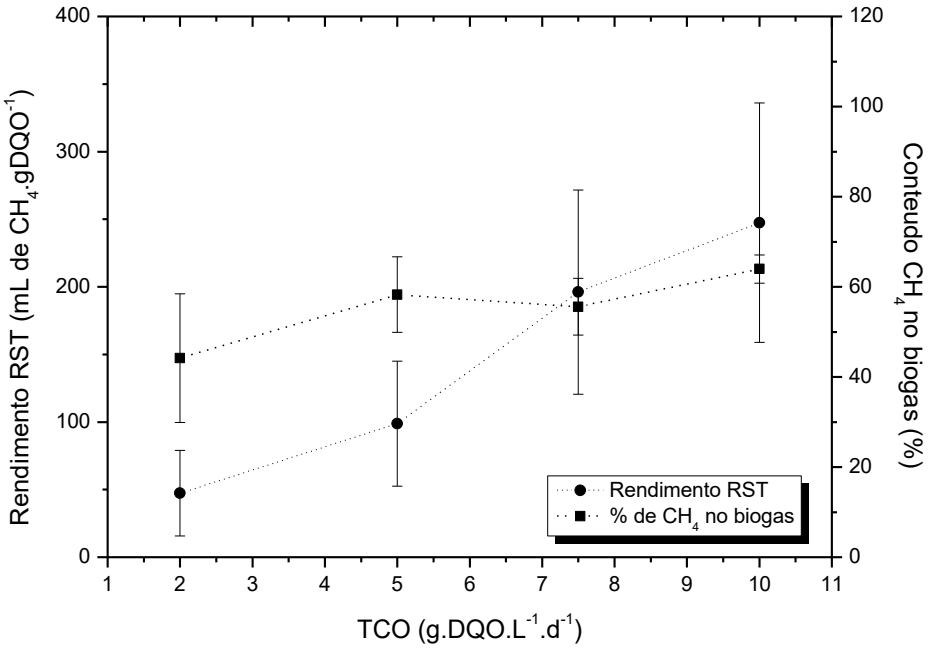


Figura 2 - Rendimento e conteúdo de metano no Reator Sequencial Termofílico (RST)

Assim como no RMT, o rendimento médio de CH_4 observado na Figura 2 referente ao RST, apresenta um contínuo crescimento conforme o aumento da TCO, variando de 47,4 a 247,4 mL de CH_4 gDQO^{-1} ao elevar a TCO de 2,0 para 10,0 gDQO.L^{-1}d^{-1}.

Ainda observando a Figura 2, verifica-se que os valores do conteúdo de CH_4 aumentaram mediante o acréscimo da TCO (de 44,2 e 64,0% de CH_4 no biogás) apresentando um pequeno decréscimo na TCO de 7,5 gDQO.L^{-1}d^{-1}.

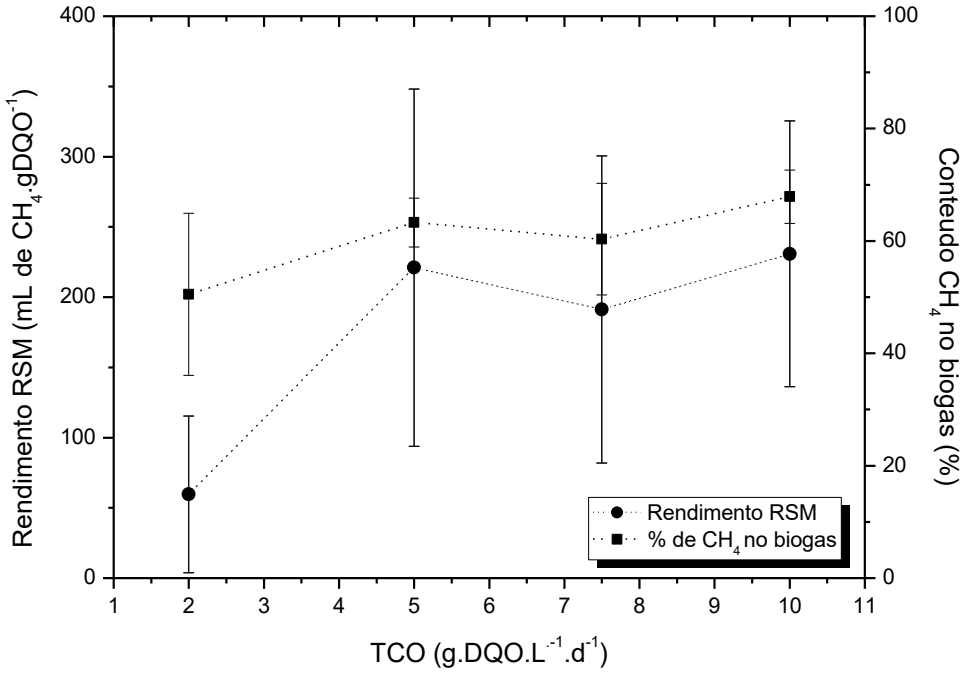


Figura 3 - Rendimento e conteúdo de metano no Reator Sequencial Mesofílico (RSM)

Na Figura 3 observa-se que o rendimento médio de CH_4 no RSM seguiu a mesma tendência dos outros reatores metanogênicos, apresentando um crescimento conforme o aumento da TCO (de 59,6 a 230,8 mL de CH_4 $gDQO^{-1}$ ao elevar a TCO de 2,0 para 10,0 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$).

No entanto, vale ressaltar que houve uma queda no rendimento durante a fase em que a TCO foi de 7,5 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$ porém, posteriormente com o aumento para 10,0 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$ o reator se recuperou.

Resultados aproximados foram obtidos por Lovato et al. (2019), utilizando o soro de queijo, um rendimento de 11,3 mol de $CH_4.kgDQO^{-1}$ foi alcançado num reator AnSBBR.

De acordo com a Figura 3, evidencia-se também que os valores do conteúdo de CH_4 no biogás apresentaram comportamento similar ao rendimento, aumentaram com a elevação da TCO (de 50,5 a 67,9%), mas houve uma pequena redução na TCO de 7,5 $gDQO.L^{-1}d^{-1}$.

Deste modo, na comparação entre os reatores operados de forma sequencial, o RST (termofílico) apresentou melhores resultados de rendimento quando comparado ao RSM (mesofílico). No quesito produtividade os reatores tiverem resultados bastante semelhantes.

Ao comparar a produção sequencial e em fase única, foi evidenciado que o RMT (fase única) forneceu maiores rendimentos e produtividade se comparado com os reatores sequenciais. No entanto, essa diferença foi de aproximadamente 8,2%, não sendo, portanto, tão relevante. Tais resultados divergem dos obtidos por Mota et al. (2018), Fuess et al. (2017) e Ferraz Júnior et al. (2016), pois os autores obtiveram melhores resultados de remoção de matéria orgânica e produção energética no sistema de dois estágios combinando.

Reator acidogênico

Os resultados obtidos de conversão de carboidrato, remoção de DQO, Produtividade Volumétrica de Hidrogênio (PVH) e rendimento de hidrogênio, bem como o conteúdo de H_2 no biogás, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Conversão de carboidrato, remoção de DQO, produtividade volumétrica, rendimento e conteúdo de H_2 no biogás do Reator Acidogênico Termofílico (RAT)

TDH (h)	**TCO ($g.DQO.L^{-1}.d^{-1}$)**	**Conversão de carboidrato (%)**	**Remoção de DQO (%)**	**PVH ($L\ de\ H_2.d^{-1}.L^{-1}$)**	**Rendimento ($mol\ H_2.mol\ carb^{-1}$)**	**Conteúdo de H_2 no biogás (%)**
4	60	39,7 ± 8,5	15,6 ± 9,8	6,3 ± 2,1	5,4 ± 1,7	61,5 ± 10,4

De acordo com a Tabela 4 é observado uma baixa remoção média de DQO (15,6%) o que já é esperado devido ao fato da fase acidogênica converter substratos complexos em outros compostos orgânicos. Assim como verificado por Antonopoulou et al. (2008) ao operar um reator CSTR mesofílico no TDH de 24 h utilizando soro como substrato, removeu apenas cerca de 5% da DQO.

Com relação ao consumo de carboidratos o reator apresentou uma média de 39,7%.

O rendimento médio de hidrogênio obtido foi de 5,4 mol de $H_2.mol.carb^{-1}$, conforme apresentado na Tabela 4.

Observa-se ainda que ao longo da operação do reator acidogênico, o hidrogênio representou em média 61,5% do conteúdo do biogás produzido.

Ottaviano (2014) operou dois reatores termofílicos tratando soro de queijo, denominados R1 e R2, no qual R1 manteve-se com concentração fixa de 5 $gDQO.L^{-1}$, com variações de TDH e em R2 o TDH manteve-se fixo em 6 horas e foram variadas as concentrações. A autora verificou a máxima PVH de 2,9 $L.h^{-1}.L^{-1}$ em R1 para o TDH de 0,5 hora. No entanto, verificou-se a diminuição do rendimento de hidrogênio a medida em que foram sendo aplicados TDH's reduzidos, sendo o valor máximo de 3,3 $molH_2.mol^{-1}$ lactose para o TDH de 4 horas. Para R2, o valor máximo de PVH de 0,854 $L.h^{-1}.L^{-1}$ encontrado para

concentração de substrato de 7 $g.L^{-1}$. Quanto ao rendimento de H_2, o maior valor obtido foi de 2,6 $molH_2.mol^{-1}$ lactose na concentração de 3 $g.L^{-1}$, uma vez que o aumento da concentração causou a diminuição de HY. O conteúdo de hidrogênio no biogás manteve-se na faixa de 48,2-54,2% e 39,8-48,4% para R1 e R2 respectivamente.

Rosa (2014) também utilizou soro de queijo para produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios, obtendo como rendimento máximo 3,2 $mmolH_2.gDQO^{-1}$ ao aplicar um TDH de 6h e concentração de 3 $g.L^{-1}$.

Ambas as autoras (Rosa, 2014; Ottaviano, 2014) encontraram resultados inferiores aos obtidos nesta pesquisa.

Ainda sobre o reator acidogênico estudado no presente trabalho, é importante salientar que não foi evidenciado a presença de CH_4 no biogás produzido ao longo da operação, logo, entende-se que o pré tratamento aplicado ao inóculo para inibição das arqueias metanogênicas foi eficiente.

Conclusões

Os reatores sequenciais mesofílico e termofílico (RST e RSM) obtiveram resultados satisfatórios e bastante semelhante nos parâmetros estudados neste trabalho e, portanto, entende-se que nas condições adotadas, a temperatura não influenciou significativamente na produção de CH_4.

Porém, o reator metanogênico de fase única (RMT) operado sob condições termofílicas, apresentou os melhores resultados de rendimento e produtividade. No entanto, não foram valores expressivamente maiores que os obtidos pelos reatores sequenciais.

Portanto, considerando a adequação ambiental (ou seja, a eficiência na remoção de DQO), bem como a possibilidade de o sistema também produzir o gás hidrogênio, conclui-se que os reatores sequenciais possuem um maior potencial para produção de biogás.

Referências Bibliográficas

Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2008. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. Ind. Eng. Chem. Res. 47, 5227–5233.

Amorim, E.L.C., Barros, A.R., Damianovic, M.H.R.Z., Silva, E.L., 2009. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. International Journal of Hydrogen Energy, 34(2), 783-790.

Azbar, N., Dokgoz, F.T.C., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. International Journal of Hydrogen Energy, 34(17), 7441-7447.

Barros, A.R., 2009. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. Universidade Federal de São Carlos.

below 3.0: Is it possible? Water Res. 128, 350–361.

Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., 2013. Chesse whey wastewater: Characterization and treatment. Science of the Total Environment. 445, 385–396.

Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., Etchebehere, C., 2018. Possible causes for the instability in the H2 production from cheese whey in a CSTR. International Journal of Hydrogen Energy, 43(5), 2654-2665.

Davila-vazquez, G., Alatriste-Mondragon, F., de Leon-Rodriguez, A., Razo-Flores, E., 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. International Journal of Hydrogen Energy, 33(19), 4989-4997.

Del Nery, V., 1987. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Dillalo, R, Albertson, O.E., 1961. Volatile acids by direct titration. Jornal Water Pollution Control Federeation. 33, 356-365.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Ferraz Júnior, A.D.N., Koyama, M.H., de Araújo Júnior, M.M., Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. Renew. Energy 89, 245–252.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Ferraz, A.D.N., Persinoti, G.F., Squina, F.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixedbed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. Appl. Energy 189, 480–491.

Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Spiga, D., 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. International Journal of Hydrogen Energy, 39(36), 20930-20941.

Kim, S., Han, S. Shin, H., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production an 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochemistry. 41, 199-207.

Lay, J.J., Lee, Y.J., Noike, T., 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. Water Research. 33, 2579 - 2586.

Lima, D. M. F., Inoue, R. K., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., 2015. Biohydrogen from cheese whey treatment in an AnSBBR: achieving process stability. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 32(2), 397-408.

Lima, D.M.F., 2016. Produção de biohidrogênio a partir de soro de leite em AnSBBR com recirculação da fase líquida., 2016. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Lovato, G., Albanez, R., Triveloni, M., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2019. Methane Production by co-digesting vinasse and whey in an AnSBBR: Effect of mixture ratio and feed strategy. Appl Biochem Biotechnol 187, 28–46.

Moraes, E.M., Adorno, M.A., Zaiat, M., Foresti, E., 2000. Determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis por Cromatografia em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando Resíduos Líquidos e Sólidos. Anais da Oficina e Seminário Latino Americano sobre Digestão Anaeróbia Recife – 05 a 09 de Novembro. II, 146-149.

Mota, V.T., Ferraz Júnior, A.D.N., Trably, E., Zaiat, M., 2018. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible?. Water research, 128, 350-361.

Ottaviano, L. M., Ramos, L. R., Botta, L. S., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L., 2017. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. International Journal of Hydrogen Energy, 42(8), 4848-4860.

Ottaviano, L.M., 2014. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado a partir de água residuária de soro de queijo em condição termófila. Universidade de São Paulo.

Peixoto, G., 2011. Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais. Universidade de São Paulo.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. Int. J. Hydrogen Energy 38, 54–62.

Rosa, P. R. F., 2010. Produção de probióticos com Lactobaccilus imobilizados em alginato de cálcio empregando soro de queijo. Universidade Federal de Uberlândia.

Rosa, P.R.F., Santos, S.C., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. Bioresource technology, 161, 10-19.

Silva, A. N., Macêdo, W. V., Sakamoto, I. K., Pereyra, D. L. A. D., Mendes, C. O., Maintinguer, S. I., Amorim, E. L. C., 2019. Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. Biomass and Bioenergy, 120, 257-264.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation.

Van Ginkel, S.W., Oh, S.E., Logan, B.E., 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. International Journal of Hydrogen Energy, v. 30, p. 1535-1542.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE HIDROGÊNIO E METANO EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO EM TEMPERATURAS MESOFÍLICA E TERMOFÍLICA

Lívia Maciel Massula [1]; Edson Luiz Silva [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da concentração de glicerol na produção sequencial de hidrogênio e metano utilizando reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF) em temperatura termofílica (55° C) e mesofílica (25° C). O RALF acidogênico termofílico foi operado na concentração de 10 g.L^{-1} e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 h, e obteve um teor de 59,6% H_2, uma produtividade volumétrica de* 3,04 $L_{H2}.d^{-1}.V^{-1}_{reator}$ e um rendimento de H_2 de 0,60 $mol_{H2}.mol^{-1}_{glicerol}$. *Os RALF metanogênicos variaram a concentração de 2,0 a 10 g.L^{-1} com TDH fixo em 24h. O RALF metanogênico sequencial (55° C) obteve valores máximos de teor de CH_4 (87,2% CH_4)* e de rendimento de CH_4 (1,40 $mol_{CH4}.mol^{-1}_{glicerol\ consumido}$) para as concentrações de 2 e 5 $g_{glicerol}.L^{-1}$, respectivamente. *O RALF metanogênico sequencial (25° C) obteve valores máximos de teor de CH_4 (59,1% CH_4)* e de rendimento de CH_4 (0,69 $mol_{CH4}.mol^{-1}_{glicerol\ consumido}$) para a concentração de 2 $g_{glicerol}.L^{-1}$. *O RALF metanogênico não-sequencial (55° C) obteve valores máximos de teor de CH_4 (84,7% CH_4)* e de rendimento de CH_4 (1,12 $mol_{CH4}.mol^{-1}_{glicerol\ consumido}$) também na concentração de 2 $g_{glicerol}.L^{-1}$.

Introdução

Com o intuito de diminuir a dependência aos combustíveis fósseis e favorecer fontes renováveis de energia, pesquisas têm sido direcionadas ao uso de resíduos industriais visando possíveis combustíveis oriundos de biomassa (Ullah Kahn et al., 2017). Diante este cenário, a indústria do biodiesel tem se destacado nacionalmente pois entre os seus subprodutos encontra-se o glicerol, que apesar de ser utilizado nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos como aditivo (Ooi et al., 2011), tem encontrado saturação no mercado devido sua elevada produção (Anitha et al., 2016).

Assim, uma das alternativas possíveis é a utilização do glicerol como substrato orgânico para a fabricação de outros compostos químicos com maior valor agregado, como o 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, ácidos orgânicos (ácido succínico, ácido cítrico, ácido propiônico, ácido lático, ácido glicérico) e lipídeos (Vivek et al., 2017). Além destes, destacam-se o hidrogênio e o metano devido ao seu potencial como combustível limpo, já que sua combustão gera uma quantidade apreciável de energia com pouco ou nenhum resíduo.

O tipo de reator empregado e os parâmetros utilizados influenciam diretamente nas rotas metabólicas dos microrganismos presentes no reator, favorecendo a produção de determinados compostos em detrimento de outros. A produção de hidrogênio (Kanchanasuta and Sillaparassamee, 2017; Marone et al., 2015; Pachapur et al., 2015) e metano (Simm et al., 2018; Vlassis et al., 2013; Zhang et al., 2015) é possível em diferentes reatores fermentativos, como o reator de leito fluidizado (RALF), o reator de manta de lodo (UASB) e o reator de leito fixo (Reis, 2010).

O RALF favorece a transferência de massa entre o afluente e a biomassa aderida ao suporte devido à fluidização do leito, levando a elevadas eficiências de remoção de DQO para TDH relativamente baixos (Shida, 2008). Trabalhos anteriores do LCAII indicaram o potencial da conversão de glicerol em hidrogênio e metano em RALF (Costa, 2017; Simões, 2017), onde avaliaram condições que favorecem a produção destes compostos separadamente. A produção de cada um dos compostos implica uma série de vantagens própria: na produção de hidrogênio, obtém-se um combustível extremamente energético e cujo principal resíduo de

combustão é a água; na produção de metano, gera-se um gás combustível e obtém-se remoções de matéria-orgânica muito maiores do que na produção de hidrogênio, diminuindo o potencial poluidor do efluente (Van Ginkel et al., 2005). A utilização de sistemas sequenciais permite obter globalmente as vantagens de ambos os processos, pois realiza-se a produção de cada um dos compostos segundo as suas respectivas condições de operação ótimas (Peixoto, 2011).

Tendo visto que poucos estudos investigam o uso do glicerol para a produção conjugada de dois compostos através de um sistema fermentativo sequencial, o presente trabalho vem suprir tal lacuna, avaliando a produção biológica de hidrogênio e metano utilizando as seguintes estratégicas operacionais: 1) RALF acidogênico termofílico (55 °C); 2) Dois RALF metanogênicos em temperaturas distintas (55 °C e 25 °C respectivamente), que são alimentados pelo efluente do RALF acidogênico; 3) RALF metanogênico termofílico para controle do processo. Todos os reatores foram operados pela mesma concentração de afluente, que variou entre 2,0 a 10 g L^{-1}, com TDH 4h para acidogênico e 24h para os metanogênicos.

Material e Métodos

Meio de cultivo

Os reatores termofílicos foram inoculados com lodo granular produzido num reator UASB anaeróbio termofílico operado para o tratamento de vinhaça na Usina São Martinho, em Pradópolis/SP. O inóculo do reator acidogênico, por sua vez, foi submetido a um pré-tratamento térmico visando a inibição de arqueias metanogênicas, conforme reportado por Kim, Han e Shin (2006). Já o reator mesofílico foi inoculado com lodo granular anaeróbio de um reator UASB utilizado no tratamento de águas residuárias oriundas da Avícola Dakar S/A, em Tietê/SP.

O substrato utilizado para alimentar os reatores acidogênico e metanogênico de controle operacional é o glicerol bruto diluído em água potável até atingir a DQO desejada. Tal glicerol é bidestilado, proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica (Brotas – SP). Ainda com a finalidade de suprir todas as necessidades metabólicas dos microrganismos foi adicionado um meio nutricional específico para o acidogênico, proposto por Barbirato et al. (1995), além de uma solução de elementos traço proposta por Biebl et al. (1998) e outro para metanogênico controle proposta por Del Nery (1987). Os reatores metanogênicos sequenciais sãos alimentados com o efluente do reator acidogênico sem a necessidade de meio nutricional uma vez que naquele já foi adicionado anteriormente.

Condições operacionais

A Figura 1 apresenta a montagem experimental do sistema utilizado neste trabalho. O sistema é constituído de quatro RALF, cujas características específicas de operação foram os produtos finais esperados. Fizeram parte do processo sequencial o acidogênico em temperatura termofílica 55 °C (± 2°C) e dois reatores metanogênicos em diferentes temperaturas, um termofílico e outro mesofílico de 25° C (± 2°C), sendo estes dois últimos alimentados com o efluente do primeiro. Desvinculado desse sistema, operou-se um quarto reator metanogênico termofílico e seu desempenho foi empregado como controle e comparação para o processo sequencial.

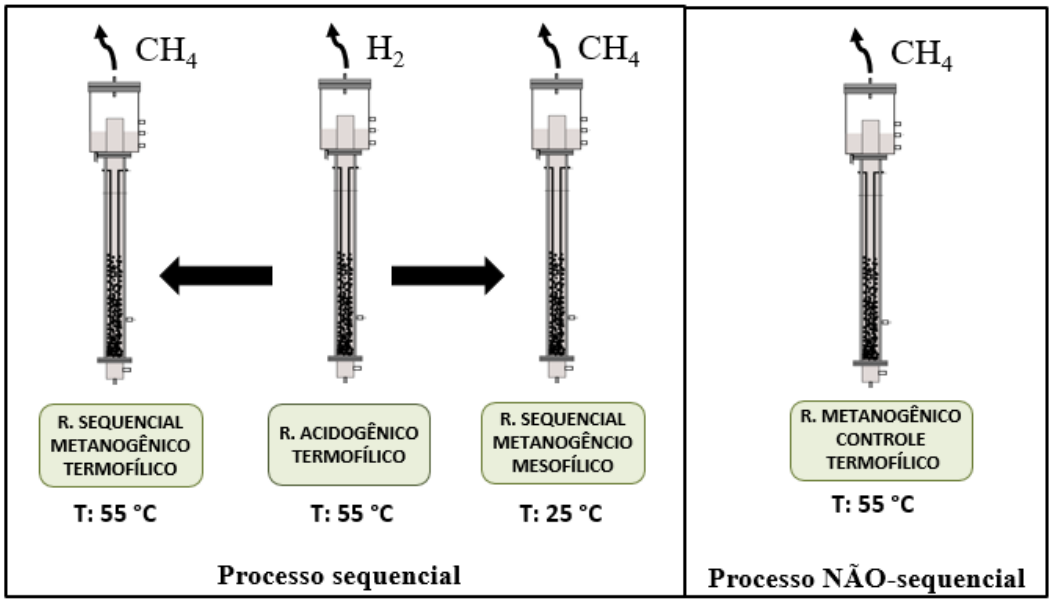


Figura 1: Reatores Anaeróbios de Leito Fluidizado (RALF).

Para o controle da temperatura termofílica foi utilizado um banho termostático (Marconi, modelo MA-184) onde a água com a temperatura desejada é recirculada pela camisa externa dos reatores. Os reatores são alimentados por meio de bomba dosadora (EXATTA, modelo EX00504) de afluente previamente preparado e a recirculação é realizada por uma bomba diafragma (ECOSAN) com o intuito de homogeneizar o meio e fluidizar o leito com 1,3 vezes a velocidade de mínima fluidização.

Na Tabela 1 é exposto resumidamente as condições em que os reatores foram operados. O parâmetro de estudo avaliado foi a concentração de glicerol em TDH constante, o que levou a diferentes valores de TCO (Tabela 2). Desta forma, cada fase de operação dos reatores correspondeu a uma TCO distinta, sendo que a estabilidade da eficiência de redução da DQO foi tomada como critério para mudança de fase.

Tabela 1: Parâmetros de processo para cada reator.

Reator	**Sigla**	**T (°C)**	**Concentração ($g\ L^{-1}$)**	**TDH (h)**	**pH**	**Material suporte**
Acidogênico Termofílico	AcT	55	10	4	4,5 – 5,5	Cinasita
Seq. Metanogênico Termofílico	SMT	55	2/5/7,5/10	24	7,0 – 8,0	Pneu triturado
Seq. Metanogênico Mesofílico	SMM	25	2/5/7,5/10	24	7,0 – 8,0	Pneu triturado
Metanogênico Termofílico Controle	MTc	55	2/5/7,5/10	24	7,0 – 8,0	Pneu triturado

Tabela 2: Equivalência entre concentração de glicerol e TCO para TDH 24h.

Concentração ($g.L^{-1}$)	2	5	7,5	10
TCO ($g\ DQO.L^{-1}.d^{-1}$)	2	5	7,5	10

A fim de garantir a adesão e imobilização da biomassa, foram adotados materiais suportes distintos para os reatores: cinasita (argila expandida) para o reator acidogênico (Amorim et al., 2009) e pneu triturado para os metanogênicos (Barros and Silva, 2012). Os demais parâmetros (pH, TDH e temperatura) foram escolhidos visando o melhor desempenho do processo, de acordo com os trabalhos reportados na literatura e com os trabalhos em andamento no LCAII.

Métodos analíticos

As análises de pH, demanda química de oxigênio (DQO) e glicerol foram realizadas segundo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater da APHA et al. (2005). A produção volumétrica do biogás gerado foi mensurada pelo método da proveta invertida Walker et al. (2009) e sua composição foi determinada por cromatografia gasosa. Para isso, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Shimadzu modelo GC-2010, Japan) nas seguintes condições: temperatura do injetor: 220ºC, temperatura do detector: 230ºC, temperatura da coluna: 130ºC, fluxo do gás de arraste (Argônio): 5,66 $mL.min^{-1}$.

Resultados e Discussão

Processo Acidogênico

Os principais resultados obtidos durante a operação do reator AcT são apresentados na Tabela 3. A remoção de DQO obtida foi de apenas 8,1%. Tal resultado já era esperado, uma vez que a fase acidogênica realiza a conversão do substrato com baixa remoção de DQO (Ramos and Silva, 2018). A conversão de glicerol obtida também está coerente de acordo com os valores reportados em trabalhos anteriores do LCAII (Costa, 2017; Simões, 2017), nos quais a conversão permaneceu abaixo de 50%. Com relação ao biogás produzido, foram obtidos valores de %H2 e HY pouco inferiores aos valores reportados por Costa (2017): 70,4 ± 2,6% H_2 e 0,94 ± 0,05 mol $H_2.mol^{-1}_{glicerol}$, respectivamente. Todavia, a produtividade volumétrica obtida neste trabalho apresentou um aumento de 400% com relação aos resultados do mesmo autor nas mesmas condições experimentais (0,60 ± 0,04 $L_{H2}.d^{-1}.V^{-1}_{reator}$).

Tabela 3: Resumo do desempenho do reator acidogênico (AcT).

REATOR ACIDOGÊNICO (AcT)			
Remoção DQO (%)	8,1 ± 2,7	HY' ($mol_{H2}.g^{-1}_{DQO}$)	1,73 ± 0,53
Conversão Glicerol (%)	31,11 ± 5,45	HY ($mol_{H2}.mol^{-1}_{glicerol}$)	0,60 ± 0,11
$\%H_2$	59,6 ± 0,40	PVH ($L_{H2}.d^{-1}.V^{-1}_{reator}$)	3,04 ± 0,77

Processo Metanogênico

A Figura 2 exibe os dados de conversão de glicerol em função da TCO para os reatores sequenciais (SMT e SMM) e para o reator MTc. É possível notar que, para níveis mais baixos de TCO, os valores de remoção de glicerol são equivalentes para os três reatores. À medida que a TCO aumenta, a conversão dos reatores sequenciais se mantém elevada, acima de 97%, enquanto que o reator MTc apresenta uma queda considerável. Além disso, pode-se verificar que valores mais elevados de TCO implicam em maiores valores de desvio-

padrão para todos os reatores, o que pode ser um indício de uma redução da estabilidade da conversão de glicerol com o aumento da TCO.

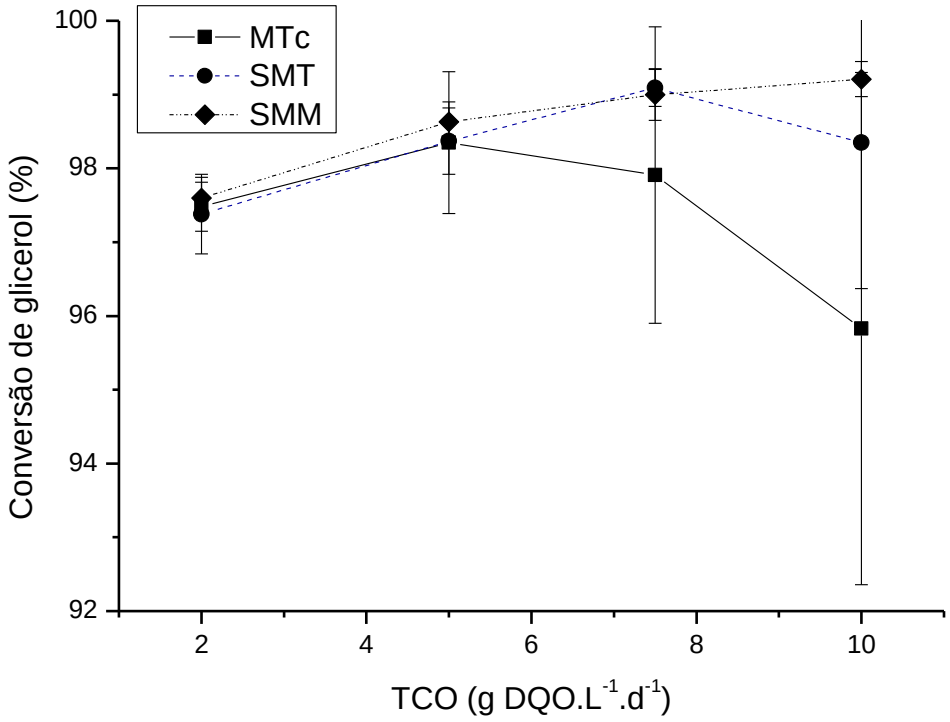


Figura 2: Conversão de glicerol (%) para os reatores metanogênicos.

A Figura 3 exibe o comportamento da remoção de DQO em função a TCO. É possível notar que o aumento da TCO tem impacto deletério sobre a remoção de DQO para o reator MTc, mas os reatores sequenciais apresentaram boa estabilidade da remoção de DQO com esse aumento. O reator SMT apresentou uma maior remoção de DQO que o reator SMM, o que é um indicativo de que temperaturas termofílicas favorecem maiores remoções de DQO.

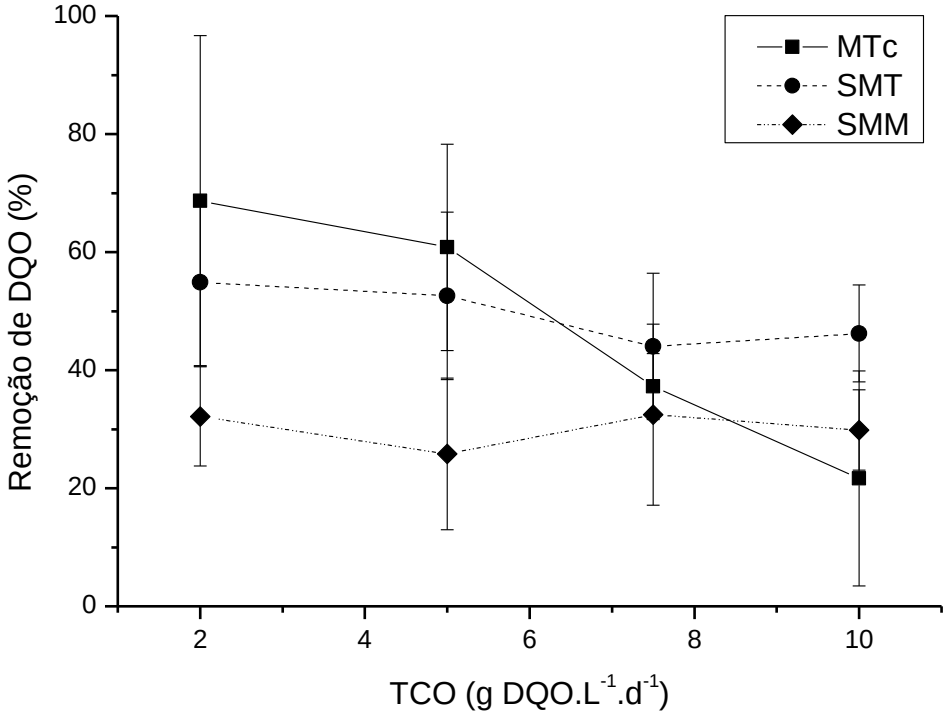


Figura 3: Remoção de DQO (%) para os reatores metanogênicos.

O biogás produzido pelos reatores metanogênicos era composto sobretudo por CO_2 e CH_4. A Figura 4 exibe o teor de CH_4 no biogás produzido em função da TCO. É possível constatar dois efeitos distintos a partir destes dados, semelhantes aos efeitos constatados para a remoção de DQO. Primeiramente, nota-se que o aumento da TCO promoveu a redução do teor de CH_4 no biogás produzido pelos reatores sequenciais, enquanto que o reator MTc também apresentou uma redução do teor de CH_4 mas de forma muito mais drástica. Este seria um indicativo de que os sistemas sequenciais são menos sensíveis a mudanças de TCO. Além disso, os reatores sequenciais apresentaram tendências similares, porém a operação em temperatura termofílica favoreceu maiores valores de $\%CH_4$ em todas as TCO.

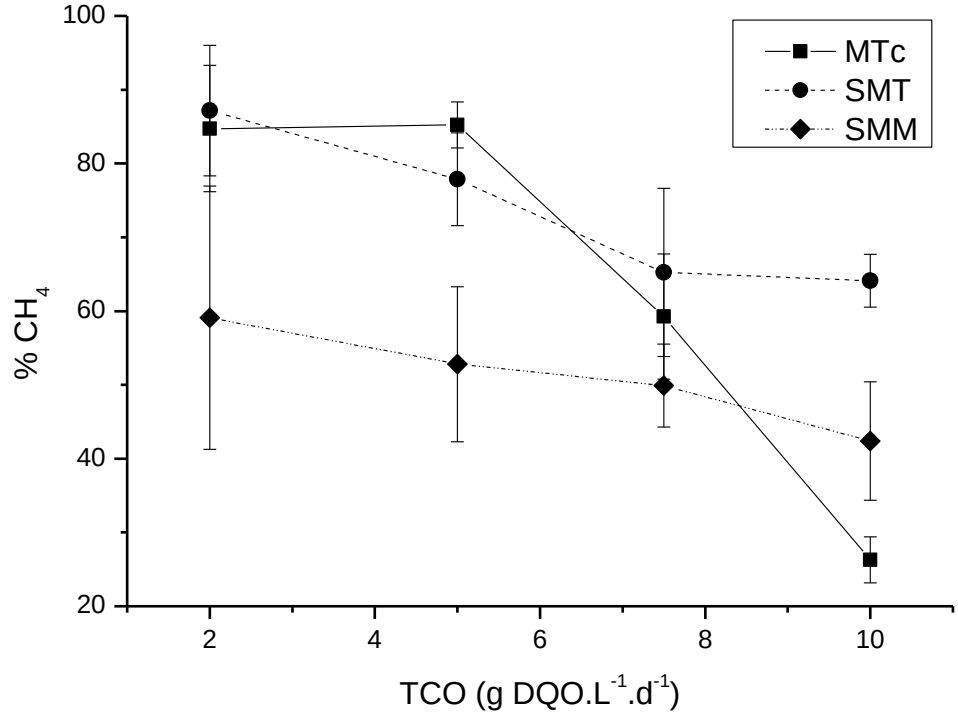


Figura 4: Teor de CH_4 no biogás produzido para os reatores metanogênicos.

O rendimento de CH_4 em função do glicerol removido é apresentado na Figura 5. O reator MTc apresentou a diminuição de MY com o aumento da TCO, enquanto que os reatores sequenciais (SMT e SMM) oscilaram em torno de um mesmo nível de MY. De fato, diferentes valores de MY são obtidos de acordo com a rota metabólica adotada durante o processo. Caso a fermentação anaeróbia ocorra de forma completa, o valor teórico máximo de MY é de 1,75 mol CH_4.mol$^{-1}_{\text{glicerol consumido}}$, conforme indicado pela reação abaixo (Buswell and Sollo, 1948):

$$C_3H_8O_3 \rightarrow 1{,}75\ CH_4 + 1{,}25\ CO_2 + 0{,}5\ H_2O$$

Todavia, o acúmulo de ácido acético no sistema pode levar a uma redução do valor de MY para 0,75 mol CH_4.mol$^{-1}_{\text{glicerol consumido}}$, segundo a reação (Zhang et al., 2015):

$$C_3H_8O_3 \rightarrow CH_3COOH + 0{,}75\ CH_4 + 0{,}25\ CO_2 + 0{,}5\ H_2O$$

Portanto, podemos assumir que o reator SMT adotou uma rota metabólica mais próxima da rota ideal, enquanto que o reator SMM adotou preferencialmente a rota do ácido acético. Além disso, o aumento da TCO teria levado a uma mudança da rota metabólica do reator MTc, passando da rota ideal em baixas TCO para a rota do ácido acético em TCO mais elevadas. Apesar desta medida fornecer um indicativo das rotas metabólicas adotadas, a análise dos metabólitos solúveis se faz necessária para confirmar tal hipótese.

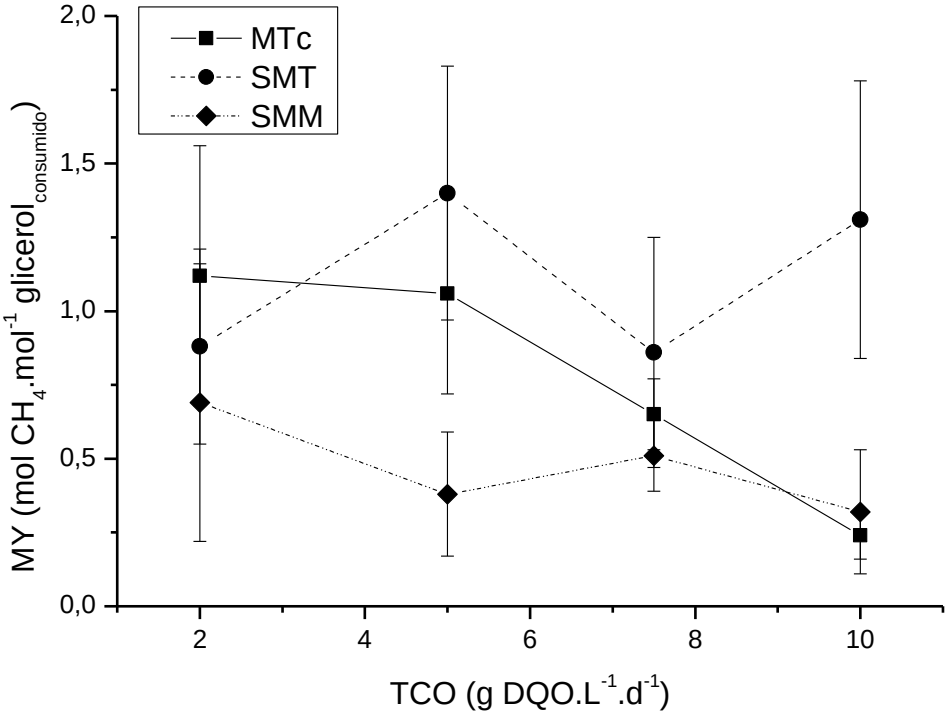


Figura 5: Rendimento de metano em função do consumo de glicerol para os reatores metanogênicos.

Além do rendimento de CH_4, uma forma de avaliar a quantidade de CH_4 produzido é a produtividade volumétrica de metano (PVM), apresentada na Figura 6. É possível notar que até 5 g $DQO.L^{-1}.d^{-1}$ de TCO, os reatores termofílicos (MTc e SMT) apresentaram comportamentos equivalentes. Contudo, para maiores valores de TCO, o reator sequencial SMT correspondeu com um aumento expressivo da PVM, sendo que o reator MTc passou a apresentar uma menor PVM. Para todas as TCO, o reator mesofílico teve valores de PVM inferiores ou equivalentes ao reator MTc.

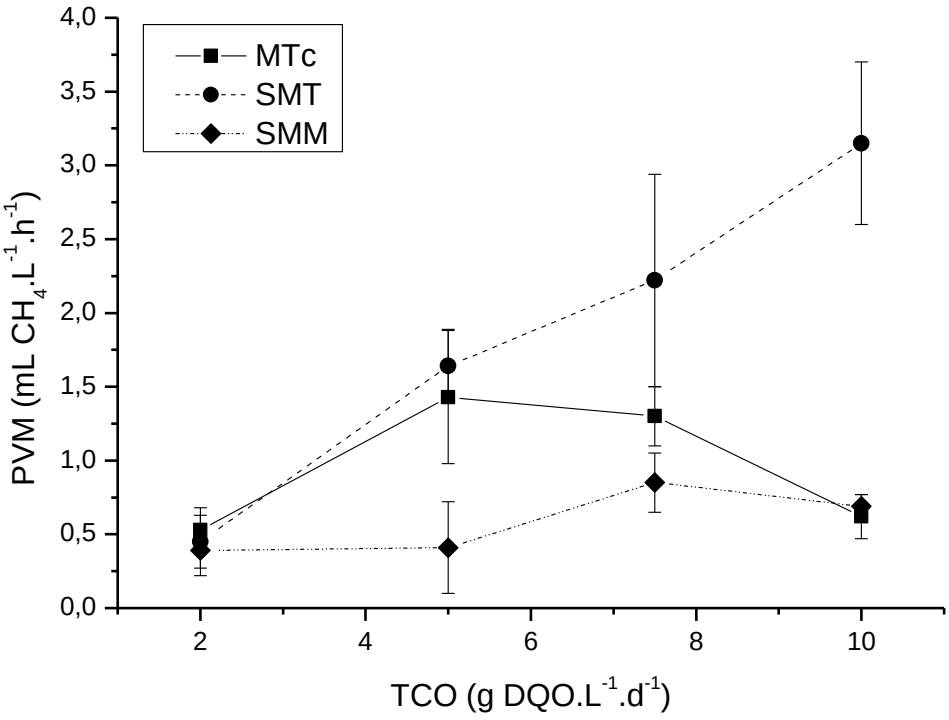


Figura 6: Produtividade volumétrica de CH_4 para os reatores metanogênicos.

Conclusões

A produção de H_2 e CH_4 em sistemas sequenciais foi realizada, tendo o glicerol como substrato em diferentes concentrações. Com relação à produção de H_2, os resultados referentes a remoção de DQO, conversão de glicerol, teor de H_2 no biogás e HY foram similares aos valores obtidos em trabalhos anteriores do LCAII, porém houve um aumento de 400% na PVH. Os resultados obtidos na produção de CH_4 indicaram que os reatores sequenciais possuem maior estabilidade na remoção de DQO e na concentração de CH_4 no biogás produzido em relação ao reator metanogênico não-sequencial. Os valores de MY permitem inferir que o reator SMT assumiu uma rota metabólica próxima da rota ideal para a fermentação anaeróbia completa do glicerol, enquanto que o reator SMM assumiu uma rota resultante do acúmulo de ácido acético, deixando os valores de MY aquém. A variação de MY do reator MTc em função da TCO indica que houve uma mudança da rota metabólica em virtude da variação de TCO. Por fim, verificou-se um aumento considerável da PVM com o aumento da TCO para o reator sequencial termofílico, muito acima dos valores obtidos para o reator não-sequencial e para o sequencial mesofílico.

Referências Bibliográficas

Amorim, E.L.C. de, Barros, A.R., Rissato Zamariolli Damianovic, M.H., Silva, E.L., 2009. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. Int. J. Hydrogen Energy 34, 783–790.

Anitha, M., Kamarudin, S.K., Kofli, N.T., 2016. The potential of glycerol as a value-added commodity. Chem. Eng. J. 295, 119–130.

APHA, AWWA, WPCF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21a. ed. American Public Health Association, Washington.

Barbirato, F., Camarasa-Claret, C., Grivet, J.P., Bories, A., 1995. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism:Enterobacter agglomerans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 786–793.

Barros, A.R., Silva, E.L., 2012. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. Biochem. Eng. J. 61, 59–65.

Biebl, H., Zeng, A.P., Menzel, K., Deckwer, W.D., 1998. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by Klebsiella pneumoniae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 24–29.

Buswell, A.M., Sollo, F.W., 1948. The Mechanism of the Methane Fermentation. J. Am. Chem. Soc. 70, 1778–1780.

Costa, T.B. da, 2017. Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol bruto e cultura mista em reatores anaeróbios de leio fluidizado termofílicos, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Del Nery, V., 1987. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo, Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo, São Carlos.

Kanchanasuta, S., Sillaparassamee, O., 2017. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. Int. J. Hydrogen Energy 42, 3440–3446.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochem. 41, 199–207.

Marone, A., Varrone, C., Fiocchetti, F., Giussani, B., Izzo, G., Mentuccia, L., Rosa, S., Signorini, A., 2015. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol, using microbial mixed culture. Int. J. Hydrogen Energy 40, 209–218.

Ooi, T.L., Yong, K.C., Hazimah, A.H., Dzulkefly, K., Yunus, W.M.Z.W., 2011. Glycerol Residue - A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. J. Oleo Sci. 53, 29–33.

Pachapur, V.L., Sarma, S.J., Brar, S.K., Le Bihan, Y., Buelna, G., Verma, M., 2015. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of Enterobacter aerogenes and clostridium butyricum. Bioresour. Technol. 193, 297–306.

Peixoto, G., 2011. Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais, Tese de Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo, São Carlos.

Ramos, L.R., Silva, E.L., 2018. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy 43, 13081–13089.

Reis, C.M. dos, 2010. Efeito da velocidade ascensional na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Shida, G.M., 2008. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado, Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo, São Carlos.

Simm, S., Amorim Orrico, A.C., Previdelli Orrico Junior, M.A., da Silva Sunada, N., Watte Schwingel, A., Teixeira Lopes, W.R., Lima Whittinghill, K., Miranda de Vargas, F., Sarolli Silva de Mendonça Costa, M., 2018. Contribute of crude glycerin to increase the efficiency of anaerobic digestion process of dairy cattle manure. Environ. Prog. Sustain. Energy 37, 1305–1311.

Simões, A.N., 2017. Processamento do glicerol bruto em reatores anaeróbios de leito fluidificado, acidogênico e metanogênico, em temperatura mesofílica, Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo, São Carlos.

Ullah Khan, I., Hafiz Dzarfan Othman, M., Hashim, H., Matsuura, T., Ismail, A.F., Rezaei-DashtArzhandi, M., Wan Azelee, I., 2017. Biogas as a renewable energy fuel – A review of biogas upgrading, utilisation and storage. Energy Convers. Manag.

Van Ginkel, S.W., Oh, S.E., Logan, B.E., 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. Int. J. Hydrogen Energy 30, 1535–1542.

Vivek, N., Sindhu, R., Madhavan, A., Anju, A.J., Castro, E., Faraco, V., Pandey, A., Binod, P., 2017. Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. Bioresour. Technol. 239, 507–517.

Vlassis, T., Stamatelatou, K., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2013. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: A comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. J. Chem. Technol. Biotechnol. 88, 2000–2006.

Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresour. Technol. 100, 6339–6346.

Zhang, F., Zhang, Y., Chen, Y., Dai, K., van Loosdrecht, M.C.M., Zeng, R.J., 2015. Simultaneous production of acetate and methane from glycerol by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. Appl. Energy 148, 326–333.

CO-DIGESTÃO DE GLICEROL E VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO

Camila Aparecida de Menezes [1]; Edson Luiz Silva [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do aumento da taxa de carregamento orgânico (TCO) na produção de metano a partir da co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol (1:1) em reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF). Foi utilizado um RALF acidogênico termofílico (55 ± 1°C) para produção de hidrogênio a partir de vinhaça e glicerol (1:1) com concentração total afluente de 10 g DQO.L^{-1} e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 h. O efluente do reator acidogênico foi utilizado na alimentação de um RALF mesofílico (RALF-SM, 25 ± 1 °C) e outro termofílico (RALF-ST, 55 ± 1 °C) com concentrações variando de 2,0 para 5,0; 7,5 e 10,0 g DQO.L^{-1} e TDH fixo de 24 h. Foi operado também um reator metanogênico de estágio único (RALF-M, 55 ± 1 °C) alimentado com vinhaça e glicerol (1:1) com concentração total afluente variando de 2,0 para 5,0; 7,5 e 10 g DQO.L^{-1} e TDH fixo de 24 h. O aumento da TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1} acarretou no aumento das produções volumétricas de metano para 4,36; 4,79 e 4,82 L CH_4 d^{-1} L^{-1} nos RALF-ST, RALF-SM e RALF-M, respectivamente.*

Introdução

Os principais subprodutos gerados na produção de biodiesel e etanol são o glicerol residual e a vinhaça, respectivamente. No processo de produção de biodiesel são gerados ésteres alquílicos como biocombustível e glicerol residual como subproduto (Viana et al., 2012). O glicerol corresponde a 10% da massa total de biodiesel produzida. Dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP) indicam que a produção de biodiesel em 2018 foi na ordem de 5,35 bilhões de litros, e a geração de glicerol foi de aproximadamente 530 milhões de litros. Apesar das inúmeras aplicações industriais para o glicerol residual, sua absorção no mercado vem se tornando limitada diante do custo de purificação e da grande oferta promovida devido à elevada produção de biodiesel. Em razão do elevado teor de carbono presente nesse subproduto (0,9 a 1,6 kg DQO.L^{-1}), o acúmulo de glicerol residual e a inadequada destinação podem acarretar em inúmeros problemas ambientais (Viana et al., 2012). Dessa forma, para tornar a produção de biodiesel mais competitiva e promover a estabilização do seu preço de oferta, torna-se necessária a busca de alternativas para agregar valor ao excedente de glicerol residual gerado (Leoneti et al., 2012).

No caso da produção de etanol, tem-se a geração de grandes volumes de vinhaça como inconveniente a ser sanado pela indústria sucroalcoleira. Estima-se que para cada litro de etanol são produzidos de 10 a 14 L de vinhaça (Wilkie et al., 2000). Segundo a ANP, a produção de etanol no Brasil atingiu cerca de 33 milhões de litros em 2018, levando a uma produção estimada de vinhaça de 396 milhões de litros. De acordo com España-Gamboa et al. (2012) a vinhaça, com carga orgânica variando entre 20 e 90 g DQO.L^{-1}, é utilizada para fertirrigação das plantações de cana-de-açúcar como forma de reaproveitamento de nutrientes e água. Entretanto, as concentrações elevadas de matéria orgânica e sais podem causar impactos no solo e nos recursos hídricos, podendo inviabilizar o uso do montante produzido. Dessa forma, a adequação ambiental e econômica da produção de biocombustíveis como o biodiesel e o etanol requer a otimização dos processos. Portanto, aproveitando o potencial energético dos subprodutos ricos em carbono gerados.

Tanto o glicerol residual quanto a vinhaça são resíduos agroindustriais que apresentam fontes de carbono para processos anaeróbios e podem gerar energia na forma de hidrogênio e

metano (Ferraz Júnior et al., 2016; Ramos e Silva, 2019) , ou como fonte de carbono para co-digestão de produtos pobres em carbono (Mata-Alvarez et al., 2014). A utilização de mono-substratos é dificultada pela falta de balanço nutricional. Para sanar este inconveniente recomenda-se então a co-digestão de substratos. A co-digestão é um processo de digestão anaeróbia de dois ou mais substratos que aumenta a viabilidade da aplicação de plantas de digestão anaeróbia devido à maior produção de metano. Este processo promove a melhoria da estabilização do sistema, a diluição de substâncias inibitórias e a utilização do mesmo aparato para tratamento de duas águas residuárias diferentes (Hagos et al., 2017).

Apesar de vantajosa, há uma carência de investigação sobre o potencial da co-digestão para produção de metano a partir das águas residuárias oriundas do processo produtivo dos principais biocombustíveis gerados no país. No estudo de Lovato et al. (2019), foi realizada a co-digestão de glicerol e vinhaça de cana-de-açúcar em bateladas sequenciais para produção de metano. Os autores variaram a proporção dos co-substratos e observaram rendimentos de produção de metano mais elevados ao aplicarem 50% de vinhaça e 50% de glicerol em taxa de carregamento orgânico (TCO) igual a 10,1 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Contudo, as investigações da co-digestão de glicerol e vinhaça para produção de hidrogênio, produção sequencial de hidrogênio e metano e produção de metano em reatores de alta taxa não foram realizadas até então. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da TCO (variando de 2,0 para 5,0; 7,5 e 10,0 kg DQO m^{-3} dia^{-1}) na produção de metano em reator anaeróbio de leito fluidizado termofílico (55 ± 1 °C) de estágio único a partir da co-digestão de glicerol e vinhaça de cana-de-açúcar (1:1); e na produção de metano em reatores anaeróbios de leito fluidizado de estágio duplo mesofílico (25 ± 1 °C) e termofílico (55 ± 1 °C) alimentados com efluente de reator acidogênico. No reator acidogênico foi realizada co-fermentação de glicerol e vinhaça de cana-de-açúcar (1:1) com concentração e tempo de detenção hidráulica (TDH) fixos em 10 g DQO.L^{-1} e 4 h, respectivamente.

Material e Métodos

Os reatores anaeróbios de leito fluidizado (RALF) com alturas e diâmetros internos de 148 cm e 3,6 cm, respectivamente, foram construídos em aço inox com volumes iguais a 1,55 L (Figura 1). O controle de temperatura dos reatores termofílicos (55 ± 1 °C) foi realizado por meio de banho ultratermostatizado. A troca de calor para manutenção da temperatura ocorreu pela recirculação da água do banho pelos encamisamentos nos exteriores e serpentinas em formato de “U” nos interiores dos reatores. No reator anaeróbio de leito fluidizado acidogênico (RALF-A) o material suporte empregado na imobilização da biomassa foi argila expandida com diâmetro entre 2,8 e 3,5 mm e densidade real igual a 1,06 g cm^{-3}. Para garantir velocidade superficial 30% superior à velocidade de mínima fluidização da argila expandida (1,24 cm s^{-1}), a vazão de recirculação do reator foi ajustada em 58,8 L h^{-1}. Nos reatores anaeróbios de leito fluidizado metanogênico de estágio único (RALF-M), metanogênico sequencial mesofílico (RALF-SM) e metanogênico sequencial termofílico (RALF-ST) o material suporte utilizado foi pneu triturado com diâmetro entre 2,8 e 3,5 mm e densidade real igual a 1,14 g cm^{-3}. Para garantir velocidade superficial também 30% superior à velocidade de mínima fluidização do pneu triturado (1,18 cm s^{-1}), as vazões de recirculação dos reatores metanogênicos foram ajustadas em 56,2 L h^{-1}. Na Figura 1 está apresentada a configuração dos sistemas sequenciais, RALF-A seguido dos RALF-ST e RALF-SM.

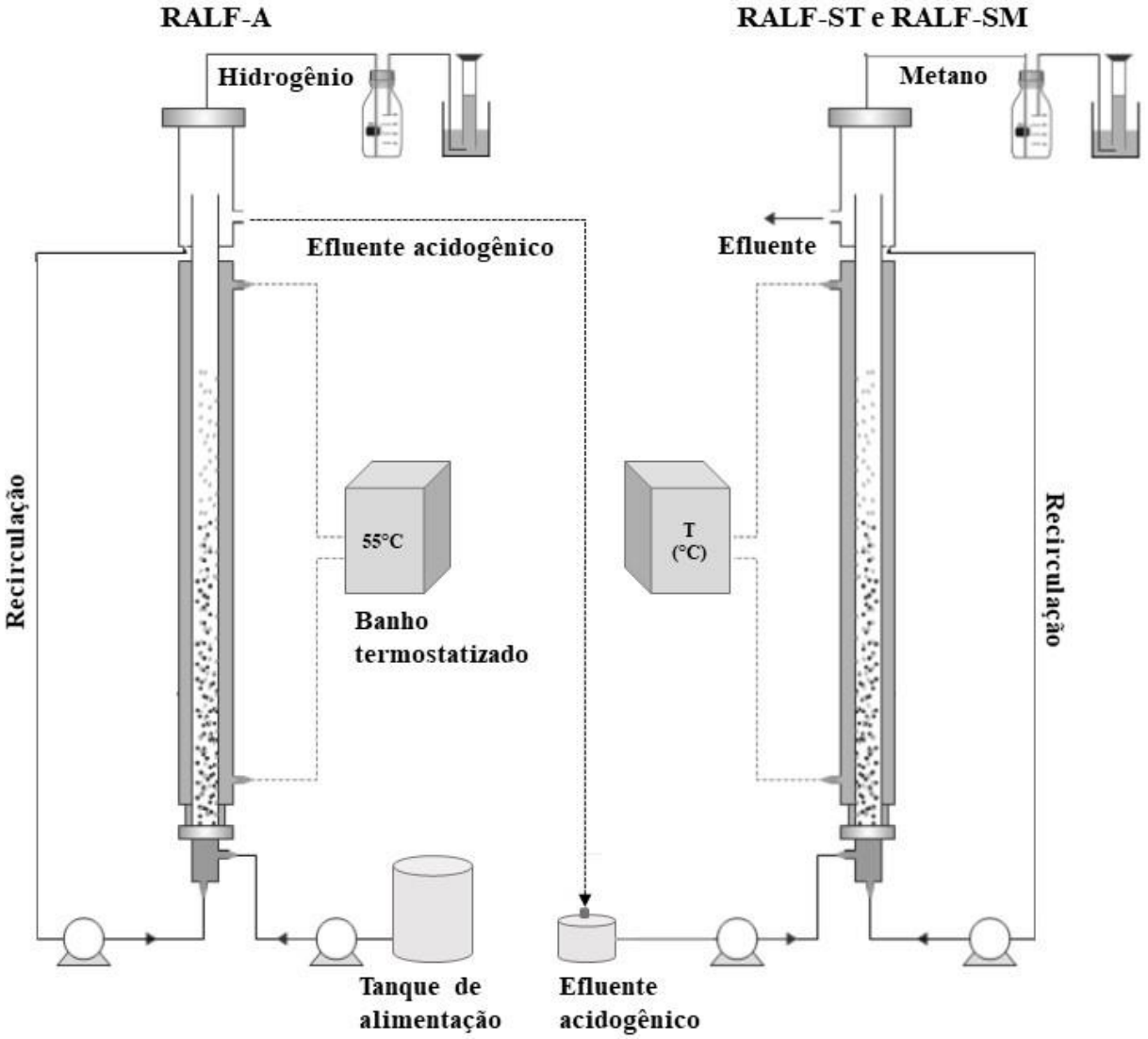


Figura 1: Configuração dos sistemas sequenciais com RALFacidogênico termofílico (55 °C) seguido dos RALFs metanogênicos termofílico (55 °C) e mesofílico (25 °C)

O glicerol bruto utilizado no presente estudo foi coletado na empresa Biobrotas Oleoquímica (Brotas, SP, Brasil). A solução preparada de glicerol bruto (~5 g L^{-1}), 82,6% de glicerol, apresentou (mg L^{-1}): DQO: 5330; cobre: 0,005; zinco: 0,2; magnésio: 0,3; cálcio: 363,3; potássio: 3,0; fosfato: 2,5; metanol: 33,6; e nitrogênio Kjedahl: 73,0. A vinhaça de cana-de-açúcar utilizada foi coletada na usina produtora de açúcar e etanol São Martinho (Pradópolis, SP, Brasil). A vinhaça de cana-de-açúcar apresentou (mg L^{-1}): DQO: 29526,1 ± 1467,1; carboidrato total: 6275,61 ± 333,0; glicerol total: 827,1 ± 14,3; SO_4^{2-}: 2300,0; e nitrogênio Kjedahl: 744,0.

A fonte de inóculo utilizada para partida operacional dos reatores termofílicos foi proveniente do lodo metanogênico termofílico de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), utilizado para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar da usina São Martinho (Pradópolis, SP, Brasil). Para aplicação no RALF-A o lodo foi pré-tratado de acordo com a metodologia proposta por Kim et al. (2006). A fonte de inóculo utilizada para partida operacional do RALF-SM foi proveniente do lodo metanogênico mesofílico de UASB utilizado no tratamento de efluente do abatedouro de aves, Avícola Dacar (Tietê, SP, Brasil).

Inicialmente, os tanques de alimentação dos reatores foram preparados com inóculo (10% v/v), 50% de vinhaça e 50 % de glicerol (proporção 1:1) com DQO total igual a 2,0 g DQO.L^{-1} para os RALF metanogênicos e 10,0 g DQO.L^{-1} para o RALF-A. O RALF-A foi operado em modo batelada pelo tempo necessário ao consumo de 80% do glicerol e carboidrato introduzido. Os reatores metanogênicos foram operados em modo batelada pelo tempo necessário ao consumo de 80% da DQO introduzida, ou seja, 17 dias.

Após a etapa de inoculação, o RALF-A foi operado com glicerol e vinhaça (1:1) (concentração total afluente igual a 10,0 g DQO.L^{-1}) em TDH fixo de 4 h. O RALF-M foi operado com glicerol e vinhaça (1:1) em TDH fixo de 24 h e concentração total afluente variando de 2,0 para 5,0; 7,5 e 10,0 g DQO.L^{-1}. As concentrações foram alteradas após estabilização do rendimento de metano (MY) e da remoção de DQO por período superior à 10 dias. Nos RALF-SM e RALF-ST foi aplicado glicerol e vinhaça (1:1) em TDH fixo de 24 h e concentração total afluente de 2,0 g DQO.L^{-1}. Após estabilização do MY e da remoção de DQO foi aplicado efluente do RALF-A na alimentação dos RALF-SM e RALF-ST com concentração variando de 5,0 para 7,5 e 10,0 g DQO.L^{-1}. O pH dos reatores foram mantidos em 8,17 ± 0,44; 8,17 ± 0,64 e 8,07 ± 0,55 para os RALF-ST, RALF-SM e RALF-M, respectivamente, pela adição de 0,20 g bicarbonato g^{-1} DQO L^{-1} nos tanques de alimentação.

As análises de DQO e pH dos reatores foram realizadas de acordo com Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2005). A concentração de sacarose foi determinada por método colorimétrico como proposto por Dubois et al. (1956). A concentração de glicerol foi determinada por método colorimétrico como proposto por Bondioli e Della Bella (2005). A produção volumétrica do biogás gerado foi realizada de acordo metodologia proposta por Walker et al. (2009). A análise de composição do biogás produzido foi feita por cromatografia gasosa de acordo com método descrito por Penteado et al. (2013).

Resultados e Discussão

Reator acidogênico

O RALF-A mantido com concentração total afluente de 10 g DQO.L^{-1} e TDH fixo em 4 h, ou seja, TCO fixa de 60 kg DQO m^{-3} d^{-1}, permaneceu com pH igual a 4,72 ± 0,23. As conversões de glicerol, carboidrato e DQO do reator permaneceram iguais a 54,3 ± 14,9%, 40,3 ± 10,7% e 5,5 ± 4,9%, respectivamente. A composição de hidrogênio foi de 30,3 ± 7,4%, a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foi de 689,6 ± 58,9 mL H_2 d^{-1} L^{-1} e o rendimento de hidrogênio (HY) foi de 0,18 ± 0,03 mmol H_2 g^{-1} DQOadd. O desempenho do RALF-A foi inferior ao do RALF acidogênico termofílico (55 °C) do estudo de Ramos e Silva (2019) que aplicaram somente vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de H_2 com concentração fixa em 10 g DQO.L^{-1} e TDH também fixo em 4 h. Os autores observaram PVH e HY iguais a 1300,0 mL H_2 d^{-1} L^{-1} e 0,34 mmol H_2 g^{-1} DQOadd, respectivamente. A diferença de desempenho entre os resultados de produção de H_2 do RALF-A e do RALF do estudo de Ramos e Silva (2019) pode ser explicado ao avaliar os resultados observados no estudo de Costa (2017). O autor utilizou glicerol bruto como substrato para produção de H_2 em RALF termofílico (55 °C) com concentração fixa em 10 g DQO.L^{-1} e TDH variando de 8 a 0,5 h. Diferentemente da vinhaça, que apresenta resultados ótimos de HY em TCO aproximada de 60 kg DQO m^{-3} d^{-1}, o HY ótimo no estudo de Costa (2017), que realizaram fermentação de glicerol, foi observado em TCO igual a 240 kg DQO m^{-3} d^{-1} e foi 30% superior ao HY na TCO igual a 60 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Portanto, os PVH e HY mais baixos no RALF-A comparados à outros estudos utilizando vinhaça de cana-de-açúcar pode ser atrubuído à adição do glicerol.

A vinhaça contém compostos recalcitrantes e baixa disponibilidade de açúcares facilmente degradáveis (Lovato et al., 2019), e portanto, requer maior variedade de microrganismos para sua conversão à hidrogênio. Como o tempo de duplicação das bactérias

produtoras de hidrogênio é muito mais curto que de outros grupos de bactérias, TDH reduzidos proporcionam uma seleção de microrganismos que consequentemente podem não ter a habilidade de fermentar um substrato complexo como a vinhaça. Ao contrário da vinhaça, o glicerol é facilmente biodegradável (Rivero et al., 2014). Então, a utilização de glicerol pelas bactérias produtoras de hidrogênio pode ser favorecida em TDH reduzidos. Esta afirmação pode ser verificada ao comparar os estudos de Lopes et al. (2017), que realizaram co-fermentação de glicerol e soro de queijo, e Rosa et al. (2014), que utilizaram somente soro de queijo como substrato. Rosa et al. (2014) utilizaram RALF (30 °C) para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo (5,0 g DQO.L^{-1}) e observaram HY máximo em TDH de 4 h (TCO igual a 30 kg DQO m^{-3} d^{-1}). Enquanto, Lopes et al. (2017) que utilizaram EGSB (30 °C) para produção de hidrogênio a partir da co-fermentação de soro de queijo e glicerol (1:1), observaram HY máximo em TDH de 0.5 h (TCO igual a 1152 kg DQO m^{-3} d^{-1}).

Reatores metanogênicos

As conversões de glicerol permaneceram estáveis entre 94,7 ± 0,7% e 97,8 ± 0,7% para o RALF-ST, entre 95,4 ± 0,6 e 97,8 ± 1,4% para o RALF-SM e entre 94,7 ± 0,9% e 98,8 ± 0,2% para o RALF-M em todas as TCO aplicadas. As conversões de carboidratos também permaneceram estáveis entre 66,0 ±8,8% e 77,2 ± 6,5% para o RALF-ST e entre 65,9 ± 7,6% e 87,3 ± 9,4% para o RALF-SM. Contudo, no RALF-M foi observado decréscimo da conversão de carboidratos de 73,8 ± 12,4% para 45,9 ± 12,9% ao aumentar a TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Foram observadas remoções de DQO entre 82,1 ± 5,4% e 91,7 ± 4,5% no RALF-ST, entre 85,8 ± 3,5% e 96,6 ± 2,3% no RALF-SM e entre 75,5 ± 6,2% e 92,4 ± 2,0% no RALF-M em todas as TCO aplicadas. As remoções de DQO dos RALF-ST, RALF-SM e RALF-M foram similares à remoção observada no estudo de Lovato et al. (2019). Os autores realizaram co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol (1:1) com concentração total afluente de substratos igual a 7,5 g DQO.L^{-1} (TCO de 10,1 kg DQO m^{-3} d^{-1}) em bateladas sequenciais sob condições mesofílicas, e observaram remoção de DQO igual a 87%. A redução da remoção de DQO com o aumento da proporção de vinhaça no estudo dos autores foi atribuída ao acréscimo de compostos recalcitrantes e com baixa degradabilidade contidos na vinhaça. A afirmação de Lovato et al. (2019) pode ser aplicada para o RALF-M, visto que, neste reator o aumento da TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1} acarretou no decréscimo da conversão de carboidratos de 73,8 ± 12,4% para 45,9 ± 12,9%, enquanto a conversão de glicerol permaneceu estável e elevada (superior à 94,7%).

A adição de glicerol à vinhaça de cana-de-açúcar se mostrou favorável em relação ao aumento da degradabilidade na digestão anaeróbia. A remoção de DQO dos RALF-M, RALF-ST e RALF-SM foram superiores às remoções de DQO de estudos que utilizaram somente vinhaça como substrato (Siqueira et al., 2013; Barros et al., 2016; Ramos e Silva, 2019). Siqueira et al., (2013) utilizaram RALF mesofílico (30 °C) para produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e observaram remoções de DQO entre 53% e 67% para as TCO entre 3,33 e 10,33 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Ramos e Silva (2019) também utilizando RALF para produção de metano a partir de vinhaça, observaram remoções de DQO entre 62,5% e 77,3% para as TCO entre 5,0 e 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Barros et al. (2016) observaram redução da remoção de DQO de 82% para 60% com o aumento da TCO de 5,0 para 7,5 kg DQO m^{-3} d^{-1} ao aplicarem reatores UASB sob temperatura ambiente, entre 20 °C e 30 °C, para produção de metano a partir de vinhaça em TDH fixo de 2,8 dias.

A composição de metano (%CH_4) decresceu de 79,4 ± 5,5%para 65,9 ± 5,4% no RALF-ST e de 81,3 ± 4,9% para 66,4 ± 5,7% no RALF-M ao aumentar a TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Já no RALF-SM a %CH_4 permaneceu estável entre 73,8 ± 4,6% e 71,4 ± 3,0% em todas as TCO aplicadas. Nas Figuras 2 e 3 estão apresentadas as produções volumétricas de metano (PVM) e os rendimentos de produção de metano (MY), respectivamente, dos RALF-ST, RALF-SM e RALF-M. Foi observado aumento na PVM de

0,95 ± 0,21 L CH_4 d^{-1} L^{-1} para 4,36 ± 0,29 L CH_4 d^{-1} L^{-1} no RALF-ST, de 0,37 ± 0,06 L CH_4 d^{-1} L^{-1} para 4,79 ± 1,37 L CH_4 d^{-1} L^{-1} no RALF-SM e de 0,94 ± 0,19 L CH_4 d^{-1} L^{-1} para 4,89 ± 0,46 L CH_4 d^{-1} L^{-1} no RALF-M. No RALF-ST foi observado aumento do MY de 184,0 ± 25,3 mL CH_4 g^{-1} DQOremov para 300,3 ± 15,7 mL CH_4 g^{-1} DQOremov ao aumentar a TCO de 2,0 para 5,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Contudo, ao aumentar a TCO para 7,5 e 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1} foi observada redução do MY para 257,9 ± 20,7 mL CH_4 g^{-1} DQOremov e 265,8 ± 25,9 mL CH_4 g^{-1} DQOremov, respectivamente. No RALF-SM foi observado aumento do MY de 76,9 ± 13,3 mL CH_4 g^{-1} DQOremov para 323,7 ± 13,7 mL CH_4 g^{-1} DQOremov ao aumentar a TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}. No RALF-M foi observado aumento no MY de 170,2 ± 16,7 mL CH_4 g^{-1} DQOremov para 278,9 ± 20,0 mL CH_4 g^{-1} DQOremov ao aumentar a TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}.

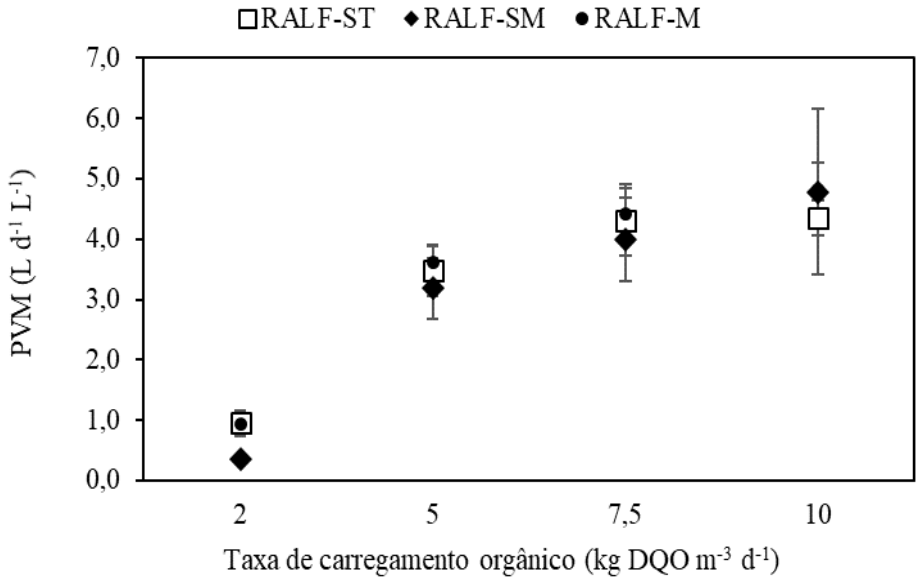


Figura 2: Efeito da TCO na produção volumétrica de metano

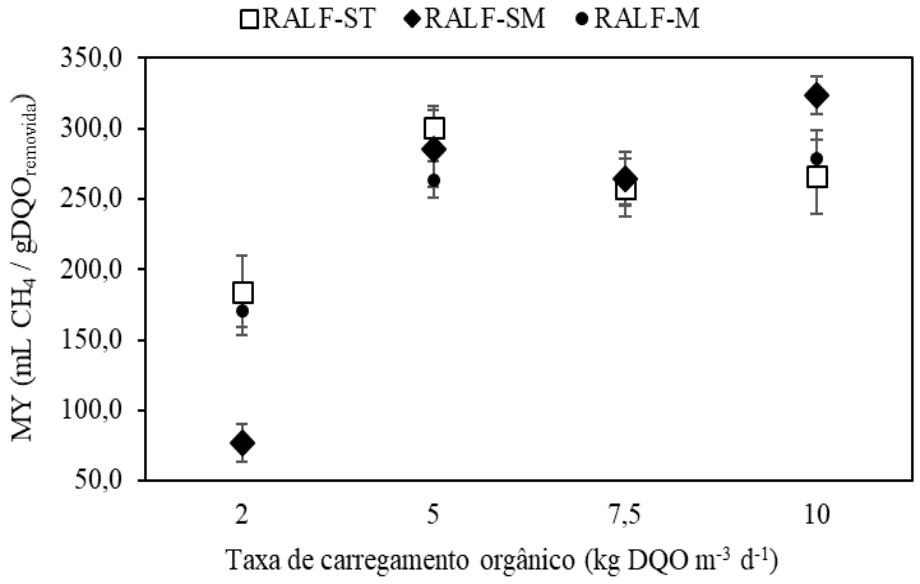


Figura 3: Efeito da TCO no rendimento de produção de metano

Diferentemente do RALF-M do presente estudo, Ramos e Silva (2019) observaram decréscimo da PVM de 3,78 L CH_4 d^{-1} L^{-1} para 1,56 L CH_4 d^{-1} L^{-1} e do MY de 300 mL CH_4 g^{-1} DQOremov para 170 mL CH_4 g^{-1} DQOremov com o aumento da TCO de 7,5 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1} ao realizarem digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em RALF termofílico (55 °C) de estágio único. Também é válido observar que a PVM e o MY do RALF-M, que realizou co-digestão de vinhaça e glicerol, foram superiores aos do estudo de Ramos e Silva (2019), que realizou digestão somente de vinhaça, para TCO igual a 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Os resultados do RALF-M também foram superiores ao do estudo de Barros et al. (2016), que aplicaram vinhaça de cana-de-açúcar para produção de metano em UASB. Os autores observaram PVM máxima de 0,12 L CH_4 d^{-1} L^{-1} e MY máximo de 185 mL CH_4 g^{-1} DQOremov para TCO igual a 25 kg DQO m^{-3} d^{-1}.

A TCO ótima destacada por Barros et al. (2016), 25 kg DQO m^{-3} d^{-1}, foi a mesma apontada por Ferraz Júnior et al. (2016) e Fuess et al. (2017) ao aplicar vinhaça como mono-substarato no processo de digestão anaerróbia em dois estágios. Ferraz Júnior et al. (2016) utilizaram UASB termofílico (55 °C) para digestão de efluente de reator acidogênico, e obervaram PVM de 2,8 L CH_4 d^{-1} L^{-1} para TCO igual a 25 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Fuess et al. (2017) utilizaram reator anaeróbio de leito estruturado termofílico (55 °C) e observaram PVM igual a 2,28 L CH_4 d^{-1} L^{-1} para TCO igual a 25 kg DQO m^{-3} d^{-1}. A PVM dos RALF-ST (4,36 ± 0,29 L CH_4 d^{-1} L^{-1}) e RALF-SM (4,79 ± 1,37 L CH_4 d^{-1} L^{-1}) para uma menor TCO aplicada (10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1}) com relação à dos estudos dos autores, foram superiores às PVM máximas observadas por Ferraz Júnior et al. (2016) e Fuess et al. (2017). Além da co-digestão, a utilização do RALF no presente estudo pode ser a explicação para a maior PVM dos RALF-ST e RALF-SM quando comparadas às PVM observadas para os reatores UASB e reator anaeróbio de leito estruturado. Reatores de leito fluidizado têm a vantagem de serem capazes de reter uma grande quantidade de biomassa e de suportar cargas orgânicas elevadas. Além disso, eles são menos propensos a colmatação do leito e às perdas de biomassa associadas leito fixo e auto-imobilizado, respectivamente (Siqueira et al., 2013). A elevada recirculação no RALF acarreta em elevado desprendimento de biogás do meio líquido, podendo consequentemente acarretar em produções volumétricas mais elevadas.

O desemepenho dos RALFs do presente estudo foram inferiores aos dos RALFs dos estudos de Siqueira et al. (2013) e Ramos e Silva (2019) que realizaram produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Siqueira et al., (2013) realizaram digestão anaeróbia de vinhaça em RALF mesofílico (30 °C) de estágio único e observaram PVM e MY iguais a 5,37 L CH_4 d^{-1} L^{-1} e 341 mL CH_4 g^{-1} DQOremov, respectivamente, para TCO igual a 19,87 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Ramos e Silva (2019) observaram aumento da PVM de 3,67 para 5,57 L CH_4 d^{-1} L^{-1} ao aumentar a TCO de 12,0 para 21,6 kg DQO m^{-3} d^{-1} em RALF sequencial termofílico (55 °C) ao utilizarem vinhaça como mono-substrato. Apesar da PVM e MY observadas no estudo de Siqueira et al. (2013) e da PVM observada no estudo de Ramos e Silva (2019) serem superiores às dos RALF-ST e RALF-SM, é válido observar que a TCO aplicada pelos autores foram superiores às aplicadas nos reatores do presente estudo, que apresentaram resultados ótimos na maior TCO aplicada.

Conclusões

Ao realizar a co-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, o aumento da TCO resultou no aumento da produtividade de metano no reator de estágio único e nos reatores de dois estágios. O aumento da TCO de 2,0 para 10,0 kg DQO m^{-3} d^{-1} ocasionou no aumento das produções volumétricas de metano para 4,36 L CH_4 d^{-1} L^{-1}; 4,79 L CH_4 d^{-1} L^{-1} e 4,82 L CH_4 d^{-1} L^{-1} nos RALF-ST, RALF-SM e RALF-M, respectivamente. O maior rendimento de produção de metano foi observado no RALF-SM (323,7 ± 13,7 mL CH_4 g DQO remov) na maior TCO aplicada. Os resultados apontam que o aumento da TCO para valores superiores a

10 kg DQO m^{-3} d^{-1} pode acarretar em maior produtividade de metano, e indicam viabilidade de aplicação da co-digestão de glicerol e vinhaça como alternativa satisfatória para aproveitamento do potencial energético desses resíduos.

Referências Bibliográficas

APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WEF – Water Environment Federation, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st. Edition. Washington D.C. 1600 p.

Barros, V.G., Duda, R.M., Oliveira, R.A., 2016. Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. Brazilian J. Microbiol. 47, 628–639.

Bondioli, P., Della Bella, L., 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 153–157.

Costa, T.B., 2017. Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol bruto e cultura mista em reatores anaeróbios de leito fluidizado termofílicos. Universidade Federal de São Carlos.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

España-Gamboa, E.I., Mijangos-Cortés, J.O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J.A.D., Alzate-Gaviria, L.M., 2012. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. Biotechnol. Biofuels 5, 1–9.

Ferraz Júnior, A.D.N., Koyama, M.H., de Araújo Júnior, M.M., Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. Renew. Energy 89, 245–252.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Ferraz, A.D.N., Persinoti, G.F., Squina, F.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. Appl. Energy 189, 480–491.

Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., Lu, X., 2017. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. Renew. Sustain. Energy Rev. 76, 1485–1496.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochem. 41, 199–207.

Leoneti, A.B., Aragão-Leoneti, V., Oliveira, S.V.W.B., 2012. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. Renew. Energy 45, 138–145.

Lopes, H.J.S., Ramos, L.R., Silva, E.L., 2017. Co-fermentation of cheese whey and crude glycerol in EGSB reactor as a strategy to enhance continuous hydrogen and propionic acid production. Appl. Biochem. Biotechnol. 183, 712-728.

Lovato, G., Batista, L.P.P., Preite, M.B., Yamashiro, J.N., Becker, A.L.S., Vidal, M.F.G., Pezini, N., Albanez, R., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2019. Viability of using glycerin as a co-substrate in anaerobic digestion of sugarcane stillage (vinasse): effect of diversified operational strategies. Appl. Biochem. Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s12010-019-02950-1.

Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M.S., Fonoll, X., Peces, M., Astals, S., 2014. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. Renew. Sustain. Energy Rev. 36, 412–427.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. Int. J. Hydrogen Energy 38, 6137–6145.

Ramos, L.R., Silva, E.L., 2019. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy 1–13. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.025.

Rivero, M., Solero, R., Perez, M., 2014. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy 39, 2481-2488.

Rosa, P.R.F., Santos, S.C., Sakamoto, I.K., Veresche, M.B.A., Silva, E.L., 2014. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. Bioresour. Technol. 161, 10-19.

Siqueira, L.M., Damiano, E.S.G., Silva, E.L., 2013. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 48, 1707–1716.

Viana, M.B., Freitas, A. V., Leitão, R.C., Pinto, G.A.S., Santaella, S.T., 2012. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. Environ. Technol. 1, 81–92.

Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresour. Technol. 100, 6339–6346.

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass Bioenergy 19, 63–102.

IMPACTO DA DQO NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE VINHAÇA EM DOIS ESTÁGIOS DE REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIFICADO TERMOFÍLICOS E MESOFÍLICO

Lucas Rodrigues Ramos [1]; Edson Luiz Silva [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *Este estudo avaliou o efeito da DQO (2 a 15 g.L^{-1}) na produção de hidrogênio (55 ^{o}C) e metano (30 e 55 ^{o}C) em reatores anaeróbios de leito fluidificado a partir de vinhaça. O reator acidogênico (RA) foi operado no TDH de 4 h com DQO de 15 g.L^{-1}. O efluente do RA foi alimentado aos reatores metanogênicos mesofílico (RSM) e termofílico (RST) no TDH de 18 h aumentando a DQO de 2 para 15 g.L^{-1}. Outro reator metanogênico (RM) foi alimentado com concentrações de vinhaça crescentes (2 a 15 g DQO.L^{-1}) no TDH de 24 h. No RA a composição de H_2 no biogás foi de 31,2 ± 5,6 % com produtividade de hidrogênio de 3,68 ± 0,53 L H_2.dia^{-1}.L^{-1} e remoção de DQO de 10,62 ± 3,3 %. O aumento da DQO de 2 para 15 g.L^{-1} nos reatores RSM e RST aumentou produtividade (4,46 ± 0,92 e 5,02 ± 0,56 L CH_4.dia^{-1}.L^{-1}) e rendimento (0,22 ± 0,05 e 0,24 ± 0,06 L CH_4.g DQO^{-1}) mantendo a composição de metano acima de 60%. Enquanto o RM observou valores similares de composição de metano (61,8 ± 8,2% a 75,0 ± 11,4%) e rendimento (0,29 ± 0,05 L CH_4.g DQO^{-1}), mas menor produtividade (3,11 ± 0,53 L CH_4.dia^{-1}.L^{-1}) com remoção 81,4 ± 3,4 % na DQO de 10,0 g DQO.L^{-1}.*

Introdução

O uso de biocombustíveis renováveis é favorecido pela sua sustentabilidade econômica e ambiental, principalmente no Brasil que conta com uma robusta indústria de produção de etanol a partir de cana de açúcar (Moraes et al., 2015). Contudo, este processo gera grandes volumes de água residuária, como a vinhaça. A cada litro de etanol produzido, 10 a 15 litros de vinhaça são gerados, apresentando um problema ambiental complexo dependendo da sua destinação final. (Moraes et al., 2015).

Dessa forma, a conversão da matéria orgânica presente na vinhaça em energia por meio da digestão anaeróbia torna-se atrativa, mantendo o conteúdo inorgânico na vinhaça biodigerida. Isso possibilita a sua aplicação como biofertilizante de menor impacto ambiental (Moraes et al., 2015). Durante a degradação anaeróbia são produzidos hidrogênio e metano, fontes de energia em gás. O biogás produzido a partir de águas residuárias combina o tratamento e a produção de biocombustíveis, observando efeito duplo na redução de gases efeito estufa ao reduzir a emissão de CO_2 por combustíveis fósseis e a emissão desordenada de CH_4 (Xia et al., 2016).

O desenvolvimento de reatores e microrganismos que possam aprimorar rendimentos e produtividades a partir matérias primas ricas em carboidratos que sejam econômicas e sustentáveis pode garantir a viabilidade econômica deste processo (Barca et al., 2015). Uma alternativa é a separação dos consórcios microbianos possibilita a operação dos reatores em suas respectivas condições operacionais ótimas, permitindo maiores cargas orgânicas, processos mais estáveis e maximizando a remoção de matéria orgânica. Portanto, a estratégia de separar as bactérias acidogênicas em um reator e as archaeas metanogênicas em outro reator alimentado em série é uma opção viável para a digestão anaeróbia (Liu et al., 2013).

Entre as configurações utilizadas para a degradação anaeróbia, os sistemas de crescimento celular suspenso, como reator de mistura perfeita (CSTR), permitem elevada transferência de massa entre a comunidade microbiana e o substrato. Entretanto, a aplicação de menores valores de tempo de detenção hidráulica (TDH) e de elevadas taxas de

carregamento orgânico (TCO) dificulta a manutenção da população microbiana no reator, ocasionando a lavagem de biomassa (Barca et al, 2015). Dessa forma, uma configuração que possibilita a aplicação em alta taxa de carregamento é o reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF). A fluidização das partículas do reator possibilita características únicas ao reator, como o máximo contato entre o biofilme e o substrato, baixa resistência difusional entre o líquido e o biofilme, baixa ocorrência de empacotamento do leito, pequena área de operação, estabilidade frente a grandes taxas de carregamento orgânico, elevada transferência de massa e energia e a homogenização do meio líquido do reator devido ao regime turbulento (Barca et al., 2015)

Definir as condições operacionais do reator, como a faixa de operação da TCO e da temperatura, é fundamental para otimizar a produção de hidrogênio e de metano (Santos et al., 2014 a). Ao variar as condições operacinais pode-se modificar as rotas metabólicas, a conversão de substrato e a comunidade microbiana presente no reator. Assim, torna-se possível a produção contínua de hidrogênio e metano de forma estável maximizando o rendimento (Ottaviano et al., 2017). Portanto, o presente estudo teve como objetivo a avaliar o desempenho da digestão anaeróbia de vinhaça (15 g $DQO.L^{-1}$) em sistema de reatores em série composto por um reator acidogênico (RA) no TDH de 4 h alimentando um reator metanogênico mesofílico (RSM) e um reator metanogênico termofílico (RST) nas DQO de 2 (100% vinhaça), 5 (100% vinhaça e 50% vinhaça + 50% efluente), 10 (100% efluente diluido com água) e 15 $g.L^{-1}$. De forma a melhor comparar o desempenho do sistema sequencial, foi operado um reator metanogênico (RM) em uma etapa no TDH de 24 h nas DQO de 2, 5, 10 e 15 $g.L^{-1}$.

Material e Métodos

Água residuária

A vinhaça de cana de açúcar usada como substrato neste estudo foi coletada na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), O substrato orgânico (vinhaça de cana-de-açúcar), utilizado para a alimentação dos reatores RALF termofílicos para a produção de hidrogênio e metano, foi coletado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), produtora de etanol e açúcar, a partir de cana de açúcar como matéria-prima. Ao longo do experimento, as características da vinhaça coletada foram avaliadas, considerando aspectos físico-químicos, como carboidratos totais, DQO total e composição de ácidos e álcoois são apresentados na Tabela 1. O pH médio das diferentes amostras de vinhaça foi de 4,58 ± 0,19.

Tabela 1 - Caracterização média da vinhaça de cana de açúcar

Componente	Concentração ($mg.L^{-1}$)	Componente	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Carboidrato total (sacarose)	7684 ± 1006	Ácido Propiônico	2814 ± 788
DQO	32003 ± 3330	Ácido Acético	4629 ± 437
Sólidos Suspensos	3256 ± 274	Ácido Succínico	2722 ± 626
Sólidos Suspensos Voláteis	2657 ± 130	Ácido Isobutírico	2010 ± 637
Sólidos Suspensos Fixos	565 ± 133	Ácido Fórmico	1478 ± 483
Etanol	2773 ± 832	Ácido Lático	3456 ± 257

Inóculo

O reator anaeróbio de leito fluidizado termofílico foi inoculado com lodo proveniente de um UASB termofílico usado para o tratamento de vinhaça de cana de açúcar para produção de biogás (principalmente CH_4), localizado na Usina São Martinho em Pradópolis, São Paulo.

O lodo foi submetido a um pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia adaptada de Kim et al. (2006) para ser usado como inóculo do RA. Nos reatores RST e RM o lodo foi utilizado sem pré-tratamento.

O lodo utilizado na inoculação do RSM foi proveniente de um UASB mesofílico usado para o tratamento de água residuária de abatedouro de aves localizado na avícola Dacar em Tiete, São Paulo.

Operação do reator anaeróbio de leito fluidizado

O esquema de instalação dos RALF é mostrado na Figura 1.

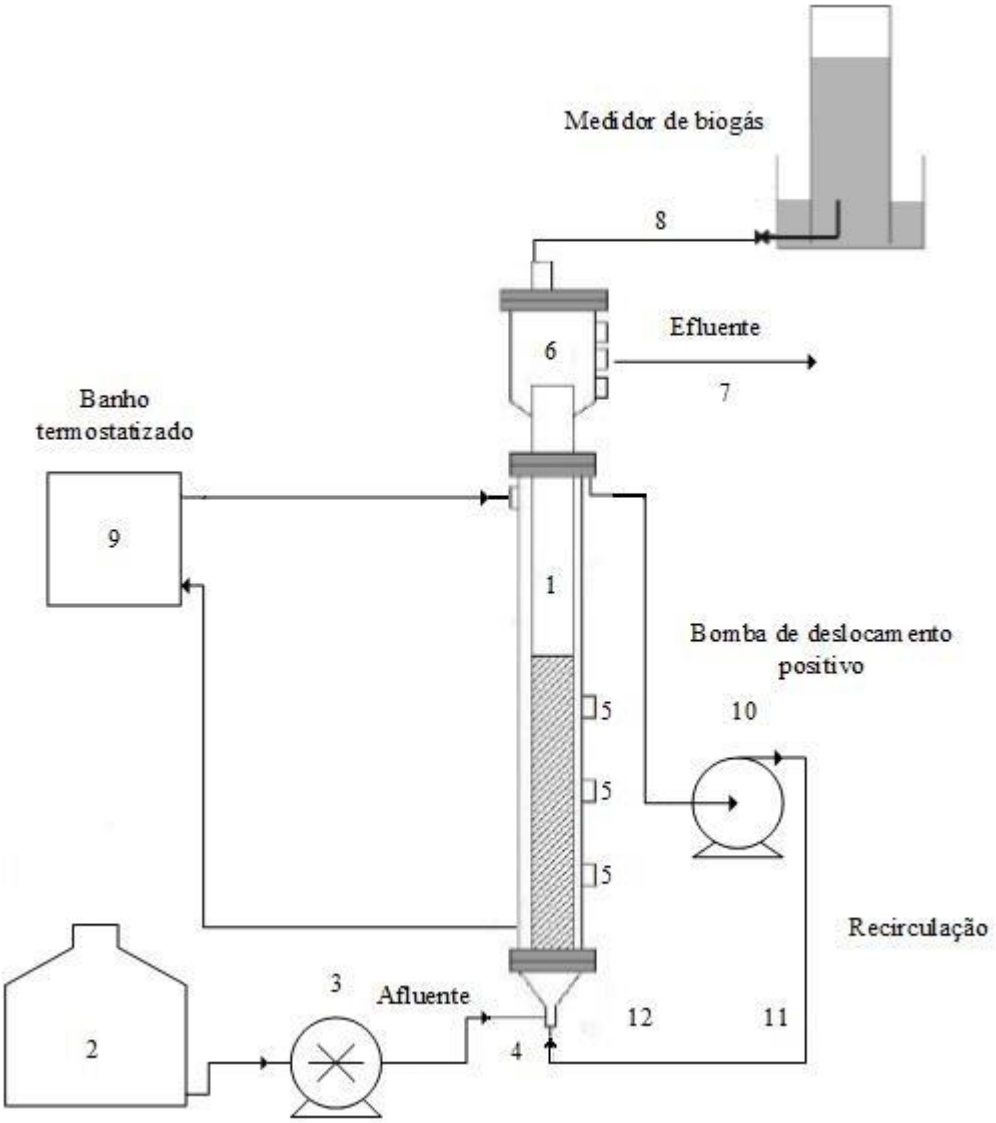


Figura 1 – Esquema da instalação do RALF: (1) Reator de leito fluidificado, (2) reservatório de alimentação, (3) bomba de alimentação, (4) entrada do afluente, (5) amostradores, (6) câmara de captação de gás, (7) saída de efluente, (8) medidor de biogás de deslocamento de fluido, (9) banho termostatizado, (10) bomba de recirculação, (11) recirculação, (12) distribuidor da alimentação.

Todos os reatores utilizados foram construídos em aço inox 304, cada um com 4,1 cm de diâmetro interno, 150 cm de altura e volume total de 1980 cm^3. O controle de temperatura

era realizado por um banho ultratermostatizado que circulava água pela câmara externa e serpentina interna do reator mantendo a temperatura em 55 ± 1 ^{o}C nos reatores termofílicos. O reator mesofílico foi mantido à temperatura ambiente. O substrato foi alimentado ao reator por meio de bomba dosadora de afluente para tornar a operação flexível e possibilitar a variação do tempo de detenção hidráulica. A recirculação foi realizada por uma bomba de deslocamento positivo para homogeneizar o meio fermentativo e fluidizar o leito do RALF com 1,3 vezes a velocidade de mínima fluidização. No reator acidogênico (RA) a vazão de recirculação foi de 78 $L.h^{-1}$, enquanto nos reatores metanogênicos (RM, RSM e RST) a vazão foi de 74 $L.h^{-1}$. O armazenamento da alimentação foi feito em um barrilete, renovando o seu volume diariamente. O efluente do reator RA foi coletado em um recipiente diariamente e alimentado aos reatores metanogênicos sequenciais (RSM e RST) (modo off-line). O material suporte usado para imobilização e adesão da biomassa do reator RA foi a argila expandida, com diâmetro entre 2,8 e 3,35 mm, densidade aparente de 1,5 $g.cm^{-3}$, 23% de porosidade e velocidade de mínima fluidização de 1,24 $cm.s^{-1}$. O material suporte usado para imobilização e adesão da biomassa dos reatores RM, RSM e RST foi o pneu triturado, com diâmetro entre 2,2 mm, densidade de 1,14$g.cm^{-3}$, 18% de porosidade e velocidade de mínima fluidização de 1,18 $cm.s^{-1}$.

Métodos analíticos

Os parâmetros monitorados foram DQO, pH, sólidos suspensos, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e sulfato (APHA, 2012). Além disso, a concentração de carboidratos totais foi estimada como sacarose pelo método apresentado por Dubois et al. (1956). A alcalinidade foi medida segundo metodologia de Ripley et al. (1986). O biogás produzido no reator foi medido pelo método de deslocamento de fluido usando uma solução salina saturada acidificada (Walker et al., 2009). A composição do biogás foi analisada por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010) usando uma coluna Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro de 0,53 mm) e detector de condutividade térmica de acordo com Rosa et al. (2014). As determinações dos ácidos orgânicos individualizados e alcóois foram feitas por cromatografia líquida (HPLC Shimadzu) de acordo com a metodologia de Penteado et al. (2013).

Resultados e Discussão

Os principais resultados do reator RA são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais resultados do reator RA

Condições de operação			
TDH (h)	4	TCO (kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$)	90
Principais resultados			
Conv. Carboidratos (%)	67,1 ± 5,2	H_2%	31,1 ± 5,6
Remoção DQO (%)	10,6 ± 3,2	PVH ($L.dia^{-1}.L^{-1}$)	3,68 ± 0,53
DQO efluente ($mg.L^{-1}$)	13066 ± 493	HY (mmol H_2. g DQO^{-1})	0,69 ± 0,13

De forma a obter a melhor condição para produção de hidrogênio, o reator RA foi operado no TDH de 4 h com DQO de 15 $g.L^{-1}$, equivalente a TCO de 90 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$, (Santos et al., 2014 b) (Ramos e Silva, 2017). Os principais resultados obtidos foram a conversão de carboidratos de 67,1 ± 5,2 %, o rendimento de hidrogênio (HY) de 0,69 ± 0,13 mmol H_2.g DQO^{-1}, equivalente a 2,08 ± 0,41 mol H_2.mol $carboidrato^{-1}$, produtividade volumétrica de hidrogênio (PVH) de 3,68 ± 0,53 L $H_2.dia^{-1}.L^{-1}$ e composição de hidrogênio (H_2%) de 31,1 ± 5,6%.

Os resultados obtidos são similares a literatura de produção continua de hidrogênio.

Ao avaliar o efeito da TCO (36,2 a 108,8 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1}) no produção termofílica (55 ºC) de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo (RLF), Ferraz Júnior et al. (2014) observaram os valores máximos de HPR e de HY de 1023 mL H_2.dia^{-1}.L^{-1} e 2,4 mol H_2.mol carboidrato^{-1} (0,7 mmol H_2.g DQO^{-1}) foram observados na TCO de 72,4 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1}.

O TDH de 4 h foi indicado como ótimo para produção termofílica (55 ºC) de hidrogênio a partir de vinhaça de cana de açúcar por Santos et al. (2014 b) que reduziram os valores de TDH de 8 a 1 h, com subseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico de 26,6 para 225,3 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1}. A condição de operação onde se obteve valor máximo de HY de 5,73 mmol H_2. g DQO_{ap}^{-1} foi na TCO de 52,7 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1}, no TDH de 4h. Fuess et al. (2016) observaram HPR máxima de 1604 mL H_2.dia^{-1}.L^{-1} e HY de 3,4 mol H_2.mol sacarose^{-1}, equivalente a 0,87 mmol H_2.g DQO^{-1}, com 37% de H_2 no biogás no TDH de 7,5 h e TCO de 84,2 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1} em RLF termofílico (55ºC) utilizando vinhaça como substrato.

No reator RM foi avaliado o efeito do aumento da TCO de 2 a 15 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1} na produção de metano por meio do aumento da DQO de 2 para 15 g.L^{-1} no TDH de 24 h. A conversão de carboidrato manteve-se constante entre 86,7 ± 4,2 % e 92,0 ± 4,0 % com o aumento da DQO de 2 para 15 g.L^{-1}. A remoção de DQO aumentou de 65,6 ± 7,7 % para 79,4 ± 5,2 % com o aumento da DQO de 2 para 15 g.L^{-1}, equivalente ao aumento da TCO de 2 a 15 kg DQO.m^{-3}.dia^{-1}.

Por outro lado, os reatores sequenciais RSM e RST foram alimentados no TDH de 18 h com 100% vinhaça nas DQO de 2 e 5 g.L^{-1}. Após adaptação na DQO de 5 g.L^{-1}, o efluente do reator acidogênico foi codigerido com a vinhaça com 50% de DQO de cada componente na DQO de 5 g.L^{-1}. (5 V+E). Por fim, apenas o efluente do reator acidogênico foi utilizado na sua forma diluída (10 g DQO.L^{-1}) e bruta (15 g DQO.L^{-1}). A conversão de carboidrato no RSM manteve-se constante entre 77,5 ± 5,7 % e 89,4 ± 2,8 % e no RST entre 76,3 ± 7,4 % e 86,6 ± 5,7 % com o aumento da DQO de 2 para 15 g.L^{-1}. Por outro lado, a remoção de DQO no reator RSM aumentou de 64,8 ± 5,2 % para 79,4 ± 5,1 % ao aumentar a DQO de 2 para 15 g.L^{-1} devido a melhor adaptação ao efluente do reator RA pré-digerido. Similarmente, a remoção de DQO no reator RST aumentou de 65,9 ± 6,9 % para 83,3 ± 4,9 % ao aumentar a DQO de 2 para 10 g.L^{-1}. Entretanto, na DQO de 15 g.L^{-1} a remoção de DQO do reator RST foi reduzida para 68,6 ± 5,7 %.

Em RALF mesofílico (30 ºC) Siqueira et al. (2013) avaliaram o aumento da TCO de 3,33 a 26,19 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1} em com partículas suporte de poliestireno no tratamento de vinhaça de cana de açúcar (DQO de 2.273 a 20.073 mg DQO.L^{-1}) no TDH de 24 h. As remoções de DQO aumentaram de 53% para 70% com o aumento da DQO de 2.273 para 15.244 mg DQO.L^{-1}, na TCO de 19,87 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1} removendo 13,93 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1}. Com o aumento da DQO para 20,073 mg DQO.L^{-1} a remoção foi reduzida para 51% pois a TCO aplicada de 26,19 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1} foi muito elevada.

Os valores de pH afluente e efluente mantiveram-se entre 6,4 ± 0,5 e 6,0 ± 0,7 e entre 8,2 ± 0,3 e 8,2 ± 0,2 nos reatores RM e nos reatores sequenciais, respectivamente. Alcalinidade foi adicionada ao afluente dos reatores RM, RSM e RST de forma a manter os valores de pH dentro destas faixas que favorecem as arquéias metanogênicas. A alcalinidade dos reatores foi medida durante toda a operação dos reatores para garantir a estabilidade. Os valores de alcalinidade parcial do reator RM aumentaram de 272 ± 100 para 665 ± 304 mg $CaCO_3$.L^{-1} com o aumento da DQO de 5 para 15 g.L^{-1}. Os valores de AI/AP mantiveram-se inferiores a 0,3 e foi possível diminuir a relação de $NaHCO_3$/DQO de 1 para 0,2 com o aumento da DQO de 5 para 10 g.L^{-1}. Da mesma forma, os valores de alcalinidade parcial dos reatores RSM e RST aumentaram de 242 ± 70 para 739 ± 274 mg $CaCO_3$.L^{-1} e de 283 ± 77 para 780 ± 225 mg $CaCO_3$.L^{-1}, respectivamente, com o aumento da DQO de 5 para 15 g.L^{-1}. Isso possibilitou a diminuição da relação de $NaHCO_3$/DQO de 1 para 0,1 mantendo os valores de AI/AP inferiores a 0,3.

Da mesma forma, no estudo de Siqueira et al. (2013) a razão entre a alcalinidade efluente e a alcalinidade afluente (AE/AA) aumentou de 1,43 para 3,00 com o aumento da TCO de 3,33 para 26,19 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1}, gerando alcalinidade. Entretanto, a alcalinidade gerada não foi suficiente para tamponar o sistema. Os valores da razão entre alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial (AI/AP) maiores que 0,4 (entre 0,49 a 0,87) indicaram instabilidades durante a operação do RALF na TCO de 26,19 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1}. Desta forma, foi observada acúmulo de ácidos e diminuição na remoção de DQO na TCO de 26,19 kg DQO. m^{-3}.dia^{-1}.

A composição do biogás produzido nos reatores RM, RSM e RST foi avaliada durante todas as condições de operações. Com o aumento da DQO afluente de 2 para 15 $g.L^{-1}$ a composição de metano (CH_4%) no reator RM permaneceu entre 61,8 ± 8,2 % e 75,0 ± 11,4 %. Da mesma forma, o aumento da DQO afluente de 2 para 15 $g.L^{-1}$ a CH_4% nos reatores sequenciais permaneceu entre 67,9 ± 7,3 % e 86,2 ± 6,9 %. No estudo de Ferraz Júnior et al. (2016) avaliando a performance de UASB termofílico (55 ^oC) a composição de metano permaneceu entre 58,4 e 62,2% (UASB I) e 51,1 e 75,9% (UASB II).

A produtividade volumétrica de metano (PVM) foi avaliada durante todas as condições de operação nos reatores RM, RSM e RST. Os valores de PVM observados para os reatores RM, RSM e RST são ilustrados nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 – Variação na PVM em função da DQO aplicada no RM

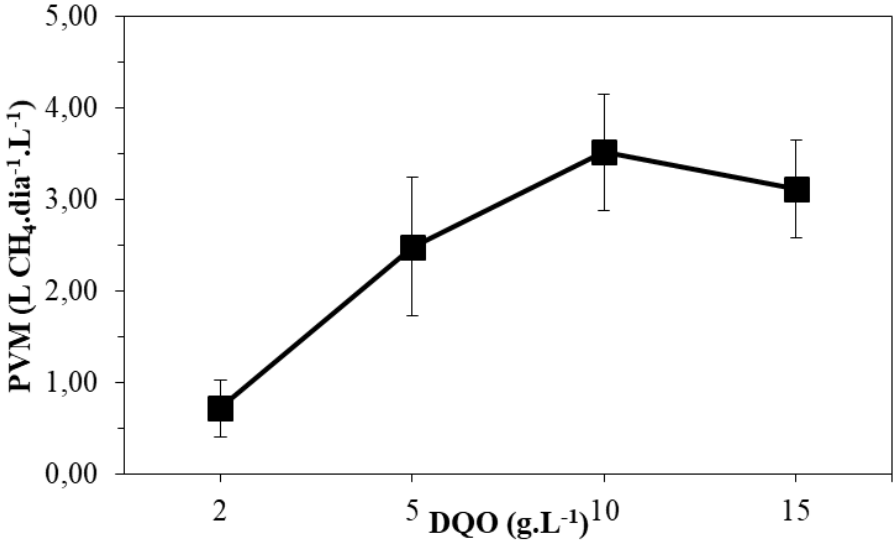
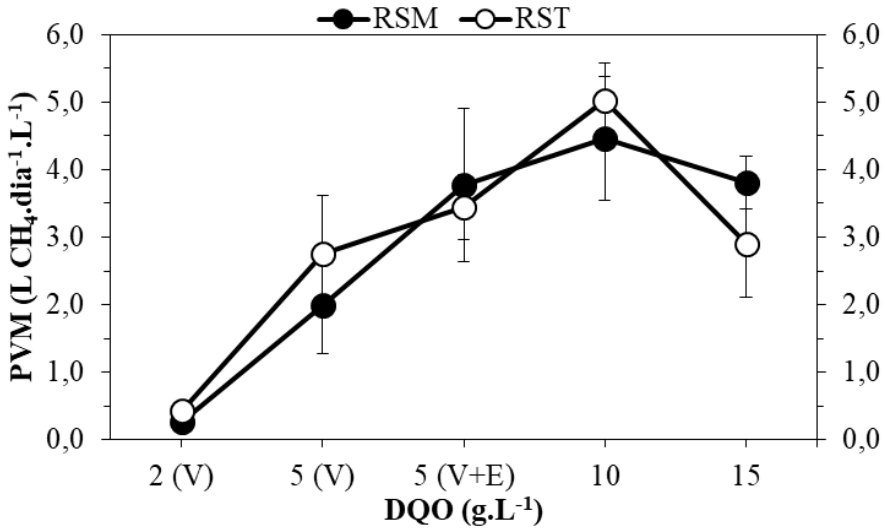


Figura 3 – Variação na PVM em função da DQO aplicada no RSM e no RST



Os valores de PVM do reator RM aumentaram de 0,72 ± 0,31 para 3,52 ± 0,63 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$ com o aumento da DQO de 2 para 10 $g.L^{-1}$. Entretanto, o aumento da DQO para 15 $g.L^{-1}$ a PVM foi reduzida para 3,11 ± 0,53 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$. Por outro lado, o aumento da DQO de 2 para 10 $g.L^{-1}$ aumentou a PVM do reator RSM de 0,27 ± 0,05 para 4,46 ± 0,91 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$. No reator RST a PVM aumentou de 0,42 ± 0,11 para 5,02 ± 0,55 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$ com o aumento da DQO de 2 para 10 $g.L^{-1}$. Entretanto, o aumento da DQO para 15 $g.L^{-1}$ reduziu a PVM do RSM e do RST para 3,81 ± 0,32 e 2,89 ± 0,79 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$, respectivamente.

De forma similar, Siqueira et al. (2013) avaliando o aumento da TCO de 3,33 a 26,19 kg DQO. $m^{-3}.dia^{-1}$ em RALF mesofílico (30 ^oC) no tratamento de vinhaça de cana de açúcar (DQO de 2.273 a 20.073 mg $DQO.L^{-1}$) no TDH de 24 h, observou aumento na PVM de 0,87 para 5,37 m^3 $CH_4.m^{-3}.dia^{-1}$, com resultado máximo na TCO de 26,19 kg DQO. $m^{-3}.dia^{-1}$. No estudo de Ferraz Júnior et al. (2016) foi avaliada a performance de UASB termofílico (55 ^oC) a produtividade de metano aumentou de 1,38 para 2,11 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$ no UASB I e de 1,37 para 2,80 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$ no UASB II com o aumento da TCO de 15 a 25 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$.

Nas Figuras 4 e 5 são ilustrados os efeitos da DQO e do TDH no rendimento de metano (MY) nos reatores RM, RSM e RST, respectivamente.

Figura 4 – Variação no MY em função da DQO aplicada no RM

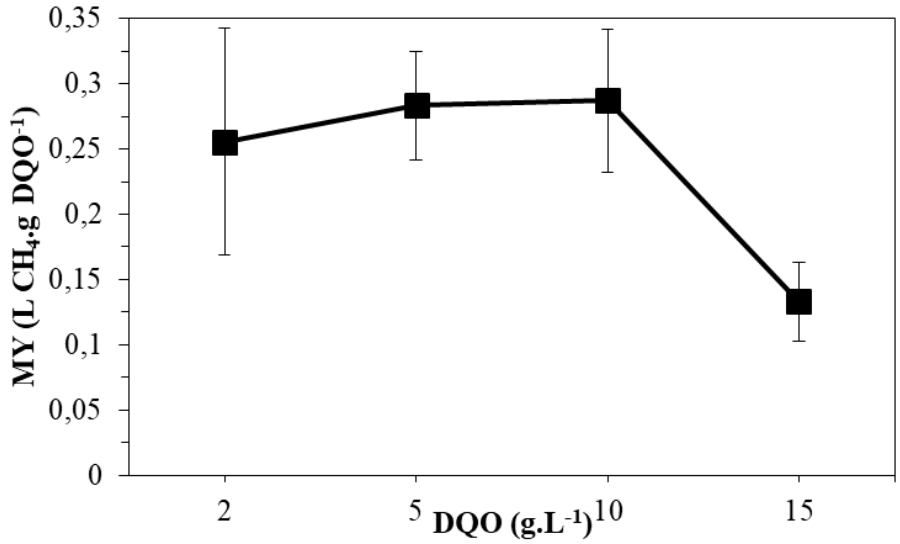
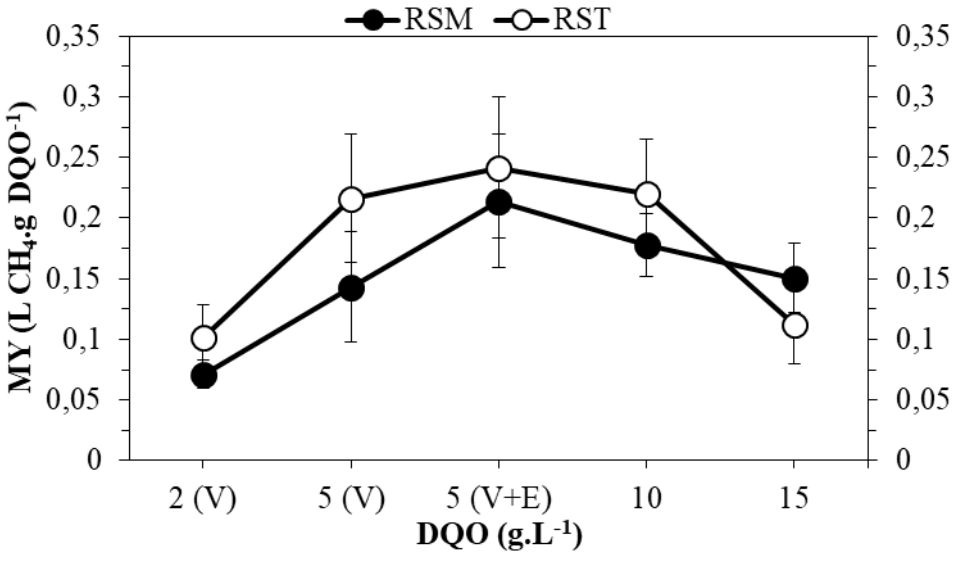


Figura 5 – Variação na MY em função da DQO aplicada no RSM e no RST



O MY do reator RM aumentou de 0,25 ± 0,08 para 0,29 ± 0,05 L CH_4.g DQO^{-1} com o aumento da DQO de 2 para 10 $g.L^{-1}$. Entretanto, o aumento da DQO para 15 $g.L^{-1}$ a MY foi reduzida para 0,13 ± 0,03 L CH_4.g DQO^{-1}. Da mesma forma, o MY do RSM aumentou de 0,07 ± 0,01 para 0,22 ± 0,05 L CH_4.g DQO^{-1} com o aumento da DQO de 2 para 5 $g.L^{-1}$. No RST o aumento da DQO de 2 para 5 $g.L^{-1}$ aumentou o MY de 0,10 ± 0,02 para 0,24 ± 0,06 L CH_4.g DQO^{-1}. Entretanto, o aumento da DQO para 15 reduziu o MY para 0,15 ± 0,03 e para 0,11 ± 0,03 L CH_4.g DQO^{-1} no RSM e no RST, respectivamente.

Desta forma, Siqueira et al. (2013) com o aumento da TCO de 3,33 para 26,19 kg DQO. $m^{-3}.dia^{-1}$ o MY permaneceu entre 0,32 a 0,38 m^3 CH_4. kg DQO^{-1}, equivalentes a 84,2% a 97,4% do rendimento estequiométrico (30 ^oC). No estudo de Ferraz Júnior et al. (2016) o rendimento de metano aumentou de 0,179 para 0,234 m^3 CH_4. kg DQO^{-1} no UASB I e de 0,227 a 0,306 m^3 CH_4. kg DQO^{-1} no UASB II com o aumento da TCO de 15 a 25 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$.

No estudo de Aquino et al. (2017) foi avaliado o efeito do aumento da TCO de 2,4 a 18,0 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$ em reator anaeróbio de leito estruturado (RALE) mesofílico (30 ^oC). No RALE o rendimento de metano permaneceu constante entre 0,26 a 0,31 m^3 CH_4. kg DQO^{-1} com o aumento da TCO de 2,4 a 18 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$, obtendo valor máximo na TCO de 10,2 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$. Por outro lado o rendimento de metano no RLF aumentou 0.26 para 0.31 m^3 CH_4. kg DQO^{-1} com o aumento da TCO de 2,4 a 5,5 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$. Entretanto, a redução do TDH de 60 h para 48 h diminuiu o MY para 0.18 m^3 CH_4. kg DQO^{-1}. A redução do TDH de 48 h para 24 h aumentou o MY para 0.27 m^3 CH_4. kg DQO^{-1}.

No estudo de Fuess et al. (2017) foi avaliado o efeito do aumento da TCO de 15 a 30 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$ na digestão aneróbia de vinhaça em 2 estágios comparando um RALE e um UASB termofílicos (55 ^oC) no estágio metanogênico. No reator UASB metanogênico o rendimento de metano aumentou de 0,232 para 0,283 m^3 CH_4. kg DQO^{-1} com o aumento da TCO de 15 para 25 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$. No reator RALE metanogênico o aumento da TCO de 15 para 30 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$ aumentou o rendimento de metano de 0,249 para 0,301 m^3 CH_4. kg DQO^{-1}, com valor máximo na TCO de 25 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$.

De forma geral, os resultados do sistema de dois estágios foram superiores à digestão anaeróbia da vinhaça em um estágio. Enquanto o reator RM obteve remoção de DQO de 79,4 ± 5,2 %, a remoção global dos sistemas de dois estágios mesofílico (RA+RSM) e termofílico (RA+RSM) foram de 82,1 ± 5,1% e 72,6 ± 5,6% , respectivamente, na DQO de 15 $g.L^{-1}$. Mesmo assim, a principal vantagem do sistema de dois estágios está na produção de hidrogênio e metano. Ao contrário do reator RM, que não obteve produção de hidrogênio, o estágio acidogênico (RA) do sistema de dois estágios obteve HY de 0,69 ± 0,13 mmol H_2.g DQO^{-1} e PVH de 3,68 ± 0,53 L $H_2.dia^{-1}.L^{-1}$, com H_2% de 31,1 ± 5,6%. O uso do reator RA para realizar a acidificação da vinhaça possibilitou uma redução do TDH global de 24 h (RM) para 22 h no sistema em dois estágios. Dessa forma, a operação em TDH inferior possibilitou uma maior PVM no reator RM de 3,81 ± 0,32 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$ em comparação com o reator RM (3,11 ± 0,53 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$) e RST (2,89 ± 0,79 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$) na DQO de 15 g $DQO.L^{-1}$. Portanto, o sistema de dois estágios com reator metanogênico mesofílico obteve maior remoção de matéria orgânica e maior produção de metano em TCO de 16,36 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$, superior a TCO de 15 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$ no RM.

De acordo com Ramos e Silva (2019) a implementação da digestão anaeróbia de vinhaça em dois estágios possibilita menor pressão parcial de hidrogênio no estágio metanogênico, diminuindo a produção de ácidos de difícil conversão a CH_4, como o ácido propiônico, além de acidificar a vinhaça para previnir a inibiçã da população metanogênica pela acidificação excessiva.

Ao comparar o segundo estágio metanogênico mesofílico (RSM) e termofílico (RST) observa-se melhor desempenho do sistema mesofílico em maior taxa de carregamento orgânico (TCO de 16,36 kg $DQO.m^{-3}.dia^{-1}$). Esta diferença de desempenho é observada

principalmente no MY e na PVM. Enquanto o RSM obteve MY de 0,15 ± 0,03 L CH_4. g DQO^{-1} e PVM de 3,11 ± 0,53 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$, em comparação com o MY de 0,11 ± 0,03 L CH_4.g DQO^{-1} e PVM de 2,89 ± 0,79 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$ no RSM.

Isso ocorre porque o processo anaeróbio necessita de múltiplos grupos de microorganismos trabalhando em sinergia para a conversão da matéria orgânica acidificada no reator RA para CH_4. Entre condições mesofílicas e termofílicas, o aumento da temperatura reorganiza a comunidade microbiana, observando maior diversidade microbiana mesofílica que a condição termofílica (Pap et al., 2015). Portanto, o reator metanogênico mesofílico tem maior robustes que o reator termofílico.

Essa caracteristia possibilita a aplicação de um sistema de reciclo entre o reator metanogênico mesofílico e o reator acidogênico termofílico. Enquanto o reator acidogênico termofílico acidifica a vinhaça, o reator metanogênico mesofílico produz alcalinidade que pode ser aproveitada na alimentação do reator acidogênico. A diferença de temperatura garante a inibição das arquéias metanogênicas mesofílicas no reator acidogênico termofílico. Assim, esta associação possibilita uma operação mais robusta, com menores gastos com produtos químicos e melhor sinergia do processo.

Conclusões

Os resultados observados neste estudo indicam a viabilidade da produção de hidrogênio e metano em condições de estágio único ou dois estágios tanto em condições termofílicas quanto mesofílicas. No reator RA a porcentagem de H_2 foi de 31,2 ± 5,6 % com PVH de 3,68 ± 0,53 L $H_2.dia^{-1}.L^{-1}$ e HY de 0,69 ± 0,13 mmol H_2.g DQO^{-1}. O aumento da DQO de 2 para 15 $g.L^{-1}$ nos reatores RSM e RST favoreceu a produção de metano, observando aumentou produtividade (4,46 ± 0,92 e 5,02 ± 0,56 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$) e rendimento (0,22 ± 0,05 e 0,24 ± 0,06 L CH_4.g DQO^{-1}) mantendo a composição de metano acima de 60%. or outro lado, foi observado no RM resultados similares de conteúdo de metano (61,8 ± 8,2% a 75,0 ± 11,4%) e MY (0,29 ± 0,05 L CH_4.g DQO^{-1}), mas com menor PVM (3,12 ± 0,53 L $CH_4.dia^{-1}.L^{-1}$) e com remoção de DQO de 81,4 ± 3,4 % na concentração de 10 g $DQO.L^{-1}$. Estes resultados mostram a vantagem do sistema em dois estágios sobre o sistema de um estágio metanogênico para a digestão anaeróbia de vinhaça, observando maior produção de hidrogênio e metano.

Referências Bibliográficas

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998) 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Aquino, S., Fuess, L.T., Pires, E.C., 2017. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. Biores. Technol. 235, 219-228.

Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-Orticoni, M., Ferrasse, L., 2015. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: a review. Biores. Technol. 185, 386-398.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

Ferraz Júnior, A.D., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. Int. J. Hydrogen Energy. 39, 16852-16862.

Ferraz Júnior, A.D., Koyama, M.H., Araújo Júnior, M.M., Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. Renew. Energ. 89, 245-252.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2016. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. Int. J. Hydrogen Energy. 41, 8132-8145.

Fuess, L.T., Kiyuna, L.S.M., Ferraz Júnior, A.D.N., Persinoti, G.F., Squina, F.M., Garcia, M.L., Zaiat, M., 2017. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. Appl. Energy. 189, 480-491.

Kim, D.H., Han, S.K., Kim, S.H., Shin, H., 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy. 31, 58-69.

Liu Z., Zhang C., Lu Y., Wu X., Wang L., Wang L., Han B., Xing X.H., 2013. States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. Bioresour. Technol. 135, 292-303.

Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A., 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. Renew. Sust. Energ. Rev. 44, 888-903.

Ottaviano L.M., Ramos L.R., Botta L.M., Varesche M.B.A., Silva E.L., 2017. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. Int. J. Hydrogen Energy. 42, 4848-60.

Pap, B., Györkei, Á., Boboescu, I.Z., Nagy, I.K., Bíró, T., Kondorosi, É., Maróti. G., 2015. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis uner thermophilic operation. Biores. Technol. 177, 375-380.

Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors, Int. J. Hydrogen Energy. 38, 6137-6145.

Ramos L.R., Silva E.L., 2017. Improving EGSB reactor performance for simultaneous bioenergy and organic acid production from cheese whey via continuous biological H_2 production. Biotechnol. Lett. 39, 983-991.

Ramos L.R., Silva E.L., 2019. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors, Int. J. Hydrogen Energy.

Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes, Water Pollution Control Fed. 58, 406-11.

Rosa, P.R.F., Santos, S.C., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community compositon. Int. J. Hydrogen Energy. 161, 10-19.

Santos, S.C, Rosa, P.R.F, Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014 a. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugar cane stillage. Biores. Technol. 159, 55-63.

Santos, S.C, Rosa, P.R.F, Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2014 b. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. Int. J. Hydrogen Energy. 39, 9000-9011.

Siqueira, L.M., Damiano, E.S.G., Silva, E.L., 2013. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogas production in fluidized bed reactor. J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 48, 1707-1716.

Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresour. Technol. 100, 6339-6346.

Xia, A., Cheng, J., Murphy, J.D., 2016. Innovation in biological production and upgrading of methane and hydrogen for use as gaseous transport biofuel. Biotechnol. Adv. 34, 451-472.

PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE BIOCOMBUSTÍVEIS, EM REATORES EM BATELADA, A PARTIR DE BIOMASSA VEGETAL SOB CONDIÇÕES MESOFÍLICAS

Alexandre Rodrigues Ribeiro [1]; Maria Bernadete Amâncio Varesche [2]; Edson Luiz Silva [3]

[1] Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento;
[2] Professora do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *As biossínteses de biodiesel, etanol e biobutanol estão em ascensão, sendo alternativas sustentáveis para o uso de combustíveis fósseis. O biodiesel tem como subproduto o glicerol bruto, gerando um problema de destinação final deste resíduo. Assim, é fundamental novos processos capazes de converter este resíduo em compostos como o hidrogênio e álcoois como butanol. A produção de biobutanol é de alto interesse como biocombustível, pois ele possui diversas vantagens sobre o etanol, por exemplo. Além disso, a fermentação para a produção de hidrogênio, tem sido notoriamente reconhecido por ser um recurso que produz energia limpa que tem grande potencialidade e pode ser produzido a partir de distintas fontes de matérias-primas, como os resíduos agroindustriais que são problemas em diversos países. Desta maneira, pretende-se avaliar a produção de butanol e hidrogênio utilizando como substratos, respectivamente, o glicerol bruto e a casca de batata gerada como resíduo do setor alimentar, triturada e hidrolisada por base, em ensaios de batelada distintas sob condições anaeróbia mesofílicas (25°C), meios de culturas específicos, analisando a influência do pH, concentração de substrato e tempo de fermentação, a partir de uma cultura mista de microrganismos, tratada termicamente para inibir as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, proveniente de um reator UASB.*

Introdução

Sabe-se que a demanda por combustíveis fosseis é bastante alta e que ocasiona diferentes problemas em amplos aspectos ambientais, no Brasil e no mundo, como a poluição ambiental com a geração de poluentes atmosféricos, o uso excessivo de recursos não renováveis, e consequentemente a escassez de suas fontes de reservas. Desta maneira, as biossínteses do biodiesel, etanol e biobutanol, oriundos de recursos renováveis estão em ascensão, sendo uma alternativa favorável a utilização de biomassa vegetal. O Brasil, com o programa PROÁLCOOL, em 1973, quando seu governo decidiu substituir a gasolina por álcool combustível, fazendo com que os automóveis produzidos no país fossem alterados para receber a combustão do etanol, foi pioneiro na utilização de energia limpa (Da Silva et al., 2009).

Outro biocombustível que vem sendo bastante usado é o biodiesel, que tem origem da reação de transesterificação de óleos vegetais e de gorduras animais, e pode ser usado em automóveis movidos a diesel comum. O biodiesel apresenta algumas características vantajosas sobre o diesel à base de petróleo, como sua biodegradabilidade, não ser tóxico, possuir índices baixos de emissões de poluentes (Chen et al., 2007), e pode ser produzido por materiais renováveis e baratos (Chen et al., 2018). O Brasil, por apresentar uma alta criação de bovinos que propiciam a gordura animal, e devido à diversidade em grãos que são base para a extração dos óleos vegetais, se destaca mundialmente na produção do biodiesel.

Porém, na síntese de cada quilograma de biodiesel 100 g de glicerol bruto é gerado como subproduto, gerando um problema de destinação final deste resíduo. O composto 1,2,3-propanotriol, mais conhecido como glicerol ou glicerina, é um álcool simples que possui diversos usos em indústrias alimentícias, automotivas farmacêuticas, têxtil, de papel e celulose, por

exemplo, devido às suas características físicas e químicas (Wang et al, 2001). O método mais comum de produção de biodiesel é por meio da reação de transesterificação em que a biomassa (óleos ou gorduras) reage com um álcool de cadeia curta, sendo o metanol geralmente utilizado, e como catalisador da reação é usado um ácido ou uma base. Neste processo, a cada um quilograma de biodiesel produzido, 0,10 kg de glicerol é gerado como subproduto (Chen et al., 2018). Segundo Mota, Silva e Gonçalves (2009), esta reação tem como produtos três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, que constituem o biodiesel, e uma molécula de glicerol.

Ademais, o glicerol é considerado como matéria prima para novas fermentações, gerando vários produtos químicos com valor agregado (Wang et al, 2001). A conversão do glicerol nestes compostos pode ser realizada química ou biologicamente, porém a conversão biológica apresenta um maior rendimento e seletividade, e oferece o uso de catalisadores mais baratos, os catalizadores biológicos. O glicerol bruto apresenta em sua composição gorduras livres, ácidos, sabões, catalisador, sais, metanol e principalmente glicerol (Chen et al., 2018). A transformação do glicerol bruto usando processo biotecnológico anaeróbio é uma alternativa, que não apresenta altos custos, quando comparada à outros processos industriais, capaz de convertê-lo em compostos como o hidrogênio (H_2) (Selembo et al., 2009), álcoois como o etanol (Lee et al., 2017), 1,3-propanodiol (Da Silva et al., 2009), ácidos carboxílicos e butanol (Taconi, Venkataramanan e Johnson, 2009).

De acordo com Yadav et al. (2014), tem-se um enorme interesse do uso do butanol como biocombustível, pois ele possui diversas vantagens sobre o etanol, apresentando característica como maior valor de aquecimento, menor pressão de vapor e maior miscibilidade com os combustíveis do petróleo, se comparado ao etanol. Ademais, é um dos principais produtos químicos da plataforma da biorrefinaria que serve como base biológica para muitos produtos químicos de petróleo e como combustível alternativo, estando o mercado de butanol em expansão devido à sua vasta gama de aplicações na produção de plastificantes, revestimentos, detergentes e freios fluidos.

A rota de obtenção industrial do butanol tem desvantagens devido à produção de coprodutos considerados indesejáveis. Além disso, os custos para a geração de butanol sintético são associados, diretamente, à produção do propileno, sendo muito sensíveis às oscilações de preços do petróleo bruto (Yadav *et al*., 2014). Assim, a rota fermentativa se mostra bastante viável, pois os produtos de interesse e os coprodutos formados podem gerar outros produtos químicos de valor agregado (Maziero, Trierweiler e Trierweiler 2011).

Segundo Yadav et al., (2014), o glicerol tem o potencial de se tornar um importante produto químico utilizado para a produção de butanol, e usando *Clostridium acetobutylicum* KF158795 perceberam que estes microrganismos são potentes produtores de butanol. Por meio de ensaios em batelada, sob condições anaeróbias, variando o pH entre 4 e 8, as concentrações de glicerol entre 25 e 65 $g.L^{-1}$, a temperatura entre 25 e 45 ºC, em um meio nutricional específico foi realizado um planejamento experimental estatístico, onde as interações entre os parâmetros mais influentes obtidos foram investigadas para aumentar o rendimento de butanol. Os resultados mostraram que a cepa foi capaz de utilizar 45 $g.L^{-1}$ de glicerol a uma temperatura de 37 ºC, pH de 6,5 (condições ótimas) em um rendimento final de 9,5 $g.L^{-1}$ de butanol a partir do glicerol bruto como uma única fonte de carbono. Em seguida, conseguiram com outra otimização de parâmetros uma produção e 13,57 $g.L^{-1}$ de butanol obtida em 96 horas de incubação.

No entanto, Taconi, Venkataramanan e Johnson (2009), realizaram, antes dos ensaios em batelada, um choque térmico à temperatura entre 70 e 80 ºC por 10 minutos, como pré-tratamento, no inóculo contendo *C. pasteurianum* (ATCC 6013TM), cultivado, posteriormente, em meio de glicose, em condições anaeróbias à 35 ºC. Em seguida, nos ensaios, testaram o glicerol puro e, posteriormente, o glicerol bruto, como substrato para a obtenção do butanol, em um pH inicial de 7, sem uso de solução tampão, em meio nutricional específico, variando a concentração de substrato em 5, 10 e 25 $g.L^{-1}$ em cada reator, obtendo como rendimento máximo de butanol de 0,36 gramas de butanol por gramas de glicerol puro

consumido, tendo como concentração de substrato inicial de 5 $g.L^{-1}$, e 0,30 gramas de butanol por gramas de glicerol bruto consumido, a partir de uma concentração inicial de 25 $g.L^{-1}$ de substrato.

Alguns parâmetros, como o pH, é reconhecido como um fator bastante relevante que afeta o resultado da fermentação, porém não existe um consenso na literatura sobre um pH específico ou concentração de ácido não dissociada que seja ideal para produção dos solventes, pois dependendo dos microrganismos utilizados o pH ótimo varia para a obtenção das concentrações necessárias dos ácidos não dissociados (Jones e Woods, 1986). Diversos fatores do meio influenciam a formação do butanol, e suas influencias variam dependendo dos microrganismos utilizados, como quando se utiliza cultura pura de *C. acetobutylicum*, fatores como pH, concentração de butirato, concentração inicial de substrato, taxa de crescimento e estado fisiológico dos microrganismos são importantes, porém em culturas puras de *Clostridium pasteurianum*, a produção de butanol não é significativamente afetado pelo pH em culturas contínuas. Diferentemente, em culturas de bateladas ao examinar a influência do pH entre 5 e 7,5, da concentração de glicerol e da presença de extrato de levedura, usado como meio de cultivo, observou-se consideráveis variações no padrão de formação dos produtos nos ensaios em bateladas (Biebl, 2001).

Além do biodiesel e do biobutanol, existe o hidrogênio, que tem sido considerado como portador de energia do futuro, e é um combustível limpo, pois apresenta a água como único produto obtido de sua combustão, e possui alto rendimento energético (Das e Veziroglub, 2001). Os métodos biológicos fermentativos de produção do hidrogênio oferecem a possibilidade de utilizar uma menor demanda de energia e usar resíduos orgânicos da agroindústria como substratos em conversões ambientalmente benignas, sendo preferíveis aos métodos químicos (Guo et al., 2010). Além do que, a produção e consumo do hidrogênio na digestão anaeróbia influencia significativamente na acumulação de ácidos graxos voláteis, que atuam consequentemente na produção de lactato, etanol, acetona e butanol (solventogênese) (Valdez-Vazquez *et al*., 2006).

O hidrogênio pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas, como os resíduos agroindustriais que são problemas em diversos países, principalmente devido ao crescimento e ao desenvolvimento populacional. Toneladas de resíduos orgânicos são produzidos pelos setores agrícolas e industriais. Estes resíduos são principalmente dispostos em aterros e corpos d'águas, prejudicando sistemas ambientais terrestres e aquáticos. A eliminação desses resíduos gera perigo a saúde das pessoas que vivem próximos aos locais de disposição, pois além de serem depósitos para vetores de doenças, como roedores e insetos (Ashton, 2008), podem ocasionar doenças respiratória e, até mesmo, câncer, devido aos gases tóxicos produzidos na degradação destes resíduos (Broomfield, Davies e Harrison, 2011). Ademais, o resíduo da batata é um substrato ideal para produção de biohidrogênio devido a sua composição (80-95% de sólidos voláteis e 75-85% de umidade) (Zhou, Elbeshbishy e Nakhla, 2013).

A produção fermentativa de hidrogênio apresenta alguns benefícios socioeconômicos e, assim, tem sido notoriamente reconhecido por ser um recurso que produz energia limpa que tem grande potencialidade, devido às várias características que incluem a habilidade de sequestrar carbono, é menos intensivo em energia, e pode ser produzido a partir de distintas fontes de matérias-primas (Mohanakrishna, Mohan e Sarma, 2010), como a polpa da mandioca (Phowan, Danvirutai, 2014), melaço (Ren et al., 2006), resíduo vegetal de cozinha (Lee et al., 2010) e a casca da batata (Sekoai, Ayeni e Daramola, 2017).

De acordo com as estatísticas da Organização das nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), no anuário estatístico de 2004, no mundo a produção de batatas chegou a 330 milhões de toneladas. Uma grande quantidade dos resíduos de batata é produzida a cada ano oriundos dos processos da produção agrícola e alimentar. Considerando que os resíduos agrícolas são formados de complexos substratos e podem ser biodegradados por meio de cultivos de microbianos complexos, a fermentação torna-se uma tecnologia fundamental para

a geração de hidrogênio a partir de resíduos alimentares (Guo *et al*., 2010). Segundo Izmirlioglu e Demirci (2015), a utilização de resíduos industriais de batata, como fonte de carbono, na síntese de produtos além de reduziremos custos de produção, faz com que ocorra o gerenciamento destes resíduos de forma econômica e ambientalmente correta.

No entanto, geralmente, quando se utiliza estes resíduos agroindustriais como substrato para a produção de hidrogênio, para facilitar a produção e aumentar a velocidade de bioconversão do resíduo ao H_2 necessita-se como etapa primordial o pré-tratamento. Esta etapa quebra o selo de lignina do material lignocelulósico e modifica o tamanho, a estrutura e a composição química, podendo ser realizada por procedimentos físicos, como a moagem e trituração (muito usados para materiais lignocelusósicos), procedimentos químicos, como o uso de meio ácido, alcalino ou líquido iônico, e procedimentos físico-químicos, como os hidrotérmicos e a explosão a vapor do substrato, sendo estes dois últimos muitos intensivos em termos de energia (Nissilä, Lay e Puhakka,2014).

Ademais, a biomassa lignocelulósica é constituída em sua maior parte de carboidratos (celulose e hemicelulose) e composta também de lignina. A hemicelulose e a lignina são estruturas que conferem rigidez para este tipo de biomassa vegetal, sendo necessária a realização de uma hidrólise prévia para facilitar a biodegradação deste resíduo (Ren et al.,2009). Desta maneira, o processo de hidrólise pode ser usado após o procedimento físico para aumentar rendimento de açúcar a partir de celulose e hemicelulose, evitar a perda de açúcares, diminuir a formação de subprodutos que inibem o processo, ter um maior custo-benefício e recuperar a lignina que pode ser convertida em coprodutos de valor agregado. A escolha dos métodos de pré-tratamento dependerá do substrato utilizado, das condições de material e operação. Em geral, comparando o tratamento ácido e alcalino, são obtidos maiores rendimentos de H_2 após o ácido (Nissilä, Lay e Puhakka,2014).

Sekoai, Ayeni e Daramola (2017), encontraram um rendimento máximo de 68,54 mL de H_2 por grama de sólidos voláteis totais, por meio de fermentação sob as seguintes condições ótimas obtidas em ensaio em batelada: 39,56 $g.L^{-1}$ de concentração de resíduo de batata; pH de 7,86; temperatura de 37,87 ºC; em um tempo de fermentação de 82,56 h. O inóculo, anteriormente, foi pré-tratado através de choque térmico à 90 ºC por 30 minutos para prevenir o crescimento de arqueas metanogênica e ativar as bactérias bio-geradoras de esporos e, em seguida, cultivada em um meio nutricional específico. Após otimização dos parâmetros os pesquisadores obtiveram 79,43 mL de H_2 por grama de sólidos voláteis totais.

Vi, Salakkam e Reungsang (2017), para a produção de biohidrogênio a partir de batata doce como substrato, observaram três fatores importantes que afetam a produção de hidrogênio a partir de deste substrato em fermentação anaeróbia em batelada, foram a concentração de amido de batata-doce, o pH inicial e a concentração de $FeSO_4$. O trabalho realizado utilizou como inóculo um lodo coletado de um reator de manta de lodo de fluxo ascendente em uma estação de tratamento de efluentes, tratado termicamente, antes da inoculação, para inibir o crescimento das bactérias consumidoras de hidrogênio. Os ensaios em bateladas foram realizados a uma temperatura em torno dos 30 ºC, testando-se uma faixa de pH de 5 a 8, e diferentes concentrações iniciais de substrato (15-40 $g.L^{-1}$) e concentrações de FeSO4 (5-120 mg. L^{-1}). Desta maneira, após a otimização dos três fatores principais, observaram uma máxima produção de hidrogênio acumulativa de 3.501 mL de H_2. L^{-1} obtida a partir de uma concentração de 27,63 $g.L^{-1}$ de amido de batata-doce, 6,05 de pH inicial e uma concentração de 63,17 mg. L^{-1} de $FeSO_4$.

Neste contexto, o presente projeto de pesquisa apresenta como objetivo principal avaliar a produção de butanol e hidrogênio utilizando como substratos o glicerol bruto e a casca de batata, respectivamente, em ensaios de batelada sob condições anaeróbia mesofílicas (25 °C), determinando a melhor hidrólise química da casca da batata, variando a proporção do composto hidrolisante. Além disso, pretende-se avaliar a influência do pH, da concentração de microrganismos, da concentração de substrato e do tempo de fermentação na produção de hidrogênio e de butanol.

Material e Métodos

A metodologia deste trabalho foi determinada em etapas, as quais englobam teste preliminares em batelada, em frascos Duran de 1L de volume total com dimensões idênticas, que objetivam otimizar o meio de cultura avaliando o rendimento na produção de hidrogênio, a partir da casca da batata; e na produção do butanol, tendo como substrato o glicerol bruto. Os frascos serão purgados com gás nitrogênio durante 10 minutos e imediatamente selado com rolhas de borracha de silicone para criar condições anaeróbicas que favoreçam o crescimento dos microrganismos produtores de butanol e hidrogênio. A quantidade de inóculo será de 10% do volume útil de cada frasco Duran. O pH inicial será ajustado entre 5,5 e 6,0 nos testes preliminares e verificados valores entre 5,5 e 7,5 nos ensaios seguintes com finalidade de otimização das condições do meio. Além disso, as concentrações dos substratos irão variar, visando encontrar a melhor carga orgânica para a produção de butanol e hidrogênio. Os experimentos serão realizados em duplicata para melhor precisão e redução erro experimental, em incubadoras agitadoras sob rotação de 150 rpm. Os testes em batelada e as análises físico-químicas, serão realizadas no Laboratório de Controle Ambiental II (LCA II), do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os ensaios em bateladas que serão realizados nesse trabalho serão inoculados com lodo granular anaeróbio proveniente de um reator UASB destinado para o tratamento das águas residuárias geradas no abatedouro de aves, Avícola Dacar S/A (Tietê/SP), que será triturado.

Objetivando-se a produção de hidrogênio e butanol, deve-se inibir a metanogênese, eliminando-se as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas e selecionando as bactérias responsáveis pela acidogênese, como as acidogênicas esporulantes, e solventogênese com a submissão do lodo e ao tratamento térmico proposto por Kim et al. (2006). O método consiste em aquecer o lodo a temperatura de 90 ºC por 10 minutos sob constante homogeneização, e em seguida é encaminhado a um banho de gelo até atingir a temperatura de 25 ºC.

Como substrato utilizado como fonte de carbono, em um dos ensaios em batelada, será o glicerol bruto bidestilado proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada no município de Brotas – SP com objetivo de produzir butanol. Desta forma, serão testadas diferentes concentrações de glicerol (10-75 $g.L^{-1}$) para estabelecer a melhor concentração de glicerol e o efeito do aumento do glicerol na produção de butanol. Além disso, serão testados em ensaios seguintes o efeito do pH inicial (5,5–7,5) e do meio nutricional, tendo como base a literatura. O meio nutricional sugerido para estes ensaios será de acordo com Khanna, Goyal e Moholkar (2012), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Nutrientes adicionados para suplementação.

Composto	**Concentração ($g.\ L^{-1}$)**
Levedura	1
$CaCl_2.\ 2\ H_2O$	0,01
$MgSO_4.\ 7.\ H_2O$	0,1
KH_2POH	0,5
K_2HPOH	0,5
$FeSO_4.\ 7.H_2O$	0,005

Em outros ensaios serão utilizadas como substrato, visando a produção de hidrogênio, a casca da *Solanum tuberosum*, mais conhecida como batata inglesa, que será adquirida em

supermercados, localizados no município de São Carlos -SP que será pré-tratada para facilitar a etapa seguinte de fermentação nos ensaios em batelada.

Desta maneira, após triturada em liquidificador, a casca da batata passará por hidrólise química, em Frascos Duran de 500 mL, com volume útil de 250 mL, durante 1 hora, em estufa sob temperatura de 55 ºC, antes de entrar em contato com o inóculo, onde serão testados alguns ácidos, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl), e a base hidróxido de sódio (NaOH) em diferentes porcentagens, como 1, 2, 3, 5 e 7 % do volume útil do meio, com o objetivo de definir qual produz o melhor efeito na produção volumétrica de hidrogênio. Ademais, serão testadas diferentes concentrações dos substratos (40-80 $g.L^{-1}$), pH (5,5-7,5) e temperatura (32-42 ºC), tendo como base a literatura, para definir os parâmetros ótimos para a produção de hidrogênio. O meio nutricional utilizado será o proposto por Del Nery (1987), como mostra a Tabela 2:

Tabela 2: Nutrientes adicionados para suplementação.

Composto	**Concentração (mg. L^{-1})**
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Cloreto férrico	0,5
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de sódio dibásico	33,4
Óxido de selênio	0,07
Sulfato de Níquel	1,00
Sulfato ferroso	5,00
Uréia	125,0

Para realização das análises será utilizada a metodologia descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater da APHA (2012). Serão avaliados os parâmetros: pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais e voláteis (SST/SSV). A concentração de carboidratos totais e de glicerol das amostras serão determinadas por meio dos métodos colorimétricos descrito por Dubois et al (1956) e Bondioli e Della Bella (2005), respectivamente.

A produção volumétrica do biogás gerado será realizada de acordo com a metodologia proposta por Walker et al. (2009). A análise de composição do biogás produzido será feita por cromatografia gasosa. As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico) e álcoois (etanol, metanol e n-butanol) será avaliada por técnica de cromatografia líquida utilizando HPLC Shimadzu (Rosa et al., 2014). Estas análises serão realizadas diariamente para observar o comportamento dos reatores e a produção de hidrogênio e metabólitos.

Referências Bibliográficas

APHA, AWWA, WPCF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition, American Public Health Association, Washington.

Ashton, Glenn, 2018. South African Waste Management in Crisis, South African.

Biebl, H., 2001. Fermentation of glycerol by Clostridium pasteurianum — batch and continuous culture studies. Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology. 27,18-26.

Bondioli, P., Della Bella, L., 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 153 – 157

Broomfield, M., Davies, J., Harrison, R., 2011. Review of Environmental and Health Effects of Management of Municipal Solid Waste. Londres, pp 1-420.

Chen, H., B. Peng, D. Wang, J. Wang. 2007. Biodiesel production by the transesterification of cottonseed oil by solid acid catalyst. Frontiers of Chemical Engineering in China. 1, 11-15.

Chen, J. et al., 2018. Chemical and biological conversion of crude glycerol derived from waste cooking oil to biodiesel. Waste Manag. 71,164–175.

Da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J, 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industry microbiology. Biotechnology Advances.27, 30-39.

Das, D., Veziroglub, 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. International Journal Of Hydrogen Energy. 26, 13-28.

Del Nery, V. 1987. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

Fao Statistc Yearbook. Statistics Division, 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fermentation: a review. Biotechnology Advances. 19, 201 – 223.

Guo, Xin Mei et al., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal Of Hydrogen Energy. 35, 10660-10673.

Izmirlioglu, Gulten, Demirci, Ali., 2015. Enhanced Bio-Ethanol Production from Industrial Potato Waste by Statistical Medium Optimization. International Journal Of Molecular Sciences. 16, 24490-24505.

Jones, David T., Woods, David R., 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. Microbiological Reviews. 50, 484-524.

Khanna, Swati, Goyal, Arun, Moholkar, Vijayanand S. Bioconversion of Biodiesel Derived Crude Glycerol by Immobilized Clostridium pasteurianum: Effect of Temperature. International Journal Of Chemical And Biological Engineering, Assam, p.301-304, jun. 2012.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. Process Biochemistry. 41, 199-207.

Lee, Sang Jun, Lee, J.H., Yang, X., Yoo, H.Y., Han, S.O., Park, C., Kim, S.W., 2017. Re-utilization of waste glycerol for continuous production of bioethanol by immobilized Enterobacter aerogenes. Journal Of Cleaner Production. 161, 757-764.

Maziero, Sara Scomazzon, Trierweiler, L. F., Trierweiler, J. O., 2018. Produção de Butanol por Clostridium Acetobutylicum. In: Oktoberfórum.10, 1 – 7.

Mohanakrishna, G., Mohan, S., Venkata, Sarma, P., 2010. Utilizing acid-rich effluents of fermentative hydrogen production process as substrate for harnessing bioelectricity: An integrative approach. International Journal Of Hydrogen Energy. 35, 3440-3449.

Mota, C. J. A., Da Silva, C. X. A., Gonçalves, V. L. C., 2009. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel. Química Nova. 32, 639-648.

Nissilä, Marika E., Lay, Chyi-how, Puhakka, Jaakko A., 2014. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates – A review. Biomass And Bioenergy.67, 145-159.

Phowan, Pantipa, Danvirutai, Paiboon, 2014. Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: Effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. Biomass And Bioenergy. 64, 1-10.

Ren, N et al., 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. International Journal Of Hydrogen Energy. 31, 2147-2157.

REN, Nanqi et al., 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. Biotechnology Advances. 27, 1051-1060.

Santos, S. C., Rosa, P. R. F., Sakamoto, I. K., Amâncio Varesche, M. B., Silva, E. L., 2014. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. International Journal of Hydrogen Energy. 39, 9599–9610.

Sekoai, Patrick T., Ayeni, Augustine O., Daramola, Michael O., 2017. Parametric Optimization of Biohydrogen Production from Potato Waste and Scale-Up Study Using Immobilized Anaerobic Mixed Sludge. Waste And Biomass Valorization. 10, 1-13.

Selembo, P.A., Perez, J.M., Loyd, W.A., Logan, B.E., 2009. High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrogen Energy. 34, 5373–5381.

Taconi, Katherine A., Venkataramanan, Keerthi P., Johnson, Duane T, 2009. Growth and Solvent Production by Clostridium pasteurianum ATCCVVR 6013TM Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. Environmental Progress & Sustainable Energy. Alabama. 28, 100-110.

Valdez-Vazquez, Idania et al., 2006. Improvement of Biohydrogen Production from Solid Wastes by Intermittent Venting and Gas Flushing of Batch Reactors Headspace. Environmental Science & Technology. 40, 3409-3415.

Vi, Lu Vu Thao, Salakkam, Apilak, Reungsang, Alissara, 2017. Optimization of key factors affecting bio-hydrogen production from sweet potato starch. Energy Procedia. 138, 973-978.

Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C. 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresour. Technol.100, 6339 – 6346.

Wang, Z.X. et al., 2001. Glycerol production by microbial fermentation: a review. Biotechnol Adv. 3,201-223.

Yadav, Sweta et al., 2014. A novel approach for biobutanol production by Clostridium acetobutylicum using glycerol: A low cost substrate. Renewable Energy.71, 37-42.

Zhou, P., Elbeshbishy, E., Nakhla, G., 2012. Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. Bioresour. Technol. 130, 710–718.

OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A REAÇÃO DE AOM COM CATALISADOR DO TIPO PEROVSKITA SUBSTITUÍDO COM MG

Larissa de Bessa Lopes[1] José Mansur Assaf[2]; Elisabete Moreira Assaf[3]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Química do IQSC/USP;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCAR;
[3] Professora do Departamento de Físico-Química do IQSC/USP

Resumo. *O aproveitamento do metano via acoplamento oxidativo (AOM) é um processo promissor para a produção de hidrocarbonetos C2. Entretanto, a aplicação em escala industrial ainda depende da obtenção de melhores valores de seletividade para a reação. A escolha de um catalisador adequado e alterações nas condições reacionais permitem melhorar os resultados de seletividade. O catalisador $LaTi_{0,5}Mg_{0,5}O_3$ (LTMO-50) foi utilizado em testes catalíticos para otimizar as condições da reação visando aumentar os valores de seletividade em C2. Foram avaliadas a razão de alimentação CH_4/O_2, uso de diferentes oxidantes e temperatura de reação como condições a serem otimizadas. Observou-se que a obtenção de oxigênio monoatômico na superfície, proveniente da regeneração do catalisador com N_2O, pode resultar no aumento da seletividade a eteno na reação em relação ao uso de O_2 como oxidante. A condição otimizada encontrada foi de GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$, CH_4/O_2 = 8 e T = 800 °C obtendo 51,4% de seletividade em C2. Esse catalisador manteve-se estável química e termicamente, sem formação de coque, durante 24 h de reação nessa condição.*

Introdução

A substituição de recursos naturais não renováveis nos mais diversos processos por matérias-primas limpas é um assunto recorrente e cada vez mais importante no meio acadêmico devido ao aumento da demanda global de energia, além dos indícios de mudanças climáticas cada vez mais irreversíveis. O biogás é um substituinte interessante, considerado uma fonte limpa e economicamente atraente, apresentando um potencial de mercado ascendente para as próximas décadas. Sua empregabilidade pode ser direcionada para a geração de energia ou em substituição ao gás natural como matéria prima para indústria química em geral (Horn e Schlögl, 2015).

O aproveitamento do metano, proveniente do biogás, na reação de acoplamento oxidativo (AOM) é um processo promissor para a obtenção de hidrocarbonetos C2. O AOM é uma reação realizada em temperaturas em torno de 680 – 830 ° C onde ocorre a conversão direta do metano na presença de oxigênio em etano e água, seguida da formação de eteno e uma segunda molécula de água (Olivos-Suarez *et al.*, 2016). Dentre os possíveis subprodutos da reação pode-se listar os COx (CO e CO_2) e hidrocarbonetos de maior massa molecular. As reações de obtenção do etano e eteno a partir do AOM encontram-se evidenciadas nas Equações 1 e 2, respectivamente (Olivos-Suarez *et al.*, 2016):

$2\ CH_4 + ½\ O_2 \rightarrow C_2H_6 + H_2O$ $\quad \Delta H^o = -1465$ kJ/mol (1073 K) (Equação 1)

$2\ CH_4 + O_2 \rightarrow C_2H_4 + 2\ H_2O$ $\quad \Delta H^o = -1163$ kJ/mol (1073 K) (Equação 2)

Ao longo dos anos, diversos catalisadores foram testados buscando aumentar a seletividade ao produto almejado. Uma característica importante para melhoria dos resultados é a basicidade dos sítios ativos do catalisador. A adição de substituintes de baixa valência na estrutura de óxidos resulta em um aumento na quantidade de vacâncias de oxigênio na sua superfície, além de menores valores de coordenação do oxigênio, tornando-o mais básico (Ivanov *et al.*, 2014). Dentre os possíveis catalisadores para a reação de AOM, os óxidos do

tipo perovskita são opções potenciais devido à elevada estabilidade térmica e possibilidade de criação de defeitos eletrônicos na estrutura que potencializam sua basicidade (Ivanov *et al.*, 2014).

Além de modificações nas propriedades dos catalisadores empregados, alterações nas condições reacionais também podem melhoram os resultados catalíticos obtidos. O valor de seletividade em C2 para um determinado catalisador pode ser aumentado alterando condições como velocidade espacial dos reagentes, razão de alimentação dos reagentes, temperatura de reação, diluição do catalisador com partículas inertes no reator, entre outros (Choudhary, Rane e Chaudhari, 1997; Dedov *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2014). Modificações dessas condições também auxiliam na avaliação das reações que ocorrem paralelamente à reação de AOM e apresenta modos de diminuir o efeito gerado por elas, aumentando a seletividade em C2 através da diminuição da quantidade de subprodutos formados.

A seletividade em C2 também pode ser aumentada por meio da utilização de diferentes oxidantes para a reação de AOM, que apresentem menor poder de oxidação que o O_2. O CO_2 e N_2O podem ser empregados como reagentes para a regeneração dos sítios ativos dos catalisadores através de mecanismo semelhante ao obtido com o uso de O_2, como visto nas equações 3-5 (Langfeld *et al.*, 2012). Além das vantagens de cunho ambiental e financeiro, a regeneração do catalisador com oxidantes moderados leva à obtenção de superfícies catalíticas mais ativas, que desfavorecem a rota de formação de espécies O_2^-. Tais espécies favorecem a oxidação dos hidrocarbonetos formados, diminuindo a seletividade da reação (Langfeld *et al.*, 2012).

$$\tfrac{1}{2}\ O_2 + () \rightarrow (O) \qquad \text{(Equação 3)}$$

$$N_2O + () \rightarrow (O) + N_2 \qquad \text{(Equação 4)}$$

$$CO_2 + () \rightarrow (O) + CO \qquad \text{(Equação 5)}$$

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo estudar as condições reacionais do AOM visando aumentar a seletividade em C2 obtida para o catalisador LTMO-50. Foram variados a razão de alimentação de CH_4/O_2, o oxidante empregado (CO_2 e N_2O) e a temperatura de reação. Por fim, testar o catalisador na condição otimizada durante 24 h para avaliar a sua estabilidade química e térmica frente às condições reacionais desativantes.

Material e Métodos

O catalisador $LaTi_{0,5}Mg_{0,5}O_3$ (LTMO-50) foi sintetizado pelo método Pechini (Milanova *et al.*, 1996), no qual 0,05 mol de isopropóxido de titânio ($Ti[OCH(CH_3)_2]_4$, 97% Aldrich) foi adicionado a 4 mols de etileno glicol ($C_2H_6O_2$, P.A. Synth) e 1 mol de ácido cítrico anidro ($C_6H_8O_7$, P.A. Synth) sob agitação constante. Depois de solubilizados foram adicionados à mistura 0,1 mol de nitrato de lantânio ($La(NO_3)_3.6H_2O$, 99% Vetec) e 0,05 mol de nitrato de magnésio ($Mg(NO_3)_2.6H_2O$, 98% Alfa Aesar). A solução foi agitada por 30 min, seguida de aquecimento a 120 °C onde permaneceu até a completa polimerização. A amostra foi calcinada a 300 °C por 2 h, macerada e calcinada a 800 °C por 4 h.

Os testes catalíticos foram realizados em um reator tubular de quartzo com 150 mg de catalisador e 200 mg de quartzo moído. Os produtos e os reagentes não convertidos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a linha de reação (VARIAN CHROMPACK modelo GC-3800) com dois canais, ambos com detectores de condutividade térmica.

Foram realizadas as reações para otimização das condições reacionais visando o aumento da seletividade em C2:

- Estudo da razão de alimentação: reações a T = 800°C e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$, variando a razão de alimentação de CH_4/O_2 (entre 2 e 8) e reação sem uso de oxidante ($CH_4/N_2 = 8$);

- Estudo com diferentes oxidantes: reações a T = 800°C e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$ com oxidantes moderados em substituição ao O_2 (CO_2 e N_2O), variando a razão de alimentação de CH_4/CO_2 (1 e 1,5) e CH_4/N_2O (entre 0,4 e 10);
- Estudo da temperatura de reação: reações a GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$ e CH_4/O_2=8, variando a temperatura de reação (entre 700 e 900°C);
- Teste de estabilidade: a condição otimizada (GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$, CH_4/O_2 = 8 e T = 800°C) foi testada durante 24 h para avaliar a estabilidade catalítica.

A atividade catalítica foi calculada através das equações 6-8, representando conversão de metano, seletividade em C2 e seletividade em COx, respectivamente.

$$X(\%) = \frac{\text{número de mol de } CH_4 \text{ convertido}}{\text{número de mols de } CH_4 \text{ alimentado}} . 100\ \% \qquad \text{(Equação 6)}$$

$$S_{C2}(\%) = \frac{2 . \text{número de mols de } C_2 \text{ formado}}{\text{número de mols de } CH_4 \text{ convertido}} . 100\% \qquad \text{(Equação 7)}$$

$$S_{COx}(\%) = \frac{\text{número de mols de } COx \text{ formado}}{\text{número de mols de } CH_4 \text{ convertido}} . 100\% \qquad \text{(Equação 8)}$$

Caracterizações pós-reação foram realizadas para verificar a estabilidade química e térmica do catalisador LTMO-50 na reação de AOM. As medidas de difração de raios X (DRX) foram realizadas no difratômetro modelo Rigaku Multiflex 600, com radiação Cu-Kα λ = 1.5418 Å, 40 kV/15 mA. A determinação do tamanho médio de cristalito foi realizada via refinamento de Rietveld com o programa Topas Academic V.5. O coque formado durante a reação foi quantificado por meio da técnica de análise elementar em um equipamento ThermoScientific modelo FlashSmart.

Resultados e Discussão

O catalisador LTMO-50 foi utilizado para otimizar as condições reacionais com o objetivo de melhorar a seletividade em C2 obtida na reação de AOM. A primeira condição a ser estudada foi a razão molar de alimentação entre CH_4 e O_2, variando desde a condição estequiométrica (CH_4/O_2 = 2) até uma condição com excesso de metano (CH_4/O_2 = 8). As reações foram realizadas a T = 800 °C e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$. A Tabela 1 mostra os resultados de conversão de metano (X%), seletividade em C2 (S_{C2} %), seletividade em COx (S_{COx} %), razão molar de C_2H_4/C_2H_6 formado, assim como de CO/CO_2 formado. Além disso foram incluídos dados de consumo de mols de CH_4 para cada mol de O_2 convertido (CH_4/O_2 conv.).

Tabela 1: Resultado catalítico variando a razão CH_4/O_2.

Razão CH_4/O_2	X_{CH4} (%)	CH_4/O_{2conv}	S_{C2} (%)	S_{COx} (%)	C_2H_4/C_2H_6	CO/CO_2
2,0	32,6 ± 0,1	0,76 ± 0,01	34,3 ± 0,5	54,9 ± 0,4	1,60 ± 0,04	0,21 ± 0,01
3,5	25,4 ± 0,1	0,87 ± 0,01	45,7 ± 0,2	53,9 ± 0,4	1,30 ± 0,02	0,20 ± 0,01
5,0	22,1 ± 1,0	1,05 ± 0,05	48,2 ± 2,4	44,4 ± 0,8	1,16 ± 0,02	0,21 ± 0,02
6,5	19,4 ± 1,4	1,26 ± 0,09	49,4 ± 3,6	35,6 ± 1,2	1,06 ± 0,01	0,23 ± 0,01
8,0	17,3 ± 1,0	1,40 ± 0,08	51,4 ± 3,0	30,7 ± 0,3	0,97 ± 0,02	0,23 ± 0,01

Condições reacionais: T = 800 °C e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$.

Os dados obtidos indicam que, conforme a quantidade de oxigênio alimentado é diminuída, a conversão de metano também decresce. Isso era esperado, uma vez que o O_2 atua

na regeneração do catalisador para a ativação do metano gerando os sítios ativos para clivagem da ligação C-H (Gambo *et. al.,* 2018). Por outro lado, se for analisado o número de mols de metano convertido em função do número de mols de O_2 alimentado, observa-se um aumento devido ao melhor aproveitamento do O_2 para essa etapa reacional em função de outros caminhos reacionais que o O_2 pode tomar, como, por exemplo, a oxidação do produto final a CO e CO_2. Ou seja, mesmo com a diminuição da quantidade de O_2 alimentado, observa-se que a estequiometria de conversão se aproxima cada vez mais da relação estequiométrica da reação ($CH_4/O_2 = 2$).

Por esse mesmo motivo observa-se uma melhora na seletividade em C2 quando se limita a alimentação de O_2. Com a limitação de O_2 no meio reacional, sua atividade torna-se mais restrita na regeneração do catalisador, sobrando pouco oxigênio para outras etapas reacionais. Além desse fator, tem-se uma questão estequiométrica, uma vez que as reações para formação de etano e de eteno demandam menos O_2 que as reações para formação de CO e CO_2, como pode ser observado nas equações 9 e 10 (Schwach, Pan e Bao, 2016), em comparação às equações 1 e 2. Entretanto, há uma diminuição na razão eteno/etano produzidos, apesar da seletividade para a soma desses compostos aumentar. Isso acontece porque, com menos O_2 disponível em fase gasosa, há uma menor formação do radical etila, um intermediário para a formação de eteno (Lunsford, 1995). Porém, mesmo com a diminuição na formação de eteno, a condição com menor quantidade de oxigênio alimentada foi escolhida para os estudos da próxima etapa já que resultaram no melhor valor de seletividade em C2.

$$CH_4 + 3/2\ O_2 \rightarrow CO + 2\ H_2O \quad \text{(Equação 9)}$$
$$CH_4 + 2\ O_2 \rightarrow CO_2 + 2\ H_2O \quad \text{(Equação 10)}$$

Para avaliar a extensão da otimização dos valores de seletividade em C2, decorrentes da limitação da alimentação de O_2, foi analisada a condição limite: a realização de uma reação sem a utilização de O_2 na alimentação. O teste catalítico foi realizado sob GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$, razão molar $CH_4/N_2 = 8$ e temperatura de 800°C. Os resultados mostraram que nessa condição não foi observado nenhuma conversão de metano significativa. Isso indica que apesar da limitação da alimentação de O_2 na reação ser vantajosa para melhorar os resultados de seletividade em C2, deve-se levar em conta que os valores de conversão diminuem cada vez mais, o que limita o uso dessa alternativa para melhora dos resultados catalíticos.

Outra condição reacional que pode ser modificada é a espécie oxidante utilizada. Reagentes com menor poder de oxidação, como o CO_2 e o N_2O, são alternativas interessantes ao O_2. A reação geral do AOM usando CO_2 é apresentada pela equação 11 (Yabe *et.al.,* 2017). O CO_2 é um oxidante barato, não tóxico, abundante e interessante do ponto de vista ambiental. Por ser um dos componentes principais do biogás, junto com o metano, a utilização de ambos os gases durante a reação é interessante para evitar gastos com purificações. Entretanto, um problema decorrente da utilização do CO_2 como oxidante para o AOM é que ele pode seguir um mecanismo preferencial de formação de depósitos de carbono na superfície do catalisador, como visto na equação 12 (Muniz, 2007), o que poderia levar a sua desativação.

$$CH_4 + CO_2 \rightarrow ½\ C_2H_4 + CO + H_2O \quad \text{(Equação 11)}$$
$$CH_4 + 2\ CO_2 \rightarrow \text{-(C)-} + 2\ CO + 2\ H_2O \quad \text{(Equação 12)}$$

Testes catalíticos foram realizados a T = 800°C e GHSV= 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$ utilizando o CO_2 como oxidante. Foram testadas as razões molares de alimentação correspondentes à estequiometria da reação (CH_4/CO_2=1) e a da proporção molar de CH_4 e CO_2 encontrada no biogás (CH_4/CO_2=1,5).

A primeira reação, com razão de alimentação CH_4/CO_2=1, não apresentou conversão de CH_4 e CO_2 suficiente para quantificação. Para a segunda, com CH_4/CO_2=1,5, foi

observado conversões muito baixas de CH_4 e CO_2 e apenas CO foi observado como produto gasoso final.

A formação de CO pode ser decorrente de 4 possíveis reações: ativação do CO_2 na superfície (equação 5), reação de reforma seca do metano (equação 14), reação de AOM com CO_2 (equação 11) e reação de formação de coque (equação 12). Como nenhum outro produto gasoso foi identificado, a reação de reforma seca do metano e de AOM com CO_2 podem ser descartadas. A reação global de formação de coque engloba a reação de ativação da superfície do catalisador com CO_2 como uma de suas etapas parciais e se apresenta como a explicação para a obtenção de CO. Essas observações indicam que a pequena quantidade convertida de metano foi destinada para a formação de coque com formação de CO e H_2O como subproduto.

Outra possibilidade é a aplicação do N_2O como oxidante para a reação de AOM. A utilização do N_2O é vantajosa por questões ambientais, e devido a criação de superfícies de oxigênio mais seletivas. O desempenho superior com N_2O pode ser explicado pela formação de oxigênio monoatômico a partir da dissociação do N_2O na superfície do catalisador, enquanto que espécies de oxigênio biatômicas são originadas pela adsorção do O_2 (Langfeld *et al.*, 2012). A formação de espécies monoatômicas é facilitada para o N_2O em comparação ao O_2 uma vez que a energia de ligação O-N é muito menor (167,4 $kJmol^{-1}$) que a energia de ligação O-O no O_2 (498,4 $kJmol^{-1}$) (Liu *et. al.*, 2010). Espécies monoatômicas atuam melhor para a ativação do metano, enquanto espécies biatômicas apresentam maior influência para a obtenção dos compostos CO_x (Langfeld *et. al.*, 2012).

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes catalíticos realizados a 800°C e GHSV= 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$ utilizando o N_2O como oxidante. As razões molares de alimentação foram variadas entre CH_4/N_2O= 0,4 e CH_4/N_2O= 10, passando pela razão estequiométrica de CH_4/N_2O= 1, para avaliar o efeito do excesso de cada reagente sobre a seletividade em C2 na reação de AOM.

Tabela 2: Resultado catalítico variando razão de CH_4 e N_2O para o catalisador LTMO-50.

Razão CH_4/N_2O	**X_{CH4} (%)**	**S_{C2} (%)**	**S_{COx} (%)**	**C_2H_4/C_2H_6**	**CO/CO_2**
0,4	36,3 ± 0,1	23,8± 0,1	75,6 ± 0,1	2,48 ± 0,04	0,09 ± 0,01
1,0	28,0 ± 0,1	32,3 ± 0,1	49,9 ± 0,1	2,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01
4,0	13,6 ± 0,1	49,2 ± 0,2	33,9 ± 0,1	2,00 ± 0,03	0,24 ± 0,01
10,0	8,0 ± 0,1	54,6 ± 0,1	24,9 ± 0,1	1,52 ± 0,06	0,37 ± 0,02

Condições reacionais: T = 800 °C e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$.

Os resultados apresentam uma correlação direta entre a diminuição da quantidade de oxidante na reação e a diminuição da conversão do metano, assim como observado quando o O_2 foi utilizado como oxidante. Outros resultados também apresentaram comportamento semelhante, como a melhora da seletividade em C2, a diminuição da seletividade em COx e a diminuição da razão de C_2H_4/C_2H_6 formado conforme se aumenta a razão de alimentação de CH_4/N_2O.

Comparações entre os valores obtidos utilizando O_2 e N_2O como oxidantes são apresentados na Tabela 3, (comparando entre razões de alimentação 1 e 4 vezes a razão estequiométrica - CH_4/O_2= 2 e 8 e CH_4/N_2O= 1 e 4). Observa-se que a alteração do O_2 por N_2O não apresentou melhora dos resultados catalíticos como esperado. Entretanto, isso pode ser explicado pela característica que alguns catalisadores apresentam de converter rapidamente as espécies diatômicas obtidas com O_2 para espécies monoatômicas, melhorando a seletividade reacional (Kondratenko et al., 2017). A seletividade adicional obtida com o uso de N_2O pode ser observada nos resultados de formação de eteno em comparação ao etano. Isso indica que apesar da seletividade em C2 ter sido próximas para os oxidantes, o uso do N_2O levou a obtenção do dobro da razão de eteno quando comparado com o O_2. Entretanto, apesar das

vantagens em se empregar o N_2O como oxidante para a reação de AOM, a sua aplicação em larga escala é limitada pelo alto preço associado a ele. (Kondratenko *et al.*, 2017)

Tabela 3: Comparação entre os resultados catalíticos utilizando o O_2 e N_2O como oxidantes para a reação de AOM para a amostra LTMO-50.

Modo de alimentação	**Razão de alimentação**	**X_{CH4} (%)**	**S_{C2} (%)**	**S_{COx} (%)**	**C_2H_4/C_2H_6**	**CO/CO_2**
CH_4/O_2	2,0	32,6 ± 0,1	34,3 ± 0,5	54,9 ± 0,4	1,60 ± 0,04	0,21 ± 0,01
CH_4/N_2O	1,0	28,0 ± 0,1	32,3 ± 0,1	49,9 ± 0,1	2,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01
CH_4/O_2	8,0	17,3 ± 1,0	51,4 ± 3,0	30,7 ± 0,3	0,97 ± 0,02	0,23 ± 0,01
CH_4/N_2O	4,0	13,6 ± 0,1	49,2 ± 0,2	33,9 ± 0,1	2,00 ± 0,03	0,24 ± 0,01

Condições reacionais: T = 800 °C e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$.

A temperatura foi a última condição estudada, sendo variada entre 700 e 900 °C, como apresentado na Tabela 4. Para a última etapa foram realizadas reações com as condições já otimizadas (GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$ e com razão de alimentação CH_4/O_2 = 8). Pode-se observar que com o aumento da temperatura há um aumento da conversão do metano. Isso acontece porque com o aumento da temperatura há mais energia disponível para a quebra da ligação C-H, e assim, mais metano é ativado e convertido nos produtos da reação. Entretanto, observa-se que a seletividade em C2 atinge um máximo em 800 °C, diminuindo com o aumento da temperatura a partir desse ponto. Isso ocorre porque temperaturas maiores favorecem reações mais endotérmicas, como é o caso das reações de reforma do metano, como apresentado nas equações 13-15 (Varma *et.al.*, 2016). Outro indicativo do favorecimento da formação de gás de síntese é o aumento da quantidade de CO formado em função de CO_2 com o aumento da temperatura.

$CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3\ H_2$ $\quad \Delta H^o = 206$ kJ/mol (Equação 13)

$CH_4 + CO_2 \rightarrow 2\ CO + 2\ H_2$ $\quad \Delta H^o = 247$ kJ/mol (Equação 14)

$CH_4 + ½\ O_2 \rightarrow CO + 2\ H_2$ $\quad \Delta H^o = -\ 35$ kJ/mol (Equação 15)

Tabela 4: Resultado catalítico variando a temperatura de reação para o catalisador LTMO-50.

Temperatura (° C)	**X_{CH4} (%)**	**S_{C2} (%)**	**S_{COx} (%)**	**C_2H_4/C_2H_6**	**CO/CO_2**
700	16,3 ± 0,5	38,0 ± 2,4	36,7 ± 0,1	0,64 ± 0,02	0,31 ± 0,02
750	17,3 ± 0,5	45,6 ± 1,8	31,5 ± 0,1	0,80 ± 0,01	0,22 ± 0,01
800	17,3 ± 1,0	51,4 ± 3,0	30,7 ± 0,3	0,97 ± 0,02	0,23 ± 0,01
850	19,3 ± 0,2	37,2 ± 0,3	30,4 ± 0,1	2,52 ± 0,13	0,40 ± 0,01
900	21,9 ± 0,3	19,3 ± 0,5	33,0 ± 0,1	10,11 ± 0,54	0,93 ± 0,03

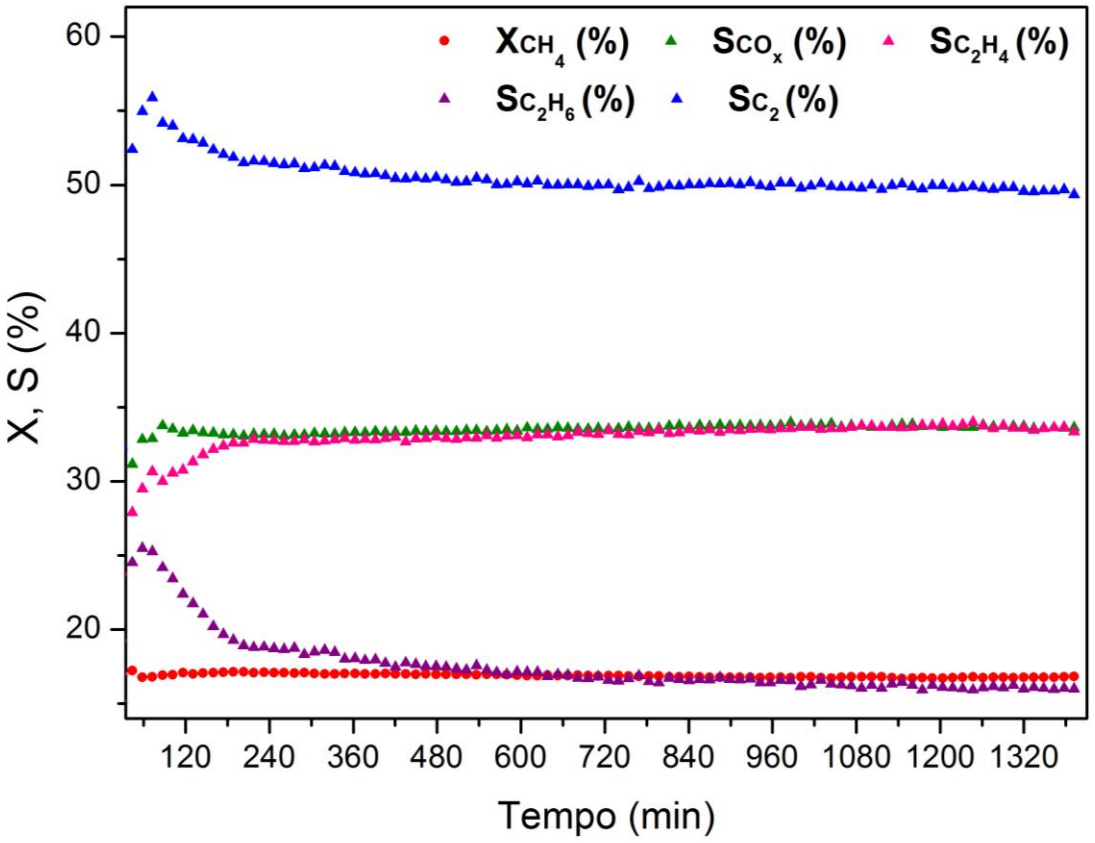
Condições reacionais: CH_4/O_2 = 8 e GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$.

Em contrapartida, observa-se que com o aumento da temperatura a razão entre eteno e etano formado aumenta consideravelmente, passando de 0,64 para 10,11. Isso ocorre devido a reação de acoplamento desidrogenativo do etano, que pode ocorrer no mesmo reator que a reação de AOM, mas que necessita de temperaturas mais elevadas para ocorrer apreciavelmente, cerca de 50° a 100°C acima da temperatura ótima para a reação de AOM (Muniz, 2007). O mecanismo dessa reação leva a formação do eteno a partir do etano através da liberação de H_2 ao invés de água, como observado na equação 16 (Muniz, 2007).

$C_2H_6 \rightarrow C_2H_4 + H_2$ (Equação 16)

O ponto reacional otimizado (GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$, razão molar CH_4/O_2 = 8 e temperatura de 800°C) foi então testado para a amostra LTMO-50 em uma reação de 24 h para avaliar a estabilidade do catalisador ao longo desse tempo e os resultados são apresentados na Figura 1. De maneira geral, o catalisador apresentou alta estabilidade catalítica, sem perdas consideráveis de atividade. Durante todo o tempo de análise a conversão de metano apresentou-se praticamente constante, mesmo o catalisador estando exposto a elevadas temperaturas e atmosfera oxidante por um longo período. Além disso, a seletividade para compostos COx também se manteve constante ao longo das 24 h de reação, em torno de 33%.

Figura 1: Conversão de metano (X_{CH4}), seletividade em COx (S_{COx}), seletividade em eteno (S_{C2H4}), seletividade em etano (S_{C2H6}) e seletividade em C2 (S_{C2}) na reação de AOM. Condições reacionais: CH_4/O_2 = 8, GHSV = 45000 $mLgcat^{-1}.h^{-1}$, T = 800 °C e t = 24 h.



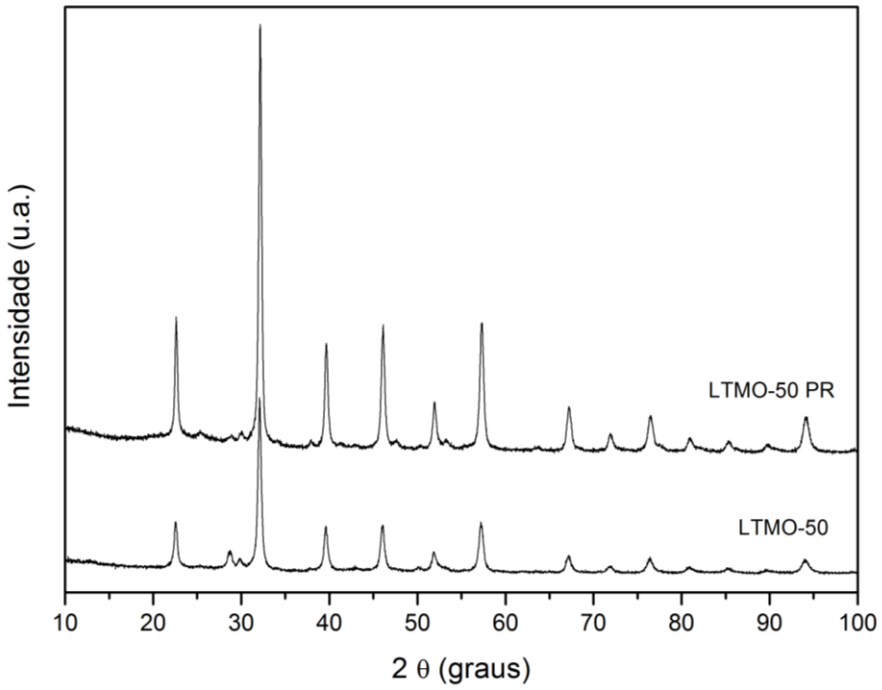
Em relação a seletividade nos produtos de interesse, a seletividade em C2 manteve-se em torno de 50% ao longo de todo o tempo de reação. Entretanto, durante as 3 primeiras horas observa-se uma pequena diminuição nos valores de seletividade em C2, passando de 54,96% para 51,86%. A partir desse ponto a queda é menos pronunciada, atingindo 49,35% de seletividade ao final das 24 h de reação. Comportamento similar é observado para a seletividade em etano, que diminui mais drasticamente ao longo das 3 primeiras horas de reação (25,48% para 19,28%), terminando a reação com 16% de seletividade.

A seletividade em eteno teve um resultado diferente ao longo do tempo, passando de 29,48% para 32,58% ao final das 3 h, atingindo 33,35% ao final da reação. Essas observações podem indicar que durante as três primeiras horas reacionais o ambiente catalítico ainda está passando por um processo de ativação que favorece a formação de eteno em comparação ao etano. Testes complementares precisam ser realizados para esclarecer se esse efeito é resultado de alterações na etapa heterogênea e/ou homogênea da reação.

Caracterizações pós teste de estabilidade foram realizadas para verificar modificações na estrutura cristalina dos catalisadores devido a exposição às condições reacionais. A Figura

2 apresenta os padrões de difração da amostra LTMO-50 antes e depois do teste de estabilidade (LTMO-50 PR). Observa-se que, a amostra manteve os padrões de difração de antes do teste catalítico, sem o aparecimento de bandas devido ao surgimento de coque e nem picos referentes ao MgO segregado.

Figura 2: Difratogramas de raios X do catalisador LTMO-50 antes e após teste catalítico de estabilidade.



Entretanto, ao comparar os padrões de difração obtidos, observa-se um aumento da cristalinidade para o LTMO-50 PR em comparação ao LTMO-50. Isso ocorre devido a uma aglomeração das partículas após a exposição do catalisador a temperatura reacional por tempo prolongado. A Tabela 5 apresenta os tamanhos médios dos cristalitos obtidos via refinamento de Rietveld dessas duas amostras. Os resultados indicam que, após exposto por 24 h às condições de reação, o tamanho médio dos cristalitos da amostra passa de 23,7 ± 0,9 para 26,4 ± 0,7.

Tabela 5: Tamanho médio do cristalito e parâmetros de ajuste do refinamento de Rietveld das amostras.

Amostra	Tamanho cristalito (nm)	Rexp	Rwp	GOF
LTMO-50	23,7 ± 0,9	1,95	11,09	5,70
LTMO-50 PR	26,4 ± 0,7	4,79	7,93	1,65

Rexp – R esperado
Rwp – R ponderado
GOF – *Goodnes of fit*

Por fim, o resultado da análise elementar do material indica a formação de apenas 7,8 x 10^{-2} μmolC.g_{cat}^{-1}.h^{-1}. A quantidade de coque formado é muito pequena, o que auxiliou para a obtenção da elevada estabilidade do catalisador observada ao longo do teste de estabilidade.

Conclusões

A otimização das condições reacionais indicaram que a razão de alimentação de CH_4/O_2 e temperatura de reação são condições reacionais importantes para a obtenção de melhores seletividades em C2. A condição otimizada foi de GHSV = 45000 $mL.gcat^{-1}.h^{-1}$, razão molar CH_4/O_2 = 8 e temperatura de 800 °C, para o catalisador LTMO-50, obtendo 51,4% de seletividade em C2. O estudo de variação de oxidante também indicou que o uso de N_2O é promissor, em especial, para a obtenção mais seletiva do eteno, sem grandes variações na seletividade em C2 em comparação ao O_2. Foi verificado que o catalisador LTMO-50 apresenta elevada estabilidade à reação de AOM comprovada pelo do teste de estabilidade de 24 h realizado nas condições otimizadas de reação. As caracterizações pós-reação apresentaram a manutenção dos padrões de difração das amostras antes e depois da reação, com pequeno aumento do tamanho médio de cristalito e formação de coque extremamente baixa, que auxiliou para obtenção da alta estabilidade reacional do catalisador.

Referências Bibliográficas

Choudhary, V. R., Rane, V. H., Chaudhari, S. T., 1997. Surface properties of rare earth promoted MgO catalysts and their catalytic activity/selectivity in oxidative coupling of methane. Applied Catalysis A: General. 158, 121–136.

Dedov, A. G., Loktev, A. S., Moiseev, I. I., Aboukais, A., Lamonier, J. F., Filimonov, I. N., 2003. Oxidative coupling of methane catalyzed by rare earth oxides: Unexpected synergistic effect of the oxide mixtures. Applied Catalysis A: General. 245 (2), 209–220.

Gambo, Y., Jalil, A. A., Triwahyono, S., Abdulrasheed, A. A., 2018. Recent advances and future prospect in catalysts for oxidative coupling of methane to ethylene: A review. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 59, 218–229.

Horn, R., Schlögl, R., 2015. Methane Activation by Heterogeneous Catalysis. Catalysis Letters. 145(1), 23–39.

Ivanov, D. V., Isupova, L. A., Gerasimov, E. Y., Dovlitova, L. S., Glazneva, T. S., Prosvirin, I. P., 2014. Oxidative methane coupling over Mg, Al, Ca, Ba, Pb-promoted SrTiO3and Sr2TiO4: Influence of surface composition and microstructure. Applied Catalysis A: General. 485, 10–19.

Kondratenko, E. V., Peppel, T., Seeburg, D., Kondratenko, V. A., Kalevaru, N., Martin, A., Wohlrab, S., 2017. Methane conversion into different hydrocarbons or oxygenates: current status and future perspectives in catalyst development and reactor operation. Catal. Sci. Technol. 7(2), 366–381.

Langfeld, K., Frank, B., Strempel, V. E., Berger-Karin, C., Weinberg, G., Kondratenko, E. V., Schomäcker, R., 2012. Comparison of oxidizing agents for the oxidative coupling of methane over state-of-the-art catalysts. Applied Catalysis A: General. 417–418, 145–152.

Liu, H., Wei, Y., Caro, J., Wang, H., 2010. Oxidative Coupling of Methane with High C 2 Yield by using Chlorinated. ChemCatChem. 2, 1539–1542.

Lunsford, J. H. (1995). The Catalytic Oxidative Coupling of Methane. Angewandte Chemie International Edition in English. 34(9), 970–980.

Milanova, M. M., Kakihana, M., Arima, M., Yashima, M., Yoshimura, M., 1996. A simple solution route to the synthesis of pure La2Ti2O7 and Nd2Ti2O7 at 700–800°C by polymerized complex method. Journal of Alloys and Compounds. 242(1–2), 6–10.

Muniz, F. C., 2007. Acoplamento oxidativo do metano. COPPE/ Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Olivos-Suarez, A. I., Szécsényi, À., Hensen, E. J. M., Ruiz-Martinez, J., Pidko, E. A., Gascon, J., 2016. Strategies for the Direct Catalytic Valorization of Methane Using Heterogeneous Catalysis: Challenges and Opportunities. ACS Catalysis. 6(5), 2965–2981.

Schwach, P., Pan, X., Bao, X., 2017. Direct Conversion of Methane to Value-Added Chemicals over Heterogeneous Catalysts: Challenges and Prospects. Chemical Reviews. 117(13), 8497–8520.

Varma, A., Mukasyan, A. S., Rogachev, A. S., Manukyan, K. V., 2016. Solution Combustion Synthesis of Nanoscale Materials. Chemical Reviews. 116(23), 14493–14586.

Yabe, T., Kamite, Y., Sugiura, K., Ogo, S., Sekine, Y., 2017. Low-temperature oxidative coupling of methane in an electric fi eld using carbon dioxide over Ca-doped LaAlO3 perovskite oxide catalysts. Journal of CO2 Utilization. 20, 156–162.

EFEITO DA CARGA DE Ni EM CATALISADORES Ni-PIROCLORO-PEROVSKITA APLICADOS NA REFORMA SECA DO METANO

Adriana P. Ramon [1]; Elisabete M. Assaf [2]; José M. Assaf [3]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar;
[2] Professora do Departamento de Físico-Química do IQSC/USP;
[3] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *O biogás produzido durante o tratamento de resíduos orgânicos, tais como os presentes em aterros sanitários e águas residuárias, tem incentivado o desenvolvimento de processos para produção de gás de síntese (CO + H_2) O gás de síntese apresenta grande interesse industrial em diversos processos, como na obtenção de combustíveis líquidos por Fischer-Tropsch. O maior problema da RSM é a formação de depósitos de carbono sobre o catalisador. Para contornar esse problema, diferentes suportes formados por óxidos mistos com estruturas estáveis vêm sendo desenvolvidos, como por exemplo: óxidos dos tipos pirocloro, perovskita e espinelio. Neste trabalho, foram avaliados o efeito do teor de Ni no catalisador $La_2Ce_{2-x}Ni_xO_{7-\delta}$ sintetizado pelo méotodo de sol-gel. Esses materiais foram caracterizados por diversas técnicas e testados na RSM, em temperaturas entre 600 a 900 °C, além de teste de estabilidade de curta duração a 850 °C. As análises de DRX mostraram que ocorreu a formação da perovskita $LaNiO_3$, além da fase $La_2Ce_{2-x}Ni_xO_{7-\delta}$. Além disso, na análise de TPR foram observados dois picos principais de redução característicos da fase perovskita. Os testes catalíticos mostraram que, independentemente do teor de níquel, todos os catalisadores foram estáveis durante o teste de curta duração. Através de análise termogravimétrica após teste de estabilidade, observou-se que não houve formação significativa de depósitos de carbono nas superfícies dos catalisadores (<2% m/m). Os resultados preliminares desse trabalho indicam que a mistura das fases $La_2Ce_{2-x}Ni_xO_{7-\delta}$ e $LaNiO_3$ é cataliticamente ativa e inibe eficazmente a formação de carbono durante a RSM*

Introdução

Nos dias de hoje, os resíduos tem sido uma das preocupações mais importantes da sociedade, devido ao grande volume de resíduos gerados e ao desafio que a sua composição representa para as comunidades. O biogás produzido durante o tratamento de resíduos orgânicos, tais como os presentes em aterros sanitários e águas residuárias, tem incentivado o desenvolvimento de processos para produção de gás de síntese (CO + H_2) utilizando metano e dióxido de carbono, principais componentes do biogás e do gás natural. Além disso, o biogás tem um potencial inexplorado de fornecer energia limpa e renovável para abastecer a sociedade e ao mesmo tempo reduzir as emissões de gases que na atmosfera afetam o efeito estufa (Curto & Martín, 2019). Pelo fato do principal componente do gás natural ser metano, nos últimos anos, os processos de reforma deste têm sido amplamente estudados, tais como a reforma a vapor, oxidação parcial, reforma autotérmica e reforma seca do metano. Esses processos resultam em diferentes razões H_2/CO do gás de síntese gerado, sendo cada uma delas aplicadas em processos químicos diferentes. (PAKHARE et al., 2014).

A reforma seca do metano (RSM), representada pela equação 1, é particularmente interessante pois consome os dois principais componentes do biogás, além disso, produz razões H_2/CO adequadas para aplicação na síntese de Fischer-Tropsch, uma vez que valores inferiores à unidade permitem um aumento na seletividade em relação a hidrocarbonetos de cadeia longa (Pakhare & Spivey, 2014).

Devido à necessidade de altas temperaturas na reação de RSM para alcançar altos rendimentos de gás de síntese, suportes convencionais não são estáveis. Isto sugere a necessidade de desenvolver um material estável que seja cataliticamente ativo e ainda seja

resistente à formação de carbono (PAKHARE et al., 2012). Para resolver esse problema, diferentes suportes constituídos de óxidos mistos com estruturas estáveis vêm sendo desenvolvidos. Óxidos mistos são aqueles que contém mais de um elemento metálico em sua estrutura, como por exemplo óxidos do tipo pirocloro, perovskita, espinelio, etc. (GRANGER et al., 2016).

Óxidos com estrutura pirocloro são óxidos de metais ternários com base na estrutura de fluorita, com vacâncias de oxigênio, célula unitária cúbica e fórmula geral $A_2B_2O_7$. O sítio A é normalmente um grande cátion (elementos de terras raras) e o sítio B é tipicamente um cátion com raio menor (metais de transição) (Pakhare et al., 2014). Na área de catalise heterogênea, os óxidos com estrutura pirocloro têm duas propriedades importantes que os tornam interessantes como catalisadores para reações químicas. A primeira é a condutividade iônica do oxigênio, onde as vacâncias criadas durante a síntese facilitam a migração de íons oxigênio para a superfície, o que pode minimizar a deposição de carbono formado. A segunda é a possibilidade de substituir isomorficamente metais de transição cataliticamente ativos no sítio B, por exemplo, Ru, Rh, Pt. Isso resulta em uma estrutura mais resistente à sinterização a altas temperaturas. (Pakhare, et al. 2012).

Os óxidos do tipo perovskita podem ser descritos como compostos metálicos mistos que possuem formula geral ABX_3, onde os sítios A e B representam um grande e um médio cátion, respectivamente, e o X representa um ânion. Esse tipo de material tem estruturas bem definidas e produzem catalisadores, após redução, com partículas muito pequenas e altamente dispersas o que melhora a atividade catalítica e dificulta a deposição de carbono (Valderrama et al., 2005).

Neste trabalho, foram sintetizados catalisadores com estrutura $La_2Ce_{2-x}Ni_xO_7$, com substituição parcial do Ce por 0, 1, 2, 3, 4 e 5 % (m/m) de Ni pelo método de sol-gel, sendo denominados no trabalho por LC, LCN1, LCN2, LCN3, LCN4 e LCN5, respectivamente. Além da estrutura principal, foi formada simultaneamente a fase perovskita $LaNiO_3$ em todos os materiais.

Material e Métodos

A preparação dos precursores seguiu a metodologia descrita por Weng, Wang e Lee (2013). Nessa síntese, foi utilizado 1g do copolímero poli(óxido de etileno)20poli(óxido de propileno)70poli(óxido de etileno)20, HO(CH2CH2O)20(CH2CH(CH3)O)70(CH2CH2O)20H (designado como EO20PO70EO20; Pluronic 123) dissolvido em 10g de etanol, o qual serviu como surfactante da reação. Posteriormente, foram adicionados nitratos de lantânio [La(NO3)3·6H2O], de cério [Ce(NO3)3·6H2O] e de níquel [Ni(NO3)2·6H2O] (nos catalisadores contendo Ni), em proporções quantitativas de acordo com os íons La, Ce e Ni em estequiometria fixa de 5 mmol no total. Esse sistema foi deixado em agitação constante por 1h30min. Após o período de agitação, a solução resultante foi deixada a 40°C em ar durante 3 dias. Em seguida, a resina resultante foi transferida para um cadinho de porcelana e levado para calcinar em mufla a 900°C durante 5h e taxa de aquecimento de 10°C.min^{-1}.

As análises de difração de raios X foram realizadas em difratômetro Rigaku Multiflex pelo método do pó, através da incidência da radiação CuKα (λ= 1,5406 Å; 40 kV; 20 mA), varredura 2θ° = 20° a 80°, velocidade de varredura 2θ°.min^{-1} e passo de 0,02 θ°. As fases cristalinas foram comparadas com informações da literatura e também com padrões de referência dos bancos de dados do Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) e do Inorganic Crystal Structure Database (ICSD).

As análises de FRX foram realizadas num equipamento Energy Dispersive X-Ray Spectrometer, modelo Ray Ny EDX-720, da Shimadzu, no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar. Já as análises de temperatura programa com H_2 (TPR-H_2) foram realizadas no Laboratório de Catálise do

Instituto de Química de São Carlos, em um equipamento Micromeritics, modelo ChemiSorb 2750 com detector de condutividade térmica. Para a análise, utilizou-se aproximadamente 100 mg do material precursor e analisado em fluxo de 25 $mL.min^{-1}$ de uma mistura 10% H_2/Ar, com taxa de aquecimento de 10°$C.min^{-1}$, até 850°C.

Os testes catalíticos foram realizados no Laboratório de Catálise do Instituto de Química de São Carlos, utilizando reator tubular de leito fixo de quartzo contendo lã de quartzo como suporte do leito catalítico. Foram utilizados 100 mg de cada composto, com granulometria entre 100 e 60 mesh. Os ensaios foram realizados à pressão atmosférica, com alimentação continua de CH_4 e CO_2 numa vazão de 15$mLmin^{-1}$ de cada gás. As amostras foram reduzidas *in situ*, a 750°C durante 1 hora sob fluxo de 30 $mLmin^{-1}$ de H_2, com taxa de aquecimento de 10°$C.min^{-1}$. Os produtos da reação foram analisados em cromatógrafo GC-3800-Varian, equipado com dois detectores de condutividade térmica, duas colunas empacotadas Porapak N em paralelo e uma Peneira Molecular 13X em série, com He e N_2 como gases de arraste. A fim de observar a atividade catalítica em diferentes patamares de temperatura, realizou-se testes entre 600 a 900°C, com intervalos de 50°C e uma taxa de aquecimento de 10 °$C.min^{-1}$. Além disso, para avaliar os catalisadores nas mesmas condições, utilizou-se um fluxo de 15 $mL.min^{-1}$ para cada gás e uma temperatura de 850°C.

Os catalisadores utilizados na estabilidade de curta duração foram submetidos a análises termogravimétricas a fim de quantificar carbono eventualmente presente na superfície do catalisador. Essas análises foram realizadas num equipamento Simultaneous DTA-TG Apparatus, modelo ATG- DTG 60 H, da Shimadzu.

Resultados Parciais e Discussão

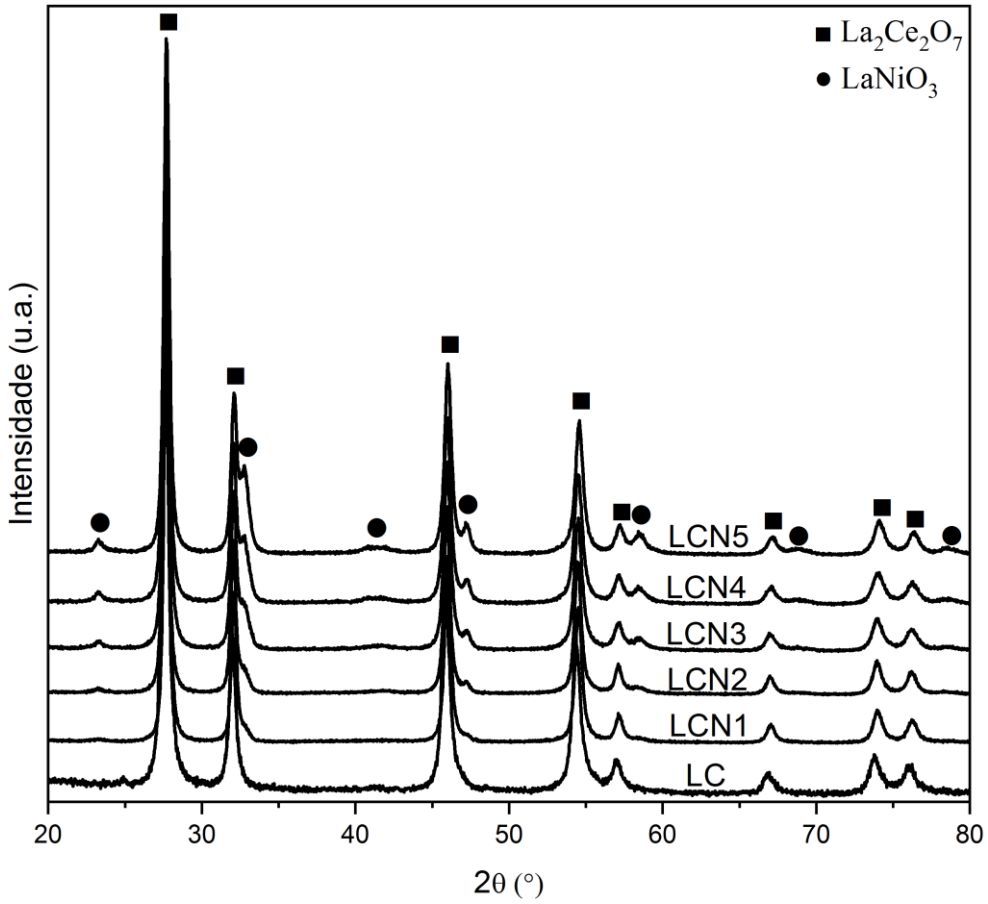
A Tabela 1 mostra os resultados obtidos pela técnica de FRX, a qual permitiu quantificar os teores dos metais presentes nas amostras. Nesse cálculo foi considerado como base as composições nominais $La_2Ce_{1,883}Ni_{0,117}O_7$, $La_2Ce_{1,775}Ni_{0,225}O_7$, $La_2Ce_{1,665}Ni_{0,335}O_7$, $La_2Ce_{1,56}Ni_{0,44}O_7$ e $La_2Ce_{1,46}Ni_{0,54}O_7$ para os catalisadores LCN1, LCN2, LCN3 LCN4 e LCN5 respectivamente. Visto que essa técnica não quantifica oxigênio e que nesse cálculo foram utilizados a composição teórica e não a real, a princípio desconhecida, variações nas quantidades de oxigênio podem levar a valores ligeiramente diferentes das quantidades mássicas reais.

Tabela 1: Teor mássico dos metais dos catalisadores sintetizados pelo método sol-gel, determinados por FRX.

L/D	Valor nominal de Ni (%)	La (%)	Ce (%)	Ni (%)	O (%)
LCN1	1	43,15	38,95	0,94	16,96
LCN2	2	43,28	37,73	1,80	17,19
LCN3	3	43,15	36,64	2,79	17,42
LCN4	4	43,41	35,25	3,68	17,66
LCN5	5	43,80	33,54	4,78	17,89

Os difratogramas normalizados de raios X em temperatura ambiente das amostras recém calcinadas LCN1, LCN2, LCN3 LCN4 e LCN5 estão apresentados na Figura 1. Em todas as amostras contendo Ni foi constatada a formação da fase perovskita $LaNiO_3$ além da fase desejada $La_2Ce_2O_{7-\delta}$. Além disso, é possível notar que o aumento da quantidade de níquel presente no catalisador aumentou a intensidade relativa da perovskita, ou seja, uma maior quantidade dessa fase foi formada com o aumento da quantidade de níquel.

Figura 1: Difratogramas de raios-X dos materiais sintetizados pelo método sol-gel. (■ $La_2Ce_2O_{7-\delta}$ – ICSD 188491); (● $LaNiO_3$ – ICSD 173477).



A Figura 2 mostra os perfis de redução dos catalisadores contendo 0, 1, 3 e 5% (m/m) de Ni. No suporte é possível observar um pico de redução característico do óxido de cério bulk. No óxido de cério (CeO_2), o cério bulk é normalmente reduzido em temperaturas acima de 800°C. Entretanto, quando o cério está na composição de um óxido misto com lantânio, sua temperatura de redução cai para valores muito mais baixos. Isso é consequência da substituição de Ce^{4+} por La^{3+}, que gera vacâncias de oxigênio e tem como resultado um aumento na mobilidade de oxigênio e, consequentemente, mais fácil redução. (LIU et al., 2014).

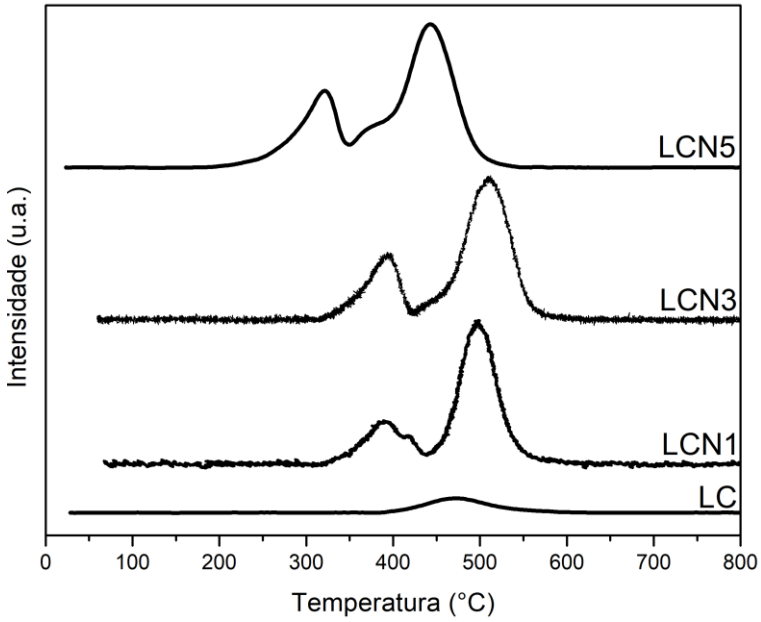
Nos três catalisadores contendo Ni, observa-se que os perfis de redução apresentam dois picos principais, o que é característico da fase perovskita $LaNiO_3$, amplamente estudada pela literatura. (DE LIMA et al., 2008; MORADI; RAHMANZADEH, 2012; RIVAS et al., 2008; SONG et al., 2016). As duas etapas de redução desse material estão representadas, respectivamente, pelas reações 1 e 2.

$$2LaNiO_3 + H_2 \rightarrow La_2Ni_2O_5 + H_2O \quad (1)$$

$$La_2Ni_2O_5 + 2H_2 \rightarrow La_2O_3 + 2Ni^0 + 2H_2O \quad (2)$$

Se a perovskita fosse a única fase presente na amostra com possibilidade de redução, a razão entre as intensidades do segundo para o primeiro pico deveria ser 2. No entanto, o suporte contribui para o perfil de redução, mesmo que de maneira mais branda. Além disso, acredita-se que NiO com tamanho de cristal pequeno e bem disperso esteja presente em todos os catalisadores, de maneira que na análise de DRX os sinais de difração dessa fase estariam abaixo da capacidade de detecção do equipamento.

Figura 2: Perfis de redução a temperatura programa com H_2 dos catalisadores LC, LCN1, LCN3 e LCN5.



A Figura 3 mostra as conversões de CO_2 (linha tracejada) e de CH_4 (linha continua) (a), o rendimento a H_2 (linha tracejada) e a CO (linha continua) (b) e a razão entre H_2 e CO (c), em função da temperatura, sobre os catalisadores LCN1, LCN2, LCN3 LCN4 e LCN5, representados pelos símbolos ■, ▲, ●, ★ e ♦, respectivamente. O suporte LC não apresentou atividade catalítica na reação de reforma seca do metano, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, e por essa razão não está apresentado na Figura 3. Como já era esperado, o aumento da temperatura levou a aumento da conversão tanto do CH_4 quanto do CO_2 em todos os catalisadores, pois o aumento da temperatura favorece termodinamicamente a reação de reforma seca, como pode-se observar na equação 3.

$$CO_2 + CH_4 \rightarrow 2CO + 2H_2 \qquad \Delta^0_{298K} = +247\ kJ.mol^{-1} \tag{3}$$

Ademais, observa-se na mesma figura que em todos os catalisadores, em todas as temperaturas, a conversão de CO_2 foi maior que a de CH_4. Isso pode ser consequência de reações paralelas, como a reversa de shift (equação 4) que é altamente endotérmica e favorecida até 820°C, a decomposição do metano (equação 5), favorecida em temperaturas superiores a 500°C e a reação de Boudoard (equação 6), favorecida até 700°C (PAKHARE; SPIVEY, 2014). A reação reversa de shift é a principal responsável pela maior conversão do CO_2 em todas as temperaturas analisadas, pois foi observado a formação de água, um dos produtos desta reação. Além disso, a Figura 3-b corrobora essa hipótese, visto que o rendimento a CO (linha tracejada) foi maior do a H_2 (linha continua) em todos os catalisadores.

$$CO_2 + H_2 \rightarrow CO + H_2O \qquad \Delta^0_{298K} = +41\ kJ.mol^{-1} \tag{4}$$

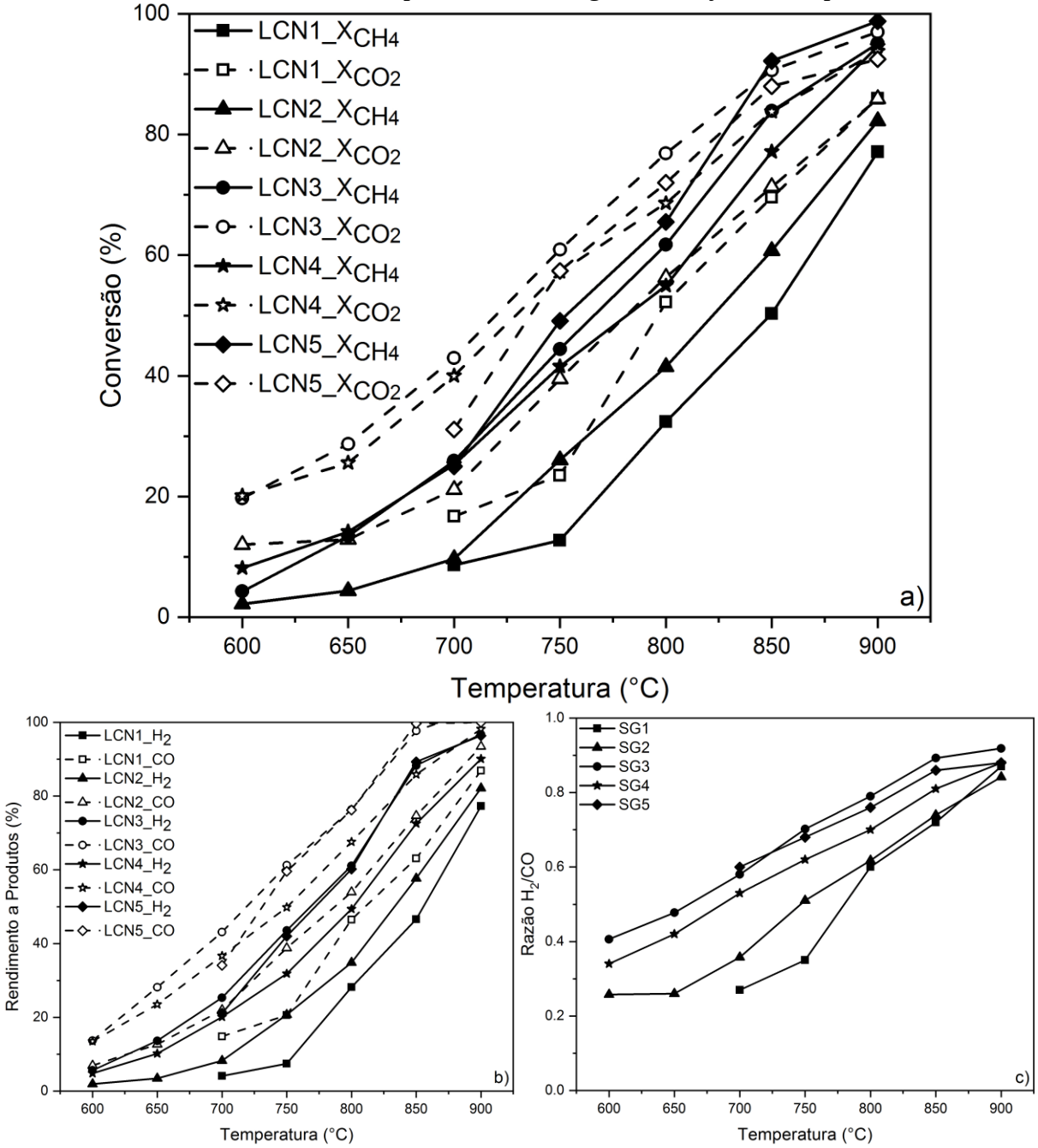
$$CH_4 \rightarrow C + 2H_2 \qquad \Delta^0_{298K} = +79{,}9\ kJ.mol^{-1} \tag{5}$$

$$2CO \leftrightarrow C + CO_2 \qquad \Delta^0_{298K} = -171{,}0\ kJ.mol^{-1} \tag{6}$$

A Figura 3-c mostra as razões de produtos H_2/CO formados na reforma seca do metano, em função da temperatura. De modo geral, o aumento de temperatura resultou em

aumento da razão H_2/CO em todos os catalisadores, o que indica um favorecimento da reação de decomposição do metano (equação 5) com o aumento da temperatura.

Figura 3: Conversão dos reagentes (b), rendimento a produtos (b) e razão H_2/CO (c) dos catalisadores sintetizados pelo método sol-gel em função da temperatura.

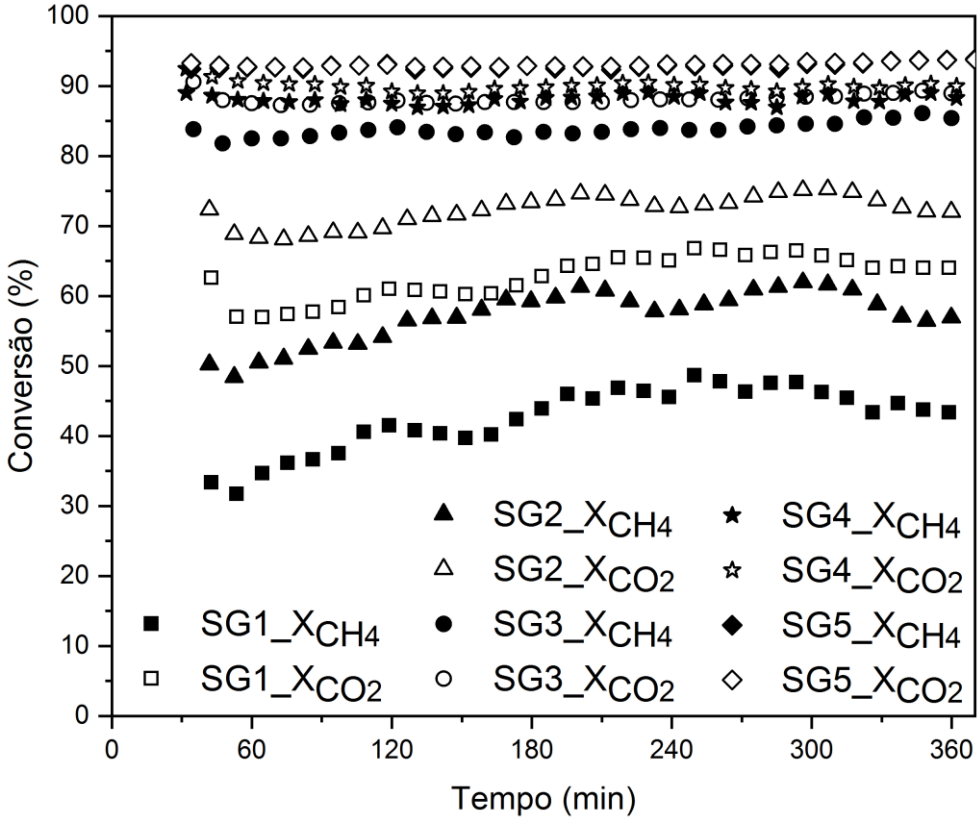


Ao analisar a Figura 4, observa-se que nenhuma das amostras sofreu desativação com o tempo, mantendo-se constantes as conversões de CO_2 (símbolo aberto) e de CH_4 (símbolo sólido). Nota-se também que o catalisador LCN1 apresentou a menor atividade catalítica; isso já era esperado, pois esse material é o que possui menor teor de Ni dentre os materiais testados, restringindo assim a quantidade de sítios metálicos disponíveis para que a reação ocorresse. Além disso, é interessante notar que apesar das atividades catalíticas serem altas e muito próximas nos catalisadores SG3, SG4 e SG5, a diferença entre as conversões de CH_4 e CO_2 diminuem com o aumento da quantidade de Ni presente na amostra. Dessa forma, pode-se dizer que quanto menor a quantidade de Ni na amostra, maior é o favorecimento da reação

reversa de *shift* (reação 4), além disso, ao final das 6 horas de reação, quanto menor o teor de Ni maior foi o volume coletado de água.

Em vista disso, pode-se considerar que esse comportamento está relacionado com a proporção de entre sítios metálicos e sítios básicos nos catalisadores, uma vez que o CH_4 se adsorve nos sítios metálicos e o CO_2 nos sítios básicos (PAKHARE; SPIVEY, 2014). A fim de entender melhor esse comportamento, pretende-se realizar testes de dessorção a temperatura programada com CO_2, a fim de quantificar os sítios básicos e determinar a sua força, assim como testes de quimissorção com H_2 para avaliar a quantidade de sítios metálicos disponíveis nos catalisadores.

Figura 4: Conversão dos reagentes sob os materiais sintetizados pelo método de sol-gel em função do tempo.



Análises termogravimétricas foram utilizadas para verificar deposição de carbono sobre os catalisadores após a reação de reforma seca do metano a 850°C, durante 6h. Nenhuma das amostras mostrou quantidades significativas de carbono, (<2% m/m). Isso pode ter ocorrido devido à presença da reação reversa de Boudouard (reversa da equação 3), uma vez que essa consome carbono para formar CO e é favorecida a temperaturas acima de 700 °C (PAKHARE; SPIVEY, 2014). O fato de nenhuma das amostras testadas formar carbono pode sugerir que o contato do Ni com o óxido $La_2Ce_2O_7$ favorece a gaseificação do carbono superficial.

Conclusões Parciais

Os resultados alcançados até o momento mostraram que o sistema $La_2Ce_{2-x}Ni_xO_{7-\delta}$ –$LaNiO_3$ é ativo e estável para catalisar a reação de reforma seca do metano. Além disso, o aumento no teor do Ni de 1% para até 5% (m/m) aumentou a atividade catalítica sem prejuízo da estabilidade dos catalisadores, como pretendido no objetivo inicial desse trabalho. E por meio de análises termogravimétricas das amostras usadas nos ensaios de estabilidade de curta duração, foi observado que nenhum dos catalisadores continha quantidades significativas de

carbono (<2% m/m), sugerindo que o sistema Ni-pirocloro-perovskita é efetivo em impedir e/ou diminuir a deposição de carbono na superfície do catalisador.

Referências Bibliográficas

Curto, D., Martín, M., 2019. Renewable based biogas upgrading. J. Clean. Prod., 224, 50–59.

De Lima, S. M., Pena, M. A., Fierro, J. L. G., Assaf, J. M., 2008. $La_{1-x}Ca_xNiO_3$ Perovskite Oxides: Characterization and Catalytic Reactivity in Dry Reforming of Methane. Catal. Lett., 124(3-4), 195.

Granger, P., Parvulescu, V. I., Kaliaguine, S., Prellier, W., 2016. Perovskites and related mixed oxides: concepts and applications. John Wiley & Sons.

Moradi, G. R., Rahmanzadeh, M., 2012. The influence of partial substitution of alkaline earth with la in the $LaNiO_3$ perovskite catalyst. Cat. Commu., 26, 169–172, 2012.

Pakhare, D., Schwartz, V., Abdelsayed, V., Haynes, D., Shekhawat, D., Poston, J., Spivey, J., 2014. Kinetic and mechanistic study of dry (CO_2) reforming of methane over Rh-substituted $La_2Zr_2O_7$ pyrochlores. J. Catal. 316, 78–92.

Pakhare, D., Spivey, J., 2014. A review of dry (CO_2) reforming of methane over noble metal catalysts. Chem. Soc. Rev., 43, 7813–7837.

Pakhare, D., Haynes, D., Shekhawat, D., Spivey, J., 2012. Role of metal substitution in lanthanum zirconate pyrochlores ($La_2Zr_2O_7$) for dry (CO_2) reforming of methane (DRM). App. Petrochem. Res., 2, 1–2, 27–35.

Rivas, M. E., Fierro, J. L. G., Goldwasser, M. R., Pietri, E., Pérez-Zurita, M. J., Griboval-Constant, A., Leclercq, G., 2008. Structural features and performance of $LaNi_{1-x}Rh_xO_3$ system for the dry reforming of methane. Appl. Catal., A, 344(1-2), 10-19.

Song, X., Dong, X., Yin, S., Wang, M., Li, M., Wang, H., 2016. Effects of Fe partial substitution of $La_2NiO_4/LaNiO_3$ catalyst precursors prepared by wet impregnation method for the dry reforming of methane. Appl. Catal., A, 526, 132-138.

Valderrama, G., Goldwasser, M. R., de Navarro, C. U., Tatibouet, J. M., Barrault, J., Batiot-Dupeyrat, C., Martínez, F., 2005. Dry reforming of methane over Ni perovskite type oxides. Catal. Today, 107, 785-791.

Weng, S. -F., Wang, Y. -H., Lee, C. -S., 2013. Autothermal steam reforming of ethanol over $La_2Ce_{2-x}Ru_xO_7$ (x = 0–0.35) catalyst for hydrogen production. App. Cata. B, 134–135, 135, 359–366.

EFEITOS INDIVIDUAIS E SINÉRGICOS ORIGINADOS DA DOPAGEM COM ÍNDIO EM CATALISADORES CU/CEO_2 APLICADOS À HIDROGENAÇÃO DE CO_2 A METANOL

Marco Aurélio de Lima Silva Rossi[1]; Elisabete Moreira Assaf [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Físico-Química do IQSC/USP;
[2] Professora do Departamento de Físico-Química do IQSC/USP.

Resumo

A influência do teor de índio como dopante em catalisadores Cu/CeO_2 aplicados à hidrogenação de CO_2 a metanol foi avaliada. Três catalisadores foram sintetizados pelo método de co-precipitação a pH constante assistida pelo surfactante CTAB. Os teores molares de índio em cada material foram 0%, 5% e 10% e os catalisadores denominados Cu/CeO_2, Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In, respectivamente. Os materiais foram caracterizados por termogravimetria, difração de raios X, espectroscopia por energia dispersiva de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, redução à temperatura programada, fisissorção de N_2, quimissorção de N_2O, dessorção de CO_2 a temperatura programada e espectroscopia fotoeletrônica por raios X. Os testes catalíticos foram realizados em um reator do tipo leito fixo sob vazão contínua dos gases de alimentação. Os resultados obtidos permitiram verificar que a adição de índio aos catalisadores levou a um aumento considerável na seletividade ao metanol, em virtude de efeitos individuais e sinérgicos advindos da presença de índio. Dentre os efeitos individuais há preponderância da ocorrência da reação pela rota d formiato e diminuição na energia de ativação para a hidrogenação de certos intermediários que se mostra elevada em outros materiais. Já no que se refere aos efeitos sinérgicos, há geração de vacâncias na estrutura da céria devido à dopagem com índio que atuam como sítios básicos fortes capazes de gerar maior interação com intermediários ácidos gerados. A diminuição nos valores de conversão foi compensada pelo aumento na seletividade de modo que, com os catalisadores dopados com índio, foi obtida maior produtividade molar de metanol além de considerável queda na produtividade de CO.

Introdução

O expressivo aumento recente na concentração de gases como CO_2 e CH_4 na atmosfera em virtude da atividade industrial e agropecuária impulsionados pelo crescimento populacional tem levado a problemas consideráveis envolvendo alterações climáticas e a acidificação dos oceanos (Porosoff, et al., 2016; Wang et al., 2011). Esse fato, associado às predições globais que apontam crescimento contínuo nas emissões de carbono a cada ano, tornam iminente a necessidade de investimentos em fontes de energia renováveis e do manejo sustentável do carbono emitido através de estratégias que possibilitem sua captura, estocagem e utilização como precursor na geração de uma série de compostos de maior valor agregado a partir de reações de hidrogenação dessa molécula (Crake et al., 2017).

Dentre os produtos que podem ser obtidos, o metanol, com demanda global de milhões de toneladas/ano, se destaca pelas suas muitas possibilidades de utilização

como molécula precursora na produção de compostos importantes para indústrias de vários setores como formaldeído, ácido acético, metacrilato de metila, tereftalato de dimetila, metilaminas e olefinas leves como etileno e propileno. Pode ainda ser convertido em produtos com maior capacidade calorífica como dimetil éter, etanol e ser utilizado como aditivo em muitos combustíveis comerciais (Goeppert et al. 2014, Fiordaliso et al. 2015).

Com base nisso, vários catalisadores vêm sendo desenvolvidos e estudados ao longo dos últimos anos na tentativa de se obter materiais que apresentem boa atividade na faixa de condições reacionais favoráveis a síntese do metanol levando-se em consideração os aspectos termodinâmicos e cinéticos do processo. Nesse aspecto, a grande maioria dos trabalhos se vale da formação de compósitos constituídos por partículas metálicas e partículas de óxidos dispersos entre si. Nesses materiais, a adsorção do dióxido de carbono e hidrogênio ocorre na interface entre as partículas com a participação de ambas as fases em um mecanismo bifuncional. Graciani *et al.* (2014) e Kattel *et al.* (2016).

Em meio a todos os metais já estudados incluindo Au, Pd, Rh e Ru, catalisadores baseados em cobre geralmente apresentam bom desempenho catalítico considerando que as energias envolvidas na adsorção e conversão do CO_2, nesses materiais, favorecem a quebra de apenas uma das ligações entre carbono e oxigênio, o que é importante para a formação de compostos oxigenados. Além disso, catalisadores baseados em cobre apresentam custo consideravelmente reduzido em relação a catalisadores contendo metais nobres e energia relativamente baixa de redução, comparado a outros materiais (Bersani *et al.*, 2016; Porosoff *et al.*, 2016).

No que se refere aos óxidos metálicos, a seletividade é potencializada pela presença de vacâncias de oxigênio em sua estrutura que atuarão como sítios básicos fortes capazes de adsorver apropriadamente moléculas de caráter ácido como o CO_2 e muitas das espécies intermediárias importantes no processo de geração do metanol (Wang, et al., 2011; Porosoff et al., 2016, Ye et al., 2012, Martin et al., 2016). A geração de vacâncias de oxigênio no óxido pode ocorrer, em geral, durante o tratamento térmico sob atmosfera redutora, no entanto, é possível que ocorra uma quantidade escassa de vacâncias apenas com esse procedimento, principalmente em temperaturas mais baixas. Além disso, a utilização de temperaturas elevadas não é desejável pelo favorecimento de agregação e diminuição da área específica de superfície do material gerado (Wang et al, 2011; Porosoff et al., 2016). Uma possível alternativa que garanta uma formação potencializada de vacâncias de oxigênio está na estratégia de dopagem de um óxido com cátions de menor valência que os cátions predominantes na rede. Como o oxigênio é eletrofílico, sua desestabilização na rede iônica pode ser facilitada a partir da criação de uma deficiência eletrônica na superfície do material pela introdução de uma espécie catiônica de menor valência que a valência do cátion principal na rede cristalina estrutural do óxido (McFarland e Metiu, 2013).

Estudos recentes evidenciaram o alto potencial do CeO_2 em virtude da possibilidade de transição dos cátions desse óxido entre diferentes estados de oxidação através da dinâmica entre Ce^{3+} e Ce^{4+}, o que contribui para a geração de vacâncias em comparação a óxidos não redutíveis e também pela sua basicidade inerente (Graciani et al., 2014, Rodriguez et al., 2015, Ouyang et al., 2017).

Além disso, estudos teóricos e experimentais recentes demonstraram que, utilizando-se In_2O_3 como catalisador, etapas críticas para a geração do metanol, para as quais há barreiras energéticas altas em outros catalisadores, são favorecidas com energias de ativação significativamente menores quando ocorrem na superfície do óxido de índio, devido a energias de interação apropriadas entre certos intermediários-chave

do processo e os sítios ativos desse material. Além disso, o mecanismo reacional pelo qual o CO_2 é hidrogenado quando se utiliza óxido de índio como catalisador favorece maiores seletividades ao metanol com expressivos valores não atingidos pela grande maioria dos demais catalisadores. O alto custo de materiais contendo índio, no entanto, inviabiliza sua utilização em altos teores nos catalisadores para diversos processos (Ye et al., 2012; Ye et al., 2013; Martin et al., 2016).

Com base nisso, neste trabalho foram introduzidos diferentes teores de índio como dopante em catalisadores Cu/CeO_2 com o objetivo de se obter melhorias na seletividade a metanol, tanto por efeitos individuais advindos da energia de interação entre os intermediários do processo e o índio em baixos teores, quanto por efeitos sinérgicos de potencialização das vacâncias devido à diferença de valência entre os cátions In^{3+} e Ce^{4+}.

Materiais e Métodos

Três catalisadores baseados em Cu/CeO_2 contendo diferentes teores de índio em sua composição (0, 5 e 10% em teor molar) foram sintetizados pelo método de co-precipitação em pH constante assistida pelo surfactante CTAB. Os materiais foram denominados Cu/CeO_2; Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In.

De forma detalhada, em um béquer contendo 250mL de água destilada foram adicionados 60mmol de CTAB e quantidades apropriadas de cada um dos nitratos metálicos (0,015 mol de $Cu(NO_3)_2$ e 0,015 mol de $Ce(NO_3)$ para o Cu/CeO_2; 0,015 mol de $Cu(NO_3)_2$, 0,0135 mol de $Ce(NO_3)_3$ e 0,0015 mol de $In(NO_3)_3$ para o Cu/CeO_2-5%In e 0,015 mol de $Cu(NO_3)_2$, 0,012 mol de $Ce(NO_3)_3$ e 0,003 mol de $In(NO_3)_3$) para o Cu/CeO_2-10%In), o sistema foi mantido em agitação por 2 horas. Essa solução foi denominada solução A.

Paralelamente, em outro béquer foi preparada uma solução aquosa de NaOH na concentração de 0,5 $mol.L^{-1}$, denominada solução B.

Em um terceiro béquer, foram adicionados 300 mL de água destilada. O pH dessa solução foi ajustado para 10 utilizando-se a solução B. Essa terceira solução foi denominada solução C.

Utilizando-se duas buretas, as soluções A e B foram, então, adicionadas à solução C de forma controlada para garantir que o pH se mantivesse em 10. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente.

A solução resultante foi mantida em agitação por 12 horas. Após esse tempo, o precipitado gerado foi obtido por meio de filtração à vácuo e lavagem até pH neutro, seco em estufa a 60°C por 48 horas e finalmente calcinado em mufla a temperatura de 600°C por 2 horas sob atmosfera oxidante.

Os catalisadores sintetizados foram caracterizados por termogravimetria, difração de raios X, espectroscopia por energia dispersiva de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, redução à temperatura programada, fisissorção de N_2, quimissorção de N_2O, dessorção de CO_2 a temperatura programada e espectroscopia fotoeletrônica por raios X.

Os testes catalíticos foram realizados em um reator do tipo leito fixo sob vazão contínua de gases. O reator foi alimentado com uma mistura de H_2 (15 $mL.min^{-1}$) e CO_2 (5 $mL.min^{-1}$). Foram utilizados os valores de pressão, temperatura e velocidade espacial iguais a 3 MPa, 473 K e 6 $L.g^{-1}.h^{-1}$. Foram utilizados 200 mg de catalisador misturados a 100 mg de carbeto de silício.

Anteriormente ao início da reação, os materiais foram reduzidos *in situ*, a 230 °C, com a taxa de aquecimento de 10 $°C.min^{-1}$, sob fluxo de H_2 (30 $mL.min^{-1}$) por 1 h.

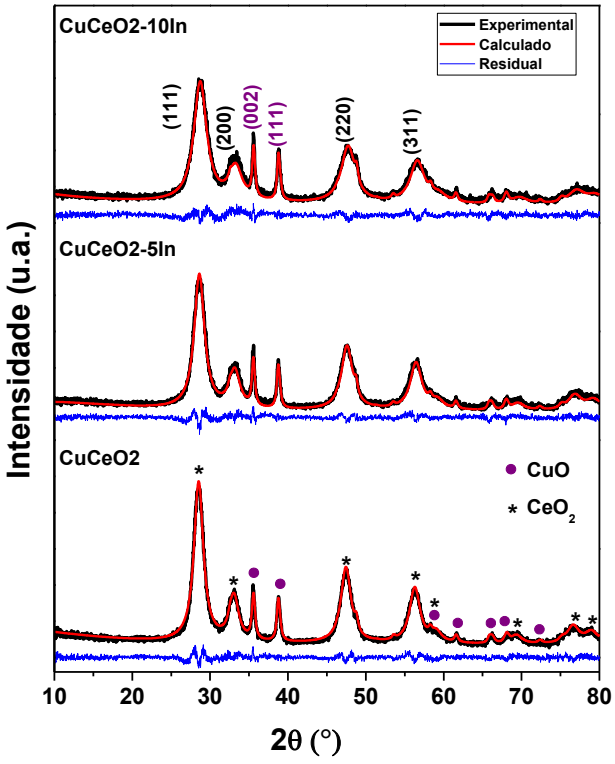
A mistura gasosa contendo os produtos gerados no reator foi analisada em linha em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de condutividade térmica e outro por ionização de chama.

Resultados e Discussão

Caracterizações:

Os difratogramas obtidos para os três materiais e os parâmetros de qualidade do refinamento se encontram na Figura 1 e tabela 1, respectivamente.

Figura 1: Refinamento de Rietveld para os difratogramas de Raios X para os catalisadores Cu/CeO_2, $CuCeO_2$-5%In e Cu/CeO_2-10%In.



Fonte: Autoria Própria

Tabel 1. Parâmetros de qualidade do refinamento de Rietveld realizado para os materiais Cu/CeO_2, Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In

Catalisadores	Rwp	GOF
Cu/CeO_2	5.20	3.70
Cu/CeO_2-5%In	5.50	3.85
Cu/CeO_2-10%In	5.46	4.01

Para todos os difratogramas, os picos em valores de 2θ igual 38°, 41° e 67° se referem ao óxido de cobre, enquanto os picos ocorrentes em 30°, 33°, 51° e 60° se

referem à estrutura do óxido de cério conforme comparação com os padrões cristalográficos JCPDS 34-394, referente à estrutura cristalina fluorita na qual se cristaliza o óxido de cério e JCPDS 48-1548, referente a estrutura tenorita na qual se cristaliza o óxido de cobre. Em nenhum dos difratogramas é verificada a presença de picos relacionados ao óxido de índio.

A partir do refinamento de Rietveld, foi possível calcular os valores dos parâmetros de rede e volume da célula unitária para a estrutura da céria em cada um dos catalisadores obtidos. Os resultados se encontram na tabela 2:

Tabela 2. Parâmetros de rede e volume de célula unitária para os catalisadores Cu/CeO_2, Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In

Catalisadores	**a_{CeO2} (Å)**	**V_{CeO2} (Å^3)**
Cu/CeO_2	5.423	159.40
Cu/CeO_2-5%In	5.411	158.43
Cu/CeO_2-10%In	5.401	157.59

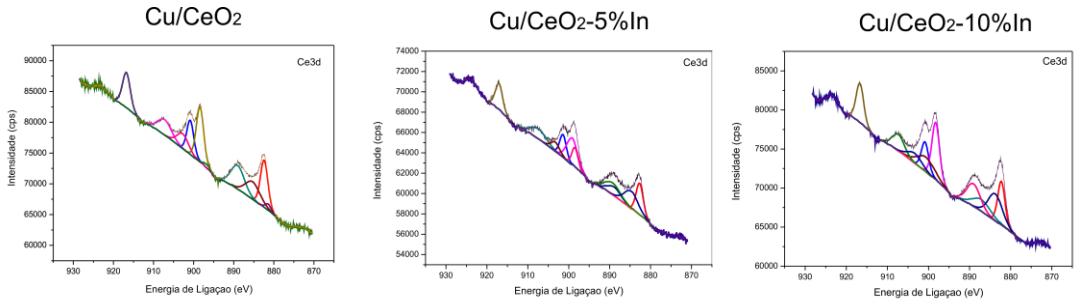
Os dados da tabela 2 evidenciam que há uma diminuição progressiva dos parâmetros de rede e volume de célula unitária da CeO_2 à medida que se aumenta o teor de índio nos materiais, o que sugere que átomos de In se inserem como dopantes na estrutura da céria uma vez que a introdução de uma espécie catiônica de raio iônico distinto do raio iônico do cátion principal na estrutura do óxido levará a alterações nos parâmetros de rede do óxido dopado (Lou et. al, 2014; Ma et . al, 2018; McFarland e Metiu, 2013).

Segundo Naik e Salker (2018), o raio iônico das espécies In^{3+} (0.94 Å) e sua coordenação são menores que o raio iônico do Ce^{4+} (1.04Å), portanto, a dopagem com índio na estrutura de CeO_2 levará à contração da rede cristalina apresentando redução dos parâmetros de rede, como foi observado para os catalisadores nesse trabalho.

Paralelamente a esse fato, verifica-se o deslocamento do pico principal da CeO_2 correspondente ao plano hkl 111 para maiores ângulos e uma diminuição progressiva da cristalinidade e da intensidade dos picos referentes às partículas de céria geradas à medida que se aumenta o teor de índio introduzido nesses materiais. Segundo Lou et. al (2014) e Naik e Salker (2018), isso corrobora a dopagem de átomos de índio na estrutura de CeO_2.

As deconvoluções para os espectros obtidos por espectroscopia fotoeletrônica por raios X se encontram na figura 1.

Figura 1. Espectros de Ce 3d deconvoluídos para os catalisadores Cu/CeO_2, Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In



Para todos os catalisadores, o espectro do cério apresenta contribuições adicionais às contribuições características das espécies catiônicas Ce^{4+} em regiões de energia de ligação ligeiramente menores sugerindo um ambiente químico distinto. De acordo com Bêche *et al*. (2008), essas contribuições estão relacionadas a vacâncias de oxigênio existentes nas partículas de CeO_2 superficiais convertendo parte das espécies de Ce^{4+} em espécies Ce^{3+}, parcialmente reduzidas. Uma vez que, para as espécies trivalentes, a carga nuclear efetiva se distribui sobre um maior número de elétrons, a energia de ligação desses elétrons ao núcleo se torna menor, justificando a posição dos picos referentes à contribuição Ce^{3+} em posições de energia de ligação inferiores às observadas para os picos relacionados a espécies Ce^{4+}.

As propriedades estruturais obtidas pelas análises de caracterização dos materiais se encontram na tabela 3.

Tabela 3. Propriedades estruturais dos catalisadores Cu/CeO_2, Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In

Catalisadores	**$S_{B.E.T.}$ ($m^2.g^{-1}$)**	**Dispersão Cu (%)**	**Área metálica ($m^2.g^{-1}$)**	**Razão molar Cu/(Ce+In) na superfície**	**Basicidade ($\mu molCO_2.g^{-1}$)**
Cu/CeO_2	57,1	7,01	11,39	2,29	178,475
Cu/CeO_2-5%In	46,3	6,48	10,50	2,99	241,796
Cu/CeO_2-10%In	54,1	6,62	11,04	2,62	237,340

Os resultados de razão molar Cu/(Ce +In) na superfície de cada um dos materiais, calculados por XPS, mostram que a adição do índio levou a um aumento do teor de cobre na superfície em detrimento dos demais elementos constituintes do óxido dopado. Além disso, houve diminuição na dispersão do cobre.

Os resultados de dessorção a temperatura programada de CO_2 evidenciam que há um aumento na basicidade dos catalisadores promovidos, o que se encontra de acordo com a presença de vacâncias de oxigênio na estrutura que atuarão como sítios básicos fortes devido à dopagem do sistema

Desempenho Catalítico

Após realizados os ensaios reacionais, os resultados de conversão de CO_2 e seletividade aos produtos gerados se encontram na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de porcentagem de conversão de CO_2 (XCO_2) e seletividade ($S_{produtos)}$ para os produtos gerados pelos catalisadores Cu/CeO_2, $CuCeO_2$-5%In e Cu/CeO_2-10%In.

Catalisadores	**XCO_2(%)**	**SCH_3OH (%)**	**SCO (%)**	**SCH_4 (%)**	**SC_2H_6 (%)**
Cu/CeO_2	2,56	47,27	52,15	0,30	0,28
Cu/CeO_2-5%In	1,67	78,46	20,65	0,46	0,43
Cu/CeO2-10%In	1,75	76,32	22,84	0,44	0,40

Condições reacionais: P= 3 MPa, T= 473 K, GHSV= 6 $L.g^{-1}.h^{-1}$

Fonte: Autoria própria

Os resultados de conversão obtidos para os catalisadores exibidos na tabela 4 demonstram que houve uma diminuição na conversão de CO_2 para os catalisadores dopados com índio em comparação ao catalisador não promovido, o que pode estar relacionado à natureza bifuncional do processo de hidrogenação do CO_2 a metanol.

De modo detalhado, na região de interface entre os sítios presentes nas partículas metálicas e de óxido, a molécula de CO_2 se adsorve através do seu átomo de carbono e um dos seus átomos de oxigênio na partícula metálica enquanto o outro átomo de oxigênio da molécula se adsorve em um sítio óxido próximo, preferencialmente nas vacâncias de oxigênio.

Já a adsorção e clivagem das ligações das moléculas de H_2 ocorre nas partículas metálicas. Por diferenças no potencial químico da superfície, os átomos de hidrogênio sofrem, então, um fenômeno de transferência (spillover) em direção aos sítios óxidos na interface onde se adsorvem como hidroxilas e participam, posteriormente, do processo de redução do CO_2 adsorvido (Graciani et al., 2014; Kattel et al., 2016).

Recentemente, Rodriguez et al. (2015) descobriram que catalisadores contendo óxido em altos teores em sua superfície recobrindo parcialmente as partículas metálicas apresentaram mais zonas interfaciais e, consequentemente, maior conversão do que os materiais cuja superfície é formada preponderantemente pela fase metálica e baixos teores de óxido.

Além disso, a dispersão da fase metálica é um parâmetro influente na atividade catalítica de uma série de catalisadores já estudados uma vez que altas dispersões favorecem a interação entre as diferentes fases constituintes do catalisador e, por consequência, a formação de um maior número de regiões interfaciais.

Os resultados obtidos para os catalisadores estão de acordo com essas observações uma vez que as conversões foram proporcionais à dispersão do cobre e ao teor de óxido na superfície do catalisador, verificado por XPS.

A incorporação de índio como dopante na estrutura dos materiais levou a um considerável aumento na seletividade para o metanol em relação ao catalisador Cu/CeO_2 o que pode estar relacionado aos mecanismos pelos quais a hidrogenação a metanol pode ocorrer.

Após a etapa de adsorção dos reagentes, duas rotas são possíveis.

A primeira delas é a rota da reação reversa de deslocamento gás-água (RWGS) seguida pela hidrogenação do CO a metanol. De acordo com Kattel *et al.* (2016), após a adsorção de CO_2 e H_2, ocorre a formação de carboxilato ($*CO_2^-$) que sofre uma primeira hidrogenação gerando uma espécie HOCO que, então, se dissocia gerando OH e uma molécula de CO. A hidroxila adsorvida (OH) é então hidrogenada e se dessorve como uma molécula de água, enquanto o monóxido de carbono adsorvido (CO) sofre sucessivas hidrogenações formando espécies HCO, H_2CO e H_3CO, até, finalmente, chegar ao metanol que se dessorve da superfície

No entanto, o CO adsorvido gerado em uma das etapas apresenta energia de adsorção consideravelmente baixa e a sua dessorção é favorecida, não somente por esse fato, mas também pelas contribuições entrópicas envolvidas no rompimento da interação presente entre essa molécula e a superfície do catalisador. Mais do que isso, há uma alta energia de ativação para a hidrogenação inicial do CO adsorvido para a maioria dos materiais e, mesmo quando ocorre a formação da espécie HCO, há alta probabilidade de que ela sofra reação reversa por sua alta instabilidade na superfície de modo que, mesmo parte do CO que seja hidrogenado, pode sofrer reversão. A maioria dos catalisadores, incluindo o catalisador comercial $Cu/ZnO/Al_2O_3$ segue, preponderantemente, essa rota.

Já a segunda rota é conhecida como Rota do Formiato. De acordo com Kattel *et al.* (2016), ela se inicia com a adsorção de CO_2 e H_2 gerando uma espécie de formiato adsorvida (HCOO). Essa espécie sofre hidrogenações sucessivas gerando as espécies H_2COO e H_2COOH que, então, sofre clivagem de uma das ligações C-O gerando as espécies H_2CO e OH. A espécie OH se hidrogena e dessorve como uma molécula de água e a espécie H_2CO se hidrogena até gerar o metanol que, por sua vez, se dessorve da superfície.

Essa segunda rota não gera CO como intermediário o que favorece fortemente maior seletividade a metanol. O problema com essa rota, no entanto, é que a etapa da clivagem da ligação C-O presente no intermediário H_2COO é muito pouco favorecida e, quando ocorre, apresenta alta probabilidade de reversão levando de volta à formação de H_2COO que permanece na superfície adsorvido, bloqueando os sítios.

Estudos teóricos recentes usando a teoria do funcional de densidade estabeleceram que em catalisadores baseados em óxido de índio, a reação segue, preponderantemente, a rota do formiato. Nos sítios ativos desses materiais a barreira energética para hidrogenação das espécies H_2COO é consideravelmente reduzida em relação a outros catalisadores já estudados (Ye *et al*., 2012; Ye *et al*., 2013).

Além disso, utilizando catalisadores baseados em índio, a produção de CO decorrente da reversa da reação de deslocamento gás-água que ocorre em menor proporção tende a ser baixa uma vez que a energia de adsorção dessa molécula nos sítios ativos é alta comparada a outros materiais, o que desfavorece sua dessorção. Além disso, assim como para o H_2COO, há baixa energia de ativação para a hidrogenação do monóxido de carbono comparado a outros catalisadores (Bielz *et al*., 2011; Ye *et al*. 2013 e Martin *et al*., 2016).

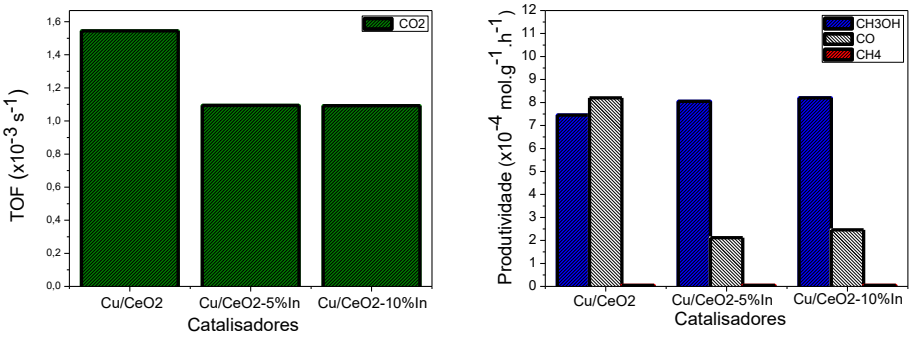
Além dos efeitos individuais advindos da presença do índio nos catalisadores, ocorre também um efeito sinérgico de maior geração de vacâncias no óxido de cério devido às diferenças de valência entre esses elementos (McFarland e Metiu 2012).

A geração dessas vacâncias leva a um efeito de maior basicidade nos catalisadores contendo índio como pode ser observado pelos resultados de basicidade provenientes da análise de dessorção de CO_2 a temperatura programada. E, de acordo com revisões amplas publicadas por Porosoff *et al*. (2016) e Wang et al. (2011) e muitos outros trabalhos específicos com o de Bansode *et al*. (2013) e Guo *et al*. (2011), uma vez que, pelas duas rotas mecanísticas principais, o CO_2 e muitos dos intermediários importantes para geração do metanol apresentam caráter ácido, um aumento na basicidade dos catalisadores se mostra benéfico à seletividade geral do processo de hidrogenação de CO_2 a metanol através de interações do tipo ácido-base de Lewis que desfavorecem a dessorção desses compostos.

Portanto, percebe-se que as diferenças nos desempenhos catalíticos dos materiais advêm de contribuições individuais da presença de índio, de contribuições sinérgicas da interação entre esse elemento e o cério que alteram a basicidade, do teor e dispersão entre os sítios metálicos e óxidos na superfície e, da relação de ocorrência e preponderância entre as duas rotas mecanísticas possíveis bem como das diferenças na energia de ativação para a hidrogenação de certos intermediários chave do processo.

Os valores de frequência de turnover (TOF) para o CO_2 e os de produtividade molar para os principais produtos obtidos para cada um dos catalisadores foram calculados e se encontram na figura 2. Os valores de TOF foram normalizados pela área metálica de cobre de superfície

Figura 2. Frequência de turnover para o CO_2 e produtividade molar de cada um dos principais produtos obtidos pelos catalisadores Cu/CeO_2, Cu/CeO_2-5%In e Cu/CeO_2-10%In



É possível verificar que há diminuição nos valores TOF dos catalisadores dopados com índio em relação ao catalisador Cu/CeO_2 o que é condizente ao se considerar os menores valores de dispersão do cobre e de teor de óxido na superfície dos catalisadores, fatores esses que influem diretamente na eficiência dos sítios ativos presentes nas regiões de interface conforme já discutido.

No entanto, a significância do aumento na seletividade superou a diminuição nos valores de TOF ao se constatar que a produtividade molar de metanol aumenta nos catalisadores contendo índio apesar da diminuição nas taxas de conversão. Mais que isso, os valores de produtividade para o CO diminuem drasticamente nos materiais contendo índio comparado ao catalisador Cu/CeO_2.

Portanto, apesar da menor conversão de CO_2, foi possível obter maiores quantidades de metanol em termos absolutos com os catalisadores dopados em um processo mais seletivo com menor geração dos demais produtos.

Conclusão

O decréscimo nos valores de conversão verificado para os catalisadores dopados ocorreu em razão da menor dispersão do cobre e menor porcentagem de óxido na superfície comparados ao catalisador não modificado.

Os catalisadores promovidos com índio apresentaram aumento expressivo na seletividade para o metanol devido a efeitos individuais e sinérgicos advindos da presença de índio na estrutura que incluem baixa energia de ativação para hidrogenação de certos intermediários adsorvidos, ocorrência da reação predominantemente pela rota do formiato conforme estabelecido por cálculos teóricos e aumento da basicidade em virtude da geração de vacâncias na estrutura da céria.

O aumento na seletividade ao metanol compensou a diminuição na conversão se mostrando mais significativo de modo que, com os catalisadores dopados, foi possível obter maior produtividade molar de metanol em comparação ao catalisador Cu/CeO_2 não modificado além de expressiva queda na produtividade de CO.

Referencial Bibliográfico

BANSODE, A.; TIDONA B.; VON ROHR, R.; URAKAWA, A. Impact of K and Ba promoters on CO2hydrogenation over Cu/Al2O3catalysts at high pressure. Catal. Sci. Technol., v. 3, n. 3, p. 767-778, 2013.

BÊCHE, E.; CHARVIN, P.; PERARNAU, D.; ABADANADES, S.; FLAMAN, G. Ce 3d XPS investigation of cerium oxides and mixed cerium oxides ($Ce_xTi_yO_z$). Surface and Interface Analysis, v. 40, p. 264-267, 2008.

BERSANI, M.; GUPTA, K.; MISHRA, A.; LANZA, R.; TAYLOR, R.; ISLAM, H.; HOLLINGSWORTH, N.; HARDACRE, C.; LEEUW, N.; DARR, J. Combined EXAFS, XRD, DRIFTS, and DFT Study of Nano Copper-Based Catalysts for CO2Hydrogenation. ACS Catalysis, v. 6, n. 9, p. 5823-5833, 2016.

BIELZ, T.; LORENZ, H.; MANN, P.; KLOTZER, B.; PENNER, S. Water-gas shift and formaldehyde reforming activity determined by defect. Chemistry of polycrystalline In_2O_3. Journal of physical chemitry C, v.115, p.6622-6628, 2011.

CRAKE, A.; CHRISTOFORIDIS, K.; KAFIZAS, A.; ZAFEIRATOS, S.; PETIT, C. CO_2 capture and photocatalytic reduction using bifunctionalTiO2/MOF nanocomposites under UV–vis irradiation. Applied Catalysis B: Environmental, v. 210, p. 131-140, 2017.

FIORDALISO, E.; SHARAFUTDINOV, I.; CARVALHO, H.; GRUNWALDT, J.; HANSEN, T.; CHORKENDORFF, I.; WAGNER, J.; DAMSGAARD, C. Intermetallic GaPd2Nanoparticles on SiO2for Low-Pressure CO2Hydrogenation to Methanol: Catalytic Performance and In Situ Characterization. ACS Catalysis, v. 5, n. 10, p. 5827-5836, 2015.

GOEPPERT, A.; CZAUN, M.; JONES, J.; PRAKASH, G.; OLAH, G. Recycling of carbon dioxide to methanol and derived products - closing the loop. Chem Soc Rev, v. 43, n. 23, p. 7995-8048, Dec 07 2014.

GRACIANI, J.; MUDIYANSELAGE, K.; XU, F.; BABER, A.; , EVANS, J.; D. SENANAYAKE, S.; STACCHIOLA, D.; LIU, P.; HRBEK, J.; SANZ, J.; RODRIGUEZ, J. Catalysis. Highly active copper-ceria and copper-ceria-titania catalysts for methanol synthesis from CO(2). Science, v. 345, n. 6196, p. 546-50, 2014.

GUO, X.; MAO, D.; LU, G.; WANG, S.; WU, G. The influence of La doping on the catalytic behavior of Cu/ZrO2 for methanol synthesis from CO2 hydrogenation. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 345, n. 1-2, p. 60-68, 2011.

KATTEL, S.; YAN, B.; YANG, Y.; CHEN, J.; LIU, P. Optimizing Binding Energies of Key Intermediates for CO2 Hydrogenation to Methanol over Oxide-Supported Copper. J Am Chem Soc, v. 138, n. 38, p. 12440-50, 2016.

LOU, Y.; MA, J.; CAO, X.; WANG, L.; DAI, Q.; ZHAO, Z.; CAI, Y.; ZHAN, W.; GUO Y.; LU, G.; GUO, Y. Promoting effects of In_2O_3 on Co_3O_4 for CO oxidation: Tuning O_2 activation and CO adsorption strength simultaneously. ACS Catalysis. V. 4, p. 4143-4152, 2014.

MA, L.; SEO, C.; CHEN, X.; SUN, K.;SCHWANK, J. Indium-doped Co_3O_4 nanorods for catalytic oxidation of CO and C_3H_6 towards Diesel Exhaust. Applied Catalysis B: Environmental, v. 222, p. 44-58, 2018

MARTIN, O.; MARTÍN, A.; MONDELLI, C.; MITCHELL, S.; SEGAWA, T.; HAUERT, R.; DROUILLY, C.; CURULLA-FERRÉ D.; PÉREZ-RAMIREZ, J. Indium Oxide as a Superior Catalyst for Methanol Synthesis by CO2 Hydrogenation. Angew Chem Int Ed Engl, v. 55, n. 21, p. 6261-5, 2016.

MCFARLAND, E. W.; METIU, H. Catalysis by doped oxides. Chem Rev, v. 113, n. 6, p. 4391-427, 2013.

NAIK, M.; SALKER, A. Effect of indium doping on magnetic properties of cerium oxide Nanoparticles. Materials Chemistry and Physics, v. 212, p. 336-342, 2018.
OUYANG, B.; TAN, W.; LIU, B. Morphology effect of nanostructure ceria on the Cu/CeO 2 catalysts for synthesis of methanol from CO 2 hydrogenation. Catalysis Communications, v. 95, p. 36-39, 2017.

POROSOFF, M. D.; YAN, B.; CHEN, J. G. Catalytic reduction of CO2by H2for synthesis of CO, methanol and hydrocarbons: challenges and opportunities. Energy Environ. Sci., v. 9, n. 1, p. 62-73, 2016.

RODRIGUEZ, J.; LIU, P.; STACCHIOLA, D.; SENANAYAKE, S.; WHITE, M.; CHEN, J. Hydrogenation of CO2to Methanol: Importance of Metal–Oxide and Metal–Carbide Interfaces in the Activation of CO2. ACS Catalysis, v. 5, n. 11, p. 6696-6706, 2015.

WANG, W.; WANG, S.; MA, X.; GONG, J. Recent advances in catalytic hydrogenation of carbon dioxide. Chem Soc Rev, v. 40, n. 7, p. 3703-27, Jul 2011.

YE, J.; LIU, C.; GE, Q. DFT Study of CO_2 Adsorption and Hydrogenation on the In2O3Surface. The Journal of Physical Chemistry C, v. 116, n. 14, p. 7817-7825, 2012.

YE, J.; LIU, C.; MEI, D.; GE, Q. Active Oxygen Vacancy Site for Methanol Synthesis from CO_2 Hydrogenation on In_2O_3(110): A DFT Study. ACS Catalysis, v. 3, n. 6, p. 1296-1306, 2013.

SÍNTESE DE CH_3OH A PARTIR DA HIDROGENAÇÃO DO CO_2 EM CATALISADORES DE Cu/Zn PROMOVIDOS POR Al, Cr, Ga, Nb OU Zr

Cássia S. Santana [1]; Janaína F. Gomes [2]; Elisabete Moreira Assaf [3]; José Mansur Assaf [2]

[1] Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar;
[3] Professora do Instituto de Química de S. Carlos - USP.

Resumo. *Uma abordagem promissora para minimizar o acúmulo de CO_2 na atmosfera e mitigar seus impactos ambientais negativos inclui o uso desse gás como matéria-prima para a síntese de produtos químicos. Em particular, o metanol é um produto de interesse que pode ser obtido a partir das reações de hidrogenação do CO_2. Entretanto, os catalisadores aplicados nessa reação apresentam desempenho insatisfatório em termos de conversão, seletividade para a formação de um produto específico e estabilidade sob condições reacionais. Visando contribuir para a superação destas barreiras, no presente trabalho estudamos o efeito da adição de Al, Cr, Ga, Nb e Zr como promotores em catalisadores de Cu/Zn aplicados à hidrogenação de CO_2 a metanol. Os catalisadores Cu/Zn, Cu/Zn/Al, Cu/Zn/Cr, Cu/Zn/Ga, Cu/Zn/Nb e Cu/Zn/Zr foram preparados pelo método de co-precipitação e caracterizados por FRX, DRX, fisissorção de N_2, RTP-H_2 e DTP-CO_2. Os resultados catalíticos mostraram que a atividade dos materiais e a seletividade a metanol aumentaram com a adição dos promotores. Combinando com os resultados de caracterização, os distintos comportamentos apresentados pelos materiais podem ser atribuídos às diferenças em suas áreas superficiais específicas, capacidades de adsorção do CO_2 e redutibilidade dos óxidos de cobre.*

Introdução

Em decorrência da queima indiscriminada de combustíveis fósseis, desde o início da revolução industrial ocorrida na Inglaterra em meados do século XVIII, a emissão de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera vem aumentando consideravelmente. Dentre as problemáticas associadas ao acúmulo maciço de CO_2 na atmosfera, destaca-se a maior retenção de calor do sol e, consequentemente, a intensificação do efeito estufa e o aumento da temperatura média da Terra. As mudanças climáticas e a perda da biodiversidade resultantes do aquecimento global já desencadearam um processo de destruição de recursos naturais que ameaça a vida no nosso planeta.

Considerando o CO_2 como uma fonte abundante de carbono, uma possibilidade para contribuir com a redução dos seus níveis na atmosfera e mitigar os efeitos negativos do seu acúmulo é empregar este gás abundante e de baixo custo como matéria-prima para a síntese de produtos de interesse industrial, tais como álcoois e outros combustíveis, que possam substituir parte dos insumos de origem fóssil (Li et al., 2018). Nesse sentido, a produção de metanol a partir das reações de hidrogenação de CO_2 desperta grande interesse, visto que este composto é largamente empregado como matéria-prima em indústrias químicas e petroquímicas, além de ser usado como combustível. Embora haja uma rota bem estabelecida para a fabricação de metanol a partir do gás de síntese ($CO+H_2$) (Equação 1), o uso de CO_2 como matéria-prima para a geração de metanol (Equação 2) ainda é pouco explorado e isso se deve em parte à sua estabilidade termodinâmica (Wang et al., 2017).

$$CO + 2H_2 \leftrightarrows CH_3OH \quad \Delta H^0_{298\,K} = -90{,}6\ \text{kJ mol}^{-1} \tag{1}$$

$$CO_2 + 3\,H_2 \leftrightarrows CH_3OH + H_2O \quad \Delta H^0_{298\,K} = -49{,}4\ \text{kJ mol}^{-1} \tag{2}$$

Atualmente o metanol é produzido em plantas industriais utilizando-se catalisadores à base de Cu-Zn, em reatores operando em pressões em torno de 100 bar e temperaturas entre 200 e 300 ºC (Wang et al., 2017). Para viabilizar a produção de metanol a partir de CO_2 e H_2, faz-se necessário o desenvolvimento de catalisadores mais eficientes em termos de rendimento e seletividade a este álcool. Sob condições reacionais, algumas limitações tais como a sinterização de partículas metálicas que compõem a fase ativa de catalisadores e, consequentemente, a baixa estabilidade destes materiais, representam um obstáculo a ser superado. Estratégias que vem sendo adotadas envolvem modificações da composição do catalisador por meio da variação da natureza química do suporte, do teor metálico da fase ativa e da adição de promotores (Cai et al., 2015; Witoon et al., 2016). Nesse sentido, no presente trabalho empregaram-se Al_2O_3, Cr_2O_3, Ga_2O_3, Nb_2O_5 e ZrO_2 como promotores do catalisador à base de Cu-Zn a fim de alcançar melhores desempenhos na síntese de metanol a partir de CO_2 e H_2.

Material e Métodos

Preparo dos catalisadores

Os catalisadores de Cu/ZnO, Cu/ZnO/Al_2O_3, Cu/ZnO/Cr_2O_3, Cu/ZnO/Ga_2O_3, Cu/ZnO/Nb_2O_5 e Cu/ZnO/ZrO_2 foram sintetizados pelo método de co-precipitação (Witoon et al., 2016). Os sais utilizados como precursores dos metais Cu, Zn, Al, Cr, Ga, Nb e Zr foram $Cu(NO_3)_2.3H_2O$, $Zn(NO_3)_2.6H_2O$, $Al(NO_3)_3.9H_2O$, $Cr(NO_3)_3.9H_2O$, $Ga(NO_3)_3.xH_2O$, $NH_4[NbO(C_20_4)_2(H_2O)_2].(H2O)_n$ e $Cl_2.OZr.8H_2O$, respectivamente. Em um experimento típico, quantidades apropriadas dos sais precursores foram dissolvidas em 25 mL de água deionizada. A solução resultante foi gotejada vagarosamente em 500 mL de uma solução de $NaHCO_3$ (0,1 $mol.L^{-1}$), mantida sob agitação constante e à temperatura fixa de 60 °C em um banho de glicerina. Manteve-se a mistura contendo os precursores metálicos em pH entre 7 e 8, gotejando-se uma solução de $NaHCO_3$ (1 $mol.L^{-1}$). Após a adição completa da solução contendo os sais precursores, aguardou-se 4 h sob as mesmas condições de pH, temperatura e agitação para o término da precipitação e reordenação dos tamanhos de partículas do precipitado formado. Em seguida, o sólido foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 rpm por 5 min) e, na sequência, foi submetido a dois ciclos de lavagem com etanol e separação por centrifugação (também a 8000 rpm por 5 min) para purificação do material. Então, o sólido resultante foi seco em estufa a 80 °C por 24 h e calcinado por 4 h sob fluxo de 100 $mL.min^{-1}$ de ar sintético a 450 °C, com uma taxa de aquecimento de 2 $°C.min^{-1}$. Obteve-se assim os catalisadores de Cu/ZnO e Cu/ZnO/X (X = Al_2O_3, Cr_2O_3, Ga_2O_3, Nb_2O_5 ou ZrO_2). As massas dos reagentes, empregadas nas sínteses dos materiais, foram calculadas considerando-se os teores mássicos nominais (%) de Cu:Zn = 50:50 e Cu:Zn:Y= 50:45:5 (Y = Al, Cr, Ga, Nb ou Zr).

Caracterização dos catalisadores

A técnica de fluorescência de raios X (FRX) foi empregada na determinação da composição química dos catalisadores em estudo. As análises foram realizadas utilizando-se o equipamento Energy Dispersive X-Ray Spectrometer, modelo Ray Ny EDX-720, da Shimadzu. As amostras foram previamente homogeneizadas e alocadas em um porta amostras de extremidades vedadas com um filme de polipropileno.

A área específica (S_{BET}) dos catalisadores foi determinada por adsorção física de N_2 sobre os materiais, a -196 °C, aplicando-se o método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (1938). Os experimentos foram realizados em um aparelho Micrometrics ASAP 2020. Analisaram-se amostras de aproximadamente 100 mg, que foram submetidas a um aquecimento em 200 ºC por 2 horas para a eliminação de água e gases fisicamente adsorvidos.

A fim de explorar a formação de fases cristalinas nos catalisadores sintetizados, os materiais foram investigados por difração de raios X (DRX), utilizando-se um difratômetro

Rigaku Multiflex. Nestas análises, empregou-se o método do pó e radiação de CuKα (λ = 1,5406 Å; 40 kV; 30 mA). O intervalo de ângulo 2θ investigado foi de 10° a 80°. A velocidade do goniômetro foi de 2°.min^{-1}.

Os experimentos de redução com hidrogênio a temperatura programada (RTP-H_2) foram realizados empregando-se um aparelho Micromeritics Autochem II 2920 Chemisorption Analyzer, equipado com detector de condutividade térmica. Nestas análises, aproximadamente 75 mg de amostra foram expostas a um fluxo de 30 mL.min^{-1} de 10% H_2/N_2, a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min^{-1}, da temperatura ambiente até 800 °C para obtenção dos termogramas.

Os experimentos de dessorção de CO_2 a temperatura programada (DTP-CO_2) foram realizados em um equipamento Micromeritics Autochem II 2920 Chemisorption Analyzer. Em um experimento característico, uma amostra com cerca de 75 mg foi inicialmente aquecida até 450 °C (temperatura utilizada na calcinação dos materiais), com rampa de 10 °C.min^{-1}, sob fluxo de 30 mL.min^{-1} de He. Posteriormente, a amostra foi resfriada até 45 °C sob fluxo de 30 mL.min^{-1} de He. Na sequência, prosseguiu-se à redução da amostra. Nesta etapa, ela foi aquecida de 45 °C até 300 °C com rampa de 10 °C.min^{-1}, sob fluxo de 30 mL.min^{-1} de uma mistura contendo 10% H_2 em N_2 e foi mantida em 300 °C sob atmosfera redutora por 1 h. Em seguida, a amostra foi resfriada até 45 °C sob fluxo de 30 mL.min^{-1} de He, e, então, foi realizada a quimissorção de CO_2 sob fluxo de 30 mL.min^{-1} de CO_2 por 30 min. Após a quimissorção, realizou-se uma purga com He por 1 h a fim de remover o CO_2 fisissorvido. Finalmente, sob fluxo de 30 mL.min^{-1} de He, a temperatura foi elevada até 300 °C, com rampa de 10 °C.min^{-1}.

Ensaios Catalíticos

Os ensaios catalíticos foram realizados em uma linha reacional de alta pressão da *Microactivity*, marca *PID Eng & Tech*. O reator de aço inox do tipo leito fixo foi alimentado com uma mistura de CO_2 (5 mL.min^{-1}) e H_2 (15 mL.min^{-1}). As reações de hidrogenação de CO_2 foram conduzidas em temperaturas entre 200 e 280 °C e à pressão de 30 bar, utilizando 200 mg de catalisador misturados a 200 mg de carbeto de silício. Em uma etapa anterior a de reação, os materiais foram reduzidos *in situ*, a 300 °C, sob fluxo de H_2 de 30 mL.min^{-1} por 1 h. A taxa de aquecimento foi de 10 °C.min^{-1}. Os gases efluentes do reator foram analisados em linha por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se um cromatógrafo Agilent Technologies modelo 7890A, equipado com um detector de condutividade térmica e outro por ionização de chama. A partir dos dados dos ensaios catalíticos foram calculados a conversão de CO_2 e a seletividade a determinado produto, de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente:

$$X_{CO_2} = \frac{\dot{n}(CO2_{entrada}) - \dot{n}(CO2_{saída})}{\dot{n}(CO2_{entrada})} . 100\% \quad (4)$$

$$S_i = \frac{\dot{n}(i_{saída})}{\dot{n}(CO2_{entrada}) - \dot{n}(CO2_{saída})} . 100\% \quad (5)$$

Onde Xco_2 é a conversão de CO_2; $n(CO_{2\ entrada})$ e $n(CO_{2\ saída})$ os fluxos molares de CO_2 na entrada e saída do reator, respectivamente; Si é a seletividade ao produto i (i = CH_4, CO ou CH_3OH); $n(i_{saída})$ é a vazão molar de saída do produto i (i = CH_4, CO ou CH_3OH).

Resultados Parciais e Discussão

A Tabela 1 apresenta os teores mássicos de metais, as áreas específicas e a quantidade de sítios básicos dos materiais.

Tabela 1: Teores mássicos experimentais dos metais nos materiais, obtidos por FRX, áreas específicas (método de BET) e quantidade de sítios básicos, determinada por DTP-CO_2.

Material	Teor nominal (% m)	Teor obtido por FRX (% m)	Área específica, S_{BET} ($m^2.g^{-1}$)	Quantidade de CO_2 dessorvido ($mmol.g^{-1}_{cat}$)
Cu/Zn	50 : 50	48 : 52	9	0,038
Cu/Zn/Al	50 : 45 : 5	50 : 44 : 6	31	0,063
Cu/Zn/Cr	50 : 45 : 5	49 : 46 : 5	12	0,041
Cu/Zn/Ga	50 : 45 : 5	51 : 44 : 5	41	0,055
Cu/Zn/Nb	50 : 45 : 5	49 : 47 : 4	48	0,056
Cu/Zn/Zr	50 : 45 : 5	51 : 44 : 5	17	0,066

De forma geral, observa-se que os teores mássicos dos metais nos materiais sintetizados foram próximos dos nominais, indicando a acurácia do método de síntese empregado neste trabalho.

Na presença de promotores a área específica dos catalisadores aumentou em até 5 vezes em comparação com aquela do material não promovido (Tabela 1). Este aumento significativo pode estar associado à formação de partículas óxidas relativamente menores. Os promotores ainda podem atuar na definição estrutural destes óxidos levando, por exemplo, à redução da cristalinidade e ao aumento de porosidade, o que resulta na formação de materiais com maior área específica (Yan et al., 2000; Li et al., 2013; Saeidi, Amin e Rahimpour, 2014). As mudanças nas propriedades dos materiais à base de Cu/Zn podem influenciar suas atividades catalíticas, seletividades aos produtos e estabilidades sob condições reacionais (Cai et al., 2015; Witoon et al., 2016).

A quantidade de CO_2 dessorvido dos materiais à base de cobre até a temperatura de 300 °C variou entre 0,038 e 0,066 $mmol.g^{-1}_{cat}$ (Tabela 1). Esses valores relacionam-se diretamente com a quantidade de sítios básicos presentes nos diferentes materiais. Pode-se perceber que os catalisadores promovidos exibiram uma maior quantidade de sítios básicos frente ao material não-promovido (Cu/Zn), seguindo a seguinte ordem: Cu/Zn/Zr > Cu/Zn/Al > Cu/Zn/Nb > Cu/Zn/Ga > Cu/Zn/Cr > Cu/Zn. A diferença pode estar associada em parte ao fato de que os promotores atuam como espaçadores estruturais e facilitam a dispersão do cobre, levando à formação de partículas menores que criam maior contato interfacial com os demais óxidos. De acordo com Witoon et al. (2018) e Phongamwong et al. (2017) um aumento na dispersão de Cu e, consequentemente, no contato interfacial entre o Cu e os demais óxidos metálicos facilita a transferência de elétrons de uma espécie a outra, ou seja, favorece a formação de sítios básicos (Zecchina, Lamberti e Bordiga, 1998).

A cristalinidade dos materiais sintetizados foi investigada pela técnica de DRX. Os resultados destes estudos são mostrados na Figura 1. O difratograma do material Cu/Zn (Figura 1a) apresenta uma série de picos entre 2θ = 30 e 80°. Em particular, os picos de difração em 2θ = 35,5°, 38,7°, 48,7°, 53,5°, 58,3°, 61,5°, 66,2°, 69,0°, 72,4°, 75,0° correspondem respectivamente aos planos cristalinos (-111), (111), (202), (020), (202), (113), (022), (220), (311) e (222) do CuO (PDF 48-1548). Já os picos de difração em 2θ = 31,8°; 34,4°, 36,3°, 47,5°, 56,6°, 62,9°, 68,0°, 77,0° são atribuídos aos planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112) e (004) do ZnO (PDF 36-1451), respectivamente. As posições dos picos no difratograma da Figura 1a não estão deslocadas em relação às dos padrões de CuO e ZnO. Isso indica que não houve a formação de solução sólida entre o Cu e o Zn. Nos difratogramas dos materiais de Cu/Zn promovidos com Al, Cr, Ga, Nb ou Zr (mostrados nas Figuras 1b, 1c, 1d, 1e e 1f, respectivamente) são perceptíveis quase todos os picos referentes aos compostos CuO e ZnO, observados no difratograma do material de Cu/Zn (Figura 1a). Não foram observados picos de difração associados com Al_2O_3, Cr_2O_3, Ga_2O_3, Nb_2O_5 ou ZrO_2. Este resultado pode ser explicado pela formação de partículas de óxidos de

alumínio, crômio, gálio, nióbio ou zircônio amorfas ou, alternativamente, pequenas e altamente dispersas nesses materiais.

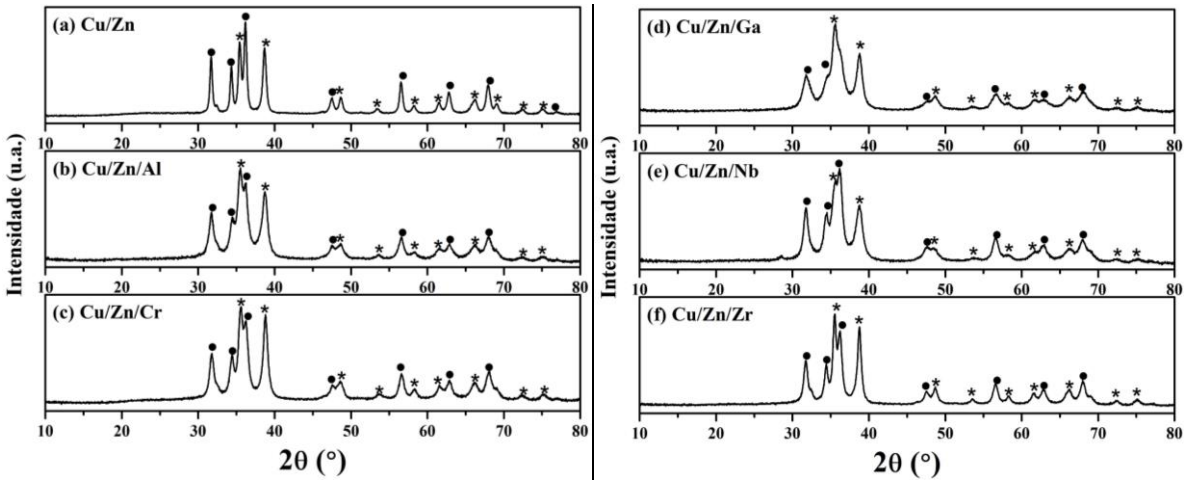


Figura 1. Difratogramas de raios X dos materiais: (a) Cu/Zn, (b) Cu/Zn/Al, (c) Cu/Zn/Cr, (d) Cu/Zn/Ga, (e) Cu/Zn/Nb e (f) Cu/Zn/Zr. Os picos destacados são relativos às fases (●) CuO e (*****) ZnO.

Para avaliar as características de redutibilidade dos materiais, em particular as temperaturas de redução dos óxidos componentes da fase ativa dos catalisadores, utilizou-se o método de redução a temperatura programada com hidrogênio. Nos perfis de redução dos materiais, apresentados na Figura 2, observam-se picos centrados em 300 °C, 200 °C, 260 °C, 200 °C, 195 °C e 205 °C para o Cu/Zn, Cu/Zn/Al, Cu/Zn/Cr, Cu/Zn/Ga, Cu/Zn/Nb e Cu/Zn/Zr, respectivamente. Eles correspondem à redução de Cu^{2+} a Cu^0 ($CuO + H_2 \rightarrow Cu^0 + H_2O$). De acordo com as caracterizações realizadas *in situ* apresentadas no trabalho de Kim et al. (2003), sob condições normais de fornecimento de hidrogênio o CuO se reduz diretamente a cobre metálico, sem a formação de um intermediário ou subóxido. As diferenças nos perfis de redução podem ser associadas às distintas interações entre os componentes dos materiais, que, por sua vez, dependem das características de dispersão, do tamanho do cristalito e do grau de cristalização do CuO (Figueiredo, Andrade e Fierro, 2010). Percebe-se nos termogramas da Figura 2 que na presença dos promotores os picos de redução do CuO estão centrados em menores temperaturas se comparados ao pico de redução do Cu/Zn, o que demonstra que os promotores investigados auxiliaram na redução do CuO.

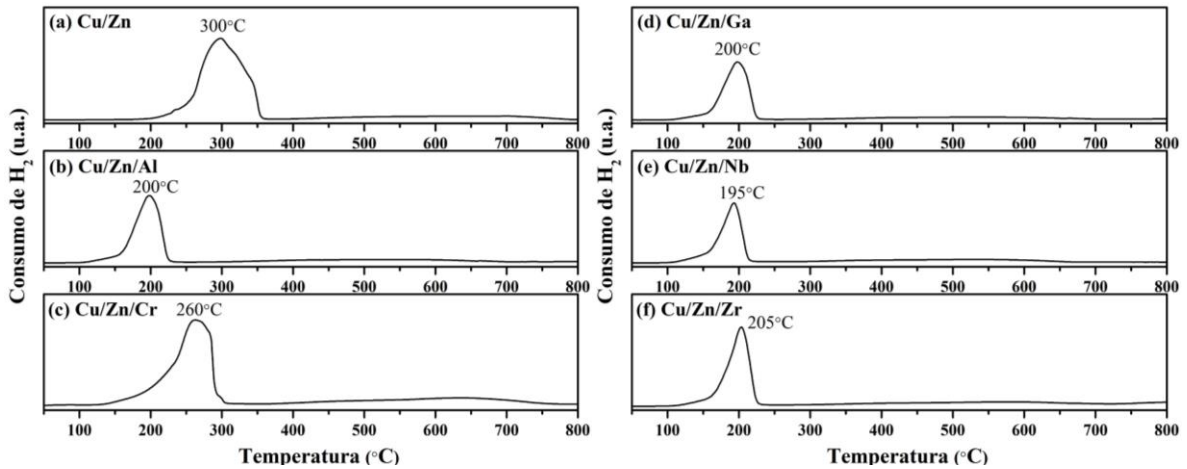


Figura 2. Termogramas de redução dos materiais: (a) Cu/Zn, (b) Cu/Zn/Al, (c) Cu/Zn/Cr, (d) Cu/Zn/Ga, (e) Cu/Zn/Nb e (f) Cu/Zn/Zr.

Realizaram-se ensaios catalíticos com os materiais Cu/Zn, Cu/Zn/Al, Cu/Zn/Cr, Cu/Zn/Ga, Cu/Zn/Nb e Cu/Zn/Zr e os correspondentes resultados encontram-se resumidamente descritos na Figura 3. Na Figura 3a, observa-se que os materiais promovidos foram mais ativos no intervalo de temperatura investigado se comparados ao Cu/Zn. Tem sido reportado que a área superficial específica possui um papel determinante na reatividade dos catalisadores à base de Cu para a síntese de metanol a partir da hidrogenação do CO_2 (Wang et al., 2019). Pelos dados apresentados na Tabela 1 percebe-se que a área específica dos catalisadores aumentou em até 5 vezes na presença dos promotores. Em geral, uma maior área superficial específica favorece a dispersão dos sítios ativos e, assim, aumenta a atividade do catalisador (Wang et al., 2019). Além disso, de acordo com a análise de DTP-CO_2, os catalisadores de Cu/Zn/Al, Cu/Zn/Cr, Cu/Zn/Ga, Cu/Zn/Nb e Cu/Zn/Zr apresentaram maiores quantidades de sítios básicos frente ao de Cu/Zn, o que pode ter favorecido a adsorção de CO_2. Uma vez adsorvidas, as moléculas de CO_2 podem ser hidrogenadas pelo H adsorvido na superfície da fase ativa (Cu^0), resultando, assim, em uma maior conversão.

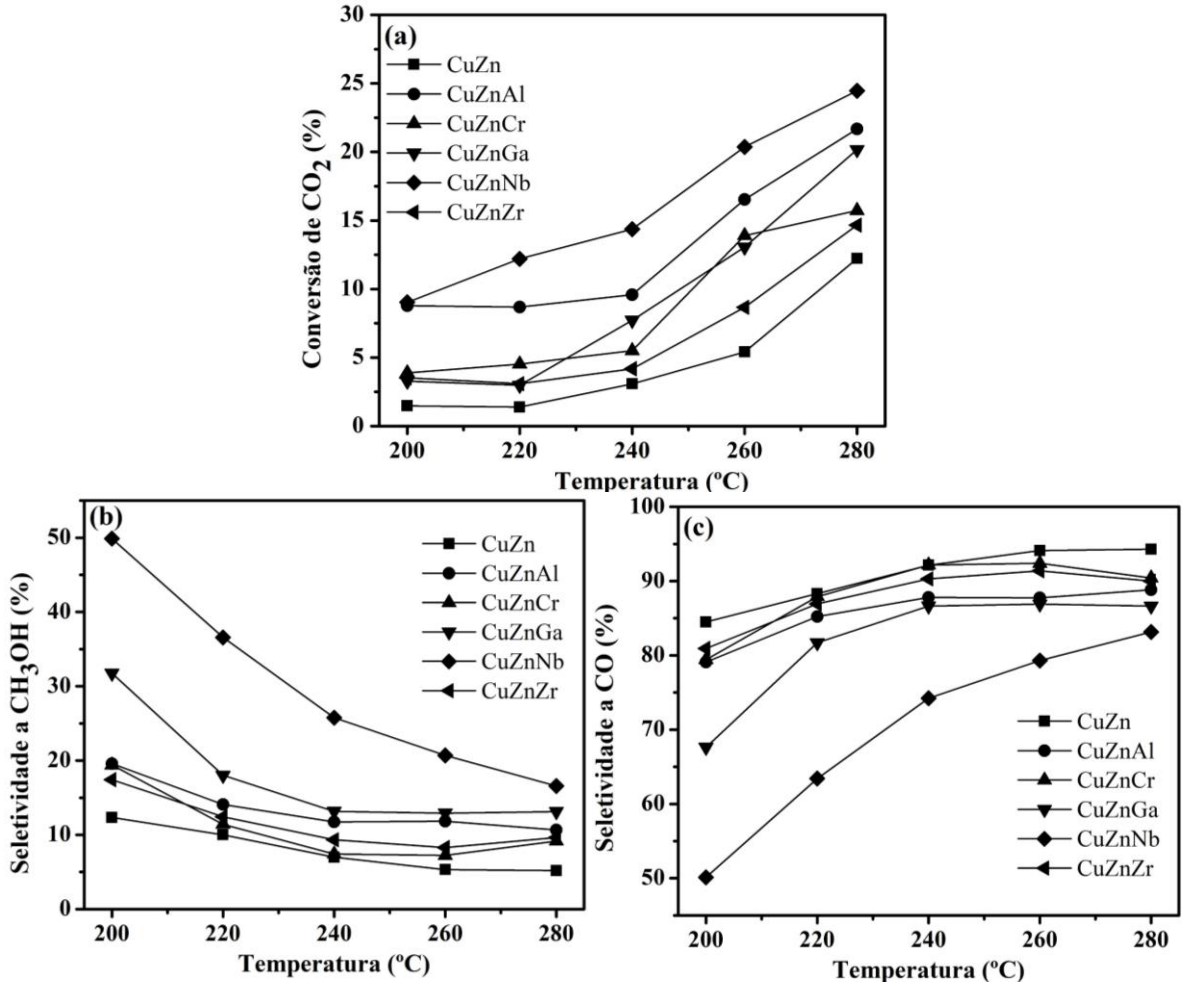


Figura 3. Desempenho catalítico dos materiais Cu/Zn, Cu/Zn/Al, Cu/Zn/Cr, Cu/Zn/Ga, Cu/Zn/Nb e Cu/Zn/Zr em termos de: (a) conversão do CO_2, (b) seletividade a CH_3OH e (c) seletividade a CO. Os ensaios foram realizados entre 200-280 °C a 30 bar, com alimentação de gases CO_2 (5 mL.min^{-1}) e H_2 (15 mL.min^{-1}).

Em relação à seletividade aos produtos formados, sob as condições reacionais empregadas neste trabalho não houve a formação de metano em nenhum dos catalisadores investigados. De forma geral, verifica-se na Figura 3b que a formação de metanol diminuiu em função do aumento da temperatura entre 200 e 280 °C. Um comportamento oposto foi

observado para a formação de CO (Figura 3c). A produção de CO está associada à ocorrência da reação reversa à de deslocamento gás-água, que compete com aquela de formação do metanol e sabe-se que em temperaturas relativamente mais altas a reação reversa à de deslocamento gás-água ($\Delta H^0_{298\,K} = +41{,}2\ kJ\ mol^{-1}$) é termodinamicamente favorecida frente àquela que leva à formação de metanol a partir do CO_2 e H_2 ($\Delta H^0_{298\,K} = -49{,}4\ kJ\ mol^{-1}$). Diversos estudos experimentais mostram uma redução significativa na seletividade a metanol quando a temperatura é aumentada em uma determinada faixa (Saito et al., 1996; Porosoff, Yan e Chen, 2016; Bukhtiyarova et al., 2017).

Nas Figuras 3b e 3c observa-se que os materiais promovidos foram mais seletivos à produção de metanol (Figura 3b) e menos seletivos à formação de CO (Figura 3c) que o material não promovido. À 200 °C, por exemplo, o Cu/Zn/Nb e o Cu/Zn/Ga apresentaram seletividade de 50% e 33% à formação de metanol frente a 12% para o material não promovido. Por outro lado, nesta mesma temperatura, esses materiais apresentaram seletividade à produção de CO de 50% (Cu/Zn/Nb) e 67% (Cu/Zn/Ga) frente a 88% para o material não promovido. Portanto, a adição de promotores ao material de Cu/Zn levou à intensificação da produção de metanol em relação a CO, embora o CO tenha sido o produto majoritário em toda a faixa de temperatura investigada. Tem sido reportado que materiais que levam à síntese de metanol pela rota do formiato, preferencialmente à rota que envolve a reação reversa a de deslocamento gás-água, são mais seletivos à produção desse álcool frente à formação de CO (Porosoff, Yan e Chen, 2016). Isso porque, na rota via a reação reversa a de deslocamento gás-água, o monóxido de carbono é formado como intermediário e pode se dessorver como produto, diminuindo, assim, a seletividade a metanol (Porosoff, Yan e Chen, 2016). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a formação de metanol pela reação de hidrogenação de CO_2 sobre os materiais à base de Cu-Zn pode ocorrer simultaneamente pelos dois mecanismos, mas com a adição dos promotores provavelmente a rota do formiato passa a ter maior importância. Investigações por espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier *in situ* poderiam fornecer informações complementares a respeito do mecanismo desta reação e serão consideradas em nossos trabalhos futuros. Além disso, outras técnicas de caracterização serão empregadas a fim de compreender como os diferentes promotores afetam a atividade e a seletividade do material à base de Cu/Zn na reação de hidrogenação do CO_2.

Conclusões Parciais

Na presença dos promotores houve um aumento nos valores das áreas específicas em relação ao material não promovido, que pode estar relacionado com a formação de partículas óxidas de menor tamanho. Os promotores também favoreceram a formação de sítios básicos nos catalisadores à base de Cu/Zn e a redução de óxidos de cobre. Pelos testes catalíticos verificou-se que a atividade dos materiais e a seletividade a metanol aumentaram especialmente com a adição de Al, Ga ou Nb ao Cu/Zn. De acordo com os resultados obtidos até então, os distintos comportamentos apresentados pelos materiais podem ser atribuídos às diferenças em suas áreas superficiais específicas, capacidades de adsorção de CO_2 e redutibilidade dos óxidos de cobre.

Referências Bibliográficas

Bukhtiyarova, M., Lunkenbein, T., Kähler, K., Schlögl, R., 2017. Methanol Synthesis from Industrial CO_2 Sources: A Contribution to Chemical Energy Conversion. Catal. Letters. 147, 1-12.

Cai, W., De la Piscina, P.R., Toyir, J., Homs, N., 2015. CO_2 hydrogenation to methanol over CuZnGa catalysts prepared using microwave-assisted methods. Catal. Today. 242, 193-199.

Figueiredo, R.T., Andrade, H.M.C., Fierro, J.L.G., 2010. Influence of the preparation methods and redox properties of $Cu/ZnO/Al_2O_3$ catalysts for the water gas shift reaction J. Mol, Catal. A Chem. 318, 15-20.

Kim, J.Y., Rodriguez, J.A., Hanson, J.C., Frenkel, A.I., Lee, P.L., 2003. Reduction of CuO and Cu_2O with H_2: H embedding and kinetic effects in the formation of suboxides. J. Am. Chem. Soc. 125, 10684-10692.

Li, S., Guo, H., Luo, C., Zhang, H., Xiong, L., Cheng, X., Ma, L., 2013. Effect of Iron Promoter on Structure and Performance of K/Cu–Zn Catalyst for Higher Alcohols Synthesis from CO_2 Hydrogenation. Catal. Letters. 143, 345-355.

Li, W., Wang, H., Jiang, X., Zhu, J., Liu, Z., Guo, X., Song, C., 2018. A short review of recent advances in CO_2 hydrogenation to hydrocarbons over heterogeneous catalysts. RSC Adv. 8, 7651-7669.

Phongamwong, T., Chantaprasertporn, U., Witoon, T., Numpilai, T., Poo-Arporn, Y., Limphirat, W., Donphai, W., Dittanet, P., Chareonpanich, M., Limtrakul, J., 2017. CO_2 hydrogenation to methanol over $CuO–ZnO–ZrO_2–SiO_2$ catalysts: effects of SiO_2 contents Chem. Eng. J. 316, 692-703.

Porosoff, M.D., Yan, B., Chen, J.G., 2016. Catalytic reduction of CO_2 by H_2 for synthesis of CO, methanol and hydrocarbons: Challenges and opportunities. Energy Environ. Sci. 9, 62-73.

Saeidi, S., Amin, N.A.S., Rahimpour, M.R., 2014. Hydrogenation of CO_2 to value-added products – a review and potential future developments. J. CO_2 Util. 5, 66-81.

Saito, M., Fujitani, T., Takeuchi, M., Watanabe, T., 1996. Development of copper/zinc oxide-based multicomponent catalysts for methanol synthesis from carbon dioxide and hydrogen. Appl. Catal. A Gen. 138, 311-318.

Wang, G., Mao, D., Guo, X., Yu, J., 2019. Methanol synthesis from CO_2 hydrogenation over $CuO-ZnO-ZrO_2$-MxOy catalysts (M=Cr, Mo and W) Int. J. Hydrog. Energy. 44, 4197-4207.

Wang, L., Yi, Y., Guo, H., Tu, X., 2017. Atmospheric Pressure and Room Temperature Synthesis of Methanol through Plasma-Catalytic Hydrogenation of CO_2. ACS Catal. 8, 90-100.

Witoon, T., Kachaban, N., Donphai, W., Kidkhunthod, P., Faungnawakij, K., Chareonpanich, M., J. Limtrakul, 2016. Tuning of catalytic CO_2 hydrogenation by changing composition of $CuO–ZnO–ZrO_2$ catalysts. Energy Convers. Manag. 118, 21-31.

Witoon, T., Numpilai, T., Phongamwong, T., Donphai, W., Boonyuen, C., Warakulwit, C., Chareonpanich, M., Limtrakul, J., 2018. Enhanced activity, selectivity and stability of a $CuO-ZnO-ZrO_2$ catalyst by adding graphene oxide for CO_2 hydrogenation to methanol. Chem. Eng. J. 334, 1781-1791.

Yan, S.R., Jun, K.W., Hong, J.S., Choi, M.J., Lee, K.W., 2000. Promotion effect of Fe–Cu catalyst for the hydrogenation of CO_2 and application to slurry reactor. Appl. Catal. A Gen. 194, 63-70.

Zecchina, A., Lamberti, C., Bordiga, S., 1998. Surface acidity and basicity: General concepts. Catal. Today. 41, 169-177.

HIDROGENAÇÃO DE CO_2 A METANOL EM CATALISADORES DE Cu E Pd MISTURADOS FISICAMENTE

Alisson H. M. da Silva [1]; Janaína F. Gomes [2]; José M. Assaf [2]

[1] Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar;
[2] Professor do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Resumo. *A síntese de metanol a partir de CO_2 surge como uma possibilidade tanto para minimizar os efeitos deletérios deste gás na atmosfera quanto para produzir um produto químico de elevado interesse industrial. Nesse sentido, neste trabalho misturas físicas de catalisadores à base de Cu e Pd são aplicadas à hidrogenação de CO_2 visando a intensificação da produção de metanol. Catalisadores de Cu/ZnO/ZrO_2 (CZZ), Cu/ZnO/Al_2O_3 (CZA), Pd/ZnO/ZrO_2 (PZZ), Pd/ZnO/Al_2O_3 (PZA) e a mistura física de Cu/ZnO/ZrO_2 com Pd/ZnO/ZrO_2 (CZZ+PZZ) foram preparados, caracterizados e aplicados à hidrogenação de CO_2 a metanol. Os catalisadores suportados em ZrO_2 foram mais ativos à conversão de CO_2 que aqueles suportados em Al_2O_3 e esta performance está associada ao caráter básico do ZrO_2. Na mistura física, o desempenho catalítico do CZZ+PZZ na hidrogenação de CO_2 foi superior em termos de conversão de CO_2 e rendimento a CO e metanol frente aos catalisadores CZZ e PZZ empregados separadamente. Este resultado pode estar relacionado com o balanço entre o número de sítios básicos e a capacidade de adsorção e spillover de H do material resultante da mistura de CZZ e PZZ.*

Introdução

Dióxido de carbono (CO_2) é largamente produzido a partir da queima indiscriminada de combustíveis, principalmente os de origem fóssil, e sua concentração na atmosfera tem aumentado cada vez mais ao longo dos anos. Por exemplo, a *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) mostrou que os níveis de CO_2 atmosférico ultrapassaram a marca de 400 ppm em 2015 e, em abril deste ano, os valores já alcançaram 413 ppm (NOAA, 2019). Como consequência do aumento nos níveis de CO_2, o efeito estufa tem se intensificado, o que agrava o aquecimento global, causando anomalias climáticas e o aumento do nível do mar.

Diversas estratégias tem sido aplicadas para reduzir as emissões de CO_2 e, assim, diminuir o aumento dos níveis deste gás na atmosfera, como, por exemplo, a substituição de combustíveis fósseis por fontes de energias renováveis, o aprimoramento da eficiência energética de automóveis e a captura de carbono a partir de fontes pontuais (Ma et al., 2017). Porém, uma outra estratégia que parece atender melhor aos interesses industriais seria considerar o CO_2 como fonte de carbono para a fabricação de produtos químicos, como, por exemplo, metanol. Este composto é de fundamental importância para a indústria química e petroquímica, pois pode ser aplicado como solvente e combustível e também pode ser utilizado como matéria-prima para a síntese de formaldeído, ácido acético, tereftalato de dimetila e clorometano, por exemplo.

Industrialmente, metanol é produzido por meio de catálise heterogênea a partir da mistura de gás de síntese ($CO+H_2$) com CO_2. Neste processo, em geral, emprega-se um catalisador de CuO/ZnO/Al_2O_3, temperaturas entre 250 °C e 300 °C e pressões entre 50 atm e 120 atm (Jadhav et al., 2014). Entretanto, quando se aplica CuO/ZnO/Al_2O_3 à hidrogenação de CO_2 na ausência de CO, a atividade catalítica e a seletividade a metanol caem drasticamente, sendo CO o produto principal da hidrogenação do CO_2. Esse comportamento catalítico ainda é tema de diversas discussões (Dang et al., 2019). Possivelmente, há duas rotas diferentes de formação de metanol a partir de CO_2 (Dang et al., 2019). A primeira delas consiste na síntese de metanol a partir do intermediário CO*, formado pela reação reversa de

deslocamento gás-água ($CO_2 + H_2 \leftrightarrow CO + H_2O$). Por essa rota, o CO* sofre hidrogenação formando o intemediário H_3CO*, e, então, o oxigênio dessa espécie é hidrogenado gerando um grupo funcional hidroxila e, consequentemente, o metanol (H_3COH). Entretanto, o CO*, formado pela hidrogenação do CO_2, pode se dessorver facilmente da superfície do catalisador como produto da reação e, consequentemente, a seletividade ao metanol é comprometida. A segunda rota envolve um intermediario formiato (HCOO*) e parece levar à formação seletiva de metanol a partir do CO_2. Nesse caso, o CO_2 é hidrogenado ao formiato, que, por sua vez, é hidrogenado formando os intermediarios $H_2CO^* + H_2O^*$. Por fim, o intermediário H_2CO* é hidrogenado a metanol. Uma vez que a formação de metanol pela rota do formiato não compreende o intermediário CO*, a seletividade a metanol é aumentada significativamente. O desafio, então, é encontrar materiais que possam levar à hidrogenação do CO_2 ao intermediário formiato, pois assim pode-se favorecer a formação seletiva ao metanol.

Nesse sentido, diversas estratégias têm sido propostas a fim de melhorar as propriedades catalíticas dos materiais tradicionalmente aplicados à síntese de metanol a partir de gás de síntese. Uma das estratégias consiste em substituir Al_2O_3 em catalisadores de $CuO/ZnO/Al_2O_3$ por óxidos metálicos com basicidade relativamente maior, já que o CO_2 é uma molécula de caráter ácido e sua adsorção sobre a superfície do catalisador poderia ser promovida na presença de maiores densidades de sítios ativos básicos. O ZrO_2 é considerado um óxido metálico apropriado porque, além de seu caráter predominantemente básico, ele também permite alta dispersão e estabilização da fase ativa, evitando a aglomeração indesejável das partículas metálicas suportadas, o que leva à perda de área superficial e, consequentemente, à perda de atividade catalítica (Ganesh, 2014).

Outra estratégia consiste na utilização de Pd como fase ativa do catalisador. Os materiais à base de Pd, embora mais caros, apresentam melhores desempenhos catalíticos em relação aos dos catalisadores à base de Cu e permitem a formação de metanol em condições de operação mais brandas (Díez-Ramírez et al., 2016). Em particular, foi mostrado que Pd/ZnO e Pd/ZnO/NF (NF = nanofibra de carbono) exibem alta seletividade (> 60%) em temperaturas inferiores a 150 ° C e sob pressão atmosférica (Díez-Ramírez et al., 2016). Embora a conversão seja relativamente baixa (< 5%), a possibilidade de produzir metanol sob pressão atmosférica representa um avanço significativo para o processo industrial, uma vez que a síntese desse álcool a partir de gás de síntese ocorre normalmente sob altas pressões. A utilização da fase bimetálica de Cu-Pd também parece uma estratégia promissora. Jiang e colaboradores (2015), por exemplo, sintetizaram catalisadores à base de Pd e Cu dispersos em SiO_2, com razões atômicas Pd/(Cu+Pd) que variaram entre 0,0 e 0,6, e aplicaram estes materiais, além de Cu/SiO_2 e Pd/SiO_2, à hidrogenação de CO_2 à temperatura de 300 °C sob 40 atm de pressão. A taxa de produção de metanol em $Pd\text{-}Cu/SiO_2$ (Pd/(Cu+Pd) = 0,34) foi de 0,31 µmol g_{cat}^{-1} s^{-1}, enquanto aquelas relativas aos catalisadores monometálicos de Cu/SiO_2 e Pd/SiO_2 foram de 0,05 e 0,09 µmol g_{cat}^{-1} s^{-1}, respectivamente. Assim, a taxa de produção de metanol no catalisador bimetálico foi aproximadamente duas vezes maior que a soma das taxas dos catalisadores monometálicos. Esse resultado revela uma melhora significativa no desempenho catalítico do material contendo simultaneamente Cu e Pd, atribuída à sinergia entre o Cu e o Pd.

Ainda que se tenha mostrado que os materiais bimetálicos de Cu-Pd são mais ativos para a formação de metanol em relação aos materiais monometálicos de Cu ou Pd, ainda não está claro como o Pd atua no mecanismo reacional para a melhora do desempenho catalítico. Uma estratégia simples que pode auxiliar na obtenção de evidências de como cada componente pode estar agindo no meio reacional envolve a aplicação de misturas físicas de diferentes catalisadores. Na mistura física, em princípio, as propriedades físicas e químicas de cada uma das frações são preservadas, enquanto que nas misturas químicas dos elementos pode haver mudanças na estrutura eletrônica dos metais, decorrentes, por exemplo, da formação de ligas entre os metais envolvidos na síntese dos materiais. Consequentemente, a

interação entre as moléculas reagentes e a fase ativa resultante da mistura química pode ser diferente com relação a das frações separadas, e isso pode ser inconveniente inicialmente.

Nesse sentido, no presente trabalho, catalisadores de $Cu/Zn/Al_2O_3$, $Cu/Zn/ZrO_2$, $Pd/Zn/Al_2O_3$ e $Pd/Zn/ZrO_2$ e a mistura física entre os catalisadores de Cu e Pd foram aplicados à hidrogenação de CO_2, visando a produção de metanol. Os materiais foram sintetizados por co-precipitação, caracterizados pelas técnicas de fluorescência de raios X (FRX), difração de raios X (DRX), redução à temperatura programada com hidrogênio (RTP-H_2) e dessorção de CO_2 à temperatura programada (DTP-CO_2) e aplicados à hidrogenação de CO_2.

Material e Métodos

Síntese dos catalisadores

Os catalisadores de $Cu/Zn/Al_2O_3$, $Cu/Zn/ZrO_2$, $Pd/Zn/Al_2O_3$ e $Pd/Zn/ZrO_2$ foram sintetizados pelo método tradicional de co-precipitação. Tipicamente, quantidades apropriadas dos precursores de Cu e/ou Pd, Zn, Al e/ou Zr foram dissolvidas em 25 mL de água deionizada e, então, a mistura foi gotejada lentamente em 500 mL de uma solução de $NaHCO_3$ (0,1 mol L^{-1}) a 60 °C. Com o auxílio de um pHmetro, a solução foi mantida em pH entre 7 e 8, gotejando-se uma solução de $NaHCO_3$ (1 mol.L^{-1}), quando necessário, e permaneceu nestas condições por 4 h. A seguir, o sólido formado foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 rpm por 7 min), lavado com etanol e seco em estufa a 80 °C por 24 h. Por fim, o sólido resultante foi calcinado por 4 h sob fluxo de 100 mL min^{-1} de ar sintético a 450 °C, com uma taxa de aquecimento de 2 °C min^{-1}. Obteve-se assim os catalisadores de $Cu/Zn/Al_2O_3$, $Cu/Zn/ZrO_2$, $Pd/Zn/Al_2O_3$ e $Pd/Zn/ZrO_2$. As massas dos precursores adicionadas nas sínteses dos materiais foram calculadas a fim de obter um catalisador com um percentual mássico de Cu/Zn/X = 40/30/30 e Pd/Zn/X = 5/30/65, onde X=Al ou Zr.

Caracterização dos catalisadores

Nas análises de FRX empregou-se um equipamento Energy Dispersive X-Ray Spectrometer, modelo Ray Ny EDX-720, da Shimadzu. As análises de DRX foram realizadas utilizando-se um difratômetro Rigaku Multiflex, pelo método do pó, através da incidência da radiação CuKα (λ = 1,5406 Å; 40 kV; 30 mA). O intervalo de ângulo 2θ investigado foi de 10° a 80°. A velocidade do goniômetro foi de 2° min^{-1}. Nos experimentos de RTP-H_2 e DTP-CO_2 usou-se um aparelho Micromeritics Autochem II 2920 Chemisorption Analyzer, equipado com um detector de condutividade térmica. Nas análises de RTP-H_2, aproximadamente 75 mg de amostra foram expostos a um fluxo gasoso (10% H_2/N_2) de 30 mL min^{-1}, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}, da temperatura ambiente até 800 °C para obtenção dos termogramas. Nos ensaios de DTP-CO_2, cerca de 75 mg foram aquecidos da temperatura ambiente até 300 °C, permanecendo por 1 h nesta temperatura sob fluxo de 20 mL min^{-1} de uma mistura de 10% H_2/N_2. Em seguida, a amostra foi resfriada sob fluxo de 30 mL min^{-1} de N_2 até 45 °C, e, então, foi realizada a quimissorção de CO_2 sob fluxo de 30 mL min^{-1}, por 20 min. Após a quimissorção, realizou-se purga com He por 1 h para a remoção do CO_2 fisissorvido. Na sequência, a temperatura foi aumentada até 800 °C, com rampa de 10 °C min^{-1}, sob fluxo de 30 mL min^{-1} de He.

Ensaios catalíticos

Os ensaios catalíticos de hidrogenação de CO_2 sobre os catalisadores à base de Cu e Pd foram realizados em um sistema de reação catalítica da *PID Eng & Tech*, equipado com um reator tubular de leito fixo de aço-inox. O reator foi alimentado com uma mistura de N_2 (20 mL min^{-1}), H_2 (30 mL min^{-1}) e CO_2 (10 mL min^{-1}). As reações de hidrogenação de CO_2 foram conduzidas entre 220 e 300 °C sob 20 bar, utilizando 200 mg de catalisador misturados

a 200 mg de carbeto de silício. Anteriormente ao início da reação, os materiais foram reduzidos *in situ*, a 300 °C, com a taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}, sob fluxo de H_2 (30 mL min^{-1}) por 1 h. Os gases efluentes do reator foram analisados em linha por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu modelo 2014, equipado com uma coluna capilar Supel-Q Plot e um detector de condutividade térmica.

Resultados e Discussão

As composições mássicas dos catalisadores em estudo, investigadas por FRX, são apresentadas na Tabela 1. Observa-se que não houve uma variação significativa entre as composições nominais e as composições experimentais obtidas por FRX. Análises de difratometria de raios-X também foram realizadas com estes materiais (resultados não apresentados nesse trabalho) a fim de investigar fases óxidas dos componentes presentes nos diferentes catalisadores. Por meio dessa técnica, foi possível identificar com clareza picos característicos de óxidos de Cu, Zn e Zr. Não se observou picos relativos ao óxido de Pd, o que sugere que este componente esteja altamente disperso na estrutura do catalisador. Também não se observou picos referentes a óxidos de Al nas amostras, o que indica que estes óxidos apresentam baixa cristalinidade. Este resultado é esperado, uma vez que a temperatura de 400 °C empregada na calcinação é consideravelmente baixa para formar óxidos de alumínio altamente cristalinos (Gulshan e Okada, 2013). De acordo com os resultados das análises de FRX e DRX, o método de co-precipitação foi adequado à síntese dos materiais compreendidos neste trabalho.

Tabela 1: Teores mássicos nominais e experimentais dos metais nos materiais.

Material	***Teor nominal (% m)***	***Teor por FRX (% m)***
Cu/Zn/Zr	40/30/30	43/31/26
Cu/Zn/Al	40/30/30	37/30/33
Pd/Zn/Zr	5/30/65	6/28/66
Pd/Zn/Al	5/30/65	4/29/67

A redutibilidade dos óxidos componentes dos catalisadores CZA e PZA foi avaliada pela técnica de RTP-H_2 e os resultados de consumo de hidrogênio em função do tempo e da temperatura no intervalo de ~35 °C até 300 °C são apresentados na Figura 1. Estes primeiros ensaios de redução foram realizados apenas com os catalisadores contendo o Al_2O_3. Essa escolha foi feita em função das características inertes deste óxido. Visto que o ZnO apresenta baixa redutibilidade e, além disso, que a redução de uma parcela de ZnO ocorre apenas em temperaturas acima de 500 °C (W. Wang et al., 2017), os picos evidenciados na Figura 1 devem-se apenas à redução de óxidos de Cu ou Pd. Especificamente, o pico de redução do Pd está centrado em torno de 150 °C, enquanto o de Cu está centrado em 300 °C. Este resultado mostra que os óxidos de Pd se reduzem mais facilmente que os de Cu. Em relação ao consumo de hidrogênio, tem-se que durante os 60 min de análise (com rampa de 10 °C min^{-1} e um fluxo de 2 mL min^{-1} de H_2), o catalisador de Cu consumiu cerca de 5,8 $mmol_{H2}$ g_{cat}^{-1}, enquanto que o catalisador de Pd consumiu cerca de 3,0 $mmol_{H2}$ g_{cat}^{-1}. É importar ressaltar que os porcentuais mássicos de Cu e Pd nos materiais CZA e PZA são ~40% e ~5%, respectivamente, e esses dados não estão normalizados pelo teor ou pelo número de sítios ativos de Cu e Pd nos materiais.

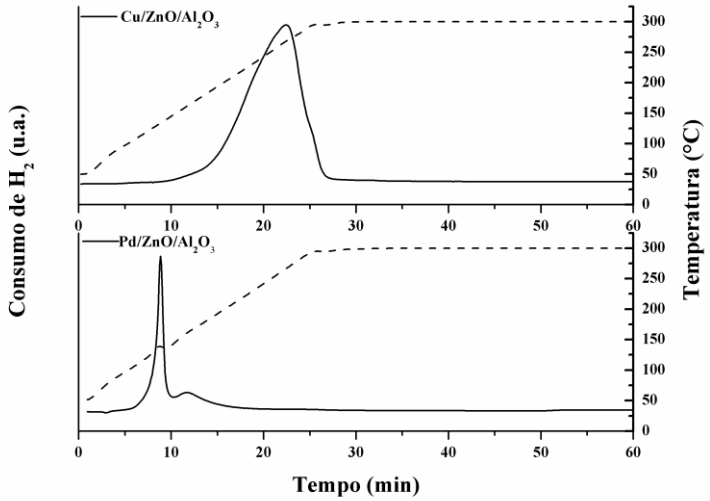


Figura 1. RTP-H_2 para os catalisadores $Cu/ZnO/Al_2O_3$ e $Pd/ZnO/Al_2O_3$.

A quantidade e a força dos sítios básicos dos materiais CZA, CZZ, PZA e PZZ foi investigada por meio de ensaios de dessorção à temperatura programada de CO_2 (DTP-CO_2). Os resultados destes estudos são mostrados na Figura 2 e na Tabela 2. A força dos sítios básicos está associada às temperaturas de dessorção do CO_2 dos materiais. Não há um consenso a respeito de quais são os limites de temperatura em que há a transição entre as forças dos sítios, mas, de maneira geral, os sítios básicos fracos são aqueles que dessorvem o CO_2 em temperaturas inferiores a 200 °C, os sítios básicos moderados são aqueles que dessorverm o CO_2 em temperaturas entre 200 e 400 °C e os sítios básicos fortes são aqueles que dessorvem o CO_2 em temperaturas superiores a 400 °C. Considerando esses intervalos de temperatura, para cada um dos materiais o número de sítios básicos fracos, moderados e fortes foi determinado pela deconvolução e integração dos picos evidenciados nas correspondentes faixas de temperatura e o número de sítios totais foi calculado somando-se o número de sítios básicos fracos, intermediários e fortes. De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, os materiais contendo o ZrO_2 foram os que apresentaram a maior quantidade de sítios básicos totais e, ainda, os que apresentaram a maior quantidade de sítios básicos fortes. Em particular, os números de sítios básicos totais do CZZ e do PZZ foram de 0,39 e 0,34 mmol g_{cat}^{-1}, respectivamente, enquanto os do CZA e do PZA foram de 0,25 e 0,23 mmol g_{cat}^{-1}, respectivamente. Já os números de sítios básicos fortes do CZZ e do PZZ foram de 0,35 e 0,24 mmol g_{cat}^{-1}, respectivamente, ao passo que os do CZA e do PZA foram de 0,25 e 0,10 mmol g_{cat}^{-1}, respectivamente. Por outro lado, os materiais de Pd foram os que apresentaram o maior número de sítios básicos fracos e moderados. A soma deles para CZZ, CZA, PZZ e PZA foi de 0,05, 0, 0,07 e 0,13 mmol g_{cat}^{-1}.

Tabela 2: Quantidade de CO_2 dessorvido dos sítios básicos fracos, moderados e fortes.

Dessorção de CO_2 (mmol g_{cat}^{-1})				
Material	Sítios fracos (<200 °C)	Sítios moderados (200 < T< 400 °C)	Sítios fortes (> 400 °C)	**Total**
Cu/Zn/Zr	0,04	-	0,35	**0,39**
Cu/Zn/Al	-	-	0,25	**0,25**
Pd/Zn/Zr	0,07	-	0,27	**0,34**
Pd/Zn/Al	0,07	0,06	0,10	**0,23**

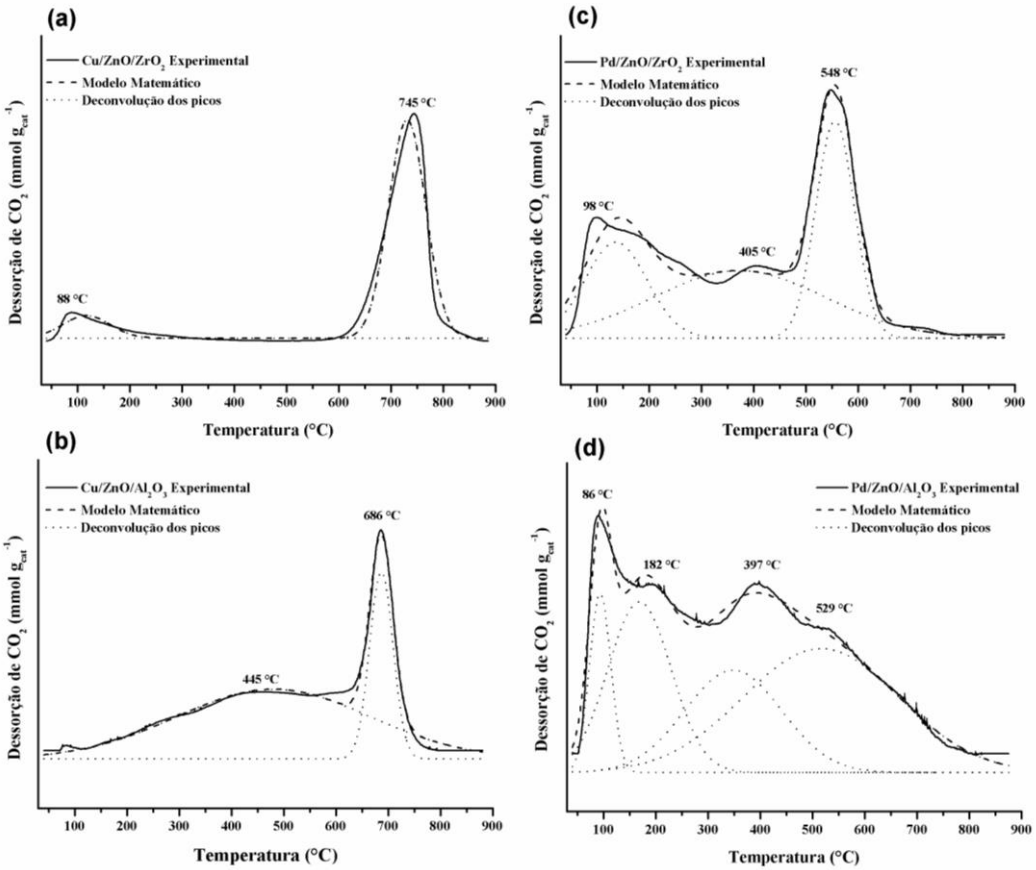


Figura 2. DTP-CO_2 dos catalisadores (a) $Cu/ZnO/ZrO_2$, (b) $Cu/ZnO/Al_2O_3$, (c) $Pd/ZnO/ZrO_2$ e (d) $Pd/ZnO/Al_2O_3$.

A maior quantidade de sítios básicos fortes nos catalisadores que possuem o ZrO_2 se deve à mobilidade de oxigênio deste óxido, que é relativamente maior que a do Al_2O_3 (Martin e Duprez, 1997). A mobilidade de oxigênio está relacionada com a força de ligação do oxigênio à rede do óxido. A energia de dissociação do Zr-O no ZrO_2 e do Al-O no Al_2O_3 são, respectivamente, 284 $kJ.mol^{-1}$ e 512 $kJ.mol^{-1}$ (Dean, 1999). Por isso, o oxigênio deixa a rede de ZrO_2 mais facilmente que a rede do Al_2O_3. Quando o oxigênio sai da rede dos óxidos, formam-se vacâncias de oxigênio, que contam com elétrons livres e, por isso, são sítios básicos fortes (Y. H. Wang et al., 2017).

Os resultados dos ensaios de hidrogenação de CO_2, que compreenderam os catalisadores CZZ, CZA, PZZ e PZA são mostrados na Figura 3. Nesta figura, o eixo y à esquerda corresponde à conversão de CO_2 (Fig. 3a e 3b) e o eixo y à direita corresponde ao rendimento a CO (Fig. 3a) ou a CH_3OH (Fig. 3b), em função da temperatura. Ressalta-se que, nas condições investigadas aqui, não se observou a formação de metano nos materiais em estudo. De maneira geral, a conversão de CO_2 e o rendimento a CO apresentaram uma tendência semelhante. A conversão de CO_2 variou entre 3,5% e 8% a 220 °C e aumentou gradualmente até 300 °C. Nesta temperatura, ela oscilou de 13,5% a 28,5%. É importante destacar que esses dados não estão normalizados pelo número de sítios ativos de Cu e Pd nos materiais. Os valores de rendimento a CO foram de 147 $g_{CO}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 314 $g_{CO}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 220 °C e de 529 $g_{CO}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 1154 $g_{CO}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 300 °C. Já em relação à formação de metanol, o comportamento do rendimento a metanol em função da temperatura foi diferente comparado aos da conversão e do rendimento a CO e, além disso, a variação entre os valores de rendimento a metanol de um material a outro foram mais evidentes. Em particular, o rendimento a metanol variou de 3 $g_{MetOH}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 98 $g_{MetOH}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 220 °C, aumentou gradativamente numa faixa entre 7 $g_{MetOH}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ e 125 $g_{MetOH}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 260 °C e, a partir

desta temperatura, diminui pouco a pouco, atingindo valores de 6 $g_{MetOH}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 64 $g_{MetOH}.h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ a 300 °C.

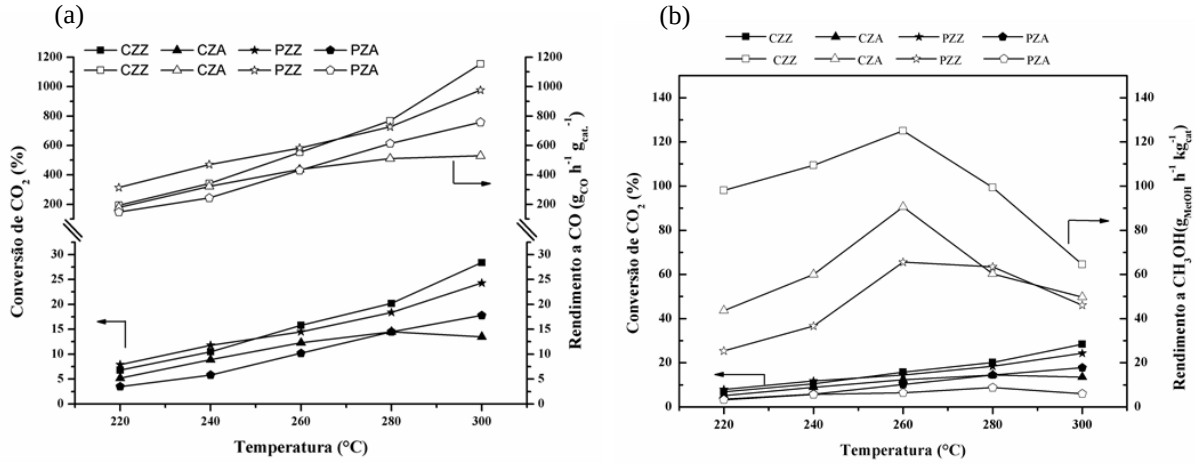


Figura 3. Conversão de CO_2 e rendimento a (a) CO e (b) CH_3OH em função da temperatura para os catalisadores CZZ (■), CZA(▲), PZZ (★) e PZA (⬟).

Em 260 °C, por exemplo, CZZ, PZZ, CZA e PZA apresentaram conversão de CO_2 de 15,8%, 14,5%, 12,4% e 10,2%, respectivamente. Nesta temperatura, CZZ e PZZ foram os materiais mais ativos à formação de CO, resultando em 555 e 582 $g_{CO.}h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$, respectivamente, contra 437 e 431 $g_{CO.}h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$ para os catalisadores CZA e PZA. Já para a formação de metanol, os materiais de cobre foram mais ativos que os de paládio. Os catalisadores CZZ e CZA renderam 125 e 90 $g_{MetOH.}h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$, respectivamente, enquanto que os catalisadores PZZ e PZA produziram 65 e 6 $g_{MetOH.}h^{-1}.g_{cat.}^{-1}$, respectivamente. Analisando-se o desempenho dos catalisadores suportados em um dado óxido, ZrO_2 ou Al_2O_3, nota-se que os materiais de Cu levaram a maiores conversões de CO_2 do que os de Pd. Em princípio, isso não era esperado, uma vez que os resultados de RTP-H_2 mostraram que o Pd interage com moléculas de H_2 mais facilmente que os materiais de Cu e essa característica poderia facilitar a conversão de CO_2. Como os porcentuais mássicos de Cu e de Pd nos catalisadores são distintos (~40% de Cu e ~5% de Pd), é possível que a taxa de rotação desses materiais (do inglês, turnover frequency – TOF), que corresponde à taxa de reação dividida pelo número de sítios ativos do metal, seja mais consistente com os resultados de RTP-H_2. Para confirmar esta hipótese, o número de sítios ativos dos materiais de Cu e Pd será investigado pelas técnicas de decomposição de N_2O e quimissorção de H_2, respectivamente. Este estudo será realizado em etapas futuras deste projeto. Por outro lado, quando se compara o desempenho dos materiais suportados em ZrO_2 com os daqueles suportados em Al_2O_3, é evidente que os catalisadores que possuem o ZrO_2 em sua composição levam a conversões de CO_2 mais elevadas que os catalisadores constituídos por Al_2O_3. Este resultado catalítico é condizente com os dados de DTP-CO_2 (Figura 2 e Tabela 2). CZZ e PZZ foram os materiais com a maior quantidade de sítios básicos totais (principalmente, sítios básicos fortes). Esta característica favorece a adsorção de um número maior de espécies CO_2, que, por sua vez, podem sofrer hidrogenação por meio de *spillover* de H adsorvido na superfície da fase ativa de Cu ou Pd, resultando, assim, em uma maior conversão de CO_2. Esses resultados mostram que a quantidade de sítios básicos é um parâmetro importante no que tange a atividade catalítica dos materiais à hidrogenação de CO_2. Além disso, a força dos sítios básicos parece influenciar na formação dos produtos reacionais, visto que os catalisadores PZZ e PZA, que apresentaram as maiores quantidades de sítios básicos fracos e moderados, foram os que resultaram nos menores rendimentos a metanol.

Na sequência dos nossos estudos catalíticos, os materiais CZZ e PZZ, que apresentaram as maiores conversões de CO_2 e as menores produções relativas de CO dentre os materiais de Cu e Pd investigados, de acordo com os resultados apresentados na Figura 3, foram misturados fisicamente na proporção mássica de CZZ/PZZ = 1 e a mistura foi aplicada à hidrogenação de CO_2. Os resultados destes estudos são apresentados na Figura 4. Pode-se observar que a performance catalítica do CZZ+PZZ foi melhor em relação àquela dos catalisadores CZZ e PZZ empregados separadamente. Em particular, a 260 °C a conversão de CO_2 foi de 20,5% para o CZZ+PZZ frente a 15,8 e 14,5% para CZZ e PZZ, respectivamente. O rendimento a CO e a metanol também aumentaram, passando de 555 $g_{CO}\ h^{-1}\ g_{cat}^{-1}$ (CZZ) e 582 $g_{CO}\ h^{-1}\ g_{cat}^{-1}$ (PZZ) a 758 $g_{CO}\ h^{-1}\ g_{cat}^{-1}$ (CZZ+PZZ) e de 125 $g_{MetOH}\ h^{-1}\ g_{cat}^{-1}$ (CZZ) e 65 $g_{MetOH}\ h^{-1}\ g_{cat}^{-1}$ (PZZ) a 142 $g_{MetOH}\ h^{-1}\ g_{cat}^{-1}$ (CZZ+PZZ). Para o catalisador CZZ+PZZ, a razão entre os rendimentos de CO e metanol foi de aproximadamente 5,3, valor um pouco superior em relação ao do CZZ (~4,5) e consideravelmente menor que aquele do PZZ (~9,0). Esses resultados mostram que a mistura física de CZZ+PZZ é capaz de promover uma melhora na conversão de CO_2, sem reduzir significativamente a seletividade a metanol. Essa melhora no desempenho catalítico do material contendo Cu e Pd pode ser explicada pela sinergia entre esses elementos. Burch e colaboradores (1990) mostraram que uma mistura física de Cu/SiO_2 e Zn/SiO_2 apresentou uma atividade catalítica muito maior à síntese de metanol do que os catalisadores separados. Por meio de experimentos com leitos separados, a transferência de intermediários da reação de um componente para o outro através da fase gasosa foi descartada. Por outro lado, resultados de análises de DTP-H_2 indicaram que a adsorção de hidrogênio sobre ZnO foi promovida pelo fenômeno de *spillover* de H do Cu para a superfície do ZnO. Então, os autores propuseram que a sinergia destes componentes na síntese de metanol deve-se à transferência de átomos de H da superfície do Cu para a superfície do ZnO, onde estes átomos de H ficam retidos nos defeitos superficiais do ZnO, formando um reservatório de H, que, por sua vez, promove a conversão de intermediários derivados da adsorção de CO_2 em outras espécies. Analogamente, a presença da fase ativa de Pd na mistura física CZZ+PZZ pode otimizar o fenômeno de *spillover* de H, favorecendo assim a conversão de CO_2 a produtos de reação.

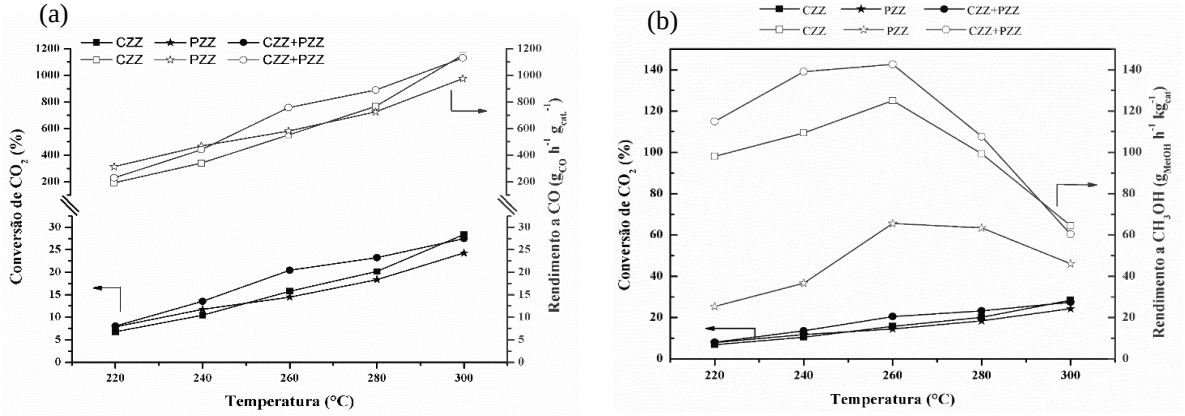


Figura 4. Conversão de CO_2 e rendimentos a (a) CO e (b) CH_3OH em função da temperatura referentes à hidrogenação de CO_2 nos catalisadores CZZ (■), PZZ (★) e CZZ + PZZ (●), empregando-se P = 20 bar, H_2/CO_2 = 3, fluxo total = 60 mL min^{-1} e m_{cat} = 0,2 g.

Segundo as caracterizações já realizadas, o CZZ apresenta um número de sítios básicos fortes maior que o PZZ, que exibe um número de sítios básicos fracos e moderados maior que o CZZ. Por outro lado, sabe-se que os catalisadores de Pd apresentam maior facilidade para adsorver H_2 e promover o fenômeno *spillover* de H em relação aos catalisadores de Cu. Outras diferenças em termos da composição e cristalinidade dos materiais também foram evidenciadas. É possível, portanto, que o efeito sinérgico se deva em parte ao balanço entre o número de sítios básicos e a capacidade de adsorção e *spillover* de H

do material resultante da mistura de CZZ e PZZ. Visando alcançar uma evolução no entendimento do comportamento catalítico da mistura física CZZ+PZZ à hidrogenação de CO_2, este material será caracterizado por RTP-H_2 e DTP-CO_2, além de outras técnicas, e os resultados destas investigações serão comparados com os dos catalisadores CZZ e PZZ. O emprego de técnicas *in-situ* poderia auxiliar na compreensão do mecanismo reacional sobre estes catalisadores. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier *in situ* (FTIR *in situ*), por exemplo, é uma técnica interessante e largamente aplicada em estudos sobre intermediários adsorvidos e produtos de reações. Em particular, ela tem sido utilizada para esclarecer o mecanismo reacional da hidrogenação de CO_2, segundo trabalhos reportados anteriormente (Fiordaliso et al., 2015; Millar et al., 1992; Shahul Hamid et al., 2018).

De maneira geral, os resultados da hidrogenação de CO_2 sobre os catalisadores à base de Cu e Pd confirmaram que esses materiais promovem a formação do grupo alcoólico. Ainda que, de acordo com a literatura, estes materiais não sejam os mais ativos à produção de metanol, eles são largamente estudados e nos servem como modelos para estudos mais complexos, como os que serão desenvolvidos na próxima etapa deste projeto. Estes estudos visam a formação de $C_{2+}OH$, que é o objetivo principal do trabalho de doutorado do aluno Alisson Henrique Marques da Silva. Assim, investigar detalhadamente as características dos materiais à base de Cu e Pd e relacioná-las aos seus respectivos comportamentos catalíticos na formação do metanol é um passo importante para entendermos o desempenho catalítico das misturas físicas com ferro na hidrogenação de CO_2 a $C_{2+}OH$.

Conclusões Parciais

Os catalisadores CZZ, CZA, PZZ e PZA foram sintetizados por co-precipitação, caracterizados por FRX, DRX, RTP-H_2 e DTP-CO_2 e aplicados à hidrogenação de CO_2. Os resultados de FRX e DRX revelaram que o método de síntese empregado neste trabalho foi adequado para a obtenção dos materiais propostos. Nos ensaios catalíticos, os materiais suportados em ZrO_2 mostraram-se mais ativos à conversão de CO_2 que aqueles suportados em Al_2O_3. Este desempenho é explicado pelo caráter básico do ZrO_2, em concordância com os resultados de DTP-CO_2. Para todos os materiais investigados, os produtos reacionais foram CO e metanol, embora o rendimento a CO tenha sido consideravelmente maior que o rendimento a metanol. PZZ e PZA foram os catalisadores que resultaram nos menores rendimentos a metanol. Esta performance pode estar relacionada com a presença de uma quantidade relativamente maior de sítios básicos fracos e moderados nestes materiais. A performance catalítica do CZZ+PZZ na hidrogenação de CO_2 foi superior em termos de conversão de CO_2 e rendimento a CO e metanol frente aos catalisadores CZZ e PZZ empregados separadamente. Este resultado pode estar associado ao balanço entre o número de sítios básicos e a capacidade de adsorção e *spillover* de H do material resultante da mistura de CZZ e PZZ.

Referências Bibliográficas

Burch, R., Golunski, S.E., Spencer, M.S., 1990. The role of copper and zinc oxide in methanol synthesis catalysts. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 86, 2683.

Dang, S., Yang, H., Gao, P., Wang, H., Li, X., Wei, W., Sun, Y., 2019. A review of research progress on heterogeneous catalysts for methanol synthesis from carbon dioxide hydrogenation. Catal. Today 330, 61–75.

Dean, J.A., 1999. Lange's Handboojk of Chemistry, fifiteenth. ed. McGRAW-HILL, New York, NY, USA.

Díez-Ramírez, J., Sánchez, P., Rodríguez-Gómez, A., Valverde, J.L., Dorado, F., 2016. Carbon Nanofiber-Based Palladium/Zinc Catalysts for the Hydrogenation of Carbon Dioxide to Methanol at Atmospheric Pressure. Ind. Eng. Chem. Res. 55, 3556–3567.

Fiordaliso, E.M., Sharafutdinov, I., Carvalho, H.W.P., Grunwaldt, J.-D., Hansen, T.W., Chorkendorff, I., Wagner, J.B., Damsgaard, C.D., 2015. Intermetallic GaPd 2 Nanoparticles on SiO 2 for Low-Pressure CO 2 Hydrogenation to Methanol: Catalytic Performance and In Situ Characterization. ACS Catal. 5, 5827–5836.

Ganesh, I., 2014. Conversion of carbon dioxide into methanol – a potential liquid fuel: Fundamental challenges and opportunities (a review). Renew. Sustain. Energy Rev. 31, 221–257.

Gulshan, F., Okada, K., 2013. Preparation of Alumina-Iron Oxide Compounds by Coprecipitation Method and Its Characterization. Am. J. Mater. Sci. Eng. 1, 6–11. https://doi.org/10.12691/ajmse-1-1-2

Jadhav, S.G., Vaidya, P.D., Bhanage, B.M., Joshi, J.B., 2014. Catalytic carbon dioxide hydrogenation to methanol: A review of recent studies. Chem. Eng. Res. Des. 92, 2557–2567.

Jiang, X., Koizumi, N., Guo, X., Song, C., 2015. Bimetallic Pd–Cu catalysts for selective CO2 hydrogenation to methanol. Appl. Catal. B Environ. 170–171, 173–185.

Ma, S., Sadakiyo, M., Heima, M., Luo, R., Haasch, R.T., Gold, J.I., Yamauchi, M., Kenis, P.J.A., 2017. Electroreduction of Carbon Dioxide to Hydrocarbons Using Bimetallic Cu–Pd Catalysts with Different Mixing Patterns. J. Am. Chem. Soc. 139, 47–50.

Martin, D., Duprez, D., 1997. Mobility of Surface Species on Oxides. 2. Isotopic Exchange of D 2 with H of SiO 2 , Al 2 O 3 , ZrO 2 , MgO, and CeO 2 : Activation by Rhodium and Effect of Chlorine. J. Phys. Chem. B 101, 4428–4436.

Millar, G.J., Rochester, C.H., Waugh, K.C., 1992. An in situ high pressure FT-IR study of CO2/H2 interactions with model ZnO/SiO2, Cu/SiO2 and Cu/ZnO/SiO2 methanol synthesis catalysts. Catal. Letters 14, 289–295.

NOAA, 2019. Global Analysis - Annual 2019 [WWW Document]. Natl. Ocean. Atmos. Adm. URL https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/ (accessed 5.20.19).

Shahul Hamid, M.Y., Triwahyono, S., Jalil, A.A., Che Jusoh, N.W., Izan, S.M., Tuan Abdullah, T.A., 2018. Tailoring the Properties of Metal Oxide Loaded/KCC-1 toward a Different Mechanism of CO 2 Methanation by in Situ IR and ESR. Inorg. Chem. 57, 5859–5869.

Wang, W., Li, X., Zhang, Y., Zhang, R., Ge, H., Bi, J., Tang, M., 2017. Strong metal–support interactions between Ni and ZnO particles and their effect on the methanation performance of Ni/ZnO. Catal. Sci. Technol. 7, 4413–4421.

Wang, Y.H., Gao, W.G., Wang, H., Zheng, Y.E., Na, W., Li, K.Z., 2017. Structure–activity relationships of Cu–ZrO 2 catalysts for CO 2 hydrogenation to methanol: interaction effects and reaction mechanism. RSC Adv. 7, 8709–8717.