

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARARAQUARA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM BIOTECNOLOGIA

DAIANA CAMILA DA SILVA

**Avaliação de efluentes citrícolas na geração de biohidrogênio e co-produtos de valor agregado
em reatores anaeróbios em batelada**

**ARARAQUARA
2022**

DAIANA CAMILA DA SILVA

Avaliação de efluentes citrícolas na geração de biohidrogênio e co-produtos de valor agregado
em reatores anaeróbios em batelada

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor e
Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer
Co-orientadora: Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires

Araraquara
2022

S586a

Silva, Daiana Camila da

Avaliação de efluentes citrícolas na geração de biohidrogênio e co-produtos de valor agregado em reatores anaeróbios em batelada / Daiana Camila da Silva. -- Araraquara, 2022

133 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Sandra Imaculada Maintinguer

Coorientadora: Lorena Oliveira Pires

1. Resíduos industriais. 2. Cultura mista (Microbiologia). 3. Clostridium. 4. Hidrogênio. 5. Bioetanol. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Avaliação de efluentes citrícolas na geração de biohidrogênio e co-produtos de valor agregado em reatores anaeróbios em batelada"

AUTORA: DAIANA CAMILA DA SILVA

ORIENTADORA: SANDRA IMACULADA MAINTINGUER

COORIENTADORA: LORENA OLIVEIRA PIRES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. SANDRA IMACULADA MAINTINGUER (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia - UNESP - Rio Claro



Profa. Dra. HELEN TREICHEL (Participação Virtual)
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS - Erechim



Profa. Dra. SILVANA DE QUIEROZ SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP - Ouro Preto



Prof. Dr. GUNTHER BRUCHA (Participação Virtual)
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - Poços de Caldas



Profa. Dra. VALERIA REGINATTO SPILLER (Participação Virtual)
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 25 de outubro de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Daiana Camila da Silva

Nome em citações bibliográficas: Silva, D. C.; Daiana Camila da Silva; D. C. Silva; SILVA, DAIANA CAMILA; SILVA, D. C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto de Pesquisa em Bioenergia- IPBEN – Câmpus Rio Claro/ SP. R. 10, 2527 - Estádio, Rio Claro - SP, 13500-230.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- **2013 – 2015**

Mestrado em Microbiologia Agropecuária

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV (Unesp – Jaboticabal/SP - Brasil)

Título: Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reatores anaeróbios horizontais de alta taxa seguidos de filtro biológico percolador.

Ano de obtenção: 2015

Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Rose Maria Duda

Bolsista da(o): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brasil.

Palavras-chaves: Arquéias Metanogênicas, Dejetos de Suínos, Digestão Anaeróbia, Hidrodinâmica dos Reatores Horizontais, Produção Metano, Remoção de DQO.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

- **2010 – 2013**

Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – IFSP- Campus Matão/SP – Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- **2021**

Curso: Anaerobic digestion wastewater treatment: towards suitable disposal, water reuse and nutrients recovery.

Carga horária: 5h.

Durante o VII Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – VII SIGERA, promovido pela Sociedade Brasileira dos Especialistas em Resíduos das Produções Agropecuária e Agroindustrial - Sbera.

- **2021**

Curso: Fotometria Nanocolor VIS II - desenvolvendo metodologias e operação do espectrofotômetro NANOCOLOR® VIS II.

Carga horária: 2h.

Carvalhaes

- **2020**

Curso: Princípios e Aplicações de Cromatografia Gasosa – Módulo I

Carga horária: 60 min.

Shimadzu - Brasil

- **2019**

Curso: Operação e manutenção básica no equipamento Cromatógrafo a Gás, modelo: GC-2014A e software GCsolution, marca Shimadzu.

Carga horária: 12 h.

Shimadzu – Brasil

- **2019**

Curso: Operação e manutenção básica no equipamento Cromatógrafo a Gás, composto por: GC-2014AT; SPL-2014 e software LabSolutions GC Lite, marca Shimadzu.

Carga horária: 16 h.

Shimadzu – Brasil

- **2019**

Curso: Biotecnologias para o Tratamento e Uso de Águas Residuárias. Ministrado pelo Prof. Dr. Albert Magrí Aloy - Universidade Politécnica da Catalunha.

Carga horária: 7 h.

Durante o VI Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – VI SIGERA, promovido pela Sociedade Brasileira dos Especialistas em Resíduos das Produções Agropecuária e Agroindustrial- Sbera.

- **2018**

Curso: “Molecular biology tools to understand the microbial processes involved in the production of bioenergy using wastes and wastewaters”.

Carga horária: 24h.

Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPEN) – Universidade Estadual Paulista (Unesp).
Rio Claro/SP - Brasil.

- **2018**

Curso: “Mendeley como ferramenta gerenciadora de referências no auxílio à escrita acadêmica”.

Carga horária: 4h.

Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPEN) – Universidade Estadual Paulista (Unesp).
Rio Claro/SP - Brasil.

- **2017**

Curso: Bases de Dados Clarivate Analytics.

Carga horária: 3h.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- **2017 - 2022**

Vínculo: Bolsista CAPES.

Carga horária: 40h semanais.

Outras informações: Doutorado em Biotecnologia – Instituto de Química (IQ) – Unesp – Araraquara/SP e Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) – Unesp – Rio Claro/SP.

Projeto: Obtenção de hidrogênio e biobutanol a partir de resíduos citrícolas

- **2018**

Estágio docência em Operações Unitárias I

Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Engenharia Química – Unesp Câmpus Araraquara.

Carga horária: 60 h.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulo de livro

Thais Silva Ribeiro de Almeida, **Daiana Camila da Silva**, Luan Vieira Adames, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. Estudo do Perfil Espacial de Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo Alimentados com Glicerol Bruto e Esgoto Sanitário. Livro Pesquisas e Inovações em Engenharias, Ciências Exatas e da Terra: Produções Científicas Multidisciplinares no Século XXI, vol 2. Instituto Scientia. DOI: 10.55232/10830014 ISBN: 978-65-85047-11-1. Capítulo 15 - DOI:10.55232/10830014.15, p. 172-191, 2022.

Artigos completos publicados

Mateus Boscaro; Danieli Fernanda Canaver Marin; **Daiana Camila da Silva**; Sandra Imaculada Maintinguer. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on microbial diversity and biogas production on anaerobic digestion of crude glycerol. Biomass and Bioenergy, v. 160, p.106439, 2022. DOI: 10.1016/j.biombioe.2022.106439

Silva, D.C.; Adames, L.V.; Pires, L.O., Marques, R. F. C.; Adorno, M. A. T.; Maintinguer, S. I. Aplicação de resíduo da agroindústria citrícola para a produção de hidrogênio utilizando culturas puras e mistas. Revista Matéria, v. 26, n. 02, 2021. ISSN 1517-7076.

Daiana Camila da Silva; Sandra Imaculada Maintinguer. Produção biológica de hidrogênio e etanol em reatores anaeróbios alimentados com efluente citrícolas. Revista Brasileira Multidisciplinar – ReBraM, (e-ISSN: 2527-2675), v.22, n.3, 2019.

MONTOYA, A. C. V.; MAZARELI, R. C. S.; **SILVA, D. C.**; LEITE, V. D.; OLIVEIRA, R. A. Dairy manure wastewater in serial UASB reactors for energy recovery and potential effluent reuse. Brazilian Journal of Chemical Engineering, V. 34, N. 04, p. 971 – 983, 2017 dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170344s20160297.

SILVA, D. C.; OLIVEIRA, R. A.; DUDA, R. M. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em reatores anaeróbios horizontais de alta taxa. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB (Online), v. 8, p. especial, 2016.

Artigos Submetidos

Daiana Camila da Silva, Caroline Varella Rodrigues, Ana Paula Jacobus, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. Hydrogen and Ethanol production with an anaerobic citrus consortium: Comparative Study with Clostridium species. Biomass and Bioenergy – 2022.

Rodrigues, C. V., Pachiega, R., **Silva, D. C.**, Maintinguer, S. I. Butanol production by biological process with pure and mixed cultures from agroindustrial wastes. Renewable Energy – 2022.

Lilian D. Moura Torquato; Lucas Moreira Silva; Beatriz Costa e Silva; Caroline V. Rodrigues; **Daiana Camila da Silva**; Sandra I. Maintinguer; Maria Valnice Boldrin Zanoni. The role of surface properties of bagasse biochars in electron transfer mediation during the bioconversion of glycerol into H₂ and high added-value products. Energy Conversion and Management – 2021.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. Valorização de resíduos agroindustriais da citricultura nacional para produção de hidrogênio. 2º Congresso Brasileiro do Hidrogênio em formato virtual. Associação Brasileira do Hidrogênio, 2021.

Daiana Camila da Silva, Luan Vieira Adames, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. Tratamento anaeróbico de resíduo da agroindústria de citricultura para a produção de H₂ utilizando culturas mistas e puras. 1º Congresso Brasileiro do Hidrogênio, Rio de Janeiro. Associação Brasileira do Hidrogênio, 2019.

Daiana Camila da Silva; Sandra Imaculada Maintinguer. Produção biológica de hidrogênio e etanol em reatores anaeróbios alimentados com efluente citrícolas. Revista Brasileira Multidisciplinar – ReBraM, (e-ISSN: 2527-2675), v.22, n.3, 2019.

Apresentação de trabalhos e/ou palestras

Oral/Simpósio Internacional

VII Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – VII SIGERA

Online

Período: 3 a 5 de Novembro de 2021

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires and Sandra Imaculada Maintinguer. Agroindustrial citrus wastewater as raw material to biohydrogen production by dark fermentation".

Oral/Congresso

2º Congresso Brasileiro do Hidrogênio

Online

Período: 8 e 9 de dezembro de 2021

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. Valorização de resíduos agroindustriais da citricultura nacional para produção de hidrogênio.

Oral/ Congresso

4ºENQBIOTEC - Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, USP Química, Ribeirão Preto.

Online

Período: 4 de agosto de 2021.

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. “Produção de H₂ e Etanol: estudo comparativo com culturas puras e consórcio anaeróbio citrícola”.

Oral/Simpósio

Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária – Siagro.

Local: Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP.

Período: 03 a 05 de dezembro de 2019

Silva, D. C., Pires, L. O., Maintinguer, S. I., “Tratamento biológico anaeróbio de água residuária citrícola para obtenção de biohidrogênio e bioetanol”.

Pôster/Congresso

1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio

Local: Rio de Janeiro – RJ.

Período: 07 e 08 de Novembro de 2019

Silva, D. C., Pires, L. O., Maintinguer, S. I., “Tratamento anaeróbio de resíduo da agroindústria de citricultura para a produção de H₂ utilizando culturas mistas e puras”

Pôster/Fórum

XI Fórum de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente – Desafios do Saneamento Ambiental

Local: Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara/SP.

Período: 07 de Junho de 2019

Silva, D. C., Pires, L. O., Maintinguer, S. I., “Produção Biológica de Hidrogênio e Etanol em Reatores Anaeróbios Alimentados com Efluente Citrícolas”.

Oral/Simpósio Internacional

VI Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – VI SIGERA

Local: Florianópolis-SC

Período: 07 a 10 de maio de 2019

Daiana Camila da Silva, Sandra Imaculada Maintinguer “Produção Biológica de H₂ Utilizando Resíduo Citrícola”.

Pôster/Workshop

II Workshop de Bioenergia

Local: IPBEN de Rio Claro

Período: 6 de dezembro de 2018

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. “Produção Biológica de H₂ utilizando resíduo citrícola”.

Pôster/Workshop

III Workshop de Bioenergia

Local: IPBEN de Rio Claro

Período: Dezembro de 2019

Daiana Camila da Silva, Luan Vieira Adames, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. Tratamento anaeróbio de resíduo da agroindústria de citricultura para a produção de H₂ utilizando culturas mistas e puras.

Oral/Workshop

IV Workshop de Bioenergia

Online

Período: Dezembro de 2020

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. “Valorização de resíduo citrícola: Produção de hidrogênio fermentativo a partir de culturas puras e mistas”.

Oral/Workshop

V Workshop de Bioenergia

Online

Período: Dezembro de 2021

Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer. “Agroindustrial citrus wastewater as raw material to bio hydrogen production by dark fermentation”.

Aula prática – IPBEN - Unesp – Rio Claro/SP

Curso de Extensão “Biocombustíveis e sustentabilidade energética”

Local: IPBEN – Laboratório Central.

Período: 07, 08, 09, 14, 15 e 16 de agosto de 2018, das 19:00 hs às 22:30 h

Determinação de DQO em resíduos orgânicos” no módulo “Biodigestão de resíduos orgânicos aplicada à geração de biocombustíveis”.

Aula prática – IPBEN - Unesp – Rio Claro/SP

Curso de Extensão “Biocombustíveis e sustentabilidade energética”

Local: IPBEN – Laboratório Central.

Período: 06, 07, 08, 13, 14 e 15 de agosto de 2019, das 19:00 hs às 22:30 h

Demonstração de técnicas físico-químicas e microbiológicas utilizadas no Laboratório de Biosistemas para Bioenergia, da aula “Biodigestão de resíduos orgânicos aplicados à geração de biocombustíveis”.

Prêmios concedidos

1º colocado - melhor apresentação oral: “Produção Biológica de H₂ Utilizando Resíduo Citrícola” durante o VI Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais–VI SIGERA, realizado nos dias 08 e 9 de maio de 2019, Florianópolis, Santa Catarina.

Melhor apresentação da Área 2: Bioenergia, a Daiana Camila da Silva, Lorena Oliveira Pires, Sandra Imaculada Maintinguer pelo trabalho “Produção de H₂ e Etanol: estudo comparativo com culturas puras e consórcio anaeróbio citrícola”. Apresentado no evento online" 4º ENQBIOTEC-Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial", no dia 6 de agosto de 2021.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. VII Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – VII SIGERA

Online

Período: 3 a 5 de Novembro de 2021

2. 2º Congresso Brasileiro do Hidrogênio

Online

Período: 8 e 9 de dezembro de 2021

3. 4ºENQBIOTEC - Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, USP Química, Ribeirão Preto.

Online

Período: 4 de agosto de 2021.

4. Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária – Siagro.

Local: Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP.

Período: 03 a 05 de dezembro de 2019

5. 1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio

Local: Rio de Janeiro – RJ.

Período: 07 e 08 de Novembro de 2019

6. XI Fórum de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente – Desafios do Saneamento Ambiental

Local: Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara/SP.

Período: 2019

7. VI Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – VI SIGERA

Local: Florianópolis-SC

Período: 07 a 10 de maio de 2019

8. II Workshop de Bioenergia

Local: IPBEN de Rio Claro

Período: 6 de dezembro de 2018

9. III Workshop de Bioenergia

Local: IPBEN de Rio Claro

Período: Dezembro de 2019

10. IV Workshop de Bioenergia

Online

Período: Dezembro de 2020

11. V Workshop de Bioenergia

Online

Período: Dezembro de 2021

CO-ORIENTAÇÕES

1. Discente Thaís Silva Ribeiro De Almeida - desenvolvimento de sua iniciação científica – bolsa PIBIC CNPq - IPBEN – Laboratório Central no período de Agosto a Dezembro de 2021, em seu projeto de pesquisa intitulado “Produção biológica de biogás a partir de misturas de resíduos orgânicos da fruticultura nacional”.
2. Discente Maria Vitoria Santiago - desenvolvimento de sua iniciação científica no IPBEN – Laboratório Central no período de janeiro a dezembro de 2019, em seu projeto de pesquisa intitulado “Aplicação de resíduos lácteos vencidos na obtenção de biogás em reatores anaeróbios em batelada”.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, pela dádiva da vida
Dedico aos meus pais, Edna e Jesus Camilo (*in memoriam*), e aos meus irmãos Luiz e Jesus,
que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.
Com carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

O meu maior agradecimento vai para Deus, pela dádiva da vida e que tornou tudo isso possível.

Agradeço sinceramente a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Sei que me esquecerei de tantos que neste período me ajudaram, mas saibam que todos estão em meu coração, obrigada!

Agradeço em especial:

À minha orientadora Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer, pela orientação competente e segura, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação ao nível de Doutorado, pelas contribuições, eterna paciência, convivência, incansável e insubstituível ajuda e pela confiança depositada.

À Professora Dra. Lorena Pires, pela co-orientação, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores doutores pela nobre participação na Banca de Defesa, disponibilidade e grandiosas contribuições a este estudo. Foi uma honra recebê-los.

As Professoras, Dra. Valéria Reginatto Spiller e Profa. Dra. Isabel Kimiko Sakamoto pela participação no Exame Geral de Qualificação e principalmente pelas valiosas contribuições a este estudo e imensa atenção dispensada.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia – IQ – UNESP - Araraquara, pelas disciplinas ministradas e pelo aprimoramento acadêmico.

Aos professores do Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN – Rio Claro: Michel Brienzo e Ana Paula Jacobus, pela ajuda e auxílios prestados.

Aos Funcionários do Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN – Rio Claro: Edna, Roberto, Lu e Maria, pela amizade, convivência, conselhos e auxílios prestados.

Aos amigos de Laboratório que conhecido durante o Doutorado e que vou levar pra vida: Danieli, Cintia, Thaís, Carol, Luan, Romário, Ivan, Mateus, Maria Vitória, Jandir, Renan e Ana, pela amizade, apoio, conselhos e pelos momentos de descontração. Sentirei muita saudade de vocês!

Aos amigos de apartamento: Luan e Cintia, pela convivência durante minha moradia em Rio Claro, pelo apoio, amizade e momentos de muita alegria.

Ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia – Unesp, Rio Claro, por conceder a infraestrutura e equipamentos necessários para as atividades científicas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, Edna e Jesus Camilo (*in Memoriam*), pelo incentivo, confiança que sempre depositaram em mim e por entender minhas dificuldades e anseios, obrigada!

Ao meu irmão caçula Jesus Jr. Pelo companheirismo, apoio e carinho.

Ao meu irmão Luiz, pelo carinho, amor, estímulo e apoio inestimável e por acreditar em mim sempre. A minha cunhada e amiga Jaqueline, pelo carinho, amizade e apoio e a benção de me presentear como tia, com a espera da minha sobrinha Cecília Amália.

E não poderia esquecer a minha pet, minha gatinha Scobinha que me acompanhou por 6 anos e me demonstrou carinho e amor, e que dormia na minha mesinha de estudo.

Muitíssimo obrigado a todos pela disposição e carinho para que este estudo fosse realizado.

Não me gloriarei em mim
A não ser na minha fraqueza
Sua graça me sustentou

Ela me basta, com certeza

Mas eu sei, que o Seu poder
Se aperfeiçoa na minha fraqueza
E quando eu, me cansar
A Sua força opera em mim

Eu sei, que a sua graça é pra mim
Eu sei, que a sua bondade não tem fim
Jesus

Quando eu não posso
Quando eu não consigo
Quando eu estou fraco
Quando estou caído

Você me levanta
E me encoraja
Você me dá forças
Você me resguarda

Eu sei, que a sua graça é pra mim
Eu sei, que a sua bondade não tem fim
Jesus

Música: Graça – André Aquino e Ton Molinari

" [...] Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito[...]
Martin Luter King

RESUMO

Os resíduos citrícolas são uma preocupação ambiental importante para as indústrias brasileiras, uma vez que o Brasil é o maior produtor e exportador de suco laranja para o mundo. Entre as possibilidades de valorização e reuso deste resíduo, o processo fermentativo é uma alternativa promissora na geração de energia renovável, como biogás, álcoois e ácidos graxos voláteis. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi utilizar o efluente bruto citrícola (EC) como substrato na geração de hidrogênio, ácidos graxos voláteis e álcoois a partir da obtenção de uma cultura mista autóctone de bactérias anaeróbias e compará-la com culturas puras de bactérias fermentativas e lodo granular metanogênico pré-tratado. A cultura mista foi submetida em ensaios com diferentes fontes de carbono, dos quais se destacaram crescimento microbiano e detecção de hidrogênio em glicose, sacarose e frutose. Posteriormente, a cultura mista e culturas puras fermentativas (inóculo 1-*Clostridium acetobutylicum* ATCC824 e inóculo 2-*Clostridium beijerinckii* ATCC10132) foram inoculadas em meios de cultivo específicos para *Clostridium* sp. (PYG, RCM, TYA, MITRA) em reatores anaeróbios em batelada, mantidos sob agitação e modo estático. Produções de etanol e ácidos graxos voláteis mais elevados foram verificadas nos reatores com os meios de cultivo RCM e PYG. A seguir foram realizados ensaios em reatores alimentados com glicose, com gerações de hidrogênio e butanol para as culturas puras (inóculos 1 e 2), além de gerações de etanol para a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3). Em reatores alimentados com efluente citrícola, foram obtidos 21,2; 15,7 e 37,6 mmol H₂ L⁻¹ com os inóculos 1; 2 e 3, respectivamente. Proporções crescentes foram adicionadas em reatores anaeróbios em batelada inoculados com culturas puras e cultura mista para produção de hidrogênio e co-produtos. Na condição 1 (0% EC+100% meio RCM), com os inóculos 1 e 2 obtiveram-se gerações de butanol e com o inóculo 3 foi verificada produção elevada de etanol. Na condição 2 (20% EC+80% meio RCM), as produções de hidrogênio foram de 11,9; 9,4 e 12,5 mmol H₂ L⁻¹ para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. Entretanto, na condição 3 (50%EC+50% meio RCM), a produção teve um declínio com valores de 4,1; 5,9 e 11,5 mmol H₂ L⁻¹ para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. Na condição 4 (80%EC+20% meio RCM) foram verificadas gerações de 12,4; 15,0 e 13,1 mmol H₂ L⁻¹ para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. Porém, na condição 5 (100% EC+0% meio RCM), ocorreu a baixa produção de hidrogênio com valores de até 4 mmol H₂ L⁻¹ no inóculo 3. Foi realizado teste com mistura das culturas puras (50% inóculo 1+50% inóculo 2), nos ensaios I (80% EC + inóculo 1 + inóculo 2) e ensaio II (100% EC + inóculo 1 + inóculo 2) e ensaio III (100% EC + lodo granular metanogênico pré-tratado). As produções de hidrogênio nos ensaios I, II e III foram 17,7; 16,5 e 7,6 mmol H₂L⁻¹, respectivamente, comprovando que a adição das culturas puras elevaram as produções de hidrogênio. A cultura mista apresentou abundâncias relativas de bactérias fermentativas distribuídas, principalmente, nos gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus* com abundâncias relativas de 13,65%, 20,44% e 10,61%, respectivamente provavelmente envolvidas nas gerações de hidrogênio e etanol verificadas. A eficiência da digestão anaeróbia no tratamento de efluentes agroindustriais como da laranja foi comprovada no reaproveitamento e na geração de biocombustíveis.

Palavras-chave: Efluente citrícola; Cultura mista; *Clostridium* sp.; Hidrogênio; Co-produtos.

ABSTRACT

Citrus residues are an important environmental concern for Brazilian industries, since Brazil is the largest producer and exporter of orange juice to the world. Among the possibilities of recovery and reuse of this residue, the fermentation process is a promising alternative in the generation of renewable energy, such as biogas, alcohols and volatile fatty acids. In this sense, the objective of this study was to use citrus effluent (EC) as a substrate to generate hydrogen, volatile fatty acids and alcohols from an autochthonous mixed culture of anaerobic bacteria and compare it with pure cultures of fermentative bacteria and pre-treated methanogenic granular sludge. The mixed culture was submitted to assays with different carbon sources, of which microbial growth and detection of hydrogen in glucose, sucrose and fructose stood out. Subsequently, the mixed culture and pure fermentative cultures (inoculum 1-*Clostridium acetobutylicum* ATCC824 and inoculum 2-*Clostridium beijerinckii* ATCC10132) were inoculated in specific culture media for *Clostridium* sp. (PYG, RCM, TYA, MITRA) in anaerobic batch reactors, kept under agitation and static mode. Higher productions of ethanol and volatile fatty acids were verified in the reactors with the RCM and PYG culture media. Subsequently, assays were carried out in reactors fed with glucose, with generations of hydrogen and butanol for pure cultures (inocula 1 and 2), in addition to generations of ethanol for the mixed culture of anaerobic bacteria (inoculum 3). In reactors fed with citrus effluent, 21.2 were obtained; 15.7 and; 37.6 mmol H₂ L⁻¹ with inocula 1; 2 and 3, respectively. Increasing proportions were added in batch anaerobic reactors inoculated with pure cultures and mixed cultures to produce hydrogen and co-products. In condition 1 (0% EC+100% RCM media), with inoculas 1 and 2, butanol generations were obtained and with inoculum 3, a high production of ethanol was observed. In condition 2 (20% EC+80% RCM media), the hydrogen yields were 11.9; 9.4 and 12.5 mmol H₂ L⁻¹ for inocula 1, 2 and 3, respectively. However, in condition 3 (50%EC+50% RCM media), the production had a decline with values of 4.1; 5.9 and 11.5 mmol H₂ L⁻¹ for inocula 1, 2 and 3, respectively. In condition 4 (80%EC+20% RCM media) generations of 12.4; 15.0 and 13.1 mmol H₂ L⁻¹ for inocula 1, 2 and 3, respectively. However, in condition 5 (100% EC+0% RCM media), there was a low production of hydrogen with values of up to 4 mmol H₂ L⁻¹ in inoculum 3. A test was performed with a mixture of pure cultures (50% inoculum 1+ 50% inoculum 2), in assays I (80% EC + inoculum 1 + inoculum 2) and assay II (100% EC + inoculum 1 + inoculum 2) and assay III (100% EC + pre-treated methanogenic granular sludge). Hydrogen yields in tests I, II and III were 17.7; 16.5 and 7.6 mmol H₂ L⁻¹, respectively, proving that the addition of pure cultures increased hydrogen production. The mixed culture showed relative abundances of fermentative bacteria distributed mainly in the genera *Clostridium*, *Bacillus* and *Lactobacillus* with relative abundances of 13.65%, 20.44% and 10.61%, respectively, probably involved in the hydrogen and ethanol generations verified. The efficiency of anaerobic digestion in the treatment of agro-industrial effluents such as oranges has been proven in the reuse and generation of biofuels.

Keywords: Citrus effluent; Mixed culture; *Clostridium*; Hydrogen; Co-products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processamento industrial de citros	35
Figura 2. Representação esquemática das vias metabólicas envolvidas na oxidação da glicose	40
Figura 3. Fluxograma geral do esquema operacional.	50
Figura 4. Fluxograma experimental: Etapas 1, 2 e 3.	51
Figura 5. Fluxograma experimental: Etapas 4 e 5.	52
Figura 6. Fluxograma experimental: Etapa 6.	52
Figura 7. Fluxograma experimental: Etapas 7	53
Figura 8. Sistema de deslocamento de volume para medidas de biogás gerado durante operação dos reatores	60
Figura 9. Crescimento em meio de cultivo genérico, após 48 horas.	69
Figura 10. Microscopia do inóculo isolado do efluente bruto citrícola. Ampliação de 1000X: Setas indicam morfologias de bacilos Gram+.	69
Figura 11. Quantificação de bactérias anaeróbias fermentativas por <i>pour plate</i> da cultura mista de bactérias anaeróbias	70
Figura 12. Classificação taxonômica da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) com respectivas abundâncias relativas (%)	71
Figura 13. Operação de reatores anaeróbios em batelada preenchidos com meios de cultivo RCM, TYA, MITRA e PYG com os inóculos 1, 2 e 3, operados sob modo estático e a 100 rpm: (a) Crescimento bacteriano e (b) Consumo de glicose.	74
Figura 14. Crescimento dos inóculos (1) <i>C. acetobutylicum</i> ; (2) <i>C. beijerinckii</i> e (3) cultura mista de bactérias anaeróbias em glicose.	79
Figura 15. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (■) e 2 (●) em reatores anaeróbios alimentados com glicose.	80
Figura 16. Vias metabólicas envolvidas na produção de hidrogênio e butanol a partir de resíduos lignocelulósicos por biomassa fermentativa	85
Figura 17. (A) Fluxograma das vias metabólicas da fermentação ABE por <i>Clostridium</i> , fase acidogênese (em rosa) e fase solventogênese (em verde). Os quadros tracejados de azul destacam a via metabólica ocorrida neste estudo; (B) Produtos gerados no ensaio 3 com as culturas puras e a cultura mista de bactérias anaeróbias.	86

Figura 18. Crescimento dos inóculos (1) <i>C. acetobutylicum</i> ; (2) <i>C. beijerinckii</i> e (3) cultura mista de bactérias anaeróbias, em efluente citrícola.	87
Figura 19. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada da geração de hidrogênio para os inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados com efluente citrícola.	88
Figura 20. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com resíduo citrícola, para inóculo 1, 2 e 3.	89
Figura 21. Reatores anaeróbios em batelada alimentados com glicose como fonte de carbono: crescimento celular, pH, remoção de glicose, produção de ácido acético, butanol e etanol com (A) Inóculo 1, (B) Inóculo 2 e (C) Inóculo 3.	93
Figura 22. Reatores anaeróbios em batelada alimentados com efluente bruto citrícola como fonte de carbono: crescimento celular, pH, remoção de glicose, produção de ácido acético, butanol e etanol com (A) Inóculo 1, (B) Inóculo 2 e (C) Inóculo 3.	94
Figura 23. Comparativo da Taxonomia em filo no início da operação (Amostra 3) e no final da operação (Amostra 4).	95
Figura 24. Vias metabólicas possíveis durante a fermentação da glicose	97
Figura 25. Diferença das vias metabólicas nas etapas 4 e 5 durante a fermentação da glicose e do efluente citrícola	97
Figura 26. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com meio de cultivo RCM (Condição 1) e Inóculo 1.	101
Figura 27. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com meio de cultivo RCM (Condição 1), para Inóculo 2.	101
Figura 28. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com meio de cultivo RCM (Condição 1), para Inóculo 3.	102
Figura 29. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados na condição 1 de 100% com Meio de cultivo RCM (Reinforced Clostridial Medium)	103
Figura 30. Abundância Relativa de gêneros <i>Clostridium</i> e <i>Lactobacillus</i> da Amostra 5	104
Figura 31. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados na condição 2 de 80% com Meio RCM (Reinforced Clostridial Medium) + 20% efluente citrícola	105
Figura 32. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 80% meio de cultivo RCM + 20% efluente bruto citrícola (Condição 2).	107
Figura 33. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios operados para a condição 3 (50% com Meio de cultivo RCM + 50% efluente citrícola)	108

- Figura 34. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 50% meio de cultivo RCM + 50% efluente bruto citrícola para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. 109
- Figura 35. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios operados na condição 4 (20% com Meio de cultivo RCM + 80% efluente citrícola) 110
- Figura 36. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 20% meio de cultivo RCM e 80% efluente bruto citrícola (Condição 4), para os inóculos 1, 2 e 3. 112
- Figura 37. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados operados na condição 5 (100% Efluente citrícola) 114
- Figura 38. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 100% efluente bruto citrícola, para os inóculos 1, 2 e 3. 115
- Figura 39. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos do ensaio I (80% EC + *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*); ensaio II (100% EC + *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*) e ensaio III (100% EC + lodo granular pré-tratado) 117
- Figura 40. Abundâncias relativas (%) das taxonomias de Filo das amostras identificadas: ensaio I (80% EC + C. a + C. b); ensaio II (100% EC + C. a + C. b) e: ensaio III (100% EC + lodo granular pré-tratado). 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição meios de cultivos específicos para o Gênero <i>Clostridium</i> sp.	56
Tabela 2. Condições operacionais dos reatores anaeróbios em batelada	58
Tabela 3. Meios de cultivo específicos para a quantificação de bactérias anaeróbias fermentativas.	63
Tabela 4. Caracterização nutricional e geração de H ₂ com cultura mista de bactérias anaeróbias	74
Tabela 5. Produtos intermediários gerados no final da operação de reatores anaeróbios sob modo estático com os inóculos 1, 2, 3 e meios de cultivo: RCM; PYG; TYA; MITRA.	76
Tabela 6. Produtos intermediários gerados no final da operação de reatores anaeróbios a 100 rpm com os inóculos 1, 2, 3 e meios de cultivo: RCM; PYG; TYA; MITRA	77
Tabela 7. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores operados com glicose para os inóculos 1, 2 e 3.	81
Tabela 8. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores com alimentados efluente citrícola nos inóculos 1, 2 e 3.	90
Tabela 9. Principais resultados durante a operação de reatores anaeróbios nas etapas 4 e 5 com os inóculos 1, 2 e 3.	91
Tabela 10. Consumos de carboidratos totais em reatores anaeróbios em batelada em misturas de meio de cultivo RCM (RCM) e Efluente citrícola (EC).	98
Tabela 11. Variações de pH no final da operação em reatores anaeróbios em batelada em misturas de meio de cultivo RCM (RCM) e Efluente citrícola (EC).	99
Tabela 12. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores na condição 1 (100% RCM).	100
Tabela 13. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores na condição 2 (80% meio RCM + 20% Efluente bruto citrícola).	106
Tabela 14. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 50% meio de cultivo RCM + 50% Efluente bruto citrícola.	109
Tabela 15. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 20% meio de cultivo RCM e 80% efluente bruto citrícola, para os inóculos 1, 2 e 3.	111
Tabela 16. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 100% efluente bruto citrícola, para os inóculos 1, 2 e 3.	115

Tabela 17. Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições de alimentação e inóculos. Ensaio: (I) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (80% efluente bruto citrícola; (II) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (100% efluente bruto citrícola) e (III) lodo anaeróbio granular de um reator UASB tratado termicamente. 117

Tabela 18. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com efluente bruto citrícola, para os inóculos dos Ensaio: (I) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (80% efluente bruto citrícola; (II) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (100% efluente bruto citrícola) e (III) lodo anaeróbio granular de um reator UASB tratado termicamente. 119

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABE	Acetona-Butanol-Etanol
CEMPEQC	Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados
DHL	Desoxycholate hydrogen sulfide lactose
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EC	Efluente citrícola
FID	Detector de Ionização por Chama
GC	Cromatografia Gasosa
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama
IPBEN	Instituto de Pesquisa em Bioenergia
IQ	Instituto de Química
LBS	Lactobacilli selective
L-cis	L-cisteína
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NBGT	Neomycin brilliant green taurocholate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NN	Neomycin nagler
OTU	Operational Taxonomic Unit
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PYG	Peptone, Yeast Extract e Glucose
RCM	Reinforced Clostridial Media
RNA	ácido ribonucleico
RNA _r	RNA ribossômico
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SRA	Sequence Read Archive
STV	Sólidos Totais Voláteis
TATAC	Triphenyl tetrazolium choline acridine orange thallous sulfate aesculin crystal violet
TCD	Detector de Condutividade Térmica

TYA	Tryptone, Yeast Extract, Acetate Medium
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VS	Veillonella selective

LISTA DE SIMBOLOS

CH ₄	Gás metano
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂	Gás hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
L	Litros
M	mol L ⁻¹
mL	Mililitros
mm	Milímetro
N ₂	Gás nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ ⁺	Amônio
P	Potencial de produção de biogás (mmol L ⁻¹ cultura)
Rm	Taxa máxima de produção de biogás (mmol L ⁻¹ cultura. h)
Rpm	Rotações por minuto
λ	Tempo de início da produção do biogás (h)
<i>e</i>	2,718281828
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	Resíduos oriundos do processamento industrial da laranja	31
2.2	Composição do resíduo de laranja	33
2.3	Alternativas para o reaproveitamento dos resíduos de laranja	35
2.4	Biocombustíveis.....	38
2.4.1	Produção de hidrogênio por via biológica.....	38
2.4.2	Fatores que influenciam a produção biológica de hidrogênio	42
2.4.3	Produção fermentativa de etanol.....	43
2.4.4	Butanol.....	44
2.4.5	Os desafios para a fermentação de butanol.....	46
2.5	Microrganismos envolvidos na fermentação de substratos orgânicos	47
3	OBJETIVOS.....	48
3.1	Geral.....	48
3.2	Específicos	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Esquema operacional.....	50
4.2	Fontes de Carbono.....	53
4.3.	Fontes de inóculo	53
4.4.	Etapas Experimentais	54
4.4.1	Etapa 1 - Obtenção da cultura mista de bactérias anaeróbias	54
4.4.2	Etapa 2: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias em reatores alimentados com diferentes fontes de carbono	55
4.4.3	Etapa 3: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com diferentes meios de cultivo sob modo estático e a 100 rpm.....	55
4.4.4	Etapa 4: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras na geração de hidrogênio em reatores alimentados com meio de cultivo contendo glicose	56
4.4.5	Etapa 5: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas na geração de hidrogênio em reatores alimentados com meio de cultivo contendo efluente bruto citrícola	57
4.4.6	Etapa 6: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas na geração de hidrogênio, em reatores alimentados com diferentes proporções de meio de cultivo e efluente bruto citrícola.....	57
4.4.7	Etapa 7 – Avaliação do lodo granular anaeróbio pré-tratado termicamente e a mistura das culturas puras fermentativas, em reatores alimentados com efluente citrícola	58

4.5	Análises Físico-químicas e cromatográficas.....	59
4.6	Análises microbiológicas.....	62
4.6.1	Microscopia.....	62
4.6.2	Quantificação de bactérias fermentativas por Técnica de <i>Pour Plate</i>	62
4.6.3	Análises de sequenciamento do gene rRNA 16S	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	Etapa 1	68
5.1.1	Caracterização do efluente citrícola	68
5.1.2	Obtenção e caracterização microbiológica da cultura mista de bactérias anaeróbias ..	68
5.2	Etapa 2: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias em reatores alimentados com diferentes fontes de carbono	73
5.3	Etapa 3: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com diferentes meios de cultivo sob modo estático e agitação..	74
5.4	Etapa 4: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com meio de cultivo contendo glicose	78
5.5	Etapa 5: Avaliação das culturas puras (inóculos 1 e 2) e da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) em reatores alimentados com meio de cultivo contendo efluente citrícola	87
5.6	Etapa 6: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com diferentes proporções de meio de cultivo e efluente bruto citrícola	98
5.7	Etapa7- Avaliação do lodo granular mesofílico pré-tratado termicamente e a mistura das culturas puras fermentativas, em reatores alimentados com efluente bruto citrícola.	116
5.7.1	Identificação biomolecular: etapa 7 (ensaio I (80% EC + <i>C. acetobutylicum</i> + <i>C. beijerinckii</i>); ensaio II (100% EC + <i>C. acetobutylicum</i> + <i>C. beijerinckii</i>) e: ensaio III (100% EC + lodo granular pré-tratado) (Amostras 7, 8 e 9).....	120
6.	CONCLUSÕES	122
7.	SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTURO	123
8.	REFERÊNCIAS	124

1 INTRODUÇÃO

O aumento na geração e no uso dos biocombustíveis renováveis tem sido visto com potencial significativo em meio à crise ambiental e financeira dos combustíveis fósseis (MEHMOOD, et al., 2021). Produzir biocombustíveis de forma sustentável, competitiva e econômica, é uma das estratégias de pesquisadores e cientistas na geração de energia por via engenharia metabólica e reaproveitamento de resíduos agroindustriais (JOSHI e MISHRA, 2022).

A citricultura da produção de laranja é a maior fruticultura do mundo. A produção global de laranja para safra 2021/22 é estimada em 48,8 milhões, pois o clima favorece as maiores colheitas de laranja como no Brasil, México e Turquia (ANONYMOUS, 2019; YADAV et al., 2022; CITRUS, 2022). Aproximadamente, 40-60% da fruta é descartada como resíduo. Anualmente, são gerados de 110 a 120 milhões de toneladas de resíduos cítricos em todo o mundo pelas indústrias de processamento de cítricos (MAHATO, et al., 2020) e no Brasil são de cerca de 8,4 milhões de toneladas (PACHIEGA et al., 2019; TORQUATO et al., 2017). Consequentemente, enormes desafios têm que ser vencidos em relação à poluição da terra, solo, lençol freático subterrâneo e gerenciamento geral de resíduos úmidos/semissólidos (SHARMA, et al., 2017).

Atualmente, a maioria dos resíduos agroindustriais não é processada adequadamente e são destinados como matéria-prima para ração animal ou despejada em aterros sanitários (MAHATO, et al., 2020). Dessa forma, o foco do século 21 está sendo produzir de maneira sustentável, utilizando os resíduos gerados (SEKOAI, et al., 2021). Além disso, a acumulação de resíduos agrícolas é hoje um grande problema mundial (BRAR, et al., 2022; SEKOAI, et al., 2021).

Recentemente, muitos pesquisadores vêm envolvendo extensas investigações no desenvolvimento de novas técnicas de geração de energia, utilizando várias tecnologias existentes a partir de resíduos cítricos, motivados por aspectos ambientais e econômicos (SURI, et al. 2022). Entre esses métodos, as abordagens biológicas são altamente favorecidas devido à sua compatibilidade com o meio ambiente e competitividade de custos (MATA, et al., 2018).

A fermentação é vista como a tecnologia alternativa do futuro, pela capacidade de utilizar diversos tipos de resíduos e de inóculos de diversos *habitats* para produção de

hidrogênio e demais co-produtos de valor agregado como álcoois e ácidos graxos voláteis (SOARES, et al., 2020; EBRAHIMIAN e KARIMI, 2020).

Além de hidrogênio, o bioetanol renovável gerado por fermentação a partir de resíduos agroindustriais, compostos por açúcares, como glicose, xilose e celulose (MUND, et al., 2022; OSMAN, et al., 2021). Outro biocombustível que tem se mostrado alternativa a partir de resíduos da agroindústria é o butanol, que pode atuar como um biocombustível substituível a gasolina (PINTO, et al, 2021).

A identificação de microrganismos autóctones presentes em efluentes da citricultura, adaptados a compostos inibidores como limoneno e à matriz lignocelulósica é fundamental para o processo fermentativo (CAMARGO et al., 2021). A bioaugmentação ou uma co-cultura definida (facultativa e anaeróbia) pode ser alternativa para melhorar a eficiência dos tratamentos biológicos convencionais de águas residuais complexas, na produção biológica de hidrogênio (CHENG, et al., 2021; MAINTINGUER, et al, 2017).

Neste contexto, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de hidrogênio e co-produtos utilizando microrganismos é alternativa competitiva das refinarias de combustíveis fósseis. E o estudo da identificação e aspectos microbiológicos de microrganismos autóctones presente em efluente advindo do processamento industrial na produção de hidrogênio, etanol e ácidos graxos voláteis a partir da laranja, é pouco explorado e o torna atrativo de interesse para pesquisas futuras com o objetivo de aproveitar ao máximo possível esse efluente excedente de indústrias de suco de laranja.

Nesse sentido, o objetivo desta tese foi avaliar o potencial do reuso de efluente bruto citrícola gerado em grandes quantidades, devido à alta demanda da exportação de suco de laranja, como substrato e fonte de cultura mista de bactérias anaeróbias autóctones para produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos, aplicando-o e comparando-o com culturas puras fermentativas e lodo mesofílico anaeróbio metanogênico, pré-tratado, em reatores anaeróbios em batelada, empregando diferentes fontes de carbono, meios de cultivo, condições operacionais e alimentados com proporções crescentes de efluente bruto citrícola proveniente da agroindústria nacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resíduos oriundos do processamento industrial da laranja

A fruticultura brasileira se destaca em produções de Laranja, Banana e Abacaxi (OCDE-FAO, 2020). Na produção de frutas no mundo, a laranja ocupa a 5ª posição em 2018, atrás de frutas como banana, melancia, maçã e uva. Outros países com maiores produções de laranja são China, Índia, Estados Unidos e México (FAO, 2021).

O Brasil se mantém como maior produtor mundial de laranja desde o início da década de 90 e o Estado de São Paulo é o principal líder, com 77% da produção nacional, seguido de Minas Gerais (6%), Paraná (5%) Bahia (4%) e Rio Grande do Sul (2%). O cinturão citrícola compreende o estado de São Paulo e parte do estado de Minas Gerais (Triângulo Mineiro), onde a safra 2019/2020 teve uma produção de 384,87 milhões de caixas (de 40,8 kg) representando 1.202.792 toneladas, sendo a maior parte destinada para a indústria de suco. O país é responsável por produzir três quartos da exportação mundial de suco de laranja. Fato esse que o torna o maior produtor e exportador do mundo (FAOSTAT, 2021).

As variedades cítricas apresentam ciclo de desenvolvimento variando de 10 a 16 meses entre o florescimento (normalmente na primavera) e a maturação dos frutos, do qual dependem das características e das condições de solo e clima. Existem diversas variedades que são divididas em precoces (Laranjas Westin, Rubi e Hamlin), meia-estação (Laranja Pera-rio) ou tardias (Laranjas Valência, Natal e Folha murcha), conforme o período de maturação (YADAV et al., 2022).

As formas de consumo mundial da laranja são naturais, descascadas e como suco. Fruta cítrica associada com um baixo custo e rica em nutrientes, incluindo vitamina C, A e B, minerais (cálcio, fósforo, potássio), a fibra dietética e muitos fitoquímicos, incluindo flavonóides, aminoácidos, triterpenos, os ácidos fenólicos e os carotenóides (SURI et al., 2022; ROUSSOS, 2011).

Apenas cerca de 50% do peso da laranja é transformado em suco no processamento industrial (REZZADORI, BENEDETTI e AMANTE, 2012; SILES et al., 2016). Consequentemente são geradas grandes quantidades de resíduos (casca, polpa, sementes, óleo essencial, folhas de laranja e frutas alaranjadas inteiras que não atingem os requisitos de qualidade) (KOPPAR e PULLAMMANAPPALLIL, 2013; MAMMA e CHRISTAKOPOULOS, 2014), que é responsável pelos outros 50% do peso da fruta e contém cerca de 82 g a 100 g de umidade⁻¹ (GARCIA-CASTELLO et al., 2011).

O processamento global de frutas cítricas gera aproximadamente 10 milhões de toneladas de resíduos anualmente (ZEMA et al., 2018, SURI et al., 2022). Estudos com resíduos de laranja vêm sendo utilizados em vários produtos, incluindo aditivos alimentares, solventes, aromas e fragrâncias (YADAV et al., 2022). Entretanto, enorme quantidade de

resíduos é, na maioria dos casos, espalhada na terra em áreas adjacentes aos locais de produção ou diretamente no aterro, ou queimado onde seu descarte não autorizado leva à poluição do solo e da água (ZEMA et al., 2018; MARTIN et al., 2010).

Processos industriais provenientes da citricultura podem gerar águas residuárias altamente poluidoras em termos de valores de demanda química e demanda biológica de oxigênio (DQO e DBO), tornando-se um risco significativo para os cursos de águas locais e solos além da produção de gás de efeito estufa (TORQUATO et al., 2017; SILES et al., 2010; REZZADORI, BENEDETTI e AMANTE, 2012).

Ao longo dos anos, algumas pesquisas vêm sendo realizadas visando à recuperação dos resíduos sólidos e líquidos do processamento da laranja, por exemplo, através da produção de adubos orgânicos, pectina, bio-óleo, óleos essenciais e compostos antioxidantes, ou como um substrato para a produção de vários compostos de alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos, biofertilizantes e materiais adsorventes (SURI et al., 2022; MAHATO et al., 2020; SILES et al., 2010). Estes são excelentes alternativas para evitar a poluição ambiental, além de agregar valor a estas substâncias (REZZADORI, BENEDETTI e AMANTE, 2012). Contudo, escassos são os estudos com a água residuária e outros tipos de resíduos gerados em indústrias de processamento do suco de laranja, aplicados na geração de biocombustíveis e demais co-produtos de valor agregado por digestão anaeróbia, como hidrogênio, álcoois e ácidos graxos voláteis.

2.2 Composição do resíduo de laranja

A valorização de resíduos requer o conhecimento de sua composição química. Resíduos cítricos compostos pela parte sólida e líquida contêm 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemiceluloses e 42,5% de pectina (fibra solúvel); aditivo alimentar natural utilizado extensivamente na indústria alimentícia (REZZADORI, BENEDETTI, AMANTE, 2012). Desta forma, este sub-produto apresenta grande potencial para a utilização em produtos com elevado valor agregado, obtidos através de hidrólise química ou enzimática e posterior conversão biológica, em sua composição rica em hidratos de carbono solúveis e insolúveis (SURI et al., 2022; RIVAS et al., 2008).

Resíduos cítricos tipicamente tem um pH ácido (3,5 a 5,8), com elevado teor de água (cerca de 80-90%) e de matéria orgânica (cerca de 95% de sólidos totais) (ZEMA, et al., 2018; SILES et al., 2016), que podem favorecer a fermentação.

Os açúcares solúveis presentes na casca de laranja são a glicose, frutose e sacarose. Os polissacarídeos insolúveis da parede celular de células da casca de laranja são compostos de pectina, celulose e hemiceluloses. A pectina e hemiceluloses são ricos em ácido galacturônico, arabinose e galactose, e também contém pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose (CAMARGO, 2021; GROHMANN et al., 1995).

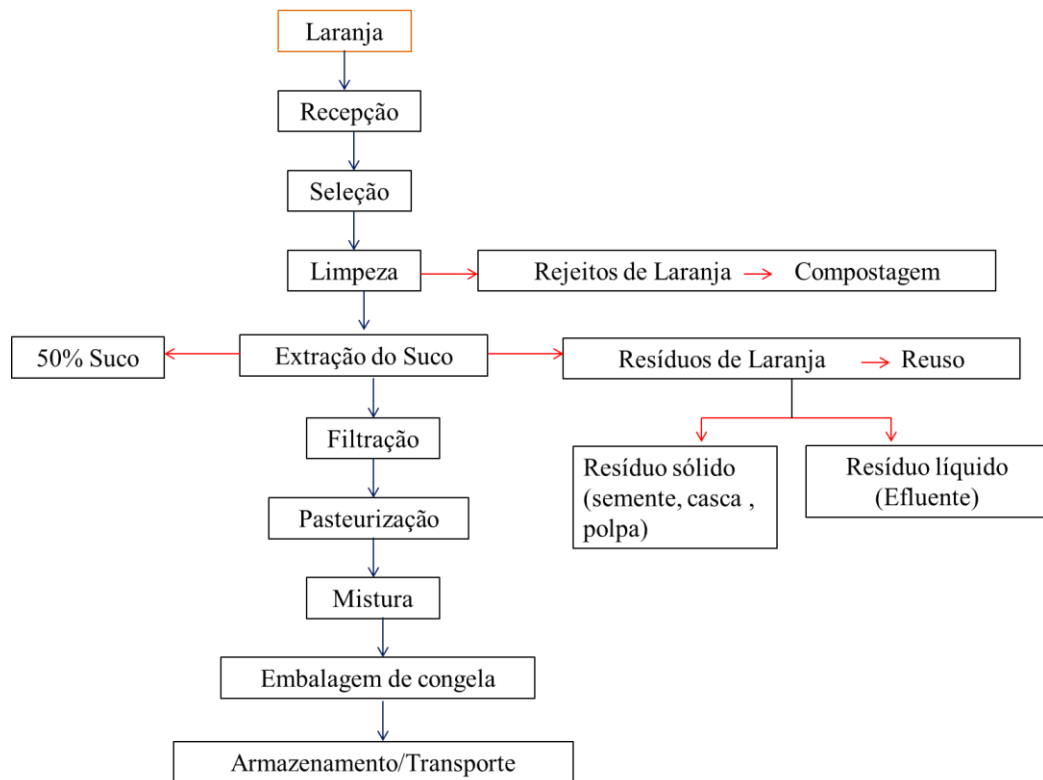
As cascas, sementes e celulose são usualmente transformadas em farelo peletizado para a alimentação animal, no processo de extração do suco na agroindústria. Os resíduos líquidos perfazem águas residuárias de lavagem das frutas, do descascamento e de lavagem das esteiras e mesas de posicionamento do fruto. Efluentes cítricos incluem ácido cítrico, pectina e óleo da casca (SHARMA et al., 2017). Entretanto, o resíduo líquido gerado e comumente nomeado de “água amarela” é de grande preocupação, uma vez que possui teor elevado de matéria orgânica, tornando-se um agente de poluição ambiental (TAVARES et al., 1998).

Alguns subprodutos da indústria de cítricos têm valor comercial expressivo, como os óleos essenciais obtidos da casca de laranja, no qual são utilizados como ingredientes em alimentos, bebidas, cosméticos, perfumes e essências aromáticas, conforme descrito a seguir.

As fases do processamento do suco de laranja na agroindústria, onde a partir da lavagem dos frutos e durante a extração do suco são gerados os resíduos sólidos e líquidos. Sendo os sólidos, as sementes, a polpa e a casca destinados a ração animal, fertilizante, extração de pectina e óleo essencial e a queima do bagaço para geração de energia (SATARI e KARIMI, 2018). O d-limoneno é utilizado na produção de tintas e solventes. O farelo da polpa cítrica é empregado na produção de rações animais. A polpa de laranja é usada pelas indústrias de alimentos e bebidas (SATARI e KARIMI, 2018; PEREIRA, 2008).

Já o efluente líquido, há poucos trabalhos na área, mas o enfoque é ser valorizado através de seu tratamento para a produção de ácidos orgânicos, bioetanol, biohidrogênio por processos fermentativos. O processamento industrial de suco de laranja é detalhado na Figura 1.

Figura 1. Processamento industrial de citros



Fonte: Adaptado de REZZADORI, BENEDETTI e AMANTE, 2012

2.1 Alternativas para o reaproveitamento dos resíduos de laranja

Alguns autores realizaram pesquisas visando à utilização de resíduos de laranja, que incluem a geração de calor pela combustão dos restos vegetais das laranjeiras como folhas e cascas, restos da poda da árvore, avaliando a eficiência e as emissões de gases, como forma de buscar novas alternativas de tratamento, conforme descritos a seguir (VAMVUKA, SFAKIOTAKIS e KOTRONAKIS, 2012).

Nighojkar et al., (2006) utilizaram a casca da laranja como indutor para a produção de pectinases utilizando *Aspergillus niger* imobilizadas em três diferentes sistemas de alginato e observaram que o alginato de sódio serve como uma boa matriz para aprisionamento de células fúngicas para produção de pectnases. Neste mesmo contexto, Faria e Peralta, (2007), utilizaram resíduos de laranja como substrato para a obtenção de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

Mamma et al.(2008) trabalharam com casca de laranja para obtenção de enzimas como pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas através de sua biodegradação microbiana por linhagens de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora* e *Penicillium*. E após o

tratamento enzimático acoplado a fermentação em estado sólido, resultou na produção de açúcares fermentescíveis que podem ser convertidos em bioetanol.

Clemente, Flores, Oliveira, (2012) obtiveram uma farinha proveniente dos resíduos da laranja (casca e bagaço) e concluíram que a farinha possui boa qualidade nutricional, com valores elevados de vitamina C e proteínas. Além disso, tais resíduos ou a farinha casca e bagaço possuem alta quantidade de fibras e apresenta grande potencial de hidratação, podendo ser utilizada como complemento alimentar.

Mantzouridou, Paraskevopoulou e Lalou (2015) investigaram o potencial da casca da laranja como substrato para a produção de compostos aromatizantes através da fermentação em estado sólido utilizando a levedura de vinho, (*S.cerevisiae*). Os autores concluíram que a levedura foi capaz da produção de ésteres voláteis com caráter “frutado” e de alta importância industrial. A levedura apresentou bom desempenho de crescimento e maior capacidade de consumir os nutrientes disponíveis e permanecer viva durante todo o processo de fermentação.

Miran et al. (2016) exploraram a casca da laranja sem qualquer pré-tratamento químico para a geração de bioeletricidade, utilizando a tecnologia de células de combustível microbianas. Os autores concluíram que a combinação de microrganismos fermentativos e exoeletrogênicos (espécies de *Pseudomonas* sp.) auxiliaram na degradação efetiva da casca da laranja combinada com alta geração de corrente elétrica.

Suri, et al., (2022) descreveram algumas aplicações atuais dos resíduos de frutas cítricas, como a produção de carvão ativado de baixo custo e ecologicamente correto a partir de *Citrus limetta* por carbonização e ativação química alcalina na remoção de ranitidina em efluentes farmacêuticos. O estudo obteve uma remoção de (85,63%) de ranitidina a temperatura de 39,85°C, velocidade de agitação de 140 rpm a 6 pH (BHATTACHARYYA et al., 2019).

Outro destaque é a produção de biocombustíveis, através de cascas de *Citrus limetta* com pré-tratamento a vapor catalisado por ácido, acompanhado de hidrólise enzimática e fermentação, com rendimento de 64% de bioetanol em pH 4, após 48 horas de tratamento (JOHN et al., 2020)

Aproveitamento do óleo não volátil das sementes de citros em produtos alimentícios, cosméticos, como fonte de biocombustível, são demonstrados a seguir. A produção de biodiesel a partir de sementes de *Citrus sinensis* pelo processo de transesterificação, onde foi observado um rendimento de biodiesel de 76,93% (EZEKOYE et al., 2019). A utilização do óleo da semente cítrica como ingrediente na preparação de sabonetes para cuidados com a

pele, apresentou notáveis propriedades como antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (ATOLANI et al., 2020)

Outros trabalhos como o uso de resíduos da laranja na adsorção de compostos químicos e de metais tóxicos presentes em efluentes industriais estão sendo estudados, conforme descrito a seguir.

No estudo de Widmer et al., (2010) aplicaram a explosão de vapor no tratamento do resíduo sólido citrícola para determinar o efeito da remoção do limoneno, consequentemente verificar a composição de carboidratos e rendimento de etanol. Utilização de resíduos de processamento de cítricos para a produção de etanol por processos de sacarificação e fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* resultou num rendimento de etanol com base no teor de açúcar após a hidrólise enzimática, variando de 76 a 94%, na condição favorável de 160 °C por até 8 min e pH 2,2–8,2.

Martin et al. (2010), demonstraram que a digestão anaeróbia de resíduos de casca de laranja após uma extração de d-limoneno revela maior produção de metano, proporcionando uma excelente oportunidade para integrar esses resíduos da fabricação de suco de laranja através de uma abordagem de biorrefinaria. No estudo foi utilizado reator de tanque agitado contínuo operando em modo semi-contínuo e sob condições termofílicas. Após a remoção D-limoneno por destilação a vapor sob 2 mg L^{-1} , os autores observaram maiores rendimentos de metano, sendo maior na condição termofílica (67 °C) (332 mL CH₄/g sólidos voláteis adicionado) do que na condição mesofílica (37 °C) (230 mL CH₄/g sólidos voláteis adicionado), com uma carga orgânica ideal entre 1,20 e 3,67 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Pourbafrani et al. (2010) testaram processo integrado para a produção de etanol, biogás e limoneno em escala laboratorial no tratamento dos resíduos gerados na indústria de suco de laranja. Utilizaram frascos de dois litros com septo de borracha. Cada reator foi alimentado com 200 g de substrato (3% sólidos voláteis) e 400 g de inóculo (cerca de 1% sólidos voláteis), e fluxonado com um gás contendo 80% de N₂ e 20% de CO₂ para garantir condições anaeróbias. Os reatores foram incubados a 55°C por 50 dias, com agitação 200 rpm duas vezes ao dia. A remoção de limoneno aconteceu por tanque de expansão seguido de condensador/decantador. A partir do hidrolisado sólido dos resíduos de laranja foi obtido biogás e a fermentação do hidrolisado líquido foi usada para geração de etanol. Ao aplicar este processo, conseguiram 39,64 L de etanol, cerca de 45 m³ de metano puro e 8,9 L de limoneno por tonelada de resíduos cítricos.

Wikandari et al. (2015) realizaram um pré-tratamento da casca de laranja por lixiviação ou extração sólido-líquido com solventes para a remoção do composto limoneno.

As cascas pré-tratadas foram então digeridas em reatores anaeróbios em batelada. O maior rendimento de metano foi conseguido no tratamento da casca de laranja picada e solvente hexano na proporção de 1:12 a 20°C durante 10 minutos, sendo de 0,217 metano m³ / kg sólidos voláteis.

Siles et al. (2016), usando a destilação a vapor para reduzir a concentração de D-limoneno (com eficiência de remoção em torno de 70% após uma hora), relataram um rendimento de metano de 0,280 m³ kg DQO⁻¹ adicionado em condições termofílicas, com carga orgânica máxima de 3,67 kg DQO m⁻¹ d⁻¹ sem acidificação e inibição do processo.

John et al., (2020) testaram cascas de *Citrus limetta* como matéria-prima para a produção de bioetanol, utilizando pré-tratamento a vapor catalisado por ácido para remoção lignina, seguido de hidrólise enzimática e fermentação. O estudo relatou um rendimento de etanol de 64% em pH 4 após 48 horas de tratamento.

A pesquisa de Falco et al. (2021) verificou o efeito do bioabsorvente à base de casca de laranja e areia de silicone na filtração do solo por meio da irrigação com água do mar. A retenção do sal da água do mar foi alcançada com sucesso usando uma mistura de bioabsorvente de casca de laranja e areia de silicone. Resíduos de casca de laranja contêm hidratos de carbono, tanto solúveis e insolúveis que podem ser digeridos a biogás. Entretanto, a presença do óleo essencial como o “D-limoneno” na casca de laranja, se torna um impasse da produção de biogás, sendo um composto antimicrobiano altamente tóxico para a digestão anaeróbia, conforme descrito anteriormente.

Desta forma, em muitos estudos foi verificado propostas promissoras em tratar e valorizar a utilização de resíduos de laranja por processo anaeróbio, do qual, se utiliza microrganismos como agentes para a redução de matéria orgânica e eliminar ou reduzir compostos tóxicos, alcançando o controle da poluição ambiental e recuperação de energia.

2.4 Biocombustíveis

2.4.1 Produção de hidrogênio por via biológica

O hidrogênio é uma fonte de energia limpa e promissora, atualmente nomeado por hidrogênio verde como um potencial de energia renovável. Este gás é um biocombustível com teor de energia elevado de 122 kJ/g, que é 2,75 vezes maior que os combustíveis fósseis

(JOSHI e MISHRA, 2022). Além disso, a partir de 2050, prevê-se que o hidrogênio contribua com 34% do total da energia renovável (IEA, 2021).

A geração biológica de hidrogênio por fermentação é um método promissor onde é possível utilizar resíduos orgânicos, como matérias-primas (efluentes orgânicos e biomassa) de maneira ambientalmente econômica e sustentável (BRAR et al., 2022; ZHAO et al., 2011).

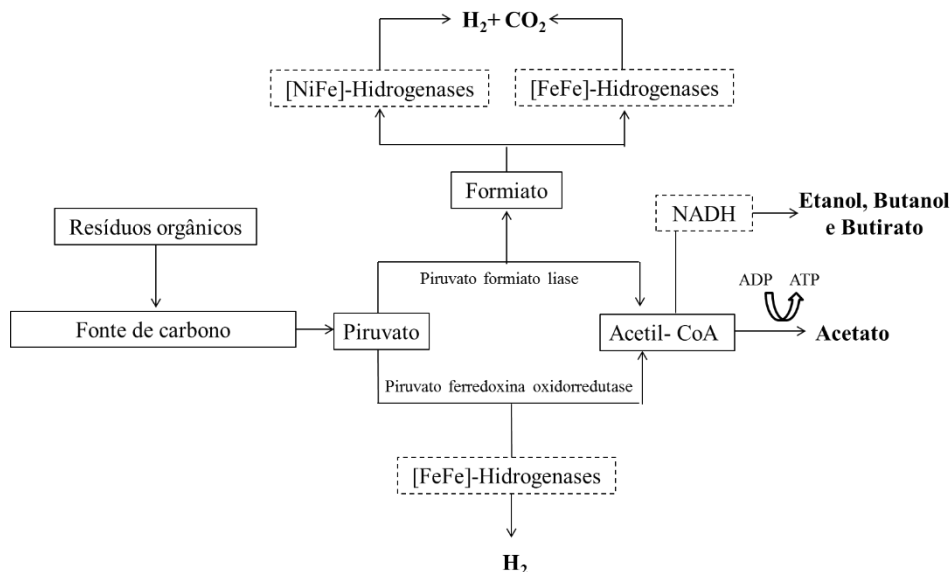
A produção biológica de hidrogênio pode ser realizada a temperatura e pressão ambiente, o que acarreta menor gasto energético. Outra vantagem desse processo é a ampla diversidade de microrganismos capazes de gerá-lo, tais como as bactérias fotossintéticas, cianobactérias, algas e bactérias fermentativas (JOSHI e MISHRA, 2022; SÁ, CAMMAROTA, LEITÃO, 2014; AN et al., 2014).

Efluentes agroindustriais, biomassa e resíduos orgânicos podem ser convertidos em hidrogênio por fermentação (BRAR, et al., 2022). Além disso, processos fermentativos são economicamente viáveis, em escala de bancada, com taxas de produção elevadas de hidrogênio no favorecimento do crescimento microbiano em tempo reduzido, quando comparado à fotofermentação e à biofotólise. É um processo simples, robusto e de rendimento elevado (KUMAR, et al., 2018).

A fermentação ocorre por metabolismo anaeróbico utilizando substratos ricos em carboidratos, por exemplo, sem oxigênio e ausência de luz para geração de piruvato, acetil-CoA, formiato e assim obter hidrogênio, dióxido de carbono e co-produtos como ácido propiônico, ácido acético, ácido butírico, álcoois como etanol, butanol, dentre outros (NABGAN, et al., 2021)

Na fermentação da glicose, as bactérias anaeróbicas convertem o substrato (fonte de carbono) em piruvato, liberando intermediários da forma reduzida de hidreto de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e dióxido de carbono (CO₂). Em seguida, o piruvato pode ser convertido em: i) acetil-CoA com ferredoxina(Fd) em produtos orgânicos (etanol, butanol e ácido butanóico), formiato ou ii) reduzido por duas hidrogenases básicas ([FeFe]-hidrogenase e [NiFe]-hidrogenase) em biohidrogênio (SARAVANAN et al., 2021) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das vias metabólicas envolvidas na oxidação da glicose



Fonte: Adaptado de Saravanan et al., (2021)

A principal enzima produtora de hidrogênio são as hidrogenases. A hidrogenase está presente em bactérias e eucariotos (algas verdes); desempenha um papel vital no metabolismo de energia em várias comunidades microbianas; é dividida em duas classes não homólogas com base em suas unidades catalíticas metálicas. São a [Fe-Fe]-hidrogenases, que contém apenas ferro (Fe) no sítio ativo e as outras são [Ni-Fe] hidrogenases e [Ni-Fe-Se] hidrogenases, que contém níquel (Ni), ferro (Fe) e às vezes, selênio (Se) (MONA, et al., 2020).

A digestão anaeróbia de resíduos orgânicos é um processo biológico com diferentes tipos de microrganismos e várias fases intermediárias tais como, hidrólise, acidogênese e acetogênese. Inicialmente, os compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) são hidrolisados em compostos mais simples (monômeros). A seguir, na fase acidogênica, os produtos gerados na etapa anterior são metabolizados no interior das bactérias fermentativas, sendo convertidos em ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), álcoois (etanol, butanol), H_2 e CO_2 . As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na acidogênese em H_2 e ácido acético e dióxido de carbono. (SÁ, CAMMAROTA e LEITÃO, 2014).

A fase acidogênica é a mais crucial para decidir a via metabólica de conversão do substrato. Nessa etapa, cada tipo de ácido graxo volátil (AGV) formado, adota uma via metabólica específica. Na reação dessas vias metabólicas, o piruvato desempenha o papel

central, para a formação de AGVs como acetato, propionato, butirato e seus equivalentes alcoólicos (etanol, propanol, butanol etc.) (YADAV et al. 2022). Assim, quantidade de piruvato distribuída para cada via depende do substrato, das condições do digestor e das cepas microbianas dominantes. Os produtos finais desta via metabólica acidogênica são acetato, etanol, butanol, propionato, butirato, ácido acético e lactato (ZHOU et al., 2018).

Entretanto, se o objetivo é a obtenção de hidrogênio, um desequilíbrio é necessário entre microrganismos produtores (acetogênicos) e os consumidores de hidrogênio (arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias redutoras de sulfato) (YADAV et al., 2022).

Contudo, algumas estratégias tem que serem adotadas para que a digestão anaeróbia seja interrompida para que hidrogênio, ácidos graxos voláteis e álcoois não sejam consumidos, na presença de cultivos mistos contendo bactérias e arqueias. O tratamento térmico de tais cultivos associado com o controle de pH, são técnicas comumente aplicadas na seleção de bactérias produtoras de hidrogênio como *Clostridium* sp., que são tolerantes a altas temperaturas e condições ambientais adversas, além de inibir a metanogênese.

Processos fermentativos de produção de hidrogênio com gênero *Clostridium* são estudados por diversos autores, conforme descrito a seguir. *Clostridium beijerinckii* é capaz de produzir butanol (LEE et al., 2008), além de hidrogênio (KIM et al., 2006; MAINTINGUER et al., 2011; AN et al., 2014).

Zhang et al., (2006) testaram a produção de hidrogênio, utilizando reator de coluna de fluxo insaturado (gotejamento) em escala laboratorial, alimentado com glicose em quatro concentrações diferentes (1,0, 3,3, 4,5 e 10,5 g L⁻¹) sob condição mesofílica. O reator consistia em uma coluna empacotada com esferas de vidro e inoculada com a cultura pura (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824) com taxa de fluxo de alimentação de 1,6 mL/min. A concentração de hidrogênio obtida foi de 70-79% por unidade de volume de reator.

Zhao et al., (2011) isolaram *Clostridium beijerinckii* RZF-1108 em reator de tanque agitado contínuo e foi avaliada a produção de hidrogênio. O rendimento máximo de hidrogênio foi de 1,97 mol H₂ / mol de glicose, sob condições ideais de 9 g L⁻¹ de glicose, 35 °C, o pH inicial de 7,0 e um volume de inóculo de 8% (v / v).

Entretanto, é importante salientar que vários estudos têm mostrado que a produção de hidrogênio é influenciada por alguns fatores tais como temperatura, pH, concentração de substrato, inóculo, além de requisitos nutricionais, tempo de detenção hidráulica, taxa carga orgânica e configuração do reator (SHIDA et al., 2012), conforme descrito a seguir.

2.4.2 Fatores que influenciam a produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio por fermentação é obtida geralmente por bactérias estritamente anaeróbias ou anaeróbias facultativas, em sistema anaeróbio. (NABGAN et al., 2021).

O inóculo utilizado para a produção de hidrogênio pode ser tanto de culturas puras quanto de culturas mistas, embora culturas mistas sejam os microrganismos mais favoráveis para produção em grande escala, devido ao controle e operação do processo ser facilitados pela utilização de meios não estéreis, reduzindo o custo global. Essa redução pode ser enfatizada quando empregadas culturas mistas a partir de fontes naturais como solo, lodo de esgoto, dejetos de animais ou resíduos (CHENG, et al., 2021). Mas a desvantagem na utilização das culturas mistas está na presença de microrganismos consumidores de H_2 (arqueias metanogênicas). Estratégias para minimizar os consumos de hidrogênio consistem no pré-tratamento do inóculo, que possui a finalidade de inibir e/ou eliminar os microrganismos consumidores, bem como selecionar os microrganismos produtores de H_2 (ERGAL et al., 2018; SÁ et al., 2011).

A utilização de culturas puras é favorável em relação à seletividade do substrato, à melhor manipulação do metabolismo através de alterações das condições de crescimento, elevados rendimentos de H_2 e a redução de subprodutos. Por outro lado, culturas puras são sensíveis à contaminação, sendo necessários condições assépticas e aumento do custo global do processo (SARAVANAN et al., 2021; SÁ, CAMMAROTA, LEITÃO, 2014).

A temperatura é considerada o mais importante parâmetro que afeta a produção de hidrogênio. As reações de fermentação podem ser conduzidas em faixas de temperatura mesofílica (30 – 49 °C) e termofílica (50 - 64 °C) (CHANDRASEKHAR, et al., 2015; XIN et al., 2016). A maioria dos estudos de produção fermentativa de H_2 tem utilizado a faixa de temperatura mesofílica. A temperatura ótima para cada processo depende do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos biodegradáveis e das condições operacionais do sistema (GUO et al., 2010). Contudo, as temperaturas que variam de 25°C a 60°C são favoráveis para todos os processos fermentativos (SARAVANAN, et al., 2021).

O pH constitui outro fator que influencia fortemente no processo de produção de H_2 fermentativo. Variações no pH podem inibir a sua produção afetando o crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, a atividade da enzima hidrogenase (SARAVANAN, et al., 2021). Na maioria dos estudos, o pH ótimo foi observado na faixa de 5,2-7,0. Em pH de 6,0 foi verificada a conversão de hidratos de carbono para H_2 . O pH dentro da faixa

supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H_2 , bem como permite a inibição dos microrganismos consumidores e presentes no meio fermentativo (CHANDRASEKHAR, et al., 2015).

Vários substratos têm sido usados nos estudos de produção de hidrogênio, entre eles diferentes açúcares (glicose, sacarose, frutose, xilose e lactose) e outros meios mais complexos como resíduos ricos em matéria orgânica, incluindo esgoto doméstico, dejetos de animais, alimentícios, da agricultura, vinhaça de várias origens, efluentes de indústrias de papel, mandioca, laticínio, amido e outras fontes de matéria orgânica. Alguns destes substratos orgânicos não são ideais para a produção de H_2 devido sua complexidade, necessitando de um pré-tratamento físico e/ou químico para ser utilizado pelas bactérias produtoras de H_2 (BRAR et al., 2022).

2.4.3 Produção fermentativa de etanol

O etanol é o biocombustível de maior relevância por sua competitividade energética direta com a gasolina, que já possui uma tecnologia de produção definida (SILVA et al., 2018).

O etanol de primeira geração é considerado um dos principais biocombustíveis no cenário atual devido à tecnologia de fermentação simples associada à sua produção. O bioetanol é atualmente o substituto dominante dos combustíveis fósseis, que responde por até 75% do uso total de biocombustíveis (MUND et al., 2022). A sua produção consiste da fermentação de açúcares pentose/hexose encontrados em diversas plantas, como milho, beterraba, mandioca, trigo e cana-de-açúcar (SILVA et al., 2018).

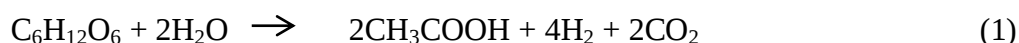
O etanol de 2ª geração é produzido a partir de matéria-prima lignocelulósica disponível em culturas energéticas (gramíneas, lenhosas), resíduos agrícolas e florestais (por exemplo, palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais) e resíduos municipais e industriais (por exemplo, as indústrias de alimentos e papel) (MUND et al., 2022; OSMAN et al., 2021).

A produção de etanol derivado de microalgas é chamada de 3ª geração. As microalgas apresentam a promissora capacidade de fornecer fontes de carbono como carboidratos (polissacarídeos, glicose) e proteínas para a fermentação utilizando fungos filamentosos e leveduras. O etanol de 4ª geração é obtido por microrganismos geneticamente

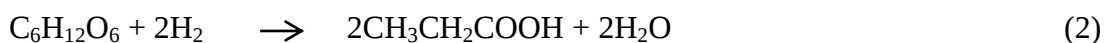
modificados como cianobactérias, leveduras e microalgas usados como fonte de matéria-prima para produzir biocombustível sustentável (OSMAN et al., 2021).

A produção de etanol ocorre na fase de acidogênese com *C. acetobutylicum* e na biodigestão anaeróbia por culturas mistas, juntamente com a produção de ácidos graxos voláteis. Nesta fase, a partir da glicose é possível obter a produção máxima de 2 mols de ácido acético (Equação 1), 2 mols de ácido propiônico (Equação 2), 1 mol de ácido butírico (Equação 3) e 2 mols de etanol (Equação 4), conforme descrito a seguir nas equações, (SAADY, 2013).

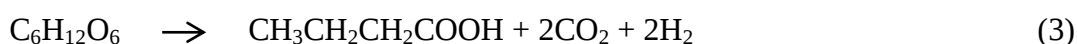
Ácido acético:



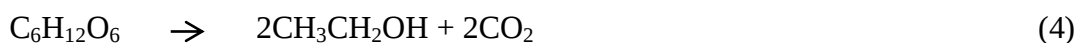
Ácido propiônico:



Ácido butírico:



Etanol:



Algumas bactérias e fungos são capazes de fermentar carboidratos e produzir etanol. As bactérias anaeróbias são as principais candidatas à produção de etanol a partir de xilose e celulose, devido à sua extensa diversidade metabólica e fisiológica. Alguns microrganismos pertencentes à classe Clostridia podem facilmente utilizar xilose e celulose como fonte de carbono (SILVA et al., 2018). Algumas bactérias anaeróbias e facultativas estudadas na produção de etanol são: *Thermoanaerobacter* sp. (SILVA et al., 2018) *C. acetobutylicum*, *C. carboxidivorans* (JOSHI e MISHRA, 2022), *Z. mobilis*, *Synechocystis* sp e *Synechococcus* sp (MUND, et al., 2022), *C. Thermocellum*, *Thermoanaerobacter mathranii* (OSMAN, et al., 2021).

2.4.4 Butanol

A produção de butanol ou n-butanol, álcool de quatro carbonos em estrutura de cadeia linear com grupo hidroxila no átomo de carbono e importante produto químico industrial é considerado combustível líquido superior com potencial para substituir a gasolina (VEZA, et al., 2021; LEE et al., 2012a; PAPOUTSAKIS, 2008). Este álcool possui

capacidade calorífica inferior de 33,1 MJ/kg, comparada com a gasolina de 42,7 MJ/kg (JIN et al., 2011).

O n-butanol possui vantagens em relação ao etanol, como reduzida pressão de vapor, ponto de ebulição elevado, maior teor de energia, menos corrosivo, menor necessidade de modificar as energias de combustão atuais e um índice de octano da gasolina semelhante (PINTO, et al., 2021), o que permite sua adição na gasolina em proporções muito mais elevadas do que o etanol, que atualmente é em torno de 27% de etanol na gasolina (LI et al., 2016).

Butanol pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, por síntese química (como petro-butanol) ou a partir de biomassa por fermentação microbiana (como biobutanol). Produção de butanol por fermentação microbiana foi primeiramente relatada por Pasteur em 1861, como um produto natural de bactérias anaeróbias (DURRE, 2011), e tem sido extensivamente estudada nos últimos anos. Fermentação de butanol ou fermentação ABE – acetona:butanol:etanol em proporção típica de 3:6:1, tem atraído atenção em pesquisas.

Microrganismos produtores de butanol pertencem ao gênero *Clostridium*, do qual quatro espécies são conhecidas por produzirem quantidades elevadas de butanol por fermentação, sendo, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* e *C. saccharoperbutylacetonicum* (PINTO, et al., 2021; LI et al., 2016; DURRE, 2011). Tais espécies podem ser divididas grosseiramente em duas classes, de acordo com a utilização de fonte de carbono, como amido e açúcar. Além disso, segundo a literatura, *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii* são as principais produtoras de butanol presentes nas indústrias por processos de fermentação ABE (VEZA, et al., 2021).

Produção de butanol em processos de fermentação ABE pode ser dividido em duas fases, isto é, fase acidogênica e a fase solventogênica. A fase acidogênica ocorre normalmente durante o crescimento exponencial, enquanto a fase solventogênica ocorre normalmente na fase estacionária e o início da esporulação como uma resposta de acumulação de ácido (MARTIEN, AMADOR-NOGUEZ, 2017). Alguns estudos mostraram que a mudança da acidogênese para solventogênese ocorre em pH inferior a 5 e a concentração de ácido butírico superior a 2 g L⁻¹ (CHENG et al., 2012 e LI et al., 2014).

Na fermentação de açúcares por espécies de *Clostridium*, observa-se um crescimento exponencial da cultura na acidogênese (LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011). Nessa primeira etapa os principais metabólitos produzidos são acetato, butirato, hidrogênio e dióxido de carbono (LEE et al., 2008). As vias de produção de butirato e acetato possuem, em seu último passo, enzimas que levam a geração de moléculas de ATP, que acabam favorecendo o

crescimento da cultura, indicando a importância desta primeira fase para o desenvolvimento das bactérias. Durante a acidogênese com a formação dos ácidos acético e butírico ocorre a queda do pH celular, o que desencadeia a solventogênese (LEE et al., 2008). Nesta segunda fase acontece a transição de crescimento estacionário e a assimilação dos ácidos com formação simultânea de solventes (acetona, n-butanol e etanol) (LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011). A conversão do ácido butírico e ácido acético em solventes eleva os valores de pH interno garantindo a capacidade das células em permanecerem metabolicamente ativas por longos períodos. Entretanto, estes solventes produzidos acabam sendo tóxicos para a bactéria e, por isso, juntamente com o início da solventogênese, os clostrídios iniciam também o processo de esporulação (DÜRRE, 2008a). Assim, ao final de uma fermentação realizada por tais espécies solventogênicas tem-se como produtos finais: acetona, n-butanol e etanol, justificando o nome dado a este processo, “fermentação ABE”.

2.4.5 Os desafios para a fermentação de butanol

Atualmente, os principais obstáculos encontrados na fermentação ABE incluem: baixa eficiência de conversão de substrato em produto, toxicidade do produto (principalmente o butanol) para as culturas que o produzem, potencial para a degeneração de cultura e; em contrapartida a capacidade de utilizar matérias-primas mais baratas ou resíduos agrícolas renováveis como os substratos. Tais fatores podem resultar em produções de butanol via ABE menos competitivas, quando comparadas às provenientes de petróleo (LIU et al., 2018; LI et al., 2016).

A toxicidade do butanol é um dos problemas mais críticos, pois o metabolismo celular em culturas de *Clostridium* cessará após a concentração do solvente atingir 20 g L^{-1} . A produção de butanol também limita o crescimento de microrganismos. Inibições em 50% do crescimento foram verificadas em gerações de butanol elevadas e na faixa de 7-13 g/L no meio líquido (HUANG, LIU, GAN, 2017).

Espécies de *Clostridium* são conhecidas por terem vantagens de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono tais como monossacáridos; oligossacarídeos; e polissacarídeos, incluindo amidos refinados e não refinados; além de pentoses e hexoses, bem como glicerol. Melaço, permeado de soro, milho, mandioca e batata têm sido estudados como substratos para a fermentação de butanol. Entretanto, em função do custo elevado de tais fontes de biomassa e da concorrência com a oferta de alimentos, existe um interesse considerável na utilização de substratos renováveis, especialmente materiais lignocelulósicos

para a fermentação butanol (JOSHI e MISHRA, 2022; NDABA, CHIYANZU, MARX, 2015; DURRE, 2011).

Uma alternativa sustentável são os resíduos oriundos das indústrias de suco de laranja, dos quais contêm açúcares fermentáveis como sacarose, frutose e glicose, substratos de grande interesse para a geração de biocombustíveis.

Há pouca informação na literatura sobre o tratamento anaeróbio de efluente da indústria de laranja, especialmente para a produção de hidrogênio, etanol e butanol. Assim, este substrato renovável apresenta grande potencial para a utilização e geração de produto com elevado valor acrescentado através do tratamento anaeróbio.

2.5 Microrganismos envolvidos na fermentação de substratos orgânicos

A microbiologia e biotecnologia industrial exploram o imenso potencial dos microrganismos. Um papel importante é atribuído às bactérias do gênero *Clostridium*, por serem microrganismos com numerosas aplicações em vários ramos da indústria. O gênero *Clostridium* pertence ao domínio bactéria. São bactérias anaeróbias heterotróficas e mesofílicas, tipicamente gram-positivas, com morfologias em forma de bacilos e produção de endósporos. Para a maioria das espécies, a temperatura de crescimento ótimo está entre 30 e 40 °C, enquanto o pH ótimo está contido no intervalo de 6,5 a 7,5. Normalmente os principais habitats das bactérias do gênero *Clostridium* são o solo, lodo de rio, lodos de estações de tratamento de esgotos sanitários, excrementos de animais, etc. (CHENG et al., 2021).

A principal característica do gênero *Clostridium* é sua capacidade em transformar diferentes fontes de carbono, como celulose e amido em hexose, glicose, lactose, sacarose, e xilose e consequente a hidrólise dos polímeros de açúcares (GARCÍA et al., 2011; JIN, et al., 2011). Além disso, outra característica pertencente a esse gênero é a fermentação bifásica (acidogênese e solventogênese). Os produtos da reação de seu metabolismo geram CO₂, H₂, assim como compostos orgânicos (butírico, láctico, acético e succínico) e solventes (butanol, acetona, isopropanol), (ÁCS, et al., 2015; REN et al., 2007; WANG et al., 2011).

As espécies *C. acetobutylicum* e *C. butyricum* são capazes de produzir hidrogênio por fermentação de açúcares como glicose, sacarose e lactose. (BRAR et al., 2022).

As bactérias gram-positivas não possuem uma membrana celular externa, consequentemente, não há espaço periplasmático, e possuem uma camada de peptidoglicano mais desenvolvida que as espécies gram-negativas. Porém, ainda não existem informações

verídicas que comprovem a ausência dessa membrana celular e uma camada bem desenvolvida, que podem ser vantajosas ou desvantajosas para as gram-positivas, quando se trata da capacidade de adaptação de resposta a concentrações elevadas de solventes em meio de fermentação. O transporte de substrato e de nutrientes é realizado do ambiente para dentro do citoplasma celular, sendo um pré-requisito para o desenvolvimento e crescimento das bactérias gram-positivas e gram-negativas (LIU, et al., 2018).

Entretanto, a geração de hidrogênio e álcoois pode ocorrer por diversas bactérias, como a facultativa *Enterobacter* sp. e as anaeróbias como *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp. também estão envolvidos na fermentação de substratos (JOSHI e MISHRA, 2022; BRAR, et al., 2022).

Existe escassez de informações na produção de hidrogênio, etanol e butanol por tratamento anaeróbio dos efluentes oriundos do processamento industrial de laranja. Tal fato justificou o estudo mais detalhado, buscando o entendimento do processo em testes com culturas puras do gênero *Clostridium*, além de culturas mistas e a obtenção de uma cultura mista de bactérias anaeróbias oriundo do efluente bruto citrícola, em reatores anaeróbios em batelada, utilizando como substrato o efluente bruto citrícola de agroindústria nacional, em diferentes proporções.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Hipótese geral: Efluente bruto citrícola é um excelente substrato com potencial na produção de hidrogênio, álcoois e ácidos orgânicos de valor agregado.

Objetivo geral: Testar efluente bruto citrícola para a produção de hidrogênio e demais co-produtos de valor agregado, em reatores anaeróbios em batelada, com cultura mista de bactérias anaeróbias proveniente do próprio efluente citrícola, culturas puras de bactérias fermentativas e lodo granular metanogênico tratado previamente.

3.2 Específicos

Hipótese 1: Efluente bruto citrícola contém fontes de carbono prontamente assimiláveis e bactérias anaeróbias fermentativas;

Objetivo 1: Realizar a caracterização do efluente bruto citrícola por análises físico-químicas e microbiológicas e obter cultura mista de bactérias anaeróbias proveniente do efluente bruto citrícola, caracterizá-la, aplicá-la em reatores anaeróbios em batelada, com diferentes fontes de carbono na geração de hidrogênio;

Hipótese 2: Cultura mista de bactérias anaeróbias proveniente do efluente citrícola são mais capazes de produzir hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos voláteis;

Objetivo 2: Comparar a eficiência de produção de hidrogênio e co-produtos de valor agregado em reatores inoculados com a cultura mista autóctone e culturas puras fermentativas, utilizando efluente bruto citrícola como fonte de carbono;

Hipótese 3: Adição de componentes nutricionais ao efluente citrícola pode influenciar no metabolismo microbiano e consequentemente elevar a produção de hidrogênio e co-produtos;

Objetivo 3: Comparar a operação de reatores anaeróbios em batelada com diferentes meios de cultivo, sob diferentes condições operacionais e testar misturas crescentes do efluente bruto citrícola em meio de cultivo fermentativo, utilizando a cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas;

Hipótese 4: Lodos granulares metanogênicos são robustos e compostos por microrganismos produtores e consumidores de hidrogênio;

Objetivo 4: Realizar o pré-tratamento térmico no lodo granular metanogênico para inibição das arqueias metanogênicas e aplicá-lo em reatores anaeróbios em batelada com efluente citrícola como substrato para produção de hidrogênio e co-produtos;

Hipótese 5: Diferentes inóculos em diferentes proporções de efluente citrícola levam a alteração da rota metabólica e geração de diferentes produtos;

Objetivo 5: Verificar alterações nas gerações de ácidos graxos voláteis, álcoois e hidrogênio durante a operação dos reatores anaeróbios em batelada, com os diferentes inóculos;

Hipótese 6: O efluente citrícola contém diversidade de microrganismos anaeróbios responsáveis pela degradação do substrato e geração de diferentes produtos de valor agregado.

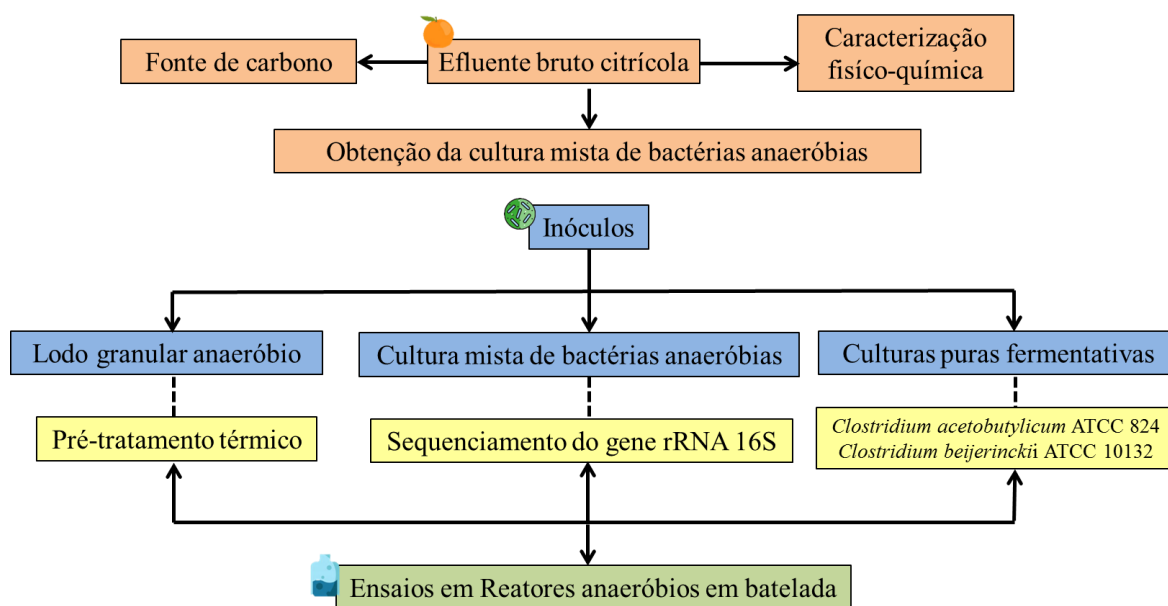
Objetivo 6: Realizar a identificação da cultura mista de bactérias anaeróbias autóctones, no sequenciamento do gene rRNA 16S, nos diferentes ensaios.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Esquema operacional

Ensaio fermentativos, em diferentes condições operacionais, foram realizados para avaliar o potencial de efluente bruto citrícola na obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como hidrogênio (H_2) e demais co-produtos (ácidos graxos voláteis e álcoois). O esquema experimental desenvolvido está ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma geral do esquema operacional.



Fonte: Próprio autor

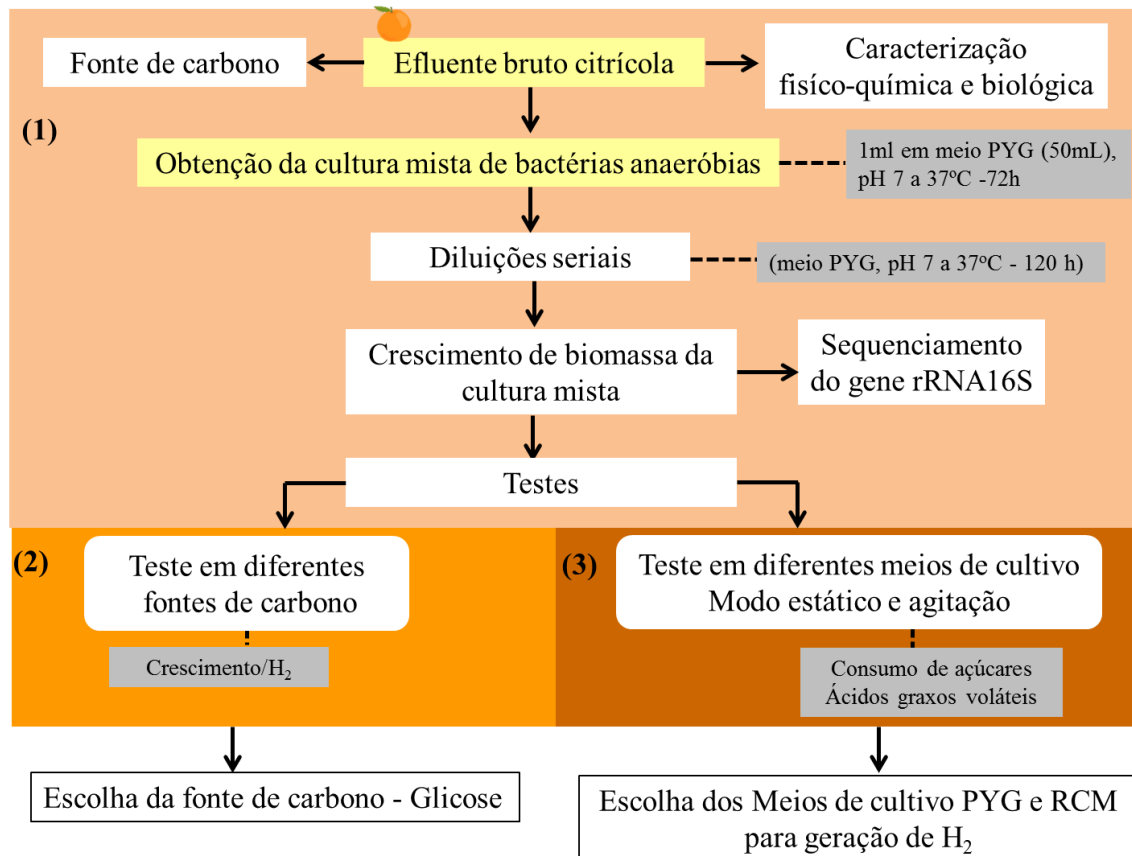
Sete etapas experimentais foram realizadas para o desenvolvimento do presente estudo. Na Etapa 1 foi caracterizado efluente bruto citrícola, em análises físico-químicas. A seguir, foi obtida uma cultura mista de bactérias anaeróbias do próprio efluente bruto citrícola, denominada cultura mista de bactérias anaeróbias, por diluições seriais, em meio de cultivo específico para a fermentação, visando obter uma cultura mista de bactérias anaeróbias, produtora de hidrogênio e demais co-produtos de valor agregado. Posteriormente, foi realizado aumento da biomassa advinda da cultura mista de bactérias anaeróbias, em meio de cultivo específico, para ser usada em ensaios posteriores, além da identificação da cultura mista de bactérias anaeróbias obtidas, em sequenciamento do gene rRNA 16S.

Na Etapa 2 foi testada a cultura mista de bactérias anaeróbias, em diferentes fontes de carbono, para verificação do seu crescimento e produção de hidrogênio.

Na etapa 3, reatores anaeróbios em batelada foram operados, com a cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas, separadamente, em diferentes meios de

cultivo, mantidos a 100 rpm e sob modo estático. Tal avaliação foi realizada em análises de produção de ácidos e álcoois, consumos de glicose e crescimento (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma experimental: Etapas 1, 2 e 3.



Fonte: Próprio autor

Na Etapa 4 foram montados ensaios em reatores anaeróbios para a produção de hidrogênio e co-produtos, utilizando glicose como fonte de carbono, utilizando culturas puras fermentativas e a cultura mista de bactérias anaeróbicas.

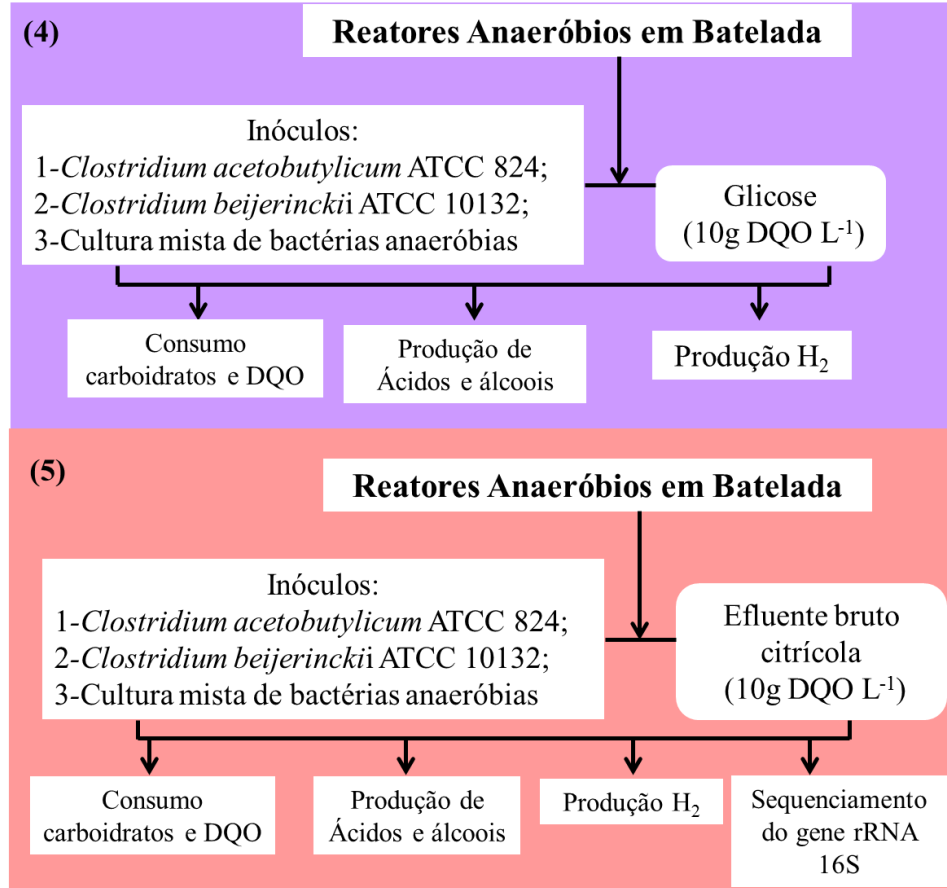
Na Etapa 5 a montagem dos ensaios foi semelhante à Etapa 4, com a troca da fonte de carbono que, nesse caso, foi o efluente bruto citrícola (Figura 5).

Na Etapa 6, outros ensaios foram realizados em reatores anaeróbios em batelada, em aumentos gradativos do efluente bruto citrícola utilizando as culturas puras fermentativas e a cultura mista de bactérias anaeróbicas, com o objetivo de comparar o melhor desempenho na produção e hidrogênio e co-produtos (Figura 6).

E por fim, na Etapa 7, foram realizados ensaios com a mistura das culturas puras fermentativas em duas condições distintas e compará-las ao lodo granular anaeróbio pré-

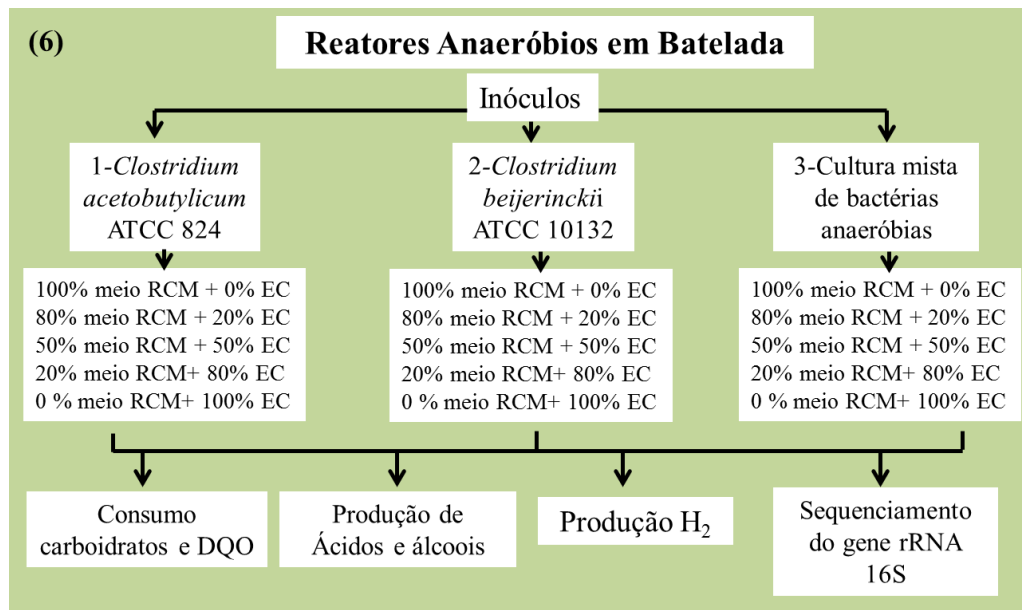
tratado termicamente. Ambos ensaios foram realizados com efluente bruto citrícola, como fonte de carbono, em reatores anaeróbios em batelada (Figura 7).

Figura 5. Fluxograma experimental: Etapas 4 e 5.



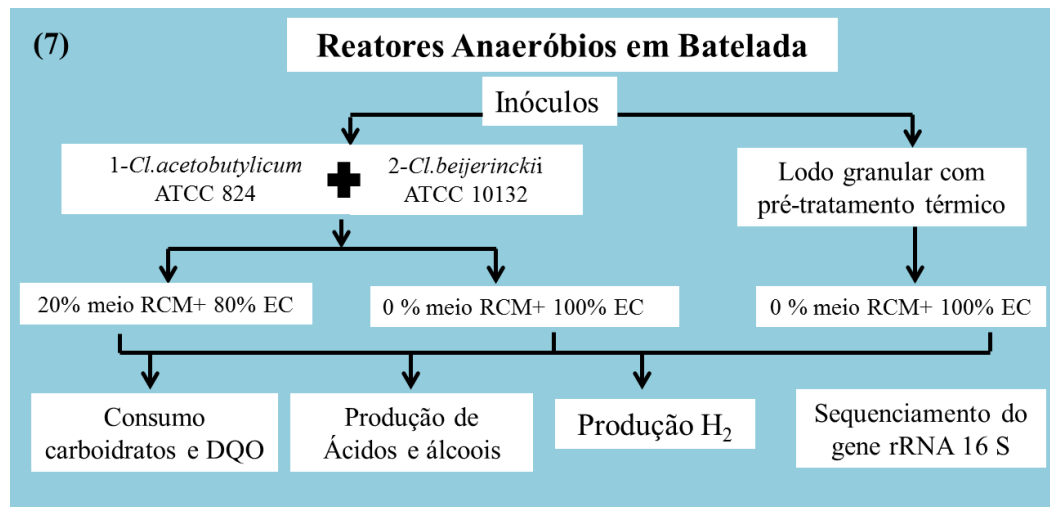
Fonte: Próprio autor

Figura 6. Fluxograma experimental: Etapa 6.



Fonte: Próprio autor

Figura 7. Fluxograma experimental: Etapas 7



Fonte: Próprio autor

4.2 Fontes de Carbono

- 4.2.1. Reagentes P.A.: glicose, maltose, frutose, xilose, sacarose, lactose, acetato de potássio, glicerina e amido solúvel.
- 4.2.2. Efluente bruto citrícola: oriundo do processamento industrial de sucos de laranja, cedido por agroindústria localizada em Araras – SP. O efluente bruto citrícola foi coletado, acondicionado em frascos plásticos lacrados, com 1L de volume e mantido a -20°C, até sua utilização. A caracterização do efluente bruto citrícola foi realizada em análises de pH, temperatura, demanda química de oxigênio total (DQO), açúcares, ácidos graxos voláteis e álcoois, descritos a seguir.

4.3. Fontes de inóculo

Os inóculos utilizados foram:

Culturas puras fermentativas: (1) *C. acetobutylicum* ATCC 824 e (2) *C. beijerinckii* ATCC 10132 cedidos pelo Laboratório de Microbiologia da UFSCar – Campus de Sorocaba – SP.

(3) cultura mista de bactérias anaeróbias obtidas a partir do efluente bruto citrícola e;

(4) lodo granular anaeróbio de reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) usado no tratamento de água residuária do abatedouro de aves (Avícola Dacar, Tietê – SP), pré-tratado termicamente (100 °C durante 15 minutos em seguida banho de gelo até atingir 25 °C), para a inibição dos microrganismos metanogênicos, de acordo com Maintinguer et al., 2008.

4.4. Etapas Experimentais

4.4.1 Etapa 1 - Obtenção da cultura mista de bactérias anaeróbias

A cultura mista de bactérias anaeróbias [inóculo (3)] foi obtida através da coleta de alíquota de 1 mL do efluente bruto citrícola e inoculado em reatores anaeróbios em batelada (100 mL), contendo 50 mL de meio de cultivo genérico PYG (Peptone, Yeast Extract, Glucose) (g L^{-1}): glicose (10,0); peptona (5,0), extrato de carne (5,0), extrato de levedura (5,0) e 50 mL de *headspace* preenchido com N_2 (99,99%), em pH inicial 7,0, mantido a 37°C (MAINTINGUER et al., 2008), sob modo estático, por 72 horas, por diluições seriais (10^{-1} a 10^{-5}). Posteriormente, foi realizado o aumento da biomassa em reatores anaeróbios em batelada (1L), em meio de cultivo genérico (meio de cultivo PYG – *Peptone Yeast Extract Glucose*), repetidas vezes, mantidos por 120 horas, nas mesmas condições descritas anteriormente, conforme descrito a seguir.

a. Condições de cultivo

As culturas puras fermentativas (1) *Clostridium acetobutylicum* e (2) *Clostridium beijerinckii* (inóculos 1 e 2) foram reativadas e mantidas a 37 °C, pH inicial 7,0, em 300 mL de meio de cultivo PYG (g L^{-1}), separadamente, em condições assépticas e anaeróbias, em reatores anaeróbios em batelada (500 mL), com *headspace* (200 mL) preenchido com N_2 (99,99%).

A seguir, o inóculo (3) foi reativado em triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (30 mL) contendo 15 mL de meio de cultivo PYG e inóculo com 0,2 g STV L^{-1} , sob fluxo de N_2 (99,99%) para manter as condições anaeróbias, pH inicial 7,0, mantidos a 37°C, por 72 horas, sob modo estático, com o objetivo de favorecer o crescimento das bactérias anaeróbias. Esse processo foi realizado repetidas vezes, até obter o volume suficiente para operação de reatores de 500 mL (250 mL de meio de cultivo), separadamente.

O inóculo (4) foi macerado e transferido, separadamente, para duplicatas de reatores anaeróbios em batelada (1000 mL) contendo 500 mL de meio de cultivo PYG sob fluxo de N_2 (100 %), no *headspace* dos reatores, durante 20 minutos, para efetuar as trocas gasosas e garantir as condições de anaerobiose, em pH inicial 7,0, mantidos a 37 °C no escuro, sob modo estático (MAINTINGUER et al., 2008), por 168 horas. A seguir, foi aplicado o pré-tratamento térmico no inóculo, mantido 100 °C durante 15 minutos. Em seguida o inóculo foi mantido em banho de gelo até atingir 25°C. O enriquecimento do inóculo 4 foi realizado em

meio de cultivo PYG, em reator anaeróbio em batelada, pH 6,0 a 37°C, por 168 horas, com o objetivo de favorecer o crescimento das bactérias anaeróbias presentes na amostra. A fase gasosa dos reatores foi coletada e analisada por cromatografia gasosa para a certificação na eficiência da inibição da metanogênese pela ausência de metano no *headspace* do reator.

4.4.2 Etapa 2: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias em reatores alimentados com diferentes fontes de carbono

Inicialmente foram realizados ensaios com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), a fim de verificar a melhor fonte de carbono para o seu crescimento. Os ensaios consistiram na operação de triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (30 mL) alimentados separadamente com: glicose, maltose, frutose, xilose, sacarose, lactose, acetato, glicerina e amido nas concentrações de 10 g L⁻¹, contendo 15 mL de meio de cultivo genérico (extrato de carne, extrato de levedura e peptona, em concentrações de 5 g L⁻¹) e cultura mista de bactérias anaeróbias (0,5 g STV L⁻¹) como fonte de inóculo, *headspace* (15 mL) preenchido com N₂ (99,99%), mantidos sob modo estático, a 37°C, pH inicial de 7,0 por 48 horas (MAINTINGUER et al., 2008). Foi mensurado o crescimento microbiano no final da operação dos reatores, por espectrofotometria (ABS 600nm), conforme APHA (2005). A geração de hidrogênio foi analisada por cromatografia gasosa, conforme (ADORNO, et al., 2014).

A seguir, para os demais ensaios realizados (etapa 3), foi utilizada glicose como fonte de carbono para os inóculos 1, 2 e 3, devido sua predominância em meios de cultivo em estudo (KHAMAISEH et al., 2012; AL-SHORGANI et al., 2016; MITRA, et al., 2017), além de ser uma das fontes de carbono contidas no efluente bruto citrícola em estudo. Foram analisados os consumos de carboidratos e a produção de ácidos e álcoois, descritos a seguir.

4.4.3 Etapa 3: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com diferentes meios de cultivo sob modo estático e a 100 rpm.

Nessa etapa experimental foi testada a influência da operação dos reatores sob modo estático e a 100rpm, em diferentes meios de cultivo, conforme descrito a seguir.

Os meios de cultivo testados foram os específicos para o Gênero *Clostridium* sp.: RCM (*Reinforced Clostridial Media*) (KHAMAISEH et al., 2012); TYA (*Tryptone, Yeast*

extract, *Acetate medium*) (AL-SHORGANI *et al.*, 2016), Mitra (MITRA, *et al.*, 2017) e PYG (*Peptone Yeast Extract Glucose*) (MAINTINGUER *et al.*, 2008), descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição meios de cultivos específicos para o Gênero *Clostridium* sp.

Reagente	Meios de Cultivo (g L ⁻¹)			
	RCM	TYA	MITRA	PYG
Glicose	30	30	10	10
Peptona	10	-	-	5
Triptona	-	6	10	-
Extrato de levedura	3	2	4	5
Extrato de carne	10	-	-	5
NaCl	5	-	-	-
Acetato de sódio	3	-	-	-
Acetato amônio	-	3	-	-
Fosfato potássio monobásico	-	0,5	-	-
Sulfato magnésio	-	0,3	-	-
Sulfato ferro	-	0,01	-	-
L-cisteína	0,5	-	1	-

Fonte: KHAMAISEH *et al.*, 2012; AL-SHORGANI *et al.*, 2016; MITRA *et al.*, 2017; MAINTINGUER *et al.*, 2008.

Reatores anaeróbios em batelada (100 mL) foram montados em triplicatas, preenchidos com os meios de cultivo (50 mL), separadamente, e *headspace* (50 mL) com N₂(99,99%), inoculados com (0,7 g L⁻¹ STV) dos inóculos (1); (2) e (3), pH inicial 6,50 mantidos sob modo estático e a 100 rpm, por 72 horas (MAINTINGUER *et al.*, 2008). Crescimento microbiano, consumo de carboidratos totais, produção de ácidos, álcoois e H₂ foram monitorados no início e no final da operação, conforme metodologias descritas no item 4.6, a seguir.

4.4.4 Etapa 4: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras na geração de hidrogênio em reatores alimentados com meio de cultivo contendo glicose

Nessa etapa experimental foi testada a influência da glicose como fonte de carbono na operação dos reatores sob modo estático, na produção de H_2 e co-produtos, conforme descrito a seguir.

Foram realizados ensaios em triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (500 mL) contendo meio de cultivo PYG (250 mL) com 10 g DQO de glicose (Tabela 1), em pH inicial 7,0, mantidos em modo estático, a 37°C por 51 horas, *headspace* (250 mL) preenchido com N_2 e 1 g L^{-1} dos inóculos (1); (2) e (3) separadamente.

Foram monitoradas as análises de produção H_2 , ácidos e álcoois, crescimento microbiano, pH e consumo de carboidratos totais, conforme metodologias descritas no item 4.5, a seguir.

4.4.5 Etapa 5: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas na geração de hidrogênio em reatores alimentados com meio de cultivo contendo efluente bruto citrícola

Nessa etapa experimental foram testados a influência do efluente citrícola como fonte de carbono na operação dos reatores, sob modo estático, na produção de H_2 e co-produtos, conforme descrito a seguir.

Foram operadas triplicatas de reatores anaeróbios em batelada (500 mL) e meio reacional (250 mL) contendo: efluente bruto citrícola (10 g DQO L^{-1}) como fonte de Carbono em meio de cultivo [(g L^{-1}) peptona (5,0), extrato de carne (5,0) e extrato de levedura (5,0)], em pH inicial 7,0, mantidos sob modo estático, a 37°C, por 51 horas, *headspace* (250mL) preenchido com N_2 e 1 g L^{-1} STV dos inóculos (1); (2) e (3), separadamente. Foram monitoradas as análises de produção biogás, ácidos e álcoois, pH e consumo de carboidratos totais, conforme metodologias descritas no item 4.7, a seguir.

4.4.6 Etapa 6: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas na geração de hidrogênio, em reatores alimentados com diferentes proporções de meio de cultivo e efluente bruto citrícola

Foram realizados testes com o meio de cultivo RCM (*Reinforced Clostridial Media*) (KHAMAISEH et al., 2012) (Tabela 1), que é específico para o Gênero *Clostridium* sp. Duplicatas de reatores anaeróbios em batelada (1L) continham meio de cultivo RCM (700

mL) e *headspace* (300 mL) preenchido com N₂ e inoculados com 1 g L⁻¹ STV dos inóculos (1), (2) e (3) separadamente, mantidos sob modo estático por 200 horas, em pH inicial de 6,0. As duplicatas dos reatores foram montadas em 5 condições distintas: (1) 100% meio de cultivo RCM; (2) 80% meio de cultivo RCM + 20% de efluente bruto citrícola; (3) 50% meio de cultivo RCM + 50% de efluente bruto citrícola; (4) 20% meio de cultivo RCM + 80% de efluente bruto citrícola e (5) 100% efluente bruto citrícola (Tabela 2). O meio de cultivo RCM continha suplementação nutricional para os inóculos. Além disso, o meio RCM foi modificado substituindo-se a glicose por efluente bruto citrícola como fonte de carbono nos ensaios. As medidas de biogás foram realizadas por deslocamento de volume, conforme metodologias descritas no item 4.5, a seguir.

Tabela 2. Condições operacionais dos reatores anaeróbios em batelada

Parâmetros	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
Meio de cultivo RCM	100%	80%	50%	20%	0%
Efluente Bruto Citrílico	0%	20%	50%	80%	100%
Inóculo (g L ⁻¹ STV)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
DQO (g L ⁻¹)	32,75	18,2	17,2	16,3	15,68
Carboidratos totais (g L ⁻¹)	21,0	1,3	2,5	3,6	4,4

4.4.7 Etapa 7 – Avaliação do lodo granular anaeróbio pré-tratado termicamente e a mistura das culturas puras fermentativas, em reatores alimentados com efluente citrícola

O inóculo 4 foi reativado previamente em reatores anaeróbios em batelada (1000 mL) contendo 500 mL de meio de cultivo PYG, *headspace* contendo N₂ (100 %) em pH inicial de 6,0, a 37°C, sob modo estático, por 168 horas.

Foram realizados 3 ensaios distintos em duplicatas de reatores anaeróbios em batelada (1L) que continham meio reacional (700 mL) e *headspace* (300 mL) preenchido com N₂ mantidos sob modo estático, em pH inicial 6,0, por 72 horas. A composição dos ensaios está descrita a seguir.

Ensaio (I): 80% efluente bruto citrícola + 20% de meio de cultivo RCM + inóculo [(1) *C. acetobutylicum* (50%) + (2) *C. beijerinckii* (50%)];

Ensaio (II): 100% efluente bruto citrícola + inóculo [(1) *C. acetobutylicum* (50%) + (2) *C. beijerinckii* (50%)];

Ensaio (III): 100% efluente bruto citrícola + lodo granular anaeróbio pré-tratado termicamente (MAINTINGUER et al., 2008).

4.5 Análises Físico-químicas e cromatográficas

As determinações de DQO, sólidos totais voláteis, pH e crescimento microbiano por espectrofotometria (ABS 600 nm) foram realizadas de acordo com APHA, AWWA, WEF (2005). Os ajustes no pH foram realizados com adições de HCl e NaOH 1M. Carboidratos totais foram determinados de acordo com Dubois et al. (1956), adaptado por Herbert, Philipps e Strang (1971).

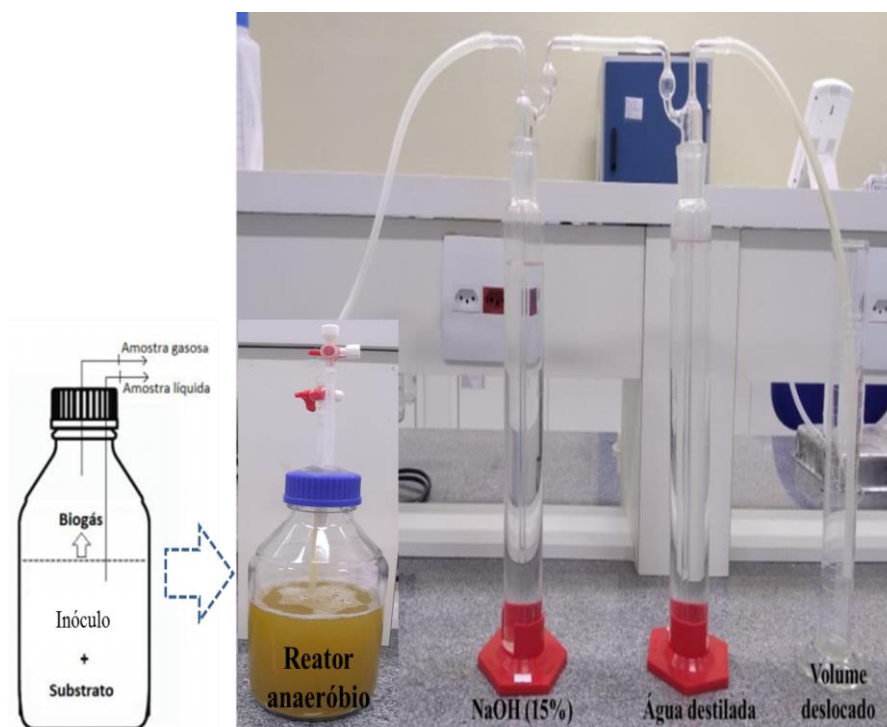
As concentrações de ácidos graxos voláteis e álcoois foram mensurados por cromatografia gasosa em dois laboratórios parceiros. Para as etapas 3, 4 e 5 foram realizados em parceria com o CEMPEQC (Centro de Monitoramento Pesquisa em Combustíveis Biocombustíveis petróleo e derivados) – Unesp IQ, utilizando um cromatógrafo Shimadzu modelo GC 2010, equipado com injetor split/splitless e detector de ionização por chama (FID) de alta frequência, configurada para amostragem líquida e *headspace*, a uma temperatura programável de PTV e detector FID a 250 °C. A temperatura do forno foi programada a 45 °C por minuto, seguido por uma rampa de aquecimento de 50 °C min⁻¹ até uma temperatura final de 250 °C, mantida por 3 min. A coluna analítica utilizada foi o RTX-1 (30 m × 0,32 mm × 3,0 µm). Hélio foi utilizado como gás de arraste 51,6 cm s⁻¹ (1 mL min⁻¹) (ADORNO, et al., 2014).

As etapas 6 e 7 das concentrações de ácidos graxos voláteis e álcoois foram realizadas no laboratório de Biosistemas para Bioenergia do Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN, Rio Claro – SP, em cromatógrafo de gás Shimadzu® GC-2030, equipado com detector de ionização de chama, amostrador automático para headspace AOC 6000 Plus e coluna HP INNOWAX (Agilent Technologies), de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme. As condições cromatográficas foram: 35 °C (0 min) 2 °C min⁻¹ 38 °C (0 min) 10 °C min⁻¹ 75 °C (0 min) 35 °C min⁻¹ 120°C (1 min) 10 °C min⁻¹ 170 °C (2 min), com aumento da temperatura final da rampa de aquecimento até 230°C por 2 minutos, totalizando

aproximadamente 17 minutos de tempo de corrida. O fluxo da coluna foi de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ com nitrogênio (N_2) como gás de arraste. O detector usou hidrogênio (H_2) a 30 mL min^{-1} com ar sintético a 300 mL min^{-1} e N_2 a 30 mL min^{-1} como gases de chama e auxiliar, respectivamente. A temperatura do detector foi de 280°C . As condições do amostrador automático utilizando seringa de $2,5 \text{ mL}$ foram: 13 minutos de incubação da amostra, a 100°C , injeção de $400 \mu\text{L}$ de amostra com a seringa a 100°C e, 3 minutos de lavagem da seringa com N_2 após cada injeção, de acordo com Adorno, Hirasawa e Varesche (2014). O software LabSolutions de solução do cromatógrafo foi usado para o tratamento dos dados.

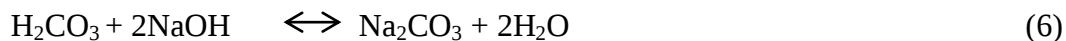
A quantificação temporal do gás hidrogênio gerado foi realizada por deslocamento de volume adaptado de Aquino et al. (2007), onde os reatores foram acoplados a um sistema de lavagem de gás contendo um frasco com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 15% para o aprisionamento de dióxido de carbono (CO_2) e Sulfeto de hidrogênio (H_2S) que poderia ser gerado e um frasco contendo água destilada. Os reatores foram conectados por meio de “agulha-mangueira” ao frasco contendo solução de NaOH ocorrendo a automática despressurização do frasco de incubação, causando o deslocamento de água do frasco posterior (Figura 8).

Figura 8. Sistema de deslocamento de volume para medidas de biogás gerado durante operação dos reatores



Fonte: Próprio autor

A solução de NaOH 15% absorve o CO₂ de acordo com as seguintes reações (Equações 5-7):



O volume de gás, representado pelo volume de água que saía do sistema, foi diretamente relacionado com a produção de H₂ e foi convertido a n° mmol de H₂ L⁻¹ a partir da equação dos gases ideais (Equação 8).

$$P = \frac{n(\text{H}_2)RT}{V} \quad (8)$$

Sendo:

P = pressão em atmosfera (1 atm);

n = número de mols da amostra gasosa;

V = volume em Litros (L)

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm*L/ mol*K);

T= temperatura em Kelvin (K)

Análises esporádicas da composição do biogás no *headspace* dos reatores operados nas etapas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foram feitas no laboratório de Biosistemas para Bioenergia no Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN, Rio Claro – SP, em cromatógrafo de gás Shimadzu® modelo GC 2014, adquirido em Projeto Regular Fapesp (Proc 2017/16795-3), equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi a Carboxen 1010 PLOT, 30 m x 0,53 mm, sendo o gás de arraste argônio ultrapuro sob fluxo de 5,00 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 230°C, respectivamente. As temperaturas da coluna foram: 120°C (1 min), 200°C (3 min), 40°C min⁻¹ e 230°C (0,5 min) 50°C min⁻¹, com o tempo total da corrida de 7,10 min.

Os dados experimentais obtidos durante os ensaios 3, 4, 5, 6 e 7 em mmol H₂ L⁻¹ foram ajustados para os valores médios obtidos das duplicatas dos reatores em batelada utilizando o software Statistica® (versão 8.0). A taxa máxima de produção de hidrogênio foi

obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificada (LAY; LI; NOIKE, 1998) (Equação 9).

$$H = P \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (9)$$

Sendo:

P = potencial de produção de hidrogênio (mmol L⁻¹ cultura),

Rm = taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol L⁻¹ cultura h),

λ = duração do início da geração de H₂ (h), e

$e = 2,718281828$.

4.6 Análises microbiológicas

4.6.1 Microscopia

Foram feitos exames microscópicos através de contraste de fase e luz comum em microscópio modelo Olympus para observação das morfologias predominantes durante a operação dos reatores anaeróbios e da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3). A captura das imagens foi realizada em câmera Moticom 2000 e software MOTIC Images Plus 2.0 em microscópio Moticom AE31, com captura de imagens, com ampliação de 1000X.

4.6.2 Quantificação de bactérias fermentativas por Técnica de *Pour Plate*

Foram realizadas quantificações de colônias de bactérias fermentativas provenientes da cultura mista (inóculo 3) em meios de cultivo específicos para os Gêneros *Clostridium* sp. (NN), *Enterobacteriaceae* sp. (DHL), *Bacteroides* sp. (NBGT), *Lactobacillus* sp. (LBS), *Streptococcus* sp. (TATAC) e *Veillonella* sp. (VS), conforme a metodologia descrita por SONG et al., (2012). As placas foram incubadas e mantidas dentro de jarra de anaerobiose e sachê de anaerobiose, a 37°C, durante 144 horas. Para assegurar a confiabilidade dos resultados, todas as diluições foram realizadas em triplicata (Tabela 3). As contagens foram realizadas manualmente.

Tabela 3. Meios de cultivo específicos para a quantificação de bactérias anaeróbias fermentativas.

NN(g L ⁻¹)	DHL(g L ⁻¹)	LBS(g L ⁻¹)
Peptona (40,0) Fosfato dissódico (5,0) Fosfato de Potássio Dibásico (1,0) Cloreto de sódio (2,0) Sulfato de magnésio (0,1) Glicose (2,0) Ágar (25,0) pH 7,6	Extrato de carne (3,0) Peptona (20,0) Sacarose (10,0) Desoxicolato de sódio (1,0) Tiosulfato de sódio (2,3) Citrato de amônio férrico (1,0) Citrato de sódio (1,0) Ágar (25,0) pH 7,4	Peptona (15,0g) Extrato de carne (2,0 g) Glicose (20,0g) Amido (0,5) Cloreto de sódio (5,0) 5% L-cisteína 10,0mL Acetato de sódio (15,0) Ácido acético (3,7 mL) Ágar (25,0) pH 7,5
NBGT (g L ⁻¹)	VS(g L ⁻¹)	TATAC(g L ⁻¹)
Peptona (10,0) Extrato de carne (5,0) Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄) (4,0) Glicose (1,5) Amido (0,5) L-cisteína (0,5) Taurocolato de sódio (1,0) Ágar (25,0) pH 7,6	Triptona (5,0) Extrato de carne (3,0) Ácido tioglicólico (CH ₂ (SH)COONa) (0,75) Tween-80 (1,0) Lactato de sódio (C ₃ H ₅ O ₃ Na) 50% (25,0 mL) Ágar (25,0) pH 7,5	Peptona (15,0) Triptona (10,0) Extrato de carne (10,0) Sacarose (1,0) Esculina hidratada (1,0) Azida de sódio (0,45) Ágar (25,0) pH 7,6

Clostridium sp. (NN), *Enterobacteriaceae* sp. (DHL), *Bacteroides* sp. (NBGT), *Lactobacillus* sp. (LBS), *Streptococcus* sp. (TATAC) e *Veillonella* sp. (VS) **Fonte:** SONG et al., (2012).

4.6.3 Análises de sequenciamento do gene rRNA 16S

Foram realizadas extrações do DNA genômico e a identificação molecular de 9 amostras, conforme descrito a seguir.

Amostra 1 - Final da operação na etapa 6 para a condição 4 (20% meio de cultivo RCM + 80% efluente citrícola), nos reatores operados com o inóculo 1;

Amostra 2 - Final da operação na etapa 6 para a condição 4 (20% meio de cultivo RCM + 80% efluente citrícola); nos reatores operados com o inóculo 2;

Amostra 3 – cultura mista de bactérias anaeróbias (Inóculo 3)

Amostra 4 - Final da operação na etapa 5, usando efluente bruto citrícola (10g DQO L⁻¹) como fonte de Carbono, nos reatores operados com o inóculo 3;

Amostra 5 - Final da operação na etapa 6 para a condição 1 (100% meio de cultivo RCM), nos reatores operados com o inóculo 3;

Amostra 6- Final da operação na etapa 6 para a condição 4 (20% meio de cultivo RCM + 80% efluente citrícola) nos reatores operados com o inóculo 3;

Amostra 7 – Final da operação da etapa 7, ensaio (I) 80% efluente citrícola + 20% de meio RCM + inóculo [(1) *C. acetobutylicum* (50%)+(2) *C. beijerinckii* (50%)];

Amostra 8 – Final da operação da etapa 7, ensaio (II) 100% efluente citrícola + inóculo [(1) *C. acetobutylicum* (50%)+(2) *C. beijerinckii* (50%)];

Amostra 9 - Final da operação da etapa 7, ensaio (III) 100% efluente citrícola + lodo granular pré-tratado termicamente.

O processo de extração do DNA foi realizado com fenol-clorofórmio como descrita por Griffiths et al., (2000) com modificações. Foi usado fenol tamponado com Tris e clorofórmio (1:1 v/v). Foram realizados testes de verificação da integridade do DNA extraído pela proporção de 260/280 nm > 1,8, medida por um fluorímetro - Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen by life technologies). A seguir, a amostra foi seca em temperatura ambiente por 24 h, em capela e, posteriormente, armazenada a -20°C até o seu envio às empresas especializadas para a identificação em Larga Escala (plataforma Illumina)

As amostras 1 a 6 foram enviadas para a empresa GENONE[®] (Rio de Janeiro-RJ, Brasil) do qual foram realizadas amplificação por PCR das amostras do DNA enviado utilizando o primer 515F (5'-barcode-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), para amplificar as regiões V4 do gene 16S RNA ribossômico por meio do GeneAmp PCR System (ABI company, USA). As amostras contendo até 300 pares de base (de acordo com o gel de agarose) foram escolhidas para as etapas seguintes. Tais amostras foram purificadas com o Kit de extração em gel Qiagen (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas geradas com o Kit NEBNext[®]Ultra[™]DNA e quantificadas via Qubit e Q-PCR, foram analisadas pela plataforma Illumina Miseq (SI et al, 2015).

As sequências tiveram os primers e *barcodes* retirados. A mescla de tais sequencias foi realizada por meio da ferramenta FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>). As sequencias de processamento foram denominadas *tags* brutas. O refinamento de tais *tags* foi realizado sob condições específicas para resultar em *tags* limpas de alta qualidade de acordo com processo de qualidade Qiime[®] (V1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html). As *tags* foram comparadas a um

banco de dado de referência (Gold Database http://drive5.com/uchime/uchime_download.html), utilizando o algoritmo UCHIME (UCHIME Algorithm, http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) para detecção de quimeras (http://www.drive5.com/usearch/manual/chimera_formation.html). Após esse processo, as sequências caracterizadas como quimeras foram removidas e as *tags* efetivas foram obtidas.

A análise das sequências foi realizada pelo software Uparse[®] (Uparse v7.0.1001 <http://drive5.com/uparse/>) utilizando todas as *tags* efetivas. Sequências com similaridade $\geq 97\%$ foram agrupadas na mesma OTU (Operational Taxonomic Unit). A sequência representativa para cada OTU foi lida por meio do software Mothur[®] apoiado na base de dados SSUrRNA do banco de dados SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) para anotação das espécies para eixo taxonômico (Threshold:0.8~1) (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie). Para obter a relação filogenética entre todas as sequências representativas das OTUs, a ferramenta MUSCLE[®] (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) foi utilizada para comparar as múltiplas sequências rapidamente. As informações sobre as abundâncias das OTUs foram normalizadas usando um número de sequências padrão correspondente à amostra com as menores sequências. Após a identificação, as sequências foram submetidas ao “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Devido à ocorrência da pandemia da covid -19, houve a necessidade da mudança de empresa para a análise de sequenciamento do gene rRNA 16S. As amostras 7, 8 e 9 foram enviadas para identificação para a empresa NGS – soluções genômicas, que procederam com o preparo das bibliotecas, seguindo as recomendações Illumina, descrito a seguir. A primeira PCR foi realizada para amplificação locus-específica. Em seguida, AMPure XP beads foram utilizadas para purificação da reação de PCR e o tamanho dos fragmentos gerados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. A segunda PCR foi realizada para ligar os barcodes do kit Nextera XT. Novas etapas de purificação da PCR e validação das bibliotecas foram realizadas. Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas, para que todas as amostras/bibliotecas fossem unidas de maneira equimolar em um único pool. Para introduzir complexidade ao sequenciamento, um controle heterogêneo, o fago *phi-X*, foi combinado com o pool de amplicons. Por fim, foi feita a desnaturação das bibliotecas e do *phi-X*, para permitir o sequenciamento.

Os primers utilizados para amplificação locus-específica de bactérias flanqueia a região locus-específica. Sequência overhang de adaptadores está incluída nos primers locus-

específicos. As sequências de adaptadores Illumina, que foram hibridizadas com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são:

Forward overhang: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

Reverse overhang: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[sequência locus-específica]

O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina Miseq, conforme descrito anteriormente, e as leituras produzidas foram de 2x250 pb.

Os dados foram analisados conforme previamente publicado por Callahan, et al., (2016a).

Primeiro, as leituras multiplexadas foram atribuídas em amostras biológicas. O programa DADA2 (CALLAHAN, et al. 2016b), um pacote de código aberto implementado na linguagem R, foi utilizado para modelagem e correção de erros de amplicons, sem a construção de OTUs. Estudos mostram que em várias comunidades simuladas, DADA2 identificaram variantes mais reais e produzem menos sequências espúrias que outros métodos (CALLAHAN, et al. 2016b). O pacote DADA2 tem um pipeline completo implementado para transformar os arquivos fastq do sequenciador em sequências de amostras inferidas, desmembradas, e sem quimeras. A filtragem de arquivos fastq foi realizada para cortar as sequências dos primers de PCR e filtrar as extremidades 3' das leituras devido ao decaimento da qualidade ($Q < 30$). Após a filtragem, as reads ficaram com um tamanho de 2 x 250 pb, mantendo a sobreposição para posterior junção das leituras e remontagem do fragmento. O algoritmo DADA2 faz uso de um modelo de erro paramétrico e cada conjunto de dados de amplicon tem um conjunto diferente de taxas de erro. O método learn Errors aprende esse modelo de erros a partir dos dados, alternando a estimativa das taxas de erro e a inferência da composição da amostra até que eles convirjam em uma solução consistente. Como em muitos problemas de aprendizado de máquina, o algoritmo deve começar com um palpite inicial, para o qual são usadas as taxas de erro máximas possíveis nesses dados (as taxas de erro se apenas a sequência mais abundante estiver correta e todo o restante for erros). Depois, a etapa de desreplicação (denoising) é realizada para se obter uma lista detalhada de sequências únicas e suas abundâncias, e produzir pontuação de qualidade de posição do consenso para cada sequência única, tomando a média das qualidades posicionais das leituras componentes.

DADA2 não cria OTUs e diferencia as variáveis de sequência relacionadas. Diferentemente de outros, esse pipeline realiza a fusão de paired-end reads após a etapa denoising. Isso ocorre porque o algoritmo de denoising do núcleo usa a relação empírica entre o índice de qualidade e as taxas de erro, atingindo maior precisão através do desmembramento antes da fusão, embora com algum custo computacional. Como a fusão ocorre após a etapa de denoising, é necessária sobreposição exata, sem mismatches, uma vez que se espera que quase todos os erros de substituição já tenham sido removidos. Em seguida, quimeras são removidas.

Após o processamento inicial dos dados de sequenciamento pelo DADA2, as taxonomias foram atribuídas a cada ASV (do inglês *Amplicon Sequencing Variants*) utilizando uma implementação do programa DADA2 do método de classificador bayesiano ingênuo para essa finalidade. A função `assignTaxonomy` toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias. O banco de dados Silva 138 foi utilizado como referência.

As classificações taxonômicas, e suas quantificações, gerados pelo DADA2 foram importados para o programa `Phyloseq` (MCMURDIE e HOLMES, 2013), também implementado no R. O pacote `phyloseq` é uma ferramenta para importar, armazenar, analisar e exibir graficamente dados complexos de sequenciamento filogenético que já foram agrupados em ASVs. Este pacote aproveita muitas das ferramentas disponíveis em R para ecologia e análise filogenética (`vegan`, `ade4`, `ape`, `picante`), enquanto também usa sistemas gráficos avançados / flexíveis (`ggplot2`) para produzir facilmente gráficos de alta qualidade. As análises de diversidade Alpha e Beta foram realizadas no pacote `phyloseq`, conforme descrito em (CALLAHAN, et al. 2016a). Foram filtradas as ASVs que não foram classificadas em pelo menos até o nível de família, e ASVs assinaladas como o mesmo gênero foram aglomeradas.

As sequências obtidas das amostras foram depositadas na base de dados NCBI, conforme descrito a seguir: SRR 14711570 (amostra 1), SRR 14711886 (amostra 2), SRR 8870613 (amostra 3), SRR 12192194 (amostra 4), SRR 14695605 (amostra 5), SRR 14712015 (amostra 6), SRR 18210441 (amostra 7), SRR 18074985 (amostra 8) e SRR 17922930 (amostra 9).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1

5.1.1 Caracterização do efluente citrícola

O efluente citrícola apresentou no início da coleta na empresa uma temperatura de 35 °C pH 11,12; 22,40 de g DQO L⁻¹, 6,22 g L⁻¹ de carboidratos totais, sólidos totais de 8,2 g L⁻¹, sólidos voláteis de 4,5 g L⁻¹, concentração inicial de ácido acético de 113,6 mg L⁻¹ e ácido butírico de 8,2 mg L⁻¹ e coloração amarronzada (visual).

O pH próximo a 11,12 foi um indicativo da probabilidade de ausência de arqueias metanogênicas, uma vez que tais microrganismos sobrevivem somente em faixas de pH próximos a 7,0 (GUO, et al., 2010). Além disso, geração de biogás foi verificado nos frascos dos resíduos recebidos pela agroindústria citrícola, através da coleta de gás gerado no recipiente e analisado em cromatografia gasosa, que provavelmente foi devido à ação de bactérias fermentativas presentes.

A determinação do pH elevado, pode estar relacionado provavelmente pelo fato do efluente tem passado por processo de tratamento com adições de alcalinizantes. Tal fato provavelmente favoreceu a manutenção de microrganismos alcalifílicos. Segundo Abbrescia et al., (2014), espécies de *Bacillus* estão entre os alcalifílicos mais encontrados frequentemente em produtos naturais e em condições de crescimento de 30 a 50 °C, em NaCl até 10%. Esta informação corrobora com pH inicial do efluente citrícola obtido da indústria, a comunidade microbiana do efluente havia presença de microrganismos alcalifílicos, além de bactérias fermentativas.

5.1.2 Obtenção e caracterização microbiológica da cultura mista de bactérias anaeróbias

A cultura mista de bactérias anaeróbias foi obtida a partir da diluição 10⁻⁵, com o crescimento da biomassa nos frascos (Figura 9).

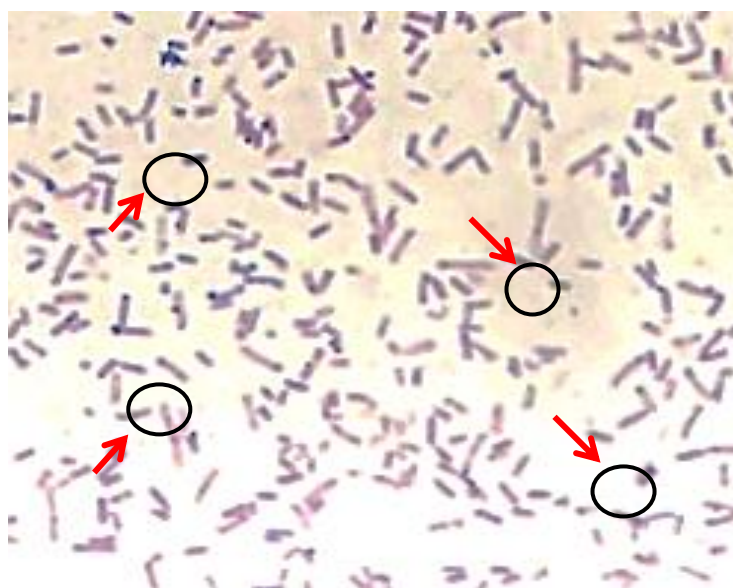
Figura 9. Crescimento em meio de cultivo genérico, após 48 horas.



Fonte: próprio autor

A morfologia da cultura mista de bactérias anaeróbias era de bacilos e cocos Gram+ (Figura 10), que é característica de microrganismos fermentativos como gênero *Clostridium* ou *Bacillus* (ETCHEBEHERE et al., 2016). Etchebehere et al. (2016) e Valdez-Vazquez; Poggi-Varaldo (2009) apontaram que este gênero de microrganismos possui potencial elevado de produção de gás hidrogênio e vários estudos com microrganismos desse gênero (ALY et al., 2018; AN et al., 2018; HAMILTON et al., 2018) corroboram o fato de que microrganismos do gênero *Clostridium* são grandes produtores de H₂. Maintinguer, et. al., (2008) operou reatores anaeróbios alimentados com sacarose e aplicados à geração de H₂, inoculados com consórcio anaeróbio advindo de lodo granular de reator UASB tratando resíduos de suinocultura pré-tratado a quente (100°C por 15 min.) e obtiveram morfologias predominantes a bacilos Gram+, como no presente estudo.

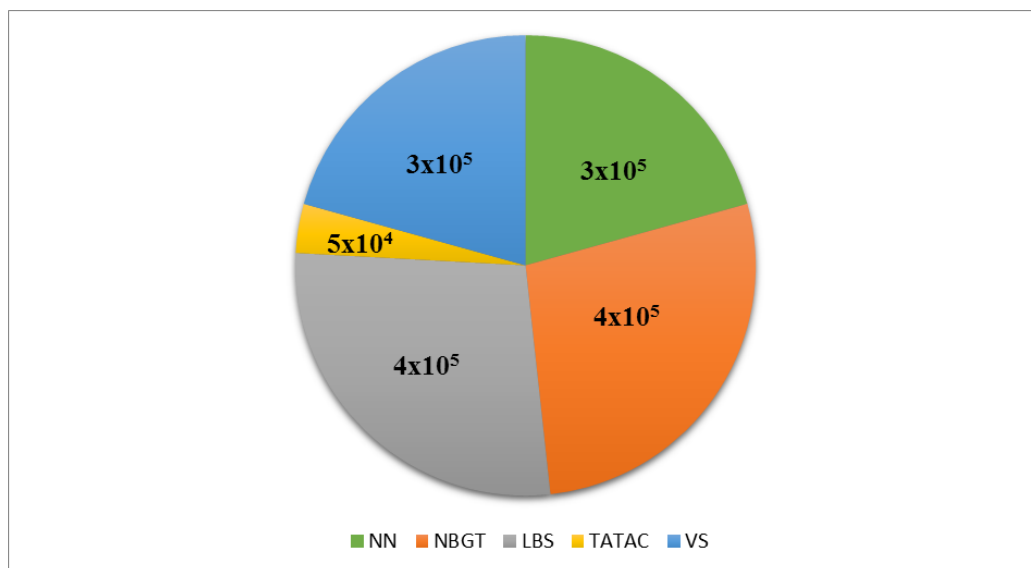
Figura 10. Microscopia do inóculo isolado do efluente bruto citrícola. Ampliação de 1000X: Setas indicam morfologias de bacilos Gram+.



Fonte: Próprio Autor

A quantificação das bactérias anaeróbias fermentativas por *pour plate* da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) em meios seletivos NN, NBGT, LBS, TATAC e VS foram respectivamente de (UFC mL⁻¹) 3×10^5 ; 4×10^5 ; 4×10^5 , 5×10^4 e 3×10^5 UFC (Figura 11). Para o meio seletivo DHL não foi verificado crescimento de colônias.

Figura 11. Quantificação de bactérias anaeróbias fermentativas por *pour plate* da cultura mista de bactérias anaeróbias



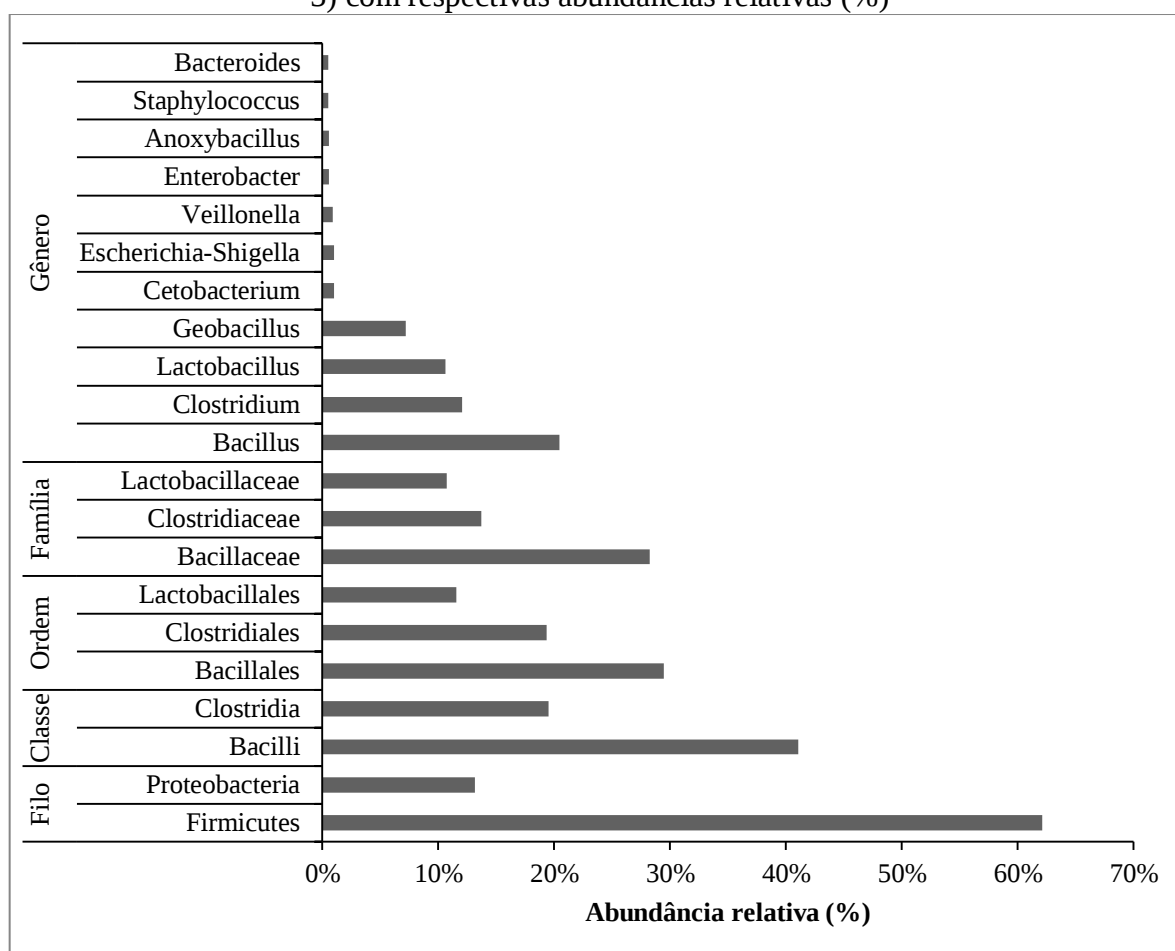
Fonte: Próprio autor

Os gêneros de bactérias tais como *Clostridium* sp.; *Bacteroides* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. e *Veillonella* sp. são envolvidas na degradação de açúcares, principalmente os advindos dos resíduos de frutas, como glicose, frutose e sacarose, que são utilizados como fontes de carbono na fermentação bacteriana (LIAKOU et al., 2018). Há uma diversidade de gêneros de bactérias fermentativas produtoras de hidrogênio descritas na literatura e as condições impostas de operação dos reatores anaeróbios, no presente estudo, provavelmente favoreceram a permanência dessas. As colônias quantificadas no presente estudo nos meios de cultivo específicos para bactérias anaeróbias estritas (NN, NBGT, VS) e facultativas (DHL, LBS e TATAC) certamente contribuíram para a conversão do substrato em metabólitos e produção de hidrogênio, conforme verificado e descrito a seguir nos ensaios realizados. Não foi verificada contagem em meio seletivo DHL para bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Provavelmente as condições experimentais, principalmente as condições de anaerobiose estrita impostas no enriquecimento da cultura mista de bactérias anaeróbias, inibiram o seu desenvolvimento (LI e FANG, 2007).

5.1.3 Identificação da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3)

A cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) apresentou abundância relativa (%) do Domínio Bactéria (99,58%) e Domínio Archaea (0,42%). Além disso, foram obtidas abundâncias relativas elevadas e distribuídas nos filos *Firmicutes* (62,15%) e *Proteobacteria* (13,5%). Verificou-se abundância relativa das ordens Clostridiales (19%), *Bacteriales* (29%), *Lactobacillales* (12%), entre outras. As principais classes identificadas foram *Bacilli* (41,05%) e *Clostridia* (19,50%), sendo consideradas como bactérias produtoras de H_2 (MAINTINGUER, et al. 2008) (Figura 12).

Figura 12. Classificação taxonômica da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) com respectivas abundâncias relativas (%)



A caracterização do efluente citrícola, principalmente o pH próximo a 11,12, provavelmente inativou o desenvolvimento de arqueias metanogênicas e favoreceu a permanência de bactérias fermentativas, conforme a presença de alcalifílicas como principal característica do *Firmicutes*, que corrobora com a sua abundância relativa de 62,15%. Esse fato era esperado, uma vez que a cultura mista de bactérias anaeróbias se originou do efluente citrícola com pH elevado, que favoreceu a esporulação de microrganismos e seu crescimento

em meio de cultivo genérico que continha nutrientes objetivando a perpetuação da diversidade de bactérias anaeróbias autóctones, selecionando microrganismos anaeróbios, destacando os gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus* com abundâncias relativas de 13,65%, 20,44% e 10,61%, respectivamente (Figura 12).

A cultura mista de bactérias anaeróbias foi enriquecida em meio genérico com substratos como glicose, peptona, triptona, extrato de levedura e as condições operacionais impostas, principalmente pH 7,0 e temperatura mantida a 37 °C, podem ter favorecido a permanência das bactérias fermentativas como as pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Geobacillus*, *Bacillus* e *Lactobacillus* que foram identificados no presente estudo. Além disso, bactérias anaeróbias dos gêneros *Clostridium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus* e *Bacillus* foram documentadas em biorreatores geradores de H₂ e álcoois, principalmente etanol. Microrganismos do gênero *Clostridium* são bactérias anaeróbias estritas, formadoras de endósporos. Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem forma de bastonetes, Gram-positivas, anaeróbias estritas ou facultativas, catalase positivas, produtoras de endósporos e de muitas enzimas, algumas tóxicas. Entretanto os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* têm sido documentadas como produtoras biológicas de H₂ e álcoois a partir de substratos como glicose, sacarose, xilose e glicerol, entre outros (LERTSRIWOG, et al 2020 e RODRIGUES et al. 2020). Camargo et al., (2021), verificaram a produção de H₂ com resíduos lignocelulósicos de citros e obtiveram abundâncias relativas do gênero *Clostridium* (79,78%) como no presente estudo, além de outros gêneros como *Coprothermobacter* (4,32%), *Defluviitoga* (4,36%), *Fervidobacterium* (2,93%), *Fluviicola* (5,01%), *Marinospirillum* (2,75%), *Pseudomonas* (2,14%) e *Sulfirimonas* (11,68%). Tais diferenças observadas com o presente estudo, provavelmente se deveram ao tipo de resíduo utilizado e às condições de cultivo.

As bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus* possuem morfologias de bacilos gram-positivos, fermentativas com capacidade de produzir ácido lático a partir de carboidratos. Podem coexistir em biorreatores anaeróbios com microrganismos produtores de H₂ como *Clostridium* e *Bacillus*. Além disso, *Lactobacillus* podem gerar bacteriocinas que inibem as bactérias fermentativas (KAWAGOSHI, et al.2005 e SANTIAGO, et al. 2019). Mazareli, et. al., (2019) avaliaram a produção fermentativa de hidrogênio, a partir de resíduo de banana utilizando consorcio de bactérias mesofílicas e observaram predomínios de bactérias fermentativas pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Lactobacillus*, como verificado no presente estudo e associadas principalmente a hidrólise e produção de hidrogênio. Entretanto no presente estudo e no trabalho de Mazareli, et al. (2019),

Lactobacillus esteve presente e provavelmente auxiliou nos processos fermentativos verificados.

O gênero *Geobacillus* é composto por bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas, formadoras de endósporos, em forma de bacilos. Podem crescer na faixa de temperatura de 35 - 75°C e faixa de pH ideal de 6,0-8,5. São capazes de utilizar carboidratos, ácidos orgânicos, peptona, triptona, extrato de levedura e consequentemente, gerar enzimas (proteases, lipases e amilases), acetato, etanol, lactato, isobutanol, bacteriocinas, etc. (NOVIK et al. 2019). Além disso, *Geobacillus* são capazes de produzir ou estimular a síntese de alguns biocombustíveis, principalmente etanol e nenhuma referência sobre a produção de H₂ foi documentada. No entanto, investigações da função de *Geobacillus* nestes processos anaeróbios tiveram início recentemente (SANTIAGO, et al. 2019). Foi identificado a presença deste microrganismo na amostra da cultura mista de bactérias anaeróbias, comprovando o potencial desta cultura mista para a produção de etanol.

5.2 Etapa 2: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias em reatores alimentados com diferentes fontes de carbono

A cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) cresceu em glicose, lactose, maltose, frutose, sacarose e xilose, separadamente. A produção de H₂ foi observada nos reatores alimentados com glicose (2,1 mmol L⁻¹), sacarose (2,7 mmol L⁻¹) e frutose (2,6 mmol L⁻¹). Não foi observado crescimento ou geração de H₂ nos demais meios de cultivo contendo acetato, glicerina e amido como fontes de carbono. Provavelmente, a cultura mista de bactérias anaeróbias proveniente do efluente bruto citrícola estava adaptada ao consumo frutose, glicose e sacarose, que são os principais açúcares presentes no processamento industrial do suco de laranja, do que nos demais substratos testados (Tabela 4). Maintinguer et al., (2017), testaram diversas fontes de carbono com cepas do gênero *Enterobacter*, isoladas de efluentes de cervejaria, e obtiveram crescimento expressivo em glicose e xilose como substratos, com gerações de H₂. Fonseca et al., (2016) isolaram bactérias fermentativas de um reator UASB no tratamento de efluentes de usina sucroalcooleira e verificaram crescimento e produção de H₂ da cepa isolada em glicose, galactose, como no presente estudo.

Tabela 4. Caracterização nutricional e geração de H₂ com cultura mista de bactérias anaeróbias

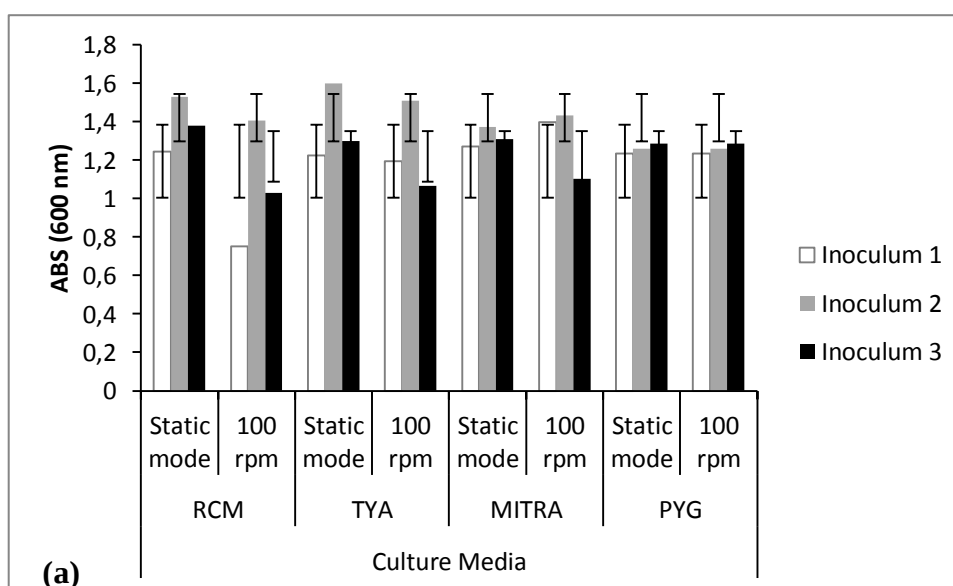
	Glicose	Sacarose	Frutose	Lactose	Maltose	Xilose	Glicerol	Amido	Acetato
Crescimento ABS 600nm	+	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₂ mmol.L ⁻¹	+	+	+	-	-	-	-	-	-

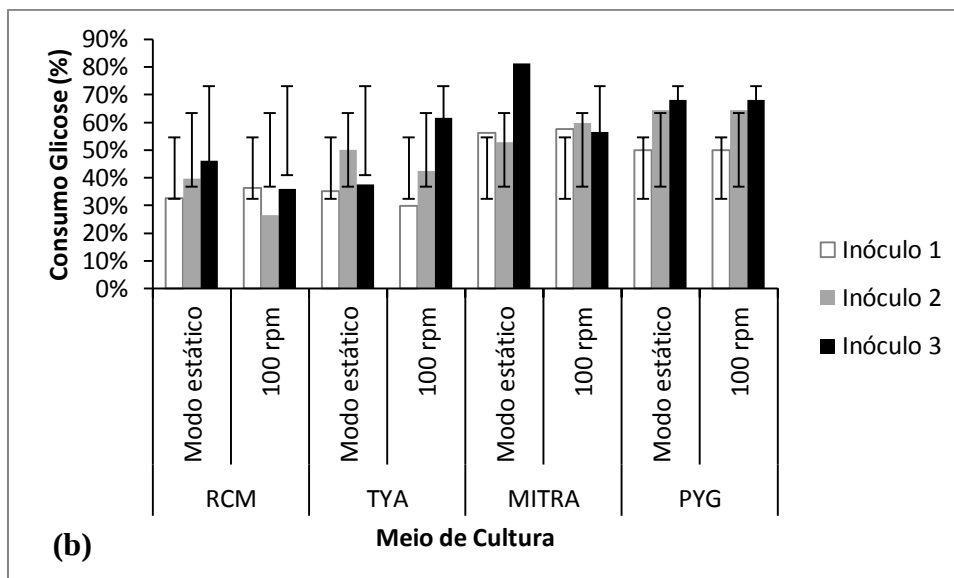
Crescimento e hidrogênio avaliado após 48 hs; temperatura de incubação: 37°C; concentração substrato 10 g L⁻¹, em meio de cultivo genérico (PYG) em pH 7,0 (MAINTINGUER et al., 2008)

5.3 Etapa 3: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com diferentes meios de cultivo sob modo estático e agitação

Foi verificado que os inóculos (1, 2 e 3) cresceram nos reatores operados sob modo estático e a 100 rpm. No entanto, o crescimento da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) foi mais elevada nos reatores operados sob modo estático, em meios de cultivo RCM, MITRA e TYG do que a 100 rpm. Além disso, nos reatores alimentados com meio de cultivo PYG, não houve diferenças entre o modo estático e a 100 rpm (Figura 13).

Figura 13. Operação de reatores anaeróbios em batelada preenchidos com meios de cultivo RCM, TYA, MITRA e PYG com os inóculos 1, 2 e 3, operados sob modo estático e a 100 rpm: (a) Crescimento bacteriano e (b) Consumo de glicose.





O consumo de glicose com meio de cultivo PYG foi semelhante nos reatores operados sob modo estático e a 100 rpm, para todos os inóculos, e variaram de 50% a 70% de suas concentrações iniciais (Figura 13b). Maiores consumos de glicose foram observados em reatores operados com cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), do que nos reatores com culturas puras (inóculo 1 e 2), em meios de cultivo RCM, TYA, MITRA e PYG. Além disso, o consumo de glicose não foi total em nenhuma das condições operacionais testadas e variaram de 40% a 80% das suas concentrações iniciais. Fonseca et al., (2019), testaram *C. beijerinckii* Br21, isolado de uma estação de tratamento de efluentes de vinhaça de cana-de-açúcar, em pH inicial 6,8, em triplicatas de reatores anaeróbios alimentados com 54,4 mmol de glicose L⁻¹ (9,8 g L⁻¹) e os autores não obtiveram o consumo total desse substrato, que foi de 70%, conforme verificado no presente estudo. Da mesma forma, Fonseca et al., (2020), avaliaram o crescimento de *C. beijerinckii* Br21 em meios de cultivo RCM e TYA com xilose (0,754 e 0,844 g L⁻¹) e obtiveram 10,5% e 14,8% de consumo do substrato, respectivamente, após 50 horas de fermentação. No presente estudo, utilizando glicose como fontes de carbono foram obtidos consumos superiores a 40% sob modo estático para todos os inóculos testados. (Figura 13b).

O pH inicial 7,0 sofreu alterações ao final da operação dos reatores alimentados com os diferentes meios de cultivo e ficou na faixa de 4,7 a 4,9, confirmando a ocorrência da fase acidogênica, com a formação de ácidos acético e butírico, etanol e butanol (AL-SHORGANI, et al., 2018) (Tabela 5).

Tabela 5. Produtos intermediários gerados no final da operação de reatores anaeróbios sob modo estático com os inóculos 1, 2, 3 e meios de cultivo: RCM; PYG; TYA; MITRA.

Meio de cultivo	Inóculos	Etanol mg L ⁻¹	Ácido acético mg L ⁻¹	Butanol mg L ⁻¹	Ácido Butírico mg L ⁻¹
RCM	1	10,7±2,1	409,8±19,4	17,0±9,3	8,4±0,7
	2	1301,0±7,5	450,4±12,5	2,7±7,1	8,7±0,4
	3	52,3±4,9	390,3±13,3	-	8,4±0,7
PYG	1	22,9±3,9	246,5±9,4	31,3±8,3	8,1±1,4
	2	18,0±1,4	201,1±7,1	306,9±13,8	8,8±1,1
	3	1571,8±9,4	146,3±7,3	-	8,7±1,4
TYA	1	13,7±1,7	110,2±9,7	-	9,0±0,7
	2	34,8±2,2	314,5±17,2	611,6±10,8	8,8±0,9
	3	52,1±2,1	374,9±19,2	-	8,3±0,9
MITRA	1	-	178,0±11,2	9,2±11,3	8,3±1,8
	2	-	178,6±10,6	10,1±15,3	8,9±0,9
	3	1434,8±12,8	177,7±12,2	-	9,5±1,3

Os reatores operados com o inóculo 1 mantiveram geração elevada de ácido acético para os diferentes meios de cultivo, sob diferentes modos de operação. De acordo com Guerrero et al., (2021), quando a glicose é utilizada como substrato, na fase acidogênica, acetil-CoA pode ser completamente metabolizado para a formação exclusiva de ácido acético, provavelmente ocorrido no presente estudo. A produção de ácidos orgânicos provavelmente causou um processo degenerativo, afetando seus estados fisiológicos levando à geração de cepas sem capacidade de esporulação. Essa propriedade incomum é conhecida como degeneração, permitindo que as células permaneçam em uma fase acidogênica, o que levaria a gerações elevadas de ácido acético para todas as condições testadas com o inóculo 1 (GUERRERO, et al. 2021) (Tabela 5 e Tabela 6).

Butanol foi obtido nos reatores operados com inóculo 2, em meios de cultivo PYG e TYA, sob modo estático e a 100 rpm. Produções mais elevadas foram alcançadas com os meios de cultivo TYA (611,6 mg L⁻¹ e 639,4 mg L⁻¹ sob modo estático e a 100rpm, respectivamente) e PYG (306,9 mg L⁻¹ e 314,5 mg L⁻¹, sob modo estático e a 100 rpm, respectivamente) (Tabela 5 e 6).

Tabela 6. Produtos intermediários gerados no final da operação de reatores anaeróbios a 100 rpm com os inóculos 1, 2, 3 e meios de cultivo: RCM; PYG; TYA; MITRA

Meio de cultivo	Inóculos	Etanol mg L ⁻¹	Ácido acético mg L ⁻¹	Butanol mg L ⁻¹	Ácido Butírico mg L ⁻¹
RCM	1	-	435,9±12,7	13,7±2,8	8,4±0,7
	2	33,3±2,1	360,6±8,2	22,5±2,1	8,2±1,4
	3	60,3±2,1	288,9±7,1	-	8,9±0,7
PYG	1	22,9±4,9	246,5±0,7	31,3±1,4	8,1±0,7
	2	18,0±1,4	201,1±2,1	306,9±2,1	8,8±0,7
	3	1571,8±4,9	146,3±2,1	-	8,7±1,4
TYA	1	-	425,5±19,1	-	9,6±0,7
	2	18,2±1,4	303,3±4,9	639,4±7,1	8,3±1,4
	3	42,0±1,4	119,9±1,4	-	8,5±2,1
MITRA	1	-	180,5±3,5	-	8,6±1,4
	2	-	200,6±4,2	20,3±2,1	8,6±1,4
	3	628,1±4,9	256,0±2,8	-	9,1±0,7

Foi observado produção de metabólitos com o meio de cultivo RCM e inóculo 2, sob modo estático, em concentrações mais elevadas de etanol (1301,0 mg L⁻¹), enquanto na condição 100 rpm foi verificada produção de ácido acético (360,6 mg L⁻¹). Os clostrídios solventogênicos normalmente reabsorvem os ácidos acético e butírico, gerados durante a etapa de acidogênese, para produzir acetona, butanol e etanol (AL-SHORGANI et al., 2020). No entanto, algumas cepas podem perder a capacidade de reabsorver esses ácidos ou gerá-los em concentrações mais reduzidas. Portanto, ácidos orgânicos podem ter sido acumulados nos reatores operados a 100 rpm, como observado no presente estudo (Tabela 6), com gerações mais elevadas de ácido acético. Esse comportamento atípico de cepas de *Clostridium* solventogênico pode estar relacionado à perda do gene responsável pela solvanteogênese, como acetil-CoA acetiltransferase, acetoacetato descarboxilase e butirato quinase (AL-SHORGANI et al., 2020). Provavelmente, a condição operacional imposta de 100 rpm promoveu essa alteração na rota metabólica.

Para o inóculo 3, com a presença de concentrações mais reduzidas de glicose, como imposto nos meios de cultivo Mitra (10 g L⁻¹) e PYG (10 g L⁻¹), foram favorecidas produções de etanol sob modo estático e a 100 rpm. Já para os meios de cultivo RCM e TYA, cujas concentrações de glicose foram mais elevadas (30 g L⁻¹), houve uma produção expressiva de ácido acético nos reatores sob modo estático e a 100 rpm. Esses resultados evidenciaram a

alteração da rota metabólica, para o inóculo 3 em diferentes meios de cultivo e em diferentes concentrações de glicose (Tabelas 5 e 6).

O pH é um fator bastante importante durante a fermentação ABE (acetona-butanol-etanol), influenciando diretamente o metabolismo microbiano. Contudo, na fase acidogênica ocorre a formação dos ácidos acético e butírico. Consequentemente a queda do pH celular acaba desencadeando a segunda fase de crescimento, a solventogênese (LEE, et al. 2008). Esta fase consiste na transição para a fase de crescimento estacionário e na assimilação dos ácidos com formação concomitante de solventes (acetona, n-butanol e etanol) (LÜTKE-EVERSLÖH e BAHL, 2011). Estes fatos não ocorreram nos reatores operados sob modo estático para todos os meios de cultivo testados. Além disso, foram verificados 450 mg ácido acético L⁻¹ para inóculo 2 em meio de cultivo RCM e de até 9,5 ácido butírico mg L⁻¹, com inóculo 3, em meio de cultivo MITRA. Álcoois foram gerados: 1571,8 mg etanol L⁻¹ com inóculo 3, em meio de cultivo PYG e 611,6 mg butanol L⁻¹ com inóculo 2, em meio de cultivo TYA. Dessa forma, o pH teve efeito sobre a produção de ácidos e álcoois, em pH 4,8 nos reatores operados, com diferentes meios de cultivo, em 72 horas de operação. Dependendo do pH, o deslocamento das fases de acidogênese para solventogênese pode ocorrer, em meios de cultivo com cepas de *Clostridium*. Além disso, pH inferior a 5,0 parece ser o ideal para produção de acetona e butanol (MONOT et al., 1984; AL-SHORGANI et.al., 2018). Entretanto, espécies produtoras de etanol sobrevivem em ampla faixa de pH de 3,5 a 9,0 (SILVA et.al., 2018). Tais informações corroboraram com os resultados obtidos no presente estudo, onde foram verificadas produções de etanol e butanol em faixas de pH 4,8 além da ausência de acetona.

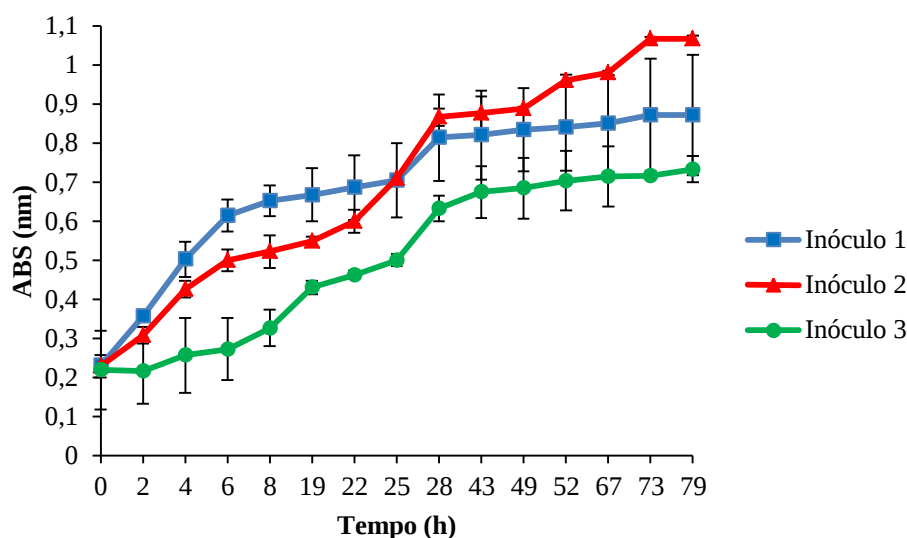
De posse dos resultados, o planejamento para os ensaios posteriores foi com adições do efluente bruto citrícola ao meio reacional, com monitoramento da produção de H₂, ácidos e álcoois, além da manutenção dos reatores sob modo estático, descritos a seguir.

5.4 Etapa 4: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com meio de cultivo contendo glicose

O crescimento da biomassa ocorreu de forma similar para os três inóculos testados. Foi observada fase lag de 2h, para o inóculo 3, indicando a adaptação da biomassa ao meio de cultivo. Nas primeiras horas da fermentação, as bactérias consomem o substrato para o crescimento celular. Após a fase lag, com o inóculo 3, iniciou-se o crescimento exponencial, fase em que ocorre a multiplicação da população microbiana e a produção de produtos como

ácidos e álcoois (HALLENBECK, LAZARO e SAGIR, 2019). A partir de 49 h foi iniciada a fase estacionária dos inóculos testados. Apesar dos inóculos iniciarem com a mesma concentração de biomassa, as culturas puras tiveram um crescimento superior ao inóculo 3, além de não apresentarem a fase lag, partindo do crescimento exponencial até a estabilização (Figura 14).

Figura 14. Crescimento dos inóculos (1) *C. acetobutylicum*; (2) *C. beijerinckii* e (3) cultura mista de bactérias anaeróbias em glicose.



Os consumos de carboidratos foram de 50%, 64% e 68%, para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores de DQO inicial e final não tiveram alterações significativas e variaram de 28,7 para 23,0 g L⁻¹ (inóculo 1) e de 26,3 para 25,03 g L⁻¹ (inóculos 2 e 3).

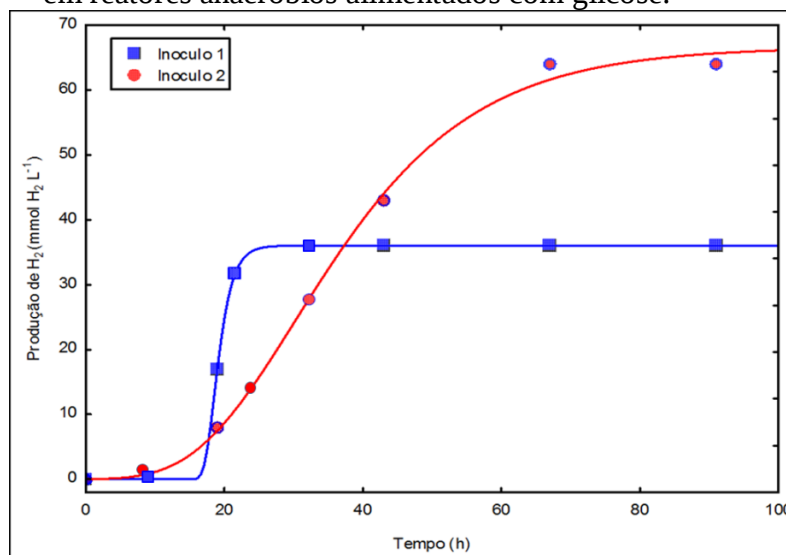
A rota metabólica da glicose em processos fermentativos acontece com geração de H₂ na fase gasosa e produtos intermediários como etanol, butanol, acetato, butirato podem ser produzidos no metabolismo oxidativo da glicose (SHINTO et al., 2008) na fase líquida, conforme descrito anteriormente. Isto sugeriu que houve uma transformação do substrato inicial (glicose) a outros compostos orgânicos na fase líquida, causando a manutenção da DQO ao longo dos ensaios. Além disso, como não foi verificada a geração de metano nas análises cromatográficas, certamente, a ausência de microrganismos consumidores desses metabólitos como arqueias metanogênicas foi a principal causa da manutenção da DQO no meio líquido.

Não foi verificada geração de hidrogênio nos reatores operados com o inóculo (3). Entretanto, nos reatores com as culturas puras (inóculos 1 e 2), foram verificadas gerações de 36,8 mmol H₂ L⁻¹ e 64,1 mmol H₂ L⁻¹, respectivamente. Pelo ajuste sigmoidal da função de

Gompertz modificada, os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H_2 (λ), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), foram respectivamente para os inóculos 1 e 2: $\lambda = 17,13$ e $15,85$ horas; $P = 36,8$ e $64,1$ $mmol\ H_2\ L^{-1}$; e $R_m = 9,12$ e $1,69$ $mmol\ H_2\ L^{-1}\ h^{-1}$. Os coeficientes de determinação (R^2), obtidos pelo tratamento estatístico [(1) 0,997 e (2) 0,998], reforçam que o modelo adotado representou os dados obtidos experimentalmente (Figura 15).

O inóculo 2 (*C. beijerinckii*) obteve a produção de hidrogênio mais elevada de $64,1$ $mmol\ H_2\ L^{-1}$ comparado ao inóculo 1 (*C. acetobutylicum*) de $36,8$ $mmol\ H_2\ L^{-1}$. Em relação ao consumo de carboidratos, os percentuais foram de $36,8$ e $64,1\%$ para os inóculos 1 e 2, respectivamente. Além disso, os consumos mais elevados de glicose e geração de hidrogênio ocorreram nos reatores com o inóculo 2 (Figura 15).

Figura 15. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (■) e 2 (●) em reatores anaeróbios alimentados com glicose.



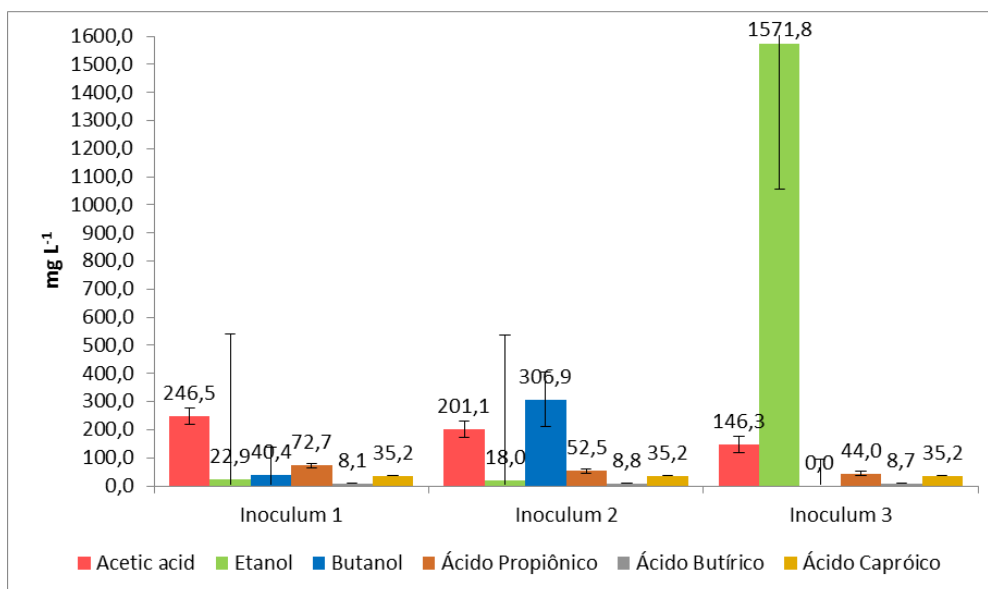
No presente estudo foi verificado a produção de butanol e etanol em ambas as culturas puras testadas, com destaque para *C. beijerinckii*, (inóculo 2) na produção de butanol ($339,5$ $mg\ L^{-1}$) e *C. acetobutylicum* (inóculo 1) na geração de etanol ($22,9$ $mg\ L^{-1}$), confirmando a habilidade de tais espécies na fermentação de tais co-produtos, com vias metabólicas que permitem a conversão espontânea de açúcares em solventes (NANDA et. al., 2017; NDABA, CHIYANZU, MARX, 2015). (Tabela 7).

O produto intermediário gerado nos reatores anaeróbios alimentados com glicose inóculos (1, 2 e 3), em concentrações mais elevadas foi ácido acético ($mg\ L^{-1}$) ($246,5$; $201,1$ e $146,3$), respectivamente. (Tabela 7, Figura 15).

Tabela 7. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores operados com glicose para os inóculos 1, 2 e 3.

Tempo (h)	Ác. Acético (mg L⁻¹)	Etanol (mg L⁻¹)	Butanol (mg L⁻¹)
Inóculo 1			
0	-	-	-
2	129,28±15	-	-
4	182,5±80	-	-
19	136,7±30	-	-
22	110,2±0	-	-
43	150,7±15	22,9±0	40,4±0
52	178,6±23	-	31,3±0
67	246,5±192	-	-
Inóculo 2			
0	-	-	-
2	117,1±2	-	-
4	134,7±15	-	-
19	119,3±6	-	-
22	145,9±50	13,9±8	-
43	189,3±21	15,0±5	339,5±0
52	219,5±30	18,2±10	182,4±149
67	201,1±15	18,0±6	306,9±0
Inóculo 3			
0	-	-	-
2	114,4±3	-	-
4	118,2±0	-	-
19	118,5±0	31,6±25	-
22	130,8±10	799,9±35	-
43	144,1±9	1514,1±243	-
52	133,2±7	1404,3±23	-
67	146,3±33	1571,8±295	-

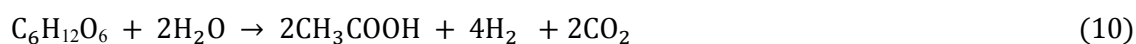
Figura 15. Concentrações máximas dos produtos intermediários nos reatores anaeróbios alimentados com glicose, para Inóculos 1, 2 e 3.



Após 22 horas de operação, foi detectado butanol em concentrações de 40,4 mg L⁻¹ e 339,5 mg L⁻¹ para os reatores operados com os inóculos 1 e 2, respectivamente. Gerações reduzidas de etanol foram observadas após 19 horas de operação, em respectivamente 22,9 e 18,2 mg L⁻¹ para os inóculos 1 e 2. Com 19 horas de operação ocorreu o acúmulo de ácido butírico em 22,0 e 12,8 mg L⁻¹ nos reatores com inóculos 1 e 2, respectivamente. Entretanto, após tal período, a concentração de ácido butírico diminuiu para até 8,1 mg L⁻¹. Provavelmente tal ácido foi consumido para a formação de butanol. De acordo com Al-Shorgani, et al. (2018) a produção de butanol na fase solventogênica inicia-se com a diminuição do ácido butírico, conforme verificado nos ensaios realizados (Tabela 7).

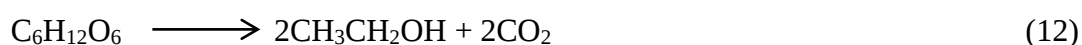
A produção de ácido acético relaciona-se diretamente com a produção de hidrogênio, a partir de glicose, sendo este ácido produzido na acidogênese. A produção de hidrogênio iniciou-se a partir das 19 h de operação dos reatores para os inóculos 1 e 2. A produção de ácido acético foi crescente como o inóculo 2 e decréscimo no inóculo 1, mostrando o consumo de glicose com gerações de ácido acético e hidrogênio (Tabela 7) (Equação 10).

Nos reatores operados com cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), foi confirmada a rota metabólica de consumo de glicose a etanol e ácido acético, sem a geração de H₂ (Tabela 7, Figura15) (Equação 11).





A geração mais elevada de butanol nos reatores operados com as culturas puras (inóculos 1 e 2) se deveu, provavelmente ao fato de serem microrganismos específicos para a produção deste álcool (NANDA, et al., 2017). No reator operado com o inóculo 3 foram verificadas concentrações de etanol de 1571,8 mg L⁻¹, com 67 horas de operação (Tabela 7). Esse resultado pode ser explicado pela ausência de H₂, onde a rota metabólica foi favorecida para a geração deste álcool (AL-SHORGANI, et al., 2017), conforme equação 12 (AMORIM, SADER e SILVA 2014).



Diversas rotas metabólicas podem ocorrer na fermentação da glicose, em diferentes produtos, no metabolismo de *C. acetobutylicum*. Segundo Lütke-Eversloh e Bahl (2011), *C. acetobutylicum* pode gerar vários metabólitos na fermentação como, por exemplo, ácido acético, butírico e láctico na fase acidogênica, além de etanol e butanol na fase solventogênica, respectivamente. Neste estudo foi verificada a diversidade de produtos gerados a partir da glicose presente no efluente bruto citrícola. Várias rotas metabólicas foram verificadas, com os inóculos testados, na geração de metabólitos tais como H₂, CO₂, acetato, butirato, butanol e etanol.

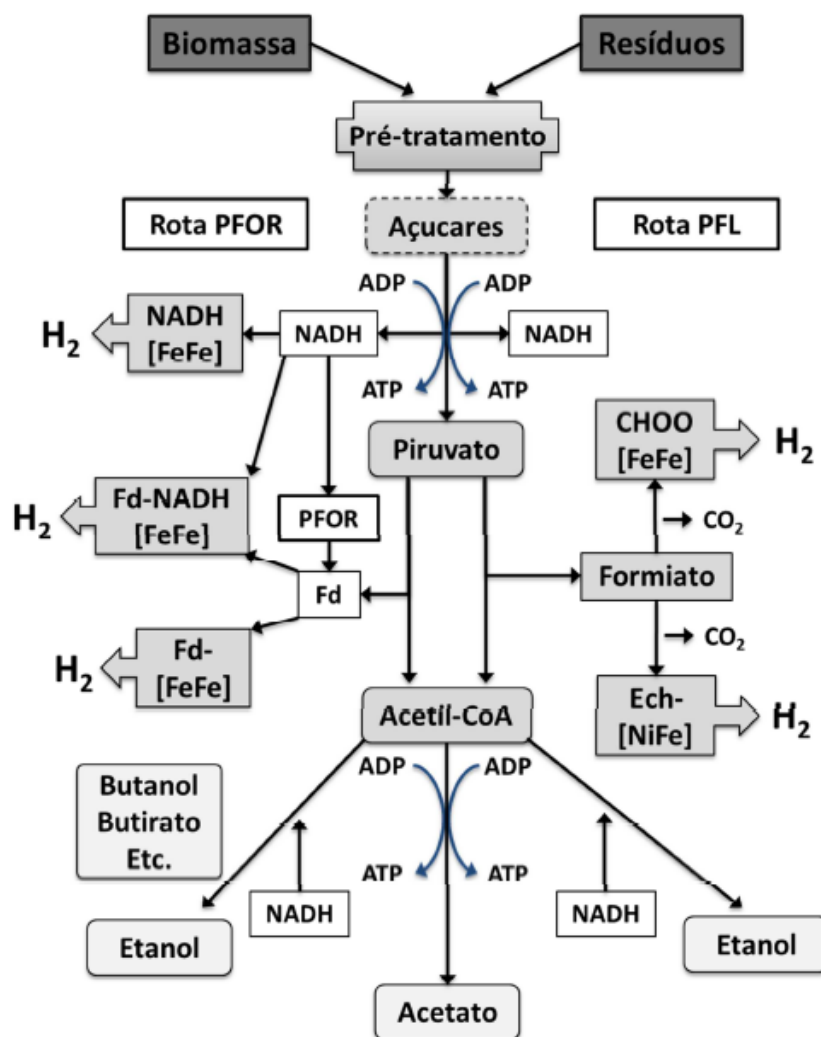
C. acetobutylicum e *C. beijerinckii* podem gerar três principais co-produtos a partir de fontes de carbono como a glicose: ácidos orgânicos (ácido acético e ácido butírico); solventes (acetona, etanol e butanol) e; biogás (dióxido de carbono e hidrogênio) na fermentação ABE em duas fases distintas; acidogênese e solventogênese (XUE, et al., 2017). A fermentação sofre primeiramente uma fase (1) acidogênica onde os ácidos são produzidos juntamente com o crescimento celular; (2) solventogênese, onde o crescimento é interrompido e os ácidos são convertidos em solventes (BHARATHIRAJA, et al., 2017). Além disso, alguns estudos mostraram que a mudança de acidogênese para solventogênese pode ser desencadeada se o pH for inferior a 5 (LI et al., 2014b), conforme descrito anteriormente. Nos resultados obtidos foi verificada a perpetuação da fase de acidogênese pela produção de hidrogênio e na fase solventogênese pela produção de butanol com as culturas puras (inóculos 1 e 2). Contrariamente, a fase de solventogênese foi estabelecida com gerações elevadas de etanol, nos reatores operados com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3).

Na rota metabólica a partir de resíduos lignocelulósicos que contêm glicose podem ser verificadas produções de hidrogênio e butanol. Entretanto, HALLENBECK, ABO-

HASHESH e GHOSH, (2012) verificaram que somente um terço desses substratos foi usado para a produção de hidrogênio. Os dois terços restantes foram convertidos na formação de outros produtos da fermentação como o acetato, butirato, formiato, etanol, butanol, acetona, além da sua utilização para o crescimento celular. Tal ocorrência na rota metabólica da glicose foi verificada nos reatores anaeróbios operados com as culturas puras (inóculos 1 e 2), descrito a seguir. Nos reatores operados com os inóculos 1 (*C. acetobutylicum*) e 2 (*C. beijerinckii*) foram verificadas produções elevadas de hidrogênio ($36,8 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ e $64,1 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) e de butanol ($40,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $339,5 \text{ mg L}^{-1}$), em 43 h de operação, conforme descrito anteriormente. Com ambos inóculos não houve a produção de acetona, mostrando que a rota da fermentação ABE favoreceu a utilização de acetato e butirato pela via butiril-CoA em butanol (NDABA, et al., 2015) (Figura 16).

É importante salientar que *C. acetobutylicum* possui um metabolismo bifásico. Ou seja, durante o seu crescimento são gerados principalmente os ácidos acético e butírico na fase exponencial, enquanto a acetona e o butanol são formados na fase estacionária (LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011). Nas vias metabólicas de produção de hidrogênio e butanol, o açúcar é quebrado a piruvato gerando ATP e NADH (Figura 16). Durante acúmulo de ácidos orgânicos da acidogênese, o pH diminui, devido a troca metabólica da acidogênese para a solventogênese. Nesta segunda fase, os ácidos são re-assimilados para produzir acetona, butanol, etanol, hidrogênio e dióxido de carbono, como os principais produtos (NDABA, et. al., 2015). A utilização de acetato e butirato ocorre pela via acetoacetil-CoA com a formação de acetona. Entretanto, etanol e butanol foram formados pela via Butiril-CoA (LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011), sem a geração de acetona no presente estudo (Figura 16).

Figura 16. Vias metabólicas envolvidas na produção de hidrogênio e butanol a partir de resíduos lignocelulósicos por biomassa fermentativa

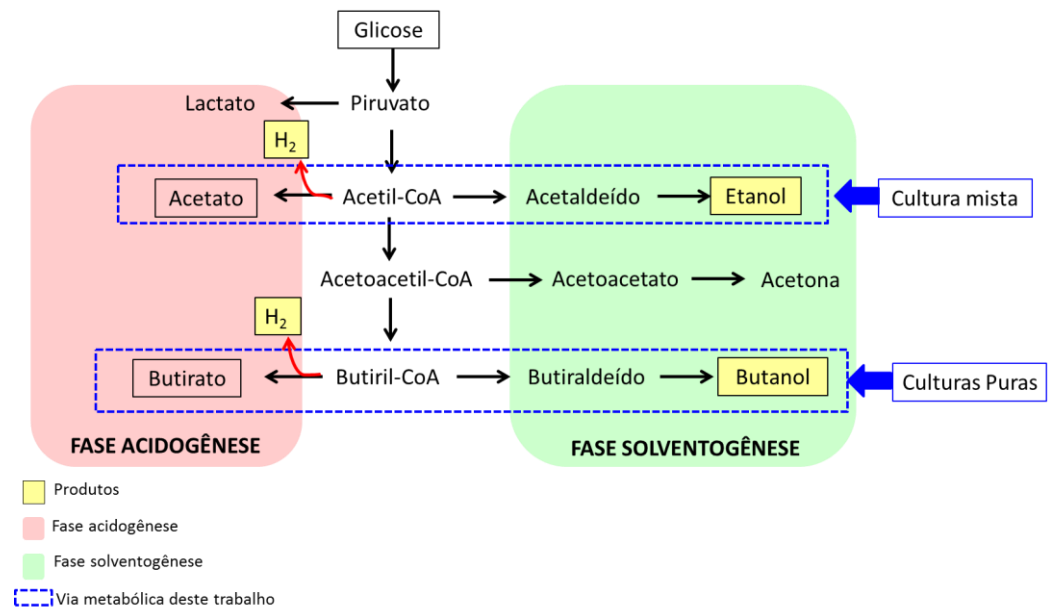


Fonte: (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).

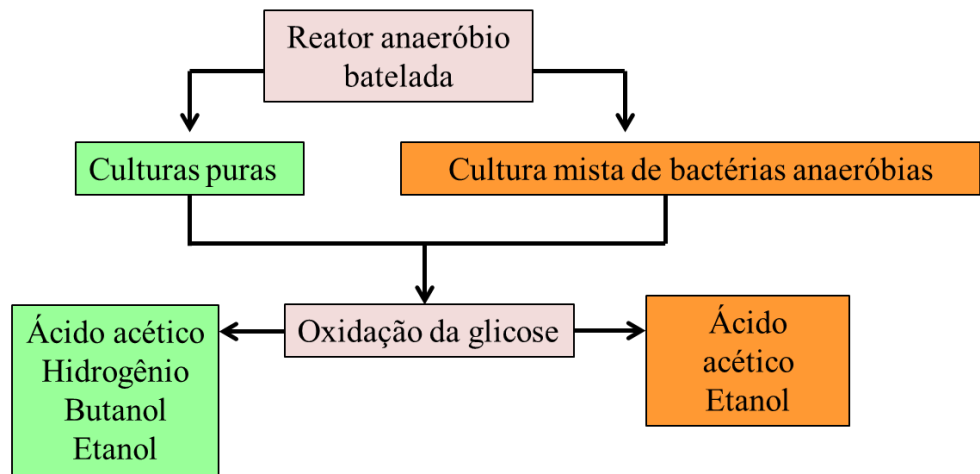
Nos reatores anaeróbios operados com cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) alimentados com glicose, ocorreu o favorecimento da rota na fermentação para a produção de etanol, conforme descrito anteriormente. A produção iniciou com 31,6 mg L⁻¹ em 19 horas de operação até 1571,8 mg L⁻¹ em 67 horas, pela via butiril-CoA e acetoacetil-CoA.

Contudo, nessa etapa 4 do presente estudo houve uma mudança na rota metabólica, favorecendo a produção de hidrogênio, butanol e etanol com os inóculos testados. As culturas puras (inóculos 1 e 2) foram hábeis nos consumos de glicose com gerações de hidrogênio acetato, etanol além de butanol. A cultura mista de bactérias anaeróbias gerou etanol pela via butirato e acetil-CoA. (Figura 17 A). Ficou evidente a capacidade dos inóculos (culturas puras e cultura mista) na oxidação da glicose por fermentação gerando hidrogênio, ácido acético, butanol e etanol (Figura 17 B).

Figura 17. (A) Fluxograma das vias metabólicas da fermentação ABE por *Clostridium*, fase acidogênese (em rosa) e fase solventogênese (em verde). Os quadros tracejados de azul destacam a via metabólica ocorrida neste estudo; (B) Produtos gerados no ensaio 3 com as culturas puras e a cultura mista de bactérias anaeróbias.



(A)

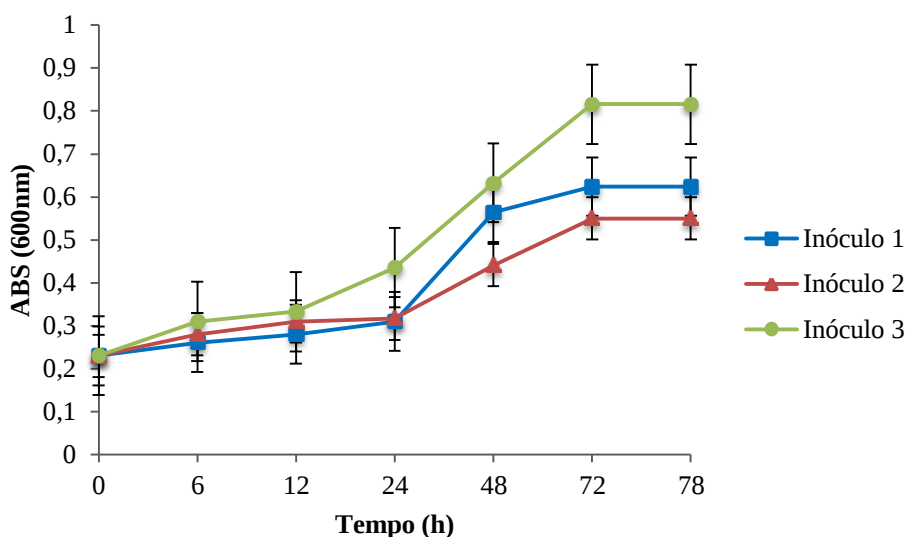


(B)

5.5 Etapa 5: Avaliação das culturas puras (inóculos 1 e 2) e da cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) em reatores alimentados com meio de cultivo contendo efluente citrícola

As culturas puras (inóculos 1 e 2) apresentaram crescimento mais reduzido que a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) em reatores anaeróbios em batelada, alimentados com efluente citrícola. Além disso, a cultura mista de bactérias anaeróbias proveniente do efluente citrícola estava adaptada a tal fonte de carbono, o que justificou a diferença verificada entre os inóculos testados (Figura 18).

Figura 18. Crescimento dos inóculos (1) *C. acetobutylicum*; (2) *C. beijerinckii* e (3) cultura mista de bactérias anaeróbias, em efluente citrícola.



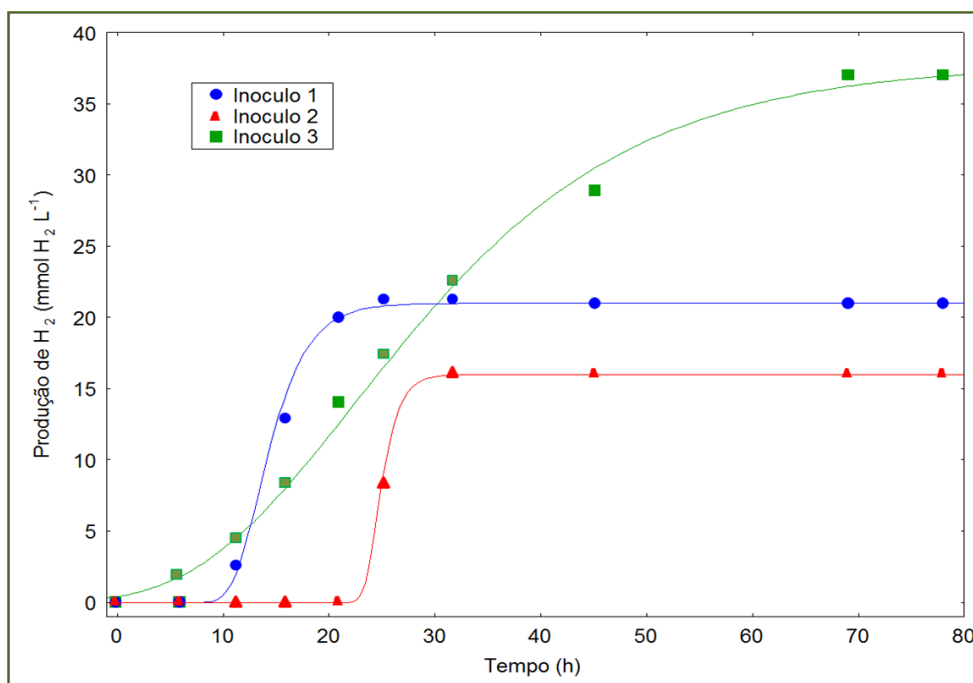
Em todos os reatores alimentados com efluente bruto citrícola foi observado comportamento diretamente proporcional entre o consumo de carboidratos e a produção acumulada de gás hidrogênio. Os consumos de carboidratos foram de 68%, 43% e 56% respectivamente, com os inóculos (1), (2) e (3). Os valores de DQO no início e final da operação não se alteraram significativamente e foram de 16,4 g L⁻¹ a 14,7 g L⁻¹ nos reatores operados com as culturas puras (inóculos 1 e 2) e 14,0 a 11,4 g L⁻¹ nos reatores com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), corroborando com o processo fermentativo e consequente geração de ácidos e álcoois observados e descritos a seguir.

Os reatores anaeróbios operados com o inóculo (3) apresentaram valores mais elevados de geração de hidrogênio (37,6 mmol H₂ L⁻¹) do que os obtidos nos reatores com as culturas puras que são conhecidas como produtoras de hidrogênio [21,2 mmol H₂ L⁻¹ (inóculo

1) e $15,7 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ (inóculo 2)]. SOARES *et al.* (2018) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidro termicamente ($5,84 \text{ g L}^{-1}$) e extrato de levedura ($2,77 \text{ g L}^{-1}$), em reatores anaeróbios em batelada (1L), com inóculo (10% v/v) proveniente de resíduo de compostagem, em pH 6,0, a 37°C , por 400 horas e obtiveram $1,50 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$. Tais resultados foram inferiores aos obtidos no presente estudo, para os reatores alimentados com efluente bruto citrícola em 21,2; 15,7 e $37,6 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ respectivamente, para os ensaios com os inóculos 1, 2 e 3.

Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada (Figura 19), os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H_2 (L), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), foram respectivamente para os inóculos 1, 2 e 3: $L = 7,6; 10,8$ e $23,3$ horas; $P = 21,0; 16,0$ e $37,8 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$; e $R_m = 0,9; 3,1$ e $4,9 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Os coeficientes de determinação (R^2), obtidos pelo tratamento estatístico [(1) 0,998; (2) 0,998 e (3) 0,997;], reforçaram que o modelo adotado representou os dados obtidos experimentalmente nos reatores anaeróbios em batelada, alimentados com efluente citrícola.

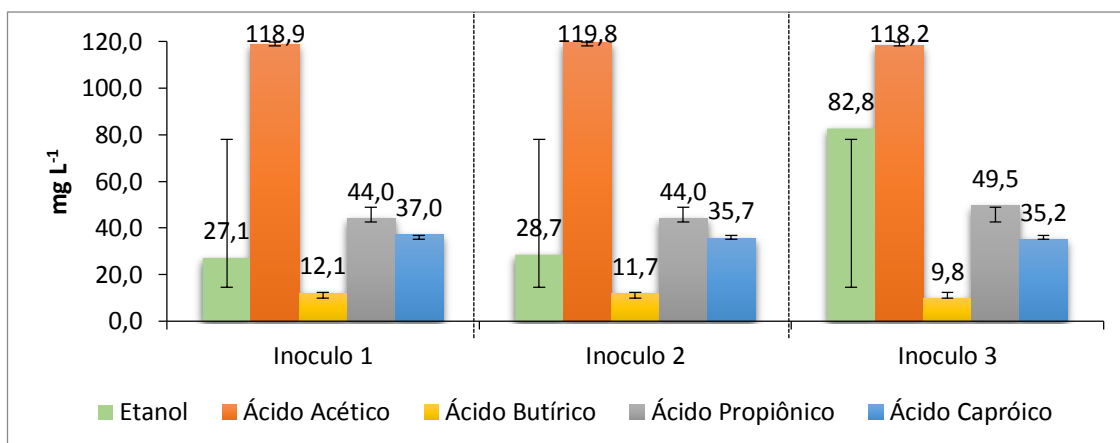
Figura 19. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada da geração de hidrogênio para os inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3 (■) em reatores anaeróbios alimentados com efluente citrícola.



Em todos os reatores alimentados com efluente bruto citrícola foi observado comportamento diretamente proporcional ao consumo de carboidratos e a produção acumulada co-produtos na fase líquida, além de hidrogênio no *headspace* dos reatores. Os

ácidos gerados em concentrações mais elevadas foram acético e propiônico, para os inóculos 1, 2 e 3. O ácido butírico se manteve presente em concentrações mais reduzidas, variando de 8,0 a 12,1 mg L⁻¹ no decorrer da operação (Figura 20).

Figura 20. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com resíduo citrícola, para inóculo 1, 2 e 3.



Entretanto, não foi observada a produção de butanol. Concentração de ácido butírico e pH em torno de 5,7 são essenciais para estimular os microrganismos a produzir butanol, devido aos mecanismos metabólicos complexos envolvidos na indução para formação deste solvente (RAMEY, YANG, 2004, HAUS et al., 2011). Com a formação de ácido butírico na acidogênese o pH da cultura pode diminuir para 4,5, valor considerado crítico para transição da solventogênica que é favorecida a faixas de pH de 5,0-5,5 (SILVA, 2019), conforme descrito anteriormente. Segundo Monot; Engasser; Petitdemange, (1984), a concentração de ácido butírico precisa estar em torno de 1,9 g L⁻¹ para que ocorra a produção de butanol. Tais inferências explicaram a ausência de butanol na etapa experimental do presente estudo, ocasionada principalmente pelas concentrações reduzidas de ácido butírico (12,1; 11,7 e 9,8 mg L⁻¹) que foram produzidas com os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente.

Com 21 horas de operação foi verificada produção de etanol para todos os inóculos testados. As concentrações máximas de etanol foram de 27,1 e 28,7 mg L⁻¹ em 45 horas de operação nos reatores operados com as culturas puras (inóculos 1 e 2, respectivamente).

Entretanto, a maior concentração de etanol foi de 82,8 mg L⁻¹ em 78 horas de operação nos reatores com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3). A fermentação etanólica foi favorecida nos reatores inoculados com cultura mista, conforme discutido anteriormente

no Etapa 4. Além disso, houve o predomínio do ácido acético nos reatores operados com os inóculos 1, 2 e 3 (Figura 20 e Tabela 8).

Tabela 8. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores com alimentados efluente citrícola nos inóculos 1, 2 e 3.

Tempo (h)	Ác. Acético (mg L ⁻¹)	Ác. Butírico (mg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)	Butanol (mg L ⁻¹)
Inóculo 1				
0	114,5±2	8,0±3	-	-
6	182,5±5	8,5±3	-	-
21	116,7±3	8,4±3	12,4±11	-
45	110,2±8	9,9±7	27,1±9	-
78	118,9±7	12,1±10	15,0±4	-
Inóculo 2				
0	110,2±16	9,4±3	-	-
6	134,7±8	9,4±2	-	-
21	114,0±5	8,7±5	18,9±27	-
45	121,1±13	8,1±2	28,7±21	-
78	119,8±5	11,7±8	26,8±16	-
Inóculo 3				
0	113,6±19	8,2±2	-	-
6	118,2±12	8,5±1	-	-
21	125,1±18	9,5±4	7,5±23	-
45	123,0±20	8,4±5	61,8±33	-
78	118,2±24	9,8±5	82,8±42	-

Ácido acético e butírico são produzidos na primeira fase da fermentação, com o consumo de glicose, consequente crescimento celular e produção de hidrogênio, conforme observado no presente estudo. Concentrações mais elevadas de ácido acético e butírico favorecem a produção de gás hidrogênio. Entretanto, quando a célula entra na fase estacionária de crescimento o seu metabolismo pode ser alterado para a produção de solventes, como etanol (LIU et. al., 2019).

Torquato et al., (2017) operaram reatores anaeróbios alimentados com efluente citrícola (16 g DQO L⁻¹), a 37 °C, pH inicial 5,5 e consórcio anaeróbio de um reator UASB e obtiveram 33,4 mmol H₂ L⁻¹, etanol (325 mg L⁻¹), ácido acético (80 mg L⁻¹) e ácido butírico (238 mg L⁻¹), em 44 h de operação. No presente estudo foi verificadas produções mais elevadas de H₂ com o efluente bruto citrícola (37,80 mmol de H₂ L⁻¹) com 10 g DQO L⁻¹, nos reatores operados com cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3).

5.5.1 Estudo comparativo das etapas 4 e 5

O crescimento das culturas puras (inóculos 1 e 2) foi diretamente proporcional às remoções de glicose com as gerações de hidrogênio, ácido acético, etanol e butanol. Em contraste, com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), não foi verificada produção de butanol ou hidrogênio. Neste caso, observou-se a fermentação etanólica a partir da glicose com consequente geração de etanol e ácido acético. Nos reatores operados com *Clostridium beijerinckii* (inóculo 2) foram obtidos os melhores rendimentos de hidrogênio ($1,65 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de glicose), bem como gerações expressivas de butanol, quando comparado ao *Clostridium acetobutylicum* (inóculo 1) ($1,19 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose) (Tabela 9).

Tabela 9. Principais resultados durante a operação de reatores anaeróbios nas etapas 4 e 5 com os inóculos 1, 2 e 3.

Inóculo	Etapa 4			Etapa 5		
	1	2	3	1	2	3
pH final	4,68±0,7	4,68±0,4	3,90±0,3	4,95±0,7	4,80±0,9	4,78±0,4
Consumo DQO (%)	20,00	5,00	4,00	12,00	8,00	19,00
Consumo de carboidratos totais (%)	50,00	65,00	69,00	96,00	95,00	96,00
P (mmol H ₂ L ⁻¹) (h)	36,80±23,1 17,00	64,10±19,3 16,00	-	21,00±22,5 11,00	16,00±21,8 23,00	37,80±31,1 8,00
Rm (mmol H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	9,12±2,9	1,69±4,8	-	0,90±3,1	3,10±5,9	4,90±7,1
Rendimento mol H ₂ /mol glicose	1,19±1,7	1,65±2,1	-	1,19±4,1	0,89±2,2	2,11±2,7
%	29,75	41,25	-	22,75	22,25	52,75
Rendimento mol etanol/mol glicose mg etanol/mol glicose	0,02±0,5 768,70±6,4	0,01±0,4 473,60±7,7	0,83±0,3 38243,30±23,4	0,02±0,4 847,40±19,2	0,03±0,5 1522,70±22,9	0,10±0,7 4651,70±28,7
Ác. Acético (mg L ⁻¹)	246,50±12,8	201,10±11,5	146,30±15,3	118,90±17,8	119,80±19,3	118,20±21,7
Etanol (mg L ⁻¹)	22,90±7,1	18,00±8,5	1571,80±31,9	15,00±14,1	26,80±19,2	82,80±28,2
Butanol (mg L ⁻¹)	31,30±19,8	306,90±31,4	-	-	-	-

Pachiega et al. (2018) obtiveram rendimentos de hidrogênio de $0,2 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose, em reatores anaeróbios em batelada alimentados com 5 g L^{-1} de glicose e consórcio anaeróbio de lodo granular de reator UASB tratando efluente de cervejaria. Tais resultados foram inferiores ao presente estudo (Tabela 9).

Os produtos intermediários gerados ao final da operação dos reatores anaeróbios alimentados com glicose foram (mg L^{-1}): ácido acético (246,50; 201,10 e 146,30), butanol (40,40; 306,90; 0,0) e etanol (22,90; 18,00; 1571,80) para reatores com inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. Duas vias metabólicas distintas podem ocorrer, conforme descrito a seguir. A glicose foi consumida por espécies de *Clostridium* (inóculos 1 e 2) com consequente geração de hidrogênio e ácido acético. Nos reatores operados com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) foi confirmada a rota metabólica de consumo de glicose a etanol e ácido acético, sem a geração de hidrogênio. Esta informação corrobora com o rendimento de 0,83 mol de etanol/mol de glicose, gerações de 146,3 mg L^{-1} de ácido acético e 69% de remoção de carboidratos totais nos reatores com o inóculo 3. (Figura 21, Tabela 9)

Foi observado um comportamento diretamente proporcional entre o crescimento dos inóculos [(1) 0,230 a 0,624; (2) 0,230 a 0,550 e (3) 0,230 a 0,816 ABS] e a produção acumulada de hidrogênio [(1) 21,0; (2) 16,0 e (3) 37,8 $\text{mmol H}_2 \text{L}^{-1}$] nos reatores alimentados com efluente bruto citrícola. A remoção de carboidratos foi elevada e de 96%, 95% e 96%, respectivamente, com os inóculos (1), (2) e (3). As remoções de DQO não se alteraram significativamente e isso corrobora com o processo de fermentação e consequente geração de ácidos graxos voláteis e álcoois observados. Todos os inóculos produziram hidrogênio e etanol, com rendimentos de 1,19; 0,89 e 2,11 $\text{mol H}_2/\text{mol glicose}$, que correspondem a 22,7%, 22,2% e 52,7%, para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. As produções de etanol foram de 15,0; 26,8 e 82,8 mg L^{-1} para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente. Esses dados confirmam a adaptação do inóculo 3 na degradação do efluente bruto, favorecendo a produção de hidrogênio e etanol via fermentação (Tabela 9, Figura 22).

Figura 21. Reatores anaeróbios em batelada alimentados com glicose como fonte de carbono: crescimento celular, pH, remoção de glicose, produção de ácido acético, butanol e etanol com (A) Inóculo 1, (B) Inóculo 2 e (C) Inóculo 3.

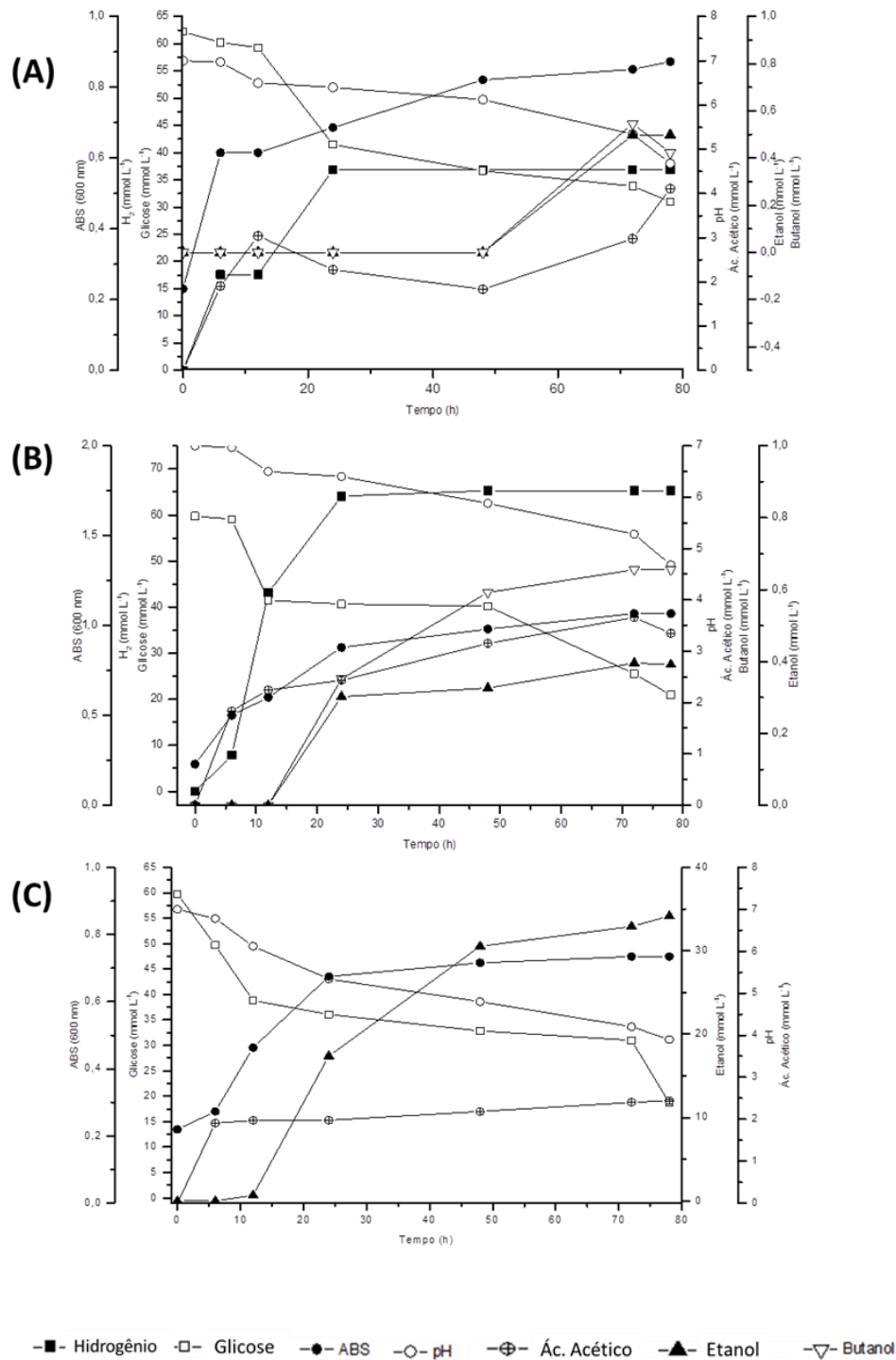
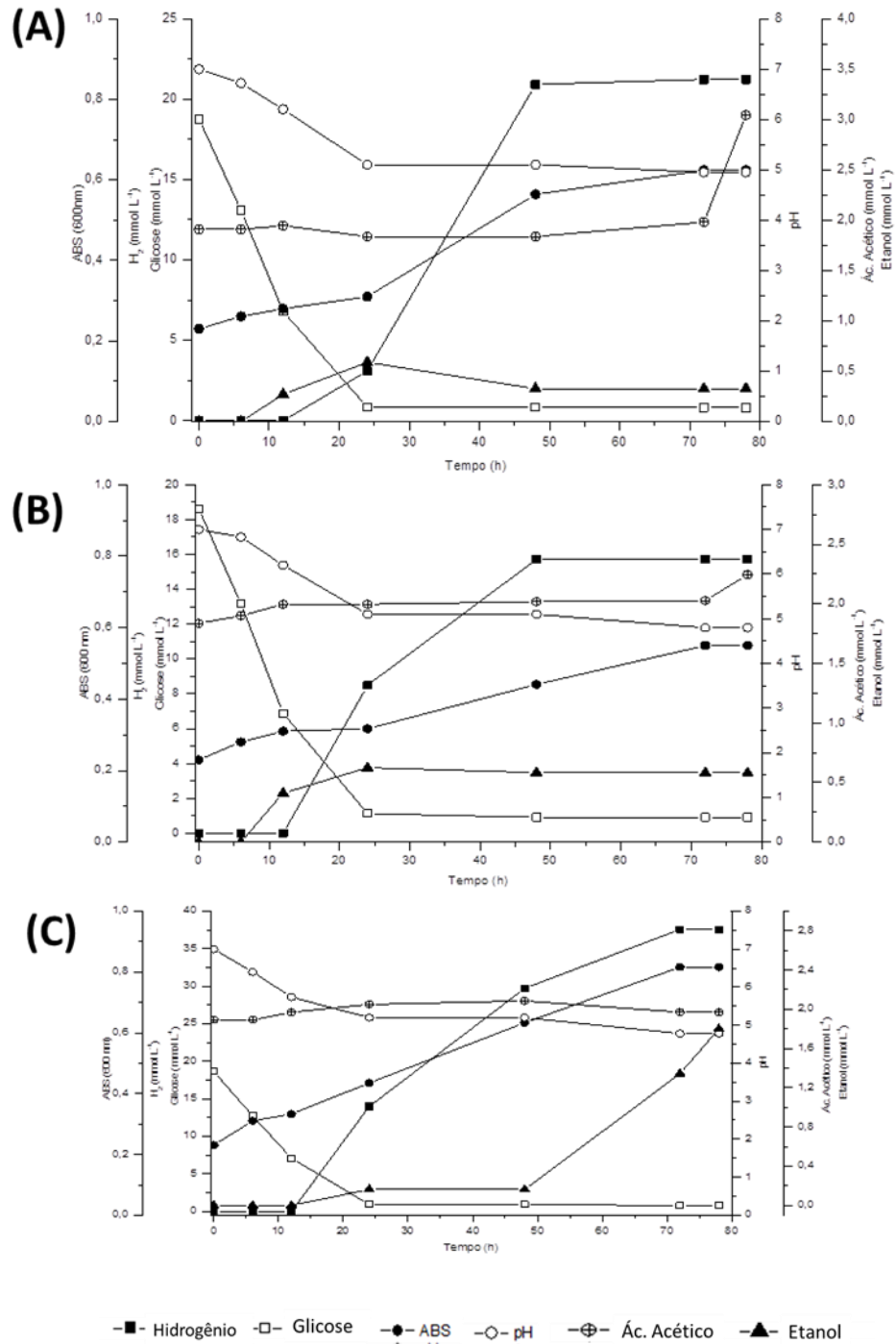


Figura 22. Reatores anaeróbios em batelada alimentados com efluente bruto citrícola como fonte de carbono: crescimento celular, pH, remoção de glicose, produção de ácido acético, butanol e etanol com (A) Inóculo 1, (B) Inóculo 2 e (C) Inóculo 3.

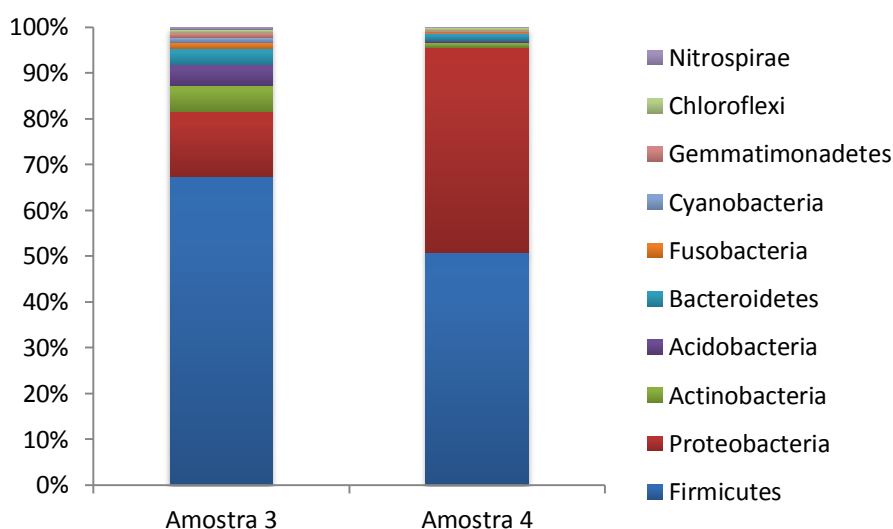


5.5.2 Alterações taxonômicas nas populações advindas da cultura mista de bactérias anaeróbias (Amostra 3) e no final da operação da etapa 5 (Amostra 4)

A abundância relativa verificada foi principalmente dos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Diversidade elevada de bactérias anaeróbias foi observada para os gêneros: *Clostridia* (27%), *Enterobacteriaceae* (37%), *Ruminococaceae* (11%), dentre outros. Abundâncias relativas elevadas foram verificadas para as classes *Clostridia* (44,88%) e *Gammaproteobacteria* (39,00%).

Ocorreu alterações nas populações advindas da cultura mista de bactérias anaeróbias (Amostra 3) e no final da operação da etapa 5 (Amostra 4). O filo *Firmicutes* foi identificado com uma abundância relativa de 62,15% e 50,06% e *Proteobacteria* em 13,15% e 44,25% para as amostras 3 e 4, no início e final da operação, respectivamente. Foi evidenciado principalmente a redução na abundância relativa do filo *Firmicutes* e o aumento de *Proteobacteria* da amostra 3 para amostra 4, respectivamente. Ou seja, a diversidade advinda do efluente bruto citrícola foi alterada, durante a operação dos reatores anaeróbios com consequente geração de hidrogênio. Provavelmente, as condições operacionais impostas causaram tal seleção, ativando bactérias anaeróbias geradoras de hidrogênio, conforme verificado no ensaio realizado (Figura 23).

Figura 23. Comparativo da Taxonomia em filo no início da operação (Amostra 3) e no final da operação (Amostra 4).



Os gêneros predominantes foram *Clostridium* em abundâncias relativas de 28,57%, reconhecido como um dos principais microrganismos fermentativos e geradores de hidrogênio, conforme verificado nas operações dos reatores alimentados com glicose e efluente bruto citrícola. Além disso, *Ruminiclostridium* foi observado em abundância relativa de 10,18%, que é um microrganismo celulolítico, produtor de hidrogênio, gás carbônico, etanol e ácido acético (KOECK et al., 2014). Tais informações corroboraram com a obtenção de etanol e hidrogênio nesta etapa 5 e que foram respectivamente de 82,8 g L⁻¹ e 37,6 mmol H₂ L⁻¹. A família predominante do filo *Proteobacteria* foi *Enterobacteriaceae* (36,22%), que são tolerantes à condição ácida, conforme verificado no presente estudo (pH 4,78), e relatado por VASIEE et al., (2020) . Contudo, *Clostridium* sp. e *Enterobacter* sp. são os principais produtores de H₂ em culturas mistas fermentativas (Maintinguer et al., 2008).

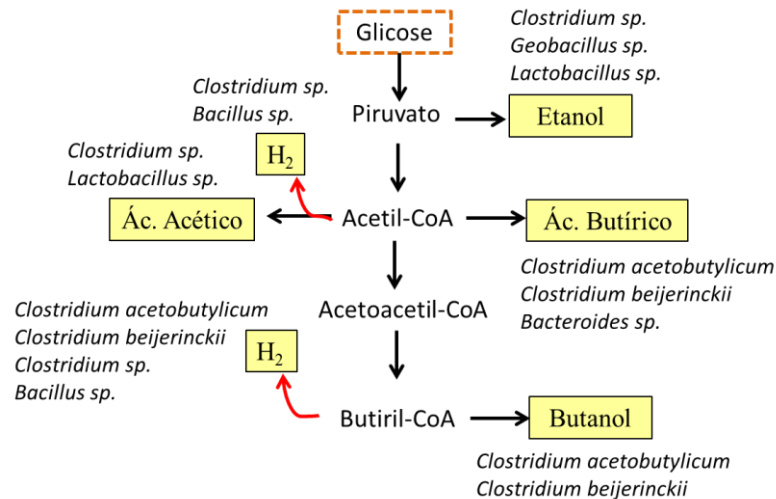
5.5.3 Vias metabólicas evidenciadas na etapa 4 (ensaio com glicose) e etapa 5 (ensaio com efluente citrícola)

Várias vias metabólicas podem ocorrer durante a fermentação da glicose na presença de bactérias fermentativas do gênero *Clostridium*. Segundo Lütke-Eversloh e Bahl (2011), *C. acetobutylicum* não segue uma rota única na degradação de glicose. Geralmente vários produtos são formados tais como ácido acético, butírico e lático durante a fase acidogênica, além de etanol e butanol durante a fase solventogênica, respectivamente.

No presente estudo foi verificado várias rotas metabólicas de produtos gerados a partir da glicose presente no efluente bruto citrícola como H₂, CO₂, acetato, butirato, butanol e etanol. Sendo assim, a heterofermentação dos inóculos testados foi verificada, conforme descrito a seguir. H₂, ácido acético, etanol e butanol foram gerados a partir da glicose na etapa 4, com os inóculos 1 e 2 (*C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii*). Os açúcares contidos no efluente bruto citrícola, conforme descrito na etapa 5, nos reatores operados com os inóculos 1 e 2, produziram ácido acético, H₂ e etanol. No entanto, em reatores operados com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) foram verificadas produções de diversos produtos como H₂, ácido acético, ácido butírico e principalmente etanol. Além disso, foram identificados os gêneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus* *Bacteroides* e *Enterobacter* na cultura mista de bactérias anaeróbias. As características do efluente bruto citrícola e as condições operacionais impostas na etapa 5 provavelmente favoreceram a via

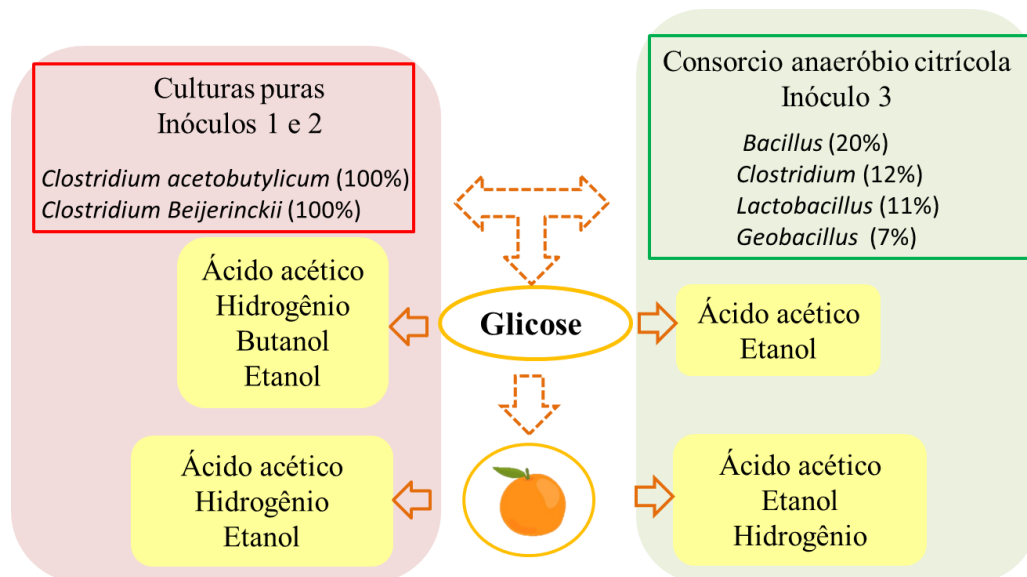
metabólica de geração de biocombustíveis, principalmente hidrogênio e etanol nos reatores operados com cultura mista de bactérias anaeróbias (Figura 24, Figura 25).

Figura 24. Vias metabólicas possíveis durante a fermentação da glicose



Fonte: próprio autor

Figura 25. Diferença das vias metabólicas nas etapas 4 e 5 durante a fermentação da glicose e do efluente citrícola



Fonte: próprio autor

Além disso, bactérias anaeróbias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram identificadas no inóculo 3, corroborando com as produções elevadas de etanol, uma vez que tais microrganismos gram-positivos não formadores de endósporos estão associados à

degradação proteolítica de resíduos de frutas, vegetais, fermentação de carboidratos e ácido acético (WANG , et al., 2018; DAUGHTRY, et al., 2018). Este gênero é baseado na via heterofermentativa, que pode fermentar monossacarídeos em ácido láctico, CO₂, ácido acético e/ou etanol (DE ANGELIS e GOBBETTI, 2016), verificado no presente estudo.

O gênero *Clostridium* identificado no inóculo 3, provavelmente contribuiu para a produção de H₂ na degradação de carboidratos simples e complexos (MAZARELI et al., 2019), além de solventes (etanol e butanol).

5.6 Etapa 6: Avaliação da cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras em reatores alimentados com diferentes proporções de meio de cultivo e efluente bruto citrícola

Foi verificado consumo de carboidratos para os inóculos 1, 2 e 3. Entretanto, tais remoções não foram totais. Mas é importante salientar que a partir da adição do efluente bruto citrícola os consumos de carboidratos foram mais evidentes. Além disso, a operação dos reatores foi cessada quando foi verificada a estabilização na geração de hidrogênio (Tabela 10).

Tabela 10. Consumos de carboidratos totais em reatores anaeróbios em batelada em misturas de meio de cultivo RCM (RCM) e Efluente citrícola (EC).

Consumo de carboidratos totais (%)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
	100% RCM (%)	80% RCM + 20% EC (%)	50% RCM + 50% EC (%)	20% RCM + 80% EC (%)	100% EC (%)
Inóculo 1	59,3	75,4	87,3	72,2	64,0
Inóculo 2	57,4	80,9	82,5	68,8	69,7
Inóculo 3	59,7	76,9	77,2	68,1	63,5

Nas cinco condições testadas, ocorreu o decaimento do pH. Exceto na condição 3, todos os ensaios apresentaram variações em relação ao pH inicial (6,0) estabelecido, indicando que o estabelecimento da fermentação com produção de ácidos e de hidrogênio, conforme descrito a seguir. Entretanto, não ocorreram variações de pH entre os inóculos testados (1, 2 e 3) para uma mesma condição (Tabela 11).

Tabela 11. Variações de pH no final da operação em reatores anaeróbios em batelada em misturas de meio de cultivo RCM (RCM) e Efluente citrícola (EC).

	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
	100% RCM	80% RCM + 20% EC	50% RCM + 50% EC	20RCM + 80% EC	100% EC
Inóculo 1	4,0	4,7	5,7	5,3	4,5
Inóculo 2	4,1	4,5	5,7	5,4	4,4
Inóculo 3	3,9	4,1	5,8	5,3	4,4

O pH é um fator importante na produção de ácidos graxos voláteis. ATASOY, et al., (2019), estudou o efeito de pH ácido (5), alcalino (8 e 10) e sem controle em diferentes inóculos (granulo pequeno, granulo grande e lodo) para a produção de ácidos graxos voláteis. Foram operados reatores com volume de trabalho de 100 mL utilizando glicose (3000 mg DQO L⁻¹) como fonte de carbono durante 1, 5, 10 e 15 dias de operação. Foi verificado o favorecimento da produção de ácido acético em pH 5,5, como verificado no presente estudo, onde as suas gerações, nas cinco condições testadas, foram em pH 6,0; 5,7 e 5,3 para as condições 2, 3 e 4, respectivamente.

5.6.1 Condição 1 - 100% Meio de cultivo RCM, com cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras

Os consumos de carboidratos totais foram de até 59,7% e o pH final da operação dos reatores estiveram na faixa de 3,9 a 4,1, comprovando a produção de ácidos, solventes e álcool (Tabela 12).

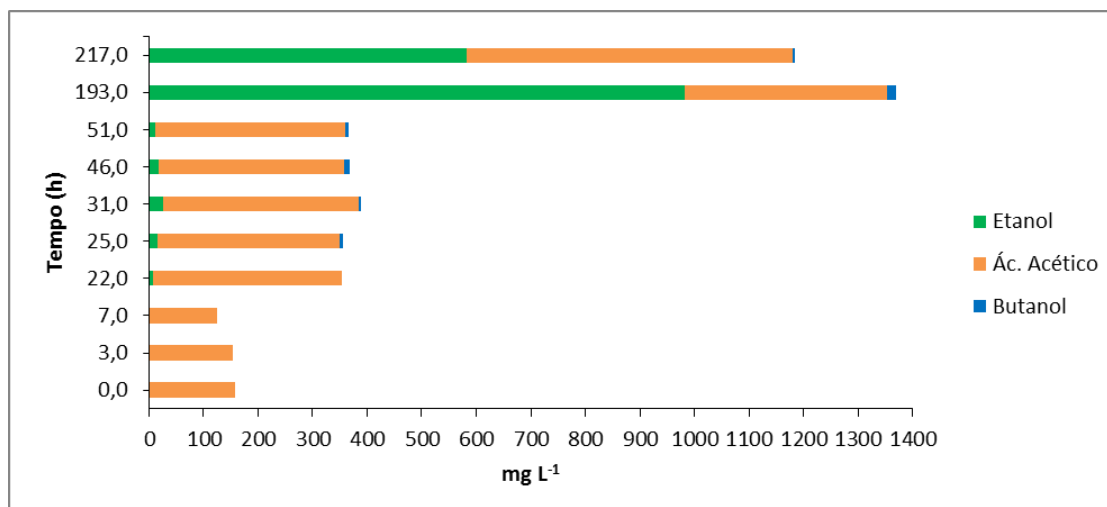
Em 217 h de operação nos reatores com o inóculo 1 foram gerados 597,6 mg L⁻¹ de ácido acético, 4,7 mg L⁻¹ de butanol e 583 mg L⁻¹ de etanol. Entretanto, nos reatores operados com o inóculo 2 as concentrações foram de 293,3; 21,3 e 966,2 mg L⁻¹ de ácido acético, butanol e etanol, respectivamente. Contrariamente, nos reatores operados com o inóculo 3 ocorreram as maiores concentrações de ácido acético e etanol, sendo de 414,0 e 1609,9 mg L⁻¹, respectivamente; além disso, não foi verificada produção de butanol, indicando que a rota metabólica favoreceu a fase acidogênica e etanólica. (Tabela 12).

Nas primeiras horas de operação nos reatores operados com o inóculo 1, foram gerados ácido acético, confirmando a rota metabólica da acidogênese. A partir das 22h de operação iniciou a produção de etanol com 7,5 mg L⁻¹ e butanol 6,9 mg L⁻¹, demonstrando a alteração na rota metabólica. As concentrações mais elevadas de butanol e etanol foram respectivamente de 15,7 e 982,4 mg L⁻¹, em 193 horas de operação (Figura 26).

Tabela 12. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores na condição 1 (100% RCM).

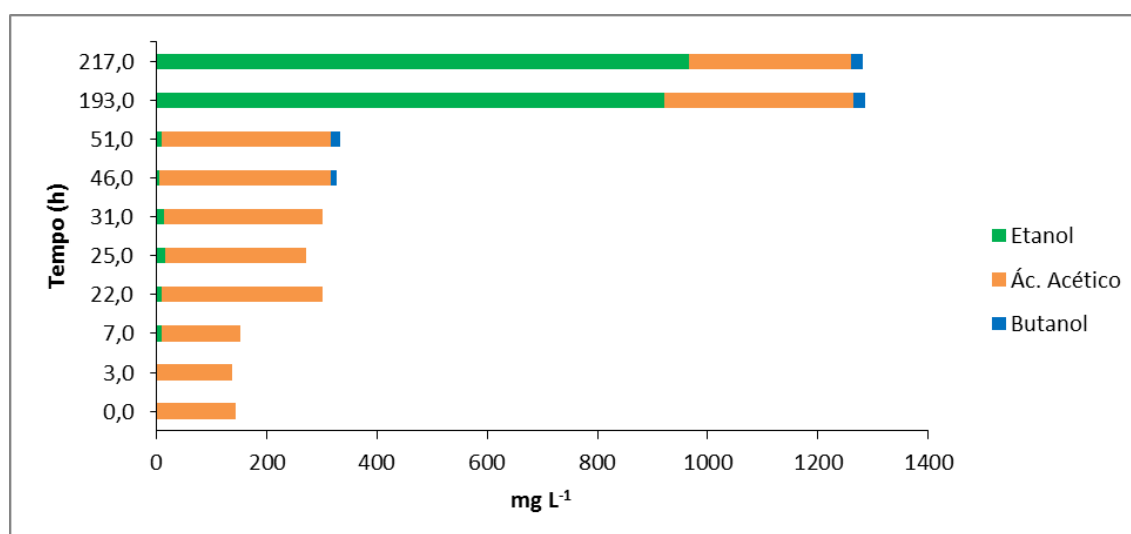
Tempo (h)	Ác. Acético (mg L ⁻¹)	Butanol (mg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)
Inóculo 1			
0,0	-	-	-
3,0	154,6±0,7	-	-
7,0	124,3±20	-	-
22,0	345,4±26	-	7,5±2
25,0	333,7±4	6,9±4	15,6±6
31,0	359,2±41	5,4±0,8	25,0±1
46,0	339,4±29	11,2±0,1	18,4±0,9
51,0	348,0±34	6,6±0,3	11,6±9
193,0	371,9±113	15,7±4	982,4±3
217,0	597,6±325	4,7±1	583,2±751
Inóculo 2			
0,0	-	-	-
3,0	137,5±9	-	-
7,0	143,0±10	-	9,7±1
22,0	290,8±5	-	9,8±5
25,0	255,2±44	-	15,6±6
31,0	287,2±17	-	13,4±5
46,0	311,1±3	9,7±3	5,3±0,01
51,0	305,8±20	17,8±6	10,1±8
193,0	343,7±70	21,8±2	920,4±5
217,0	293,3±17	21,3±10	966,2±43
Inóculo 3			
0,0	-	-	-
3,0	139,0±1	-	9,9±5
7,0	158,2±2	-	49,1±1
22,0	153,8±5	-	252,2±28
25,0	359,2±40	-	894,5±109
31,0	391,3±2	-	1125,5±108
46,0	443,6±38	-	1164,9±335
51,0	270,5±186	-	1288,0±205
193,0	513,3±99	-	1562,0±11
217,0	414,0±5	-	1609,9±45

Figura 26. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com meio de cultivo RCM (Condição 1) e Inóculo 1.



Os reatores anaeróbios em batelada operados com o inóculo 2, em 7 h de operação, foram verificadas gerações de etanol de 9,7 mg L⁻¹ e de ácido acético de 143,0 mg L⁻¹. A produção de butanol (9,7 mg L⁻¹) foi verificada em 46 h de operação. As produções de ácido acético, butanol e etanol foram respectivamente de 293,3; 21,3 e 966,2 mg L⁻¹, no final da operação dos reatores (Figura 27).

Figura 27. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com meio de cultivo RCM (Condição 1), para Inóculo 2.

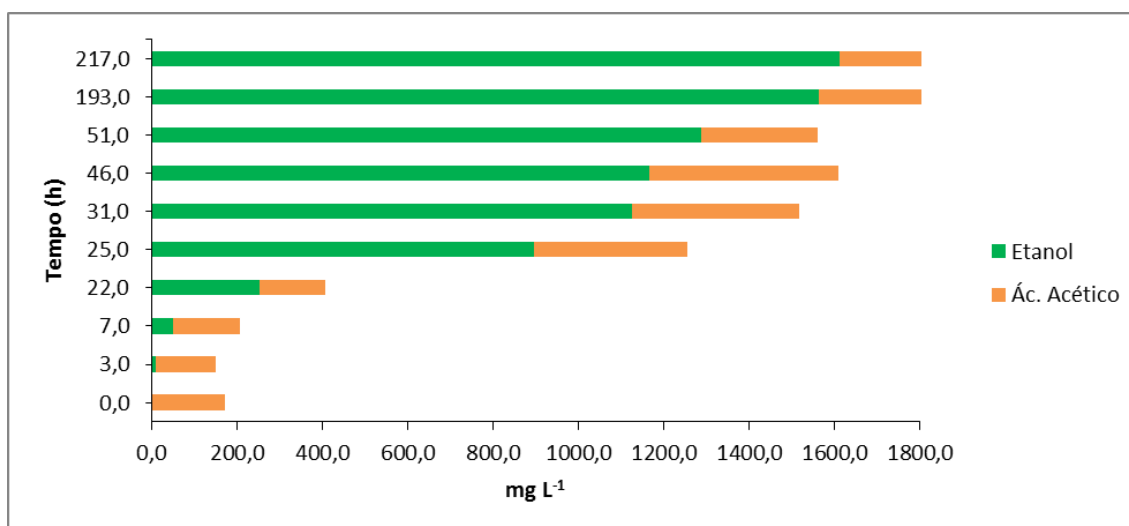


Para as culturas puras (inóculos 1 e 2) foi verificado gerações de ácido acético, butanol e etanol. Tais resultados mostraram claramente alterações de rota metabólica, com as

culturas puras no consumo da glicose para piruvato, favorecendo a rota do Acetil-CoA para etanol e de Butiril-CoA para butanol, conforme discutido anteriormente (NANDA, et al., 2017).

Reatores anaeróbios em batelada operados com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), a partir de 3 horas de operação, geraram 9,9 mg etanol L⁻¹ e em 217 h atingiram a produção de 1609,9 etanol mg L⁻¹. A produção final de ácido acético foi de 414,0 mg L⁻¹ (Figura 28). Não ocorreu a produção de butanol com este inóculo.

Figura 28. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com meio de cultivo RCM (Condição 1), para Inóculo 3.



Ficou evidente a diferença entre os inóculos testados, mostrando a produção de butanol somente com os inóculos 1 e 2 e a maior concentração de etanol produzida pelo inóculo 3, favorecida pela rota metabólica Acetil-CoA gerando acetaldeído e finalmente etanol (HALLENBECK, ABO-HASHESH e GHOSH, 2012).

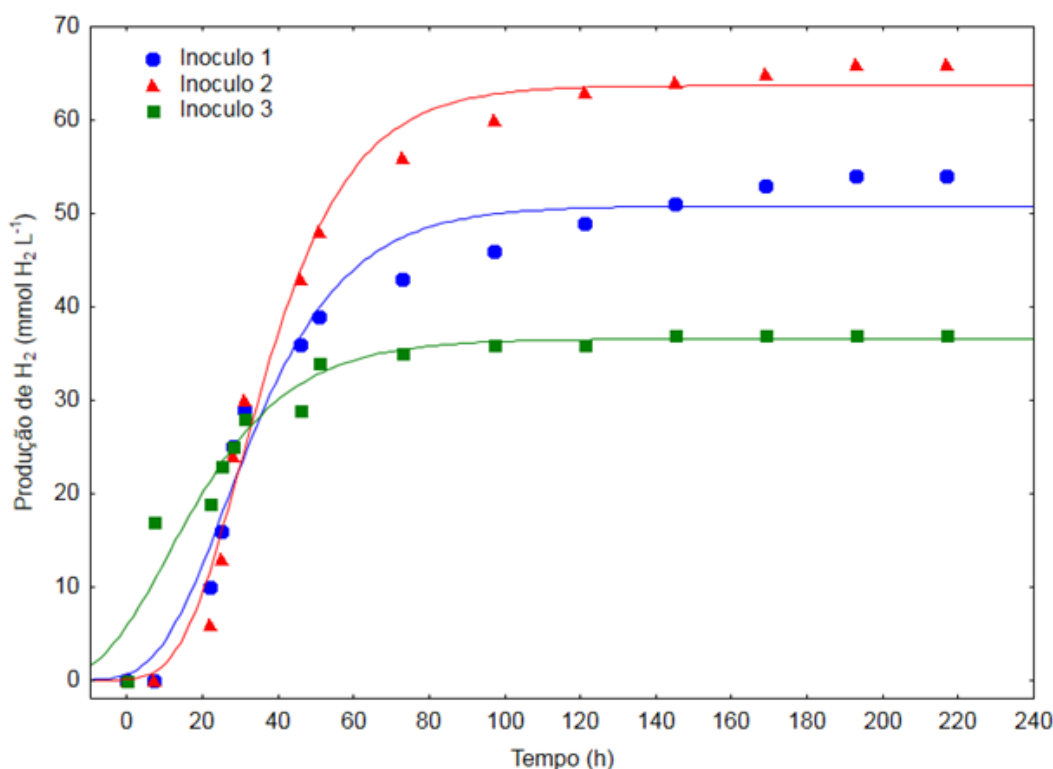
Nos reatores anaeróbios foram verificadas produções de hidrogênio de 54,7; 66,6 e 37,1 mmol H₂ L⁻¹ para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente, em 217 h de operação. Os inóculos 1 e 2 provenientes de culturas puras do gênero *Clostridium* foram responsáveis pelas maiores produções de hidrogênio. A partir das 25 e 46 horas de operação, com o decaimento do pH (4,0), houve a mudança de rota metabólica com a produção de butanol (6,9 e 9,7 mg L⁻¹) que variou de até 15,7 e 21,8 mg L⁻¹, nos inóculos 1 e 2, respectivamente. *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii* são conhecidos na literatura em produção de hidrogênio e

butanol na fermentação de glicose (LIN, et al., 2007; HALLENBECK, LAZARO e SAGIR, 2019; HUZIR, et al, 2018), conforme descrito anteriormente.

Com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) foi verificada a menor produção de hidrogênio. Entretanto, foi favorecida a rota metabólica etanólica, com produção expressiva de etanol de até 1609,9 mg L⁻¹ (SILVA, 2015).

Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada (Figura 29), os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H₂ (λ), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), foram respectivamente para os inóculos 1, 2 e 3: λ = 8,5; 14,5 e 6,9 horas; P = 50,8; 63,7 e 36,5 mmol H₂ L⁻¹; e R_m = 1,1; 1,5 e 0,7 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹. Os coeficientes de determinação (R²), obtidos pelo tratamento estatístico foram [(1) 0,997; (2) 0,998 e (3) 0,977].

Figura 29. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados na condição 1 de 100% com Meio de cultivo RCM (Reinforced Clostridial Medium)



5.6.1.1 Identificação biomolecular: condição 1 (100% meio RCM) [reatores operados com o inóculo 3 (Amostra 5)]

Foi verificada abundância relativa do filo *Firmicutes*, distribuído na classe *Bacilli*, ordem *Lactobacilales*; famílias *Lactobacilaceae* (97%) e *Clostridiales* (3%). Ou seja, para essa condição em meio de cultivo específico para *Clostridium* ocorreu o predomínio de bactérias pertencentes ao Gênero *Lactobacillus* que não são desejáveis para a geração de hidrogênio em bioreatores. Provavelmente, as condições operacionais impostas favoreceram a permanência desse gênero em detrimento às bactérias anaeróbias formadoras de endósporos e pertencentes ao Gênero *Clostridium*, que são reconhecidas na literatura com eficiências elevadas na geração de hidrogênio (Figura 30). Esse gênero pode ser dividido em: *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos e *Lactobacillus* heterofermentativos que fermentam monossacarídeos como glicose e têm a capacidade de degradá-los em ácido lático, CO₂, ácido acético e/ou etanol (DE ANGELIS e GOBBETTI, 2016). Tais metabólitos foram verificados na condição 1, gerando 414,0 mg L⁻¹ de ácido acético e 1609,9 mg L⁻¹ de etanol. Provavelmente, os microrganismos pertencentes a esse gênero estavam envolvidos nas gerações de ácido acético e etanol verificadas com os demais microrganismos pertencentes às Famílias *Clostridiales* e *Bacilli*. Contudo, a presença de *Lactobacillus* justificaram a produção de hidrogênio reduzida (37,1 mmol H₂ L⁻¹), em comparação às gerações expressivas e elevadas de etanol (1609,9 mg L⁻¹) verificadas.

Figura 30. Abundância Relativa de gêneros *Clostridium* e *Lactobacillus* da Amostra 5

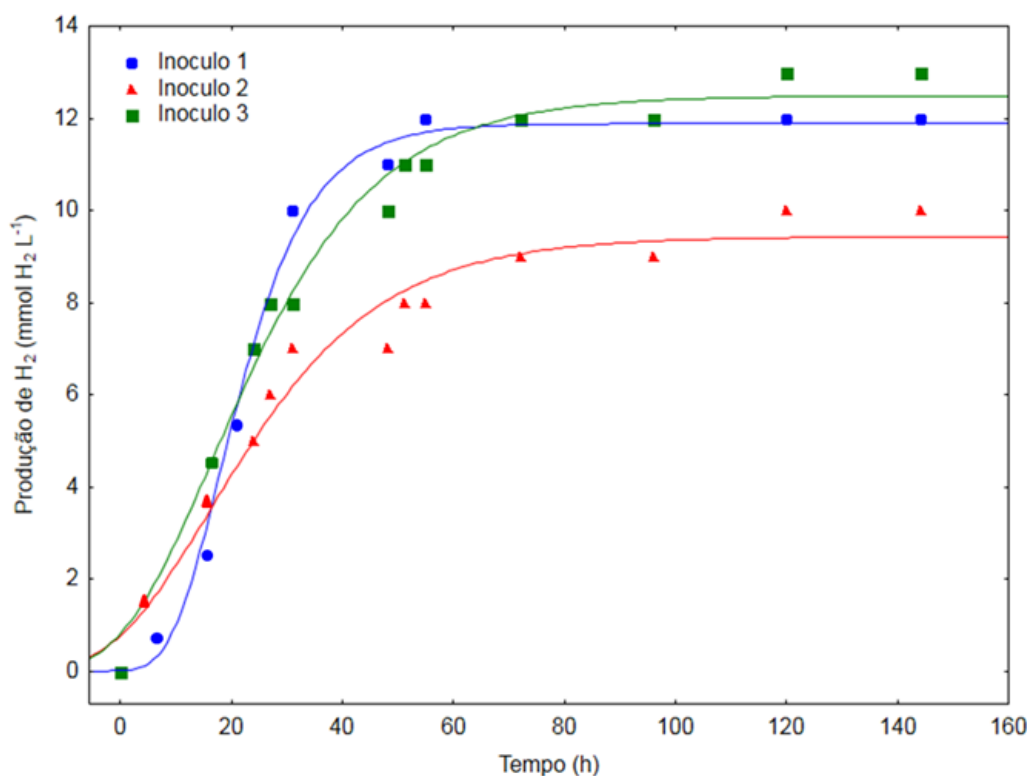


5.6.2 Condição 2 - 80% Meio de cultivo RCM + 20% Efluente bruto citrícola com cultura mista de bactérias anaeróbias e Culturas puras

A produção de hidrogênio foi inferior quando comparada à condição 1. Entretanto, o inóculo 3 obteve a maior produção ($13,1 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) quando comparado às culturas puras ($12,0$ e $9,9 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$, para inóculo 1 e 2, respectivamente).

Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada (Figura 31), os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H_2 (λ), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), foram respectivamente para os inóculos 1, 2 e 3: $\lambda = 9,2$; $1,3$ e $0,1$ horas; $P = 11,9$; $9,4$ e $12,5 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$; e $R_m = 0,5$; $0,2$ e $0,3 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Os coeficientes de determinação (R^2), obtidos pelo tratamento estatístico foram de [(1) $0,996$; (2) $0,977$ e (3) $0,990$]. Vale ressaltar que a fase de início da produção de H_2 foi imediata para o inóculo 3 ($\lambda = 0,1 \text{ h}$), quando comparado aos inóculos 1 e 2 ($\lambda=9,2$ e $\lambda=1,3$); respectivamente, confirmando sua adaptação ao processo fermentativo, conforme descrito a seguir.

Figura 31. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados na condição 2 de 80% com Meio RCM (Reinforced Clostridial Medium) + 20% efluente citrícola



Além de ser observada a produção de H₂ nos reatores em batelada com a mistura de meio de cultivo e efluente bruto citrícola, outros metabólitos solúveis (ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, etanol e metanol) estavam presentes no efluente e foram consumidos e/ou produzidos durante a operação dos reatores (Tabela 13 e Figura 32).

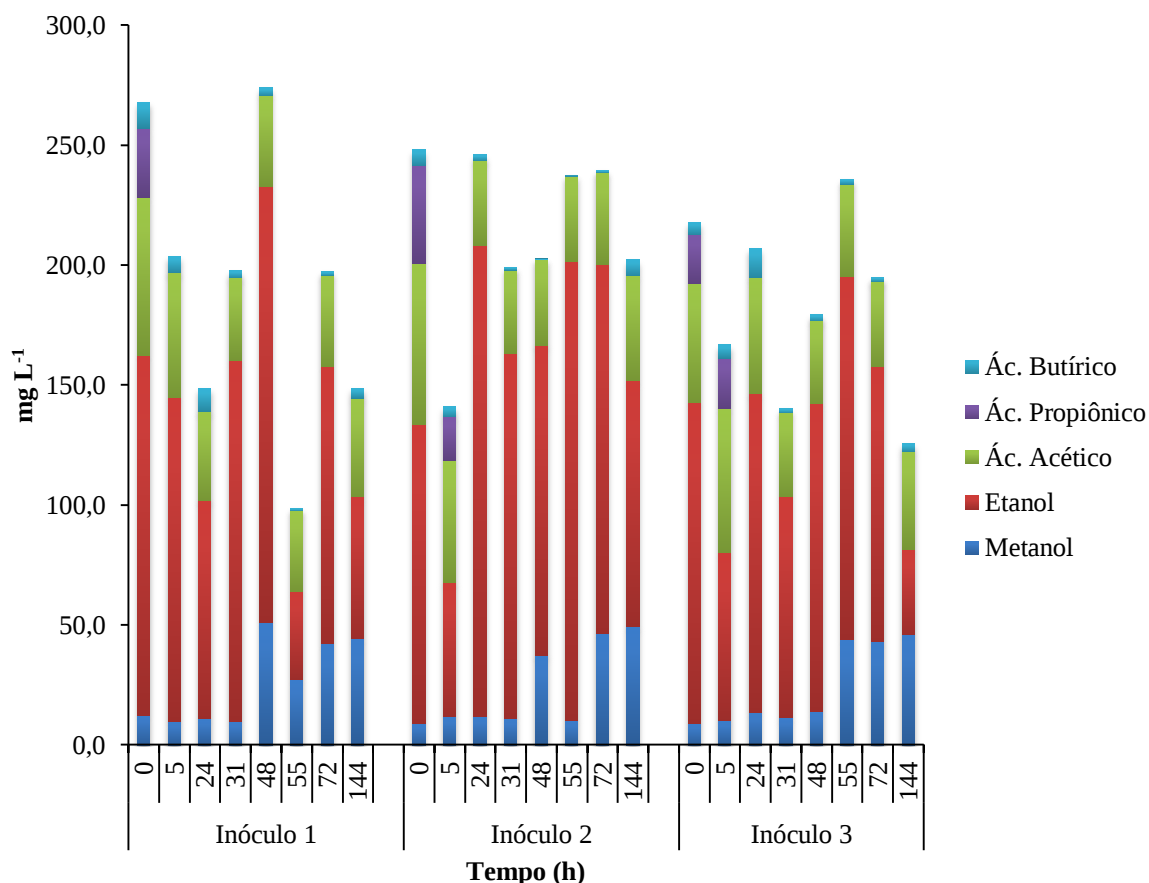
Tabela 13. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores na condição 2 (80% meio RCM + 20% Efluente bruto citrícola).

Tempo (h)	Metanol (mg L⁻¹)	Etanol (mg L⁻¹)	Ác. Acético (mg L⁻¹)	Ác. Propiônico (mg L⁻¹)	Ác. Butírico (mg L⁻¹)
Inóculo 1					
0	12,6±1	150,0±1	65,8±2	28,8±4	10,8±1
5	9,8±1	135,1±1	52,1±4	-	6,7±1
24	11,0±1	90,9±3	37,1±2	-	9,6±2
31	10,0±1	150,6±4	34,2±7	-	3,0±2
48	51,2±1	181,7±3	37,9±1	-	3,2±1
55	27,5±1	36,5±1	33,8±2	-	1,0±1
72	42,2±1	115,7±1	37,9±4	-	1,6±1
144	44,4±1	59,1±6	41,2±6	-	4,1±2
Inóculo 2					
0	9,2±6	124,4±15	67,4±22	40,7±31	6,6±1
5	12,0±6	55,7±38	51,1±18	18,0±11	4,1±1
24	12,0±6	196,1±10	35,6±11	-	2,5±1
31	11,2±2	152,2±39	34,6±12	-	1,3±2
48	37,4±8	129,2±29	35,8±8	-	0,1±1
55	10,4±1	191,1±19	35,7±2	-	0,3±1
72	46,7±6	153,6±23	38,4±4	-	1,0±2
144	49,4±12	102,6±58	43,7±5	-	6,6±1
Inóculo 3					
0	9,1±1	133,9±6	49,6±13	20,2±3	5,2±1
5	10,2±1	70,0±49	60,3±12	20,9±4	5,5±1
24	13,8±4	132,6±24	48,4±14	-	12,3±4
31	11,4±8	92,2±81	34,9±11	-	1,8±1
48	14,1±8	128,5±56	34,2±1	-	2,7±1
55	44,3±3	151,2±17	38,3±2	-	2,2±1
72	43,0±6	114,6±40	35,6±1	-	1,9±1
144	46,2±3	35,6±20	40,6±1	-	3,4±4

Este ensaio foi diferenciado do ensaio anterior, pois com a presença de 20% de efluente bruto citrícola, o etanol foi evidente em todos os inóculos testados. Os resultados obtidos de etanol para os inóculos em estudo corroboram com a faixa de pH deste ensaio que foi abaixo de 5,0. Este resultado está de acordo com o estudo de Ren et al. (2007) onde a faixa adequada para a fermentação do etanol está em pH entre 4,0-5,0. Ressaltando também que em

processos fermentativos, microrganismos produtores de hidrogênio como *Clostridium*, produzem solventes em condições de pH mais reduzido (TREVISAN, 2020), corroborando com o comportamento observado neste trabalho.

Figura 32. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 80% meio de cultivo RCM + 20% efluente bruto citrícola (Condição 2).



5.6.3 Condição 3 - 50% Meio RCM + 50% Efluente bruto citrícola, com cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras

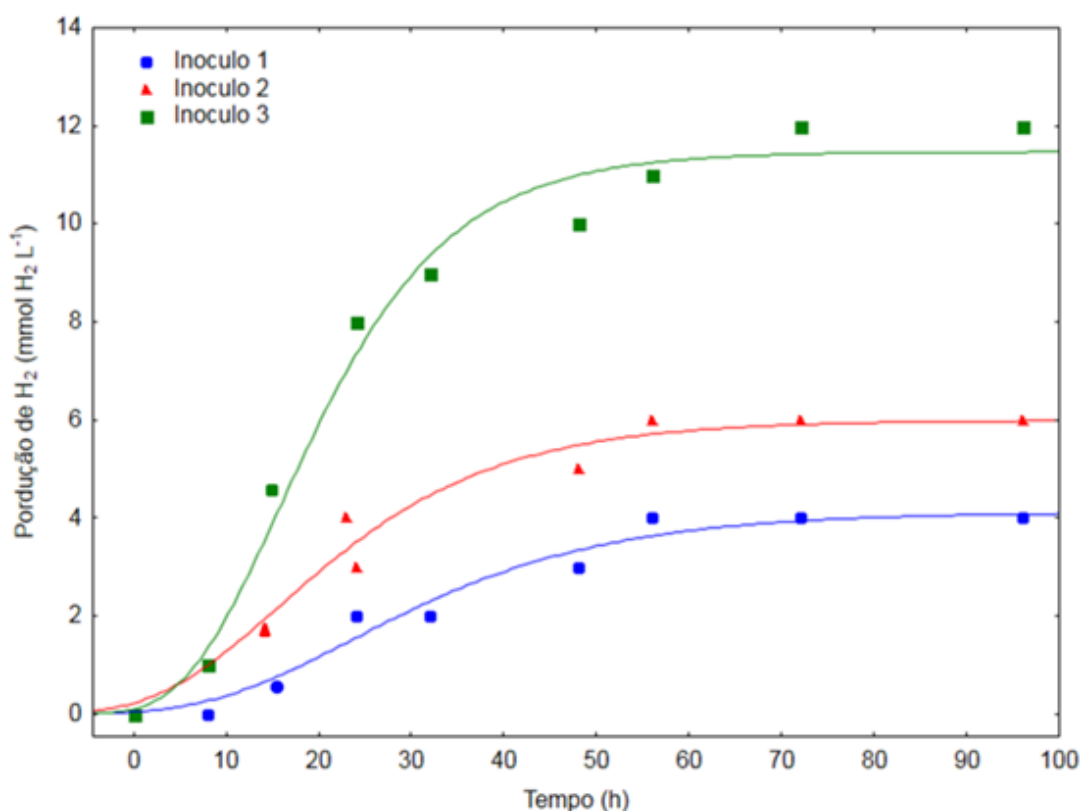
Os reatores anaeróbios se mantiveram por 96 horas de operação, resultando na maior produção de hidrogênio de 11,5 mmol H₂ L⁻¹ para o inóculo 3 e de 4,1; 6,0 mmol H₂ L⁻¹, nos inóculos 1 e 2, respectivamente (Figura 33).

Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada (Figura 33), os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H₂ (λ), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), foram respectivamente para os inóculos 1, 2 e 3: λ = 8,0; 2,5 e 5,6 horas; P = 4,1; 5,99 e

11,5 mmol H₂ L⁻¹; e R_m = 0,09; 0,2 e 0,4 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹. Os coeficientes de determinação (R²), obtidos pelo tratamento estatístico [(1) 0,984; (2) 0,986 e (3) 0,992].

Com o inóculo 3 (cultura mista de bactérias anaeróbias) foram obtidos os melhores resultados de geração de H₂ confirmando, mais uma vez, a sua adaptação ao processo fermentativo de geração desse biocombustível, conforme verificado na condição 2, descrita anteriormente.

Figura 33. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios operados para a condição 3 (50% com Meio de cultivo RCM + 50% efluente citrícola)



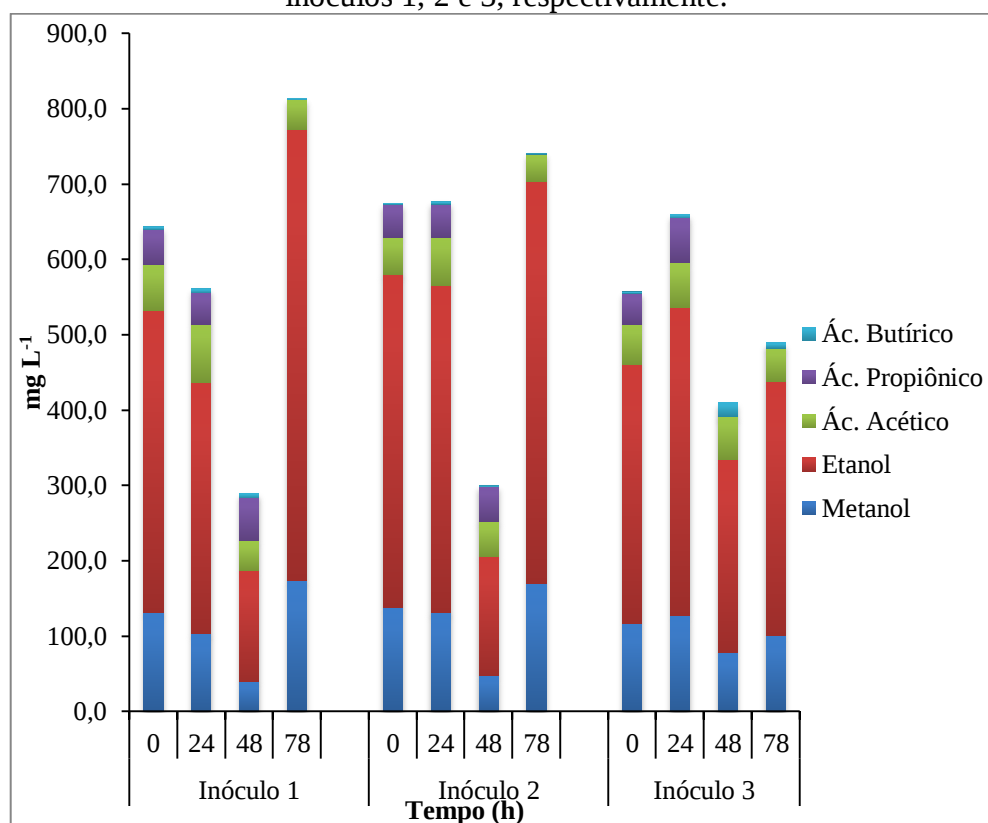
Nos reatores anaeróbios em batelada, foram consumidos e/ou produzidos, em 78 horas de operação, os ácidos acético, butírico e propiônico, além de álcoois como metanol e etanol, em diferentes proporções (Tabela 14 e Figura 34).

Este ensaio se mostrou diferente aos anteriores, pois a proporção de 50% de efluente bruto citrícola, que continha ácidos e álcoois em sua composição, alterou na produção de hidrogênio e de etanol, com o inóculo 3. Isso mostra a adaptação do inóculo ao efluente no meio reacional.

Tabela 14. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 50% meio de cultivo RCM + 50% Efluente bruto citrícola.

Tempo (h)	Metanol (mg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)	Ác. Acético (mg L ⁻¹)	Ác. Propiônico (mg L ⁻¹)	Ác. Butírico (mg L ⁻¹)
Inóculo 1					
0	131,6±20	400,3±57	60,8±1	47,4±1	3,3±1
24	103,0±5	333,5±29	77,2±27	42,1±2	5,0±4
48	39,8±1	146,7±8	39,7±1	57,1±11	6,2±7
78	173,4±24	598,9±39	39,6±7	-	2,0±2
Inóculo 2					
0	137,8±4	442,5±5	48,4±6	44,6±9	1,3±1
24	131,5±26	434,2±88	63,1±4	44,8±9	3,0±1
48	47,4±22	158,3±93	46,4±4	46,4±4	1,3±1
78	169,7±32	533,9±265	36,3±4	-	0,5±1
Inóculo 3					
0	116,9±22	343,9±70	53,0±8	41,6±10	1,5±1
24	126,8±3	410,0±4	59,6±11	58,7±15	4,6±1
48	78,3±71	255,5±228	57,7±5	-	18,3±11
78	101,0±49	336,8±149	44,4±9	-	7,0±1

Figura 34. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 50% meio de cultivo RCM + 50% efluente bruto citrícola para os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente.



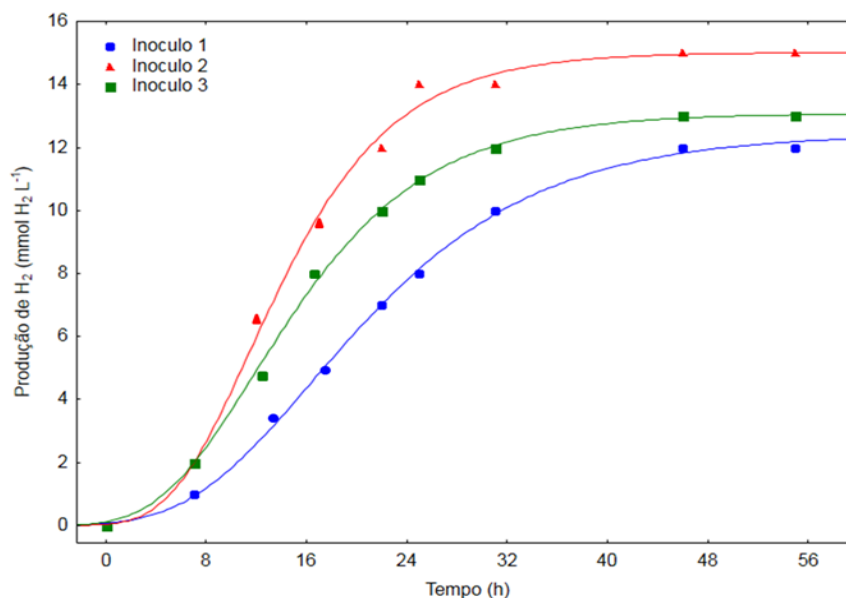
5.6.4 Condição 4 - 20% Meio RCM + 80% Efluente bruto citrícola, com cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras

Foi verificada a adaptação da cultura *C. beijerinckii* (inóculo 2) ao meio reacional contendo 80% de efluente citrícola, resultando na produção de $15,0 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$. Para os inóculos 1 e 3 a produção de hidrogênio foi de $12,4$ e $13,1 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$, respectivamente.

Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada (Figura 35), os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H_2 (λ), produção máxima (P) e taxa de produção (R_m), foram respectivamente para os inóculos 1, 2 e 3: $\lambda = 6,6$; $5,1$ e $4,2$ horas; $P = 12,4$; $15,0$ e $13,1 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$; e $R_m = 0,5$; $0,9$ e $0,6 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Os coeficientes de determinação (R^2), obtidos pelo tratamento estatístico [(1) $0,999$; (2) $0,998$ e (3) $0,999$].

Mesmo assim destaca-se a adaptação do inóculo 3 aos processos fermentativos de geração de H_2 com tempo mais reduzido de início da geração desse biogás ($\lambda = 4,2\text{h}$), quando comparada às culturas puras (inóculo 1 $\lambda = 6,6 \text{ h}$ e; inóculo 2 $\lambda = 5,1 \text{ h}$), na condição operacional imposta.

Figura 35. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3 (■) em reatores anaeróbios operados na condição 4 (20% com Meio de cultivo RCM + 80% efluente citrícola)



Os co-produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios em batelada estão descritos a seguir (Tabela 15, Figura 36).

Em 55 horas de fermentação foi verificado que os principais produtos da fermentação foram o ácido acético, etanol, ácido butírico e ácido propiônico durante a rota de produção de hidrogênio. Com a fase exponencial do crescimento dos microrganismos devido ao consumo do substrato, com 22 horas de operação dos reatores anaeróbios foi observado elevadas produções de ácido acético (91,1; 64,9; 189,0 mg L⁻¹), butírico (65,9; 83,7; 64,3 mg L⁻¹), etanol (114,4; 78,8; 85,3 mg L⁻¹) e ácido propiônico (66,5; 71,9; 81,3 mg L⁻¹) como principais produtos metabólicos (Tabela 15).

Além disso, foi produzido concomitantemente ácido acético e etanol em todos os ensaios. Certamente, uma parte do ácido acético produzido pode ser proveniente da acetogênese (MAZARELI, 2019).

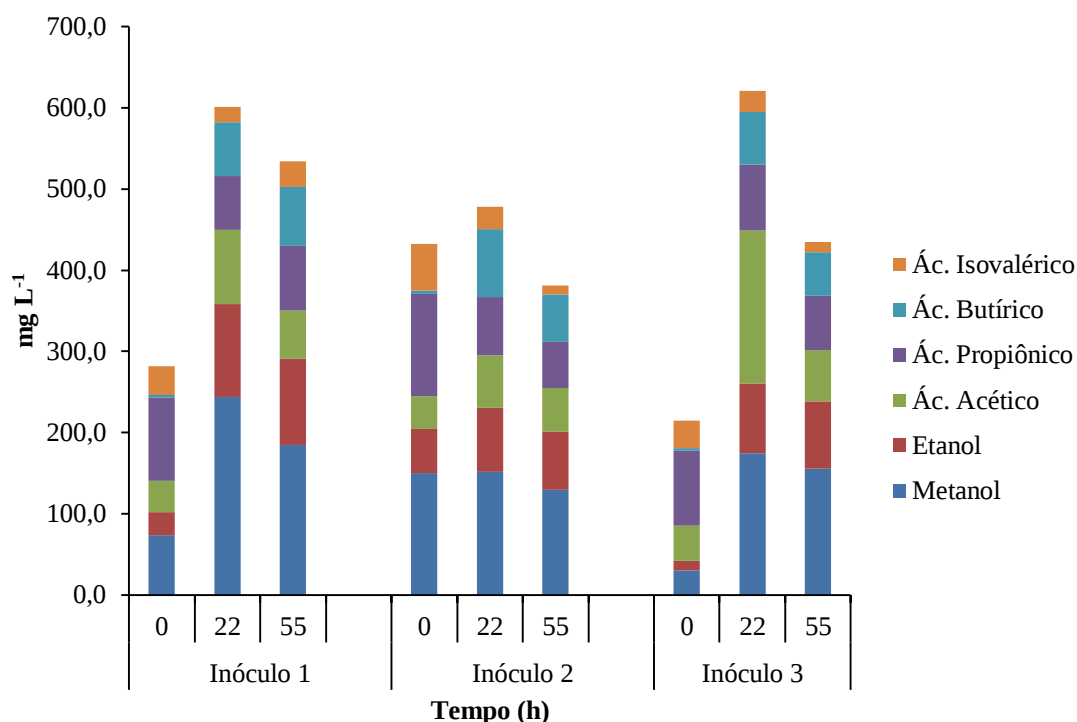
A produção de etanol foi mais evidente no ensaio com o inóculo 1 com concentração de 114,4 mg L⁻¹, que se relacionou com a produção de hidrogênio mais reduzida (12,4 mmol H₂ L⁻¹) em comparação aos inóculos 2 (15,0 mmol H₂ L⁻¹) e 3 (13,1 mmol H₂ L⁻¹). Nesse caso, com o inóculo 1, a rota metabólica para a geração de etanol foi favorecida, confirmando a redução nas gerações de hidrogênio verificadas.

Em relação ao ácido propiônico, verificou-se consumos em todas as condições avaliadas, após 20 horas de fermentação (Tabela 15). Concentração máxima de propiônico de 126,2 mg L⁻¹ foi observada nos ensaios em pH ácido (5,4 – 5,3). Este resultado corrobora com aqueles obtidos por Dareioti et al., (2014), no qual valor de pH ácido favorece a estabilidade da rota fermentativa do ácido propiônico.

Tabela 15. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 20% meio de cultivo RCM e 80% efluente bruto citrícola, para os inóculos 1, 2 e 3.

Tempo (h)	Metanol (mg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)	Ác. Acético (mg L ⁻¹)	Ác. Propiônico (mg L ⁻¹)	Ác. Butírico (mg L ⁻¹)	Ác. Isovalérico (mg L ⁻¹)
Inóculo 1						
0	73,4±43	28,3±12	38,9±3	102,5±2	3,5±1	35,3±8
22	244,1±17	114,4±12	91,1±12	66,5±4	65,9±9	19,6±1
55	185,1±47	106,4±28	59,0±12	79,9±35	71,9±33	31,8±18
Inóculo 2						
0	149,9±119	54,4±38	40,4±6	126,2±15	4,2±1	57,6±14
22	151,4±138	78,8±68	64,9±5	71,9±25	83,7±15	27,3±3
55	129,4±173	71,8±92	54,2±8	56,1±18	58,6±33	11,4±11
Inóculo 3						
0	30,3±2	11,7±3	43,5±2	92,0±13	2,9±1	34,7±16
22	174,8±8	85,3±1	189,0±167	81,3±16	64,3±19	26,6±8
55	155,4±13	82,7±1	63,2±10	67,4±28	53,7±2	12,1±14

Figura 36. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 20% meio de cultivo RCM e 80% efluente bruto citrícola (Condição 4), para os inóculos 1, 2 e 3.



5.6.4.1 Identificação biomolecular: condição 4 (20% meio RCM + 80% EC) [reatores operados com os inóculos 1, 2 e 3 (Amostras 1, 2 e 6)]

Foi verificada abundância relativa de 98% do Filo *Firmicutes* e 2% do Filo *Proteobacteria*. Como esse reator foi inoculado com uma cultura pura de *Clostridium acetobutylicum* (inóculo 1) sem condições assépticas; outras culturas mistas de bactérias anaeróbias advindas do efluente citrícola também foram favorecidas. As famílias de bactérias anaeróbias de geradoras de H₂ identificadas nesta amostra foram: *Clostridiaceae* (73%), *Peptostreptococaceae* (8%) a *Family_IX* (12%). A aplicação do inóculo 1 (*C. acetobutylicum*), por bioaugmentação é uma alternativa para a biodigestão de substratos complexos, como o efluente citrícola, para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico (CAMARGO, et al., 2020), como hidrogênio e álcoois. Nessa condição, a microbiota passou por mudanças, entretanto, para a ordem *Clostridia* foi verificada abundância relativa mais elevada, favorecendo a produção de hidrogênio em 12,4 mmol H₂ L⁻¹.

Bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* são bastante importantes na fermentação dos resíduos para produção de ácidos e álcoois (ATASOY, et al., 2019), sendo o inóculo 1 do gênero *Clostridium* parte deste filo. A família *Clostridiaceae* da respectiva ordem *Clostridiales*, são bactérias gram positivas que apresentam parede celular rígida, tornando-se

mais resistentes a toxicidade dos ácidos e álcoois (WEIDE, et. al., 2019). Com a adição da cultura *Clostridium acetobutylicum* era esperado um predomínio elevado do Gênero *Clostridium*, conforme verificada abundância relativa para este gênero de 72,9 %, com produção de hidrogênio que é característica desses microrganismos anaeróbios.

Para a amostra 2 foram verificadas abundâncias relativas para os Filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Gammabacteria*. Similar ao ocorrido com a amostra 1, a diversidade de bactérias anaeróbias não se limitou à cultura pura de *Clostridium beijerinckii* que foi inoculado nos reatores para essa condição. Ou seja, as mesmas condições não assépticas e a cultura mista de bactérias anaeróbias advindas do efluente citrícola favoreceram a permanência das Famílias *Clostridiaceae* (52%), *Peptostreptococaceae* (4%) a Family_IX (27%), *Gammaproteobacteria* (2%), *Caldicoproteobacteriaceae* (3%), dentre outros.

Os gêneros identificados com maior abundância foram *Clostridium* (53,75%) e *Sporanaerobacter* (26,06%). Esses gêneros podem produzir gás hidrogênio por fermentação escura (WANG e WAN, 2009). Portanto, é provável que espécies desses gêneros tenham contribuído para a geração de hidrogênio neste ensaio, que resultaram em 15,02 mmol H₂ L⁻¹. Ziara, et. al. (2019) também identificaram estes gêneros em seu estudo com águas residuárias contendo lactato a 45°C e pH inicial 8,5 e obtiveram 0,85 mol H₂ / mol de lactato. Tais estudos, com diferentes resíduos agroindustriais, obtiveram gêneros produtores de hidrogênio em comum.

Amostra 6 revelou diversidade elevada em bactérias geradoras de hidrogênio, como a Classe *Clostridiaceae* (44%) e *Bacilli* (3%). Além disso, foram verificadas ainda abundâncias relativas de bactérias anaeróbias pertencentes às Famílias *Peptostreptococaceae* (32%), *Gammaproteobacteria* (3%), dentre outros.

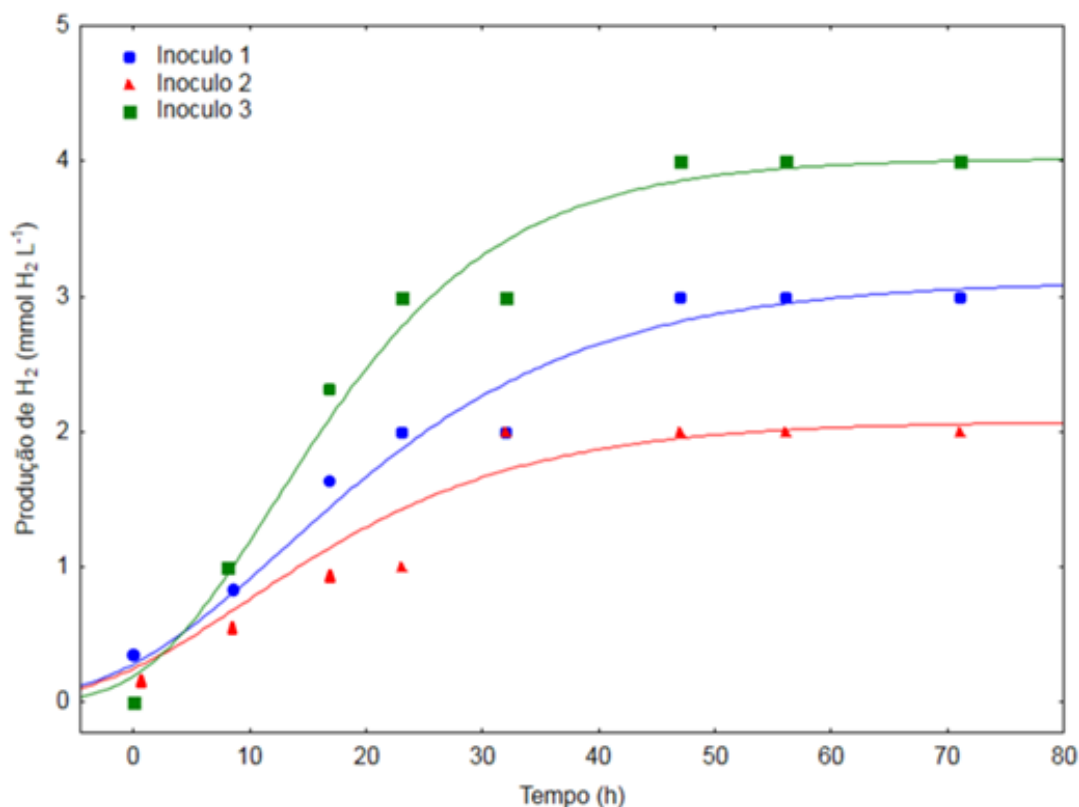
5.6.5 Condição 5 - 100% Efluente bruto Citrícola, com cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras

Os reatores anaeróbios operados durante 71 h produziram 3,1; 2,1 e 4,0 mmol H₂ L⁻¹, com os inóculos 1, 2 e 3, respectivamente.

Pelo ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada (Figura 37), os parâmetros estimados de fase inicial de geração de H₂ (λ), produção máxima (P) e taxa de produção (Rm), foram respectivamente para os inóculos 1, 2 e 3: λ = 1,9; 3,3 e 1,1 horas; P = 3,1; 2,1 e

4,0 mmol H₂ L⁻¹; e R_m = 0,08; 0,06 e 0,13 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹. Os coeficientes de determinação (R²), obtidos pelo tratamento estatístico [(1) 0,979; (2) 0,937 e (3) 0,991].

Figura 37. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos 1 (●), 2 (▲) e 3(■) em reatores anaeróbios alimentados operados na condição 5 (100% Efluente citrícola)



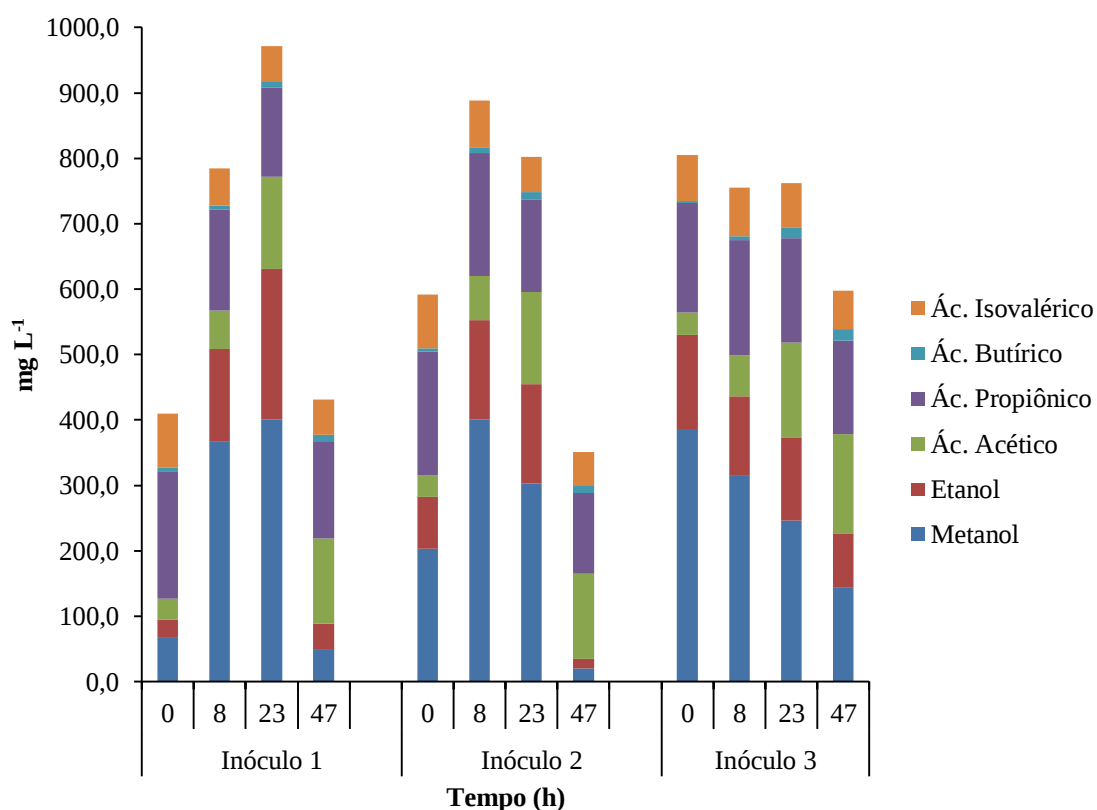
Mais uma vez se destaca a produção de hidrogênio e velocidades de geração desse biogás mais elevadas para os reatores operados com a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3 P = 4,1 mmol H₂ L⁻¹ e R_m = 0,13 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹), quando comparado às culturas puras (inóculo 1 P = 3,1 mmol H₂ L⁻¹ R_m = 0,08 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ e; inóculo 2 P= 2,1 mmol H₂ L⁻¹ e R_m = 0,06 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹).

Durante as operações dos reatores em batelada para os inóculos 1, 2 e 3 ocorreram variações entre consumos e produções de produtos intermediários de valor agregado (Tabela 16 e Figura 38).

Tabela 16. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 100% efluente bruto citrícola, para os inóculos 1, 2 e 3.

Tempo (h)	Metanol (mg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)	Ác. Acético (mg L ⁻¹)	Ác. Propiônico (mg L ⁻¹)	Ác. Butírico (mg L ⁻¹)	Ác. Isovalérico (mg L ⁻¹)
Inóculo 1						
0	68,3±21	26,4±12	31,9±1	194,7±18	5,8±2	82,2±14
8	367,5±5	140,7±2	58,6±6	155,3±1	5,7±1	56,4±3
23	400,9±43	230,2±23	141,1±20	135,6±24	8,7±3	55,0±16
47	48,8±6	40,0±7	130,1±35	148,5±71	9,6±1	53,9±21
Inóculo 2						
0	203,2±126	79,6±45	33,1±1	188,7±13	4,9±1	82,6±3
8	401,2±17	151,4±6	67,7±12	187,9±1	8,3±1	72,3±1
23	303,2±84	151,7±30	141,1±14	140,5±12	12,0±1	53,7±5
47	20,5±14	14,8±10	129,5±13	123,2±2	11,0±3	51,7±5
Inóculo 3						
0	385,8±46	143,9±7	34,2±1	167,8±4	3,2±1	70,2±9
8	315,6±61	120,4±23	62,5±2	176,8±4	5,9±1	73,7±1
23	246,2±33	126,2±17	146,2±8	159,5±7	16,4±15	67,1±8
47	143,8±53	82,8±24	152,0±32	143,0±26	17,7±11	58,3±16

Figura 38. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com 100% efluente bruto citrícola, para os inóculos 1, 2 e 3.



Foram obtidas concentrações elevadas de metabólicos de valor agregado nos reatores em batelada com os inóculos trabalhados em meio reacional contendo somente efluente bruto citrícola. Dentre os produtos gerados destacam-se ácido acético e etanol com todos os inóculos testados.

5.7 Etapa7- Avaliação do lodo granular mesofílico pré-tratado termicamente e a mistura das culturas puras fermentativas, em reatores alimentados com efluente bruto citrícola.

Esta etapa se constituiu-se de:

- Ensaio (I) 80% efluente citrícola + 20% de meio RCM + inóculo [(1) *C. acetobutylicum* (50%)+(2) *C. beijerinckii* (50%)];
- Ensaio (II) 100% efluente bruto citrícola + inóculo [(1) *C. acetobutylicum* (50%)+(2) *C. beijerinckii* (50%)];
- Ensaio (III) 100% efluente bruto citrícola + lodo granular pré-tratado termicamente.

Foi verificado que o pH final se manteve na faixa de 5,5 a 5,8, em comparação aos ensaios anteriores, com os valores reduzidos na faixa de 4,4, mostrando a ocorrência da hidrólise do efluente citrícola pela via fermentativa (Tabela 17).

Nos reatores operados com o inóculo 4, oriundo do lodo granular anaeróbio de reator UASB, submetido ao tratamento térmico para favorecer as bactérias fermentativas e inibir as arqueias metanogênicas, foi obtida uma produção reduzida de hidrogênio de $7,61 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ e um rendimento de $0,71 \text{ mol H}_2/\text{mol glicose}$. Esse resultado mostrou que o tratamento térmico inibiu não somente os consumidores de hidrogênio, mas alguns produtores presentes no lodo, com uma produção mais reduzida, em comparação às culturas puras, descrito a seguir (Tabela 17, Figura 39).

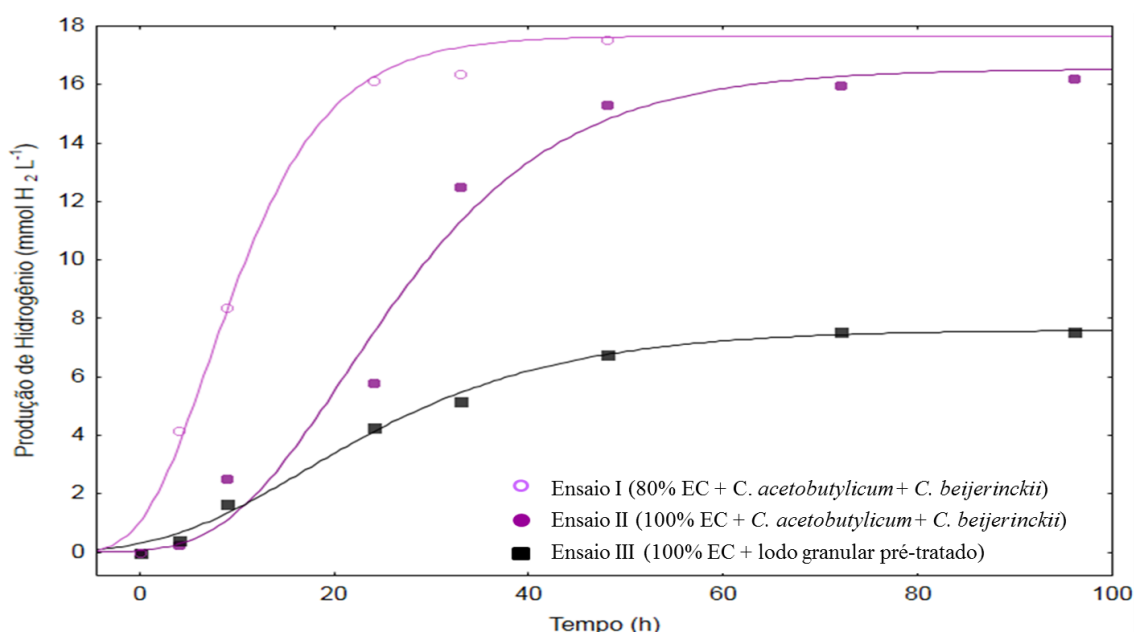
Para os ensaios I e II, com a mistura das culturas puras (*C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*) com duas proporções diferentes de efluente citrícola foi verificado que com 100% EC a produção foi de $16,54 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ e nos reatores alimentados com 80% EC as produções foram de $17,66 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$. Observou-se que o ensaio I com 80% EC a velocidade de geração do biogás foi mais elevada ($0,95 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que no ensaio com 100% EC ($0,49 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Tal fato mostrou que a adição do meio de cultivo em 20%

ao efluente citrícola pode ter oferecido mais substrato prontamente assimilável as bactérias anaeróbias que foram favorecidos para a produção mais elevada de hidrogênio. (Figura 39).

Tabela 17. Resumo geral dos parâmetros obtidos dos reatores anaeróbios para as diferentes condições de alimentação e inóculos. Ensaios: (I) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (80% efluente bruto citrícola; (II) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (100% efluente bruto citrícola) e (III) lodo anaeróbio granular de um reator UASB tratado termicamente.

Condição	80% EC	100% EC	100% EC
Ensaios	(I)	(II)	(III)
pH final	5,7	5,5	5,8
Tempo operação na produção máxima de H ₂ (h)	72	72	72
Consumos DQO (%)	49,4	34,3	54,5
Consumo Carboidratos (%)	55,0	60,8	63,3
Produção Máxima (mmol H ₂ L ⁻¹)	17,66	16,54	7,61
Velocidade global específica (mmol H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	0,95	0,49	0,19
Rendimento mol H ₂ /mol glicose	1,98	1,60	0,71

Figura 39. Ajuste sigmoidal da função de Gompertz modificada nos inóculos do ensaio I (80% EC + *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*); ensaio II (100% EC + *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*) e ensaio III (100% EC + lodo granular pré-tratado)



Segundo Hallenbeck, (2005) o rendimento teórico máximo atingido pelas bactérias fermentativas é de $2 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose. Corroborando com o presente trabalho, a cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) obteve um rendimento de $0,40 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose, elevado quando se comparado às culturas puras (inóculos 1 e 2). Os reatores inoculados com o lodo granular (inóculo 4) alcançaram o rendimento de $0,71 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose. Entretanto, os maiores rendimentos foram com a mistura dos inóculos de culturas puras (*C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*) de 1,60 e 1,98 $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose, para as proporções de 100% e 80% EC, respectivamente, com valores próximos do teórico.

Dentre os ácidos gerados, foram obtidos produções de ácido acético de até $172,9 \text{ mg L}^{-1}$ no ensaio II com 9hs de operação, ácido butírico de até $103,2 \text{ mg L}^{-1}$ no ensaio I com 9hs para as misturas de inóculos 1 e 2, respectivamente; e lodo granular com produções de $116,1 \text{ mg ác. acético L}^{-1}$ e $56,6 \text{ mg ác. Butírico L}^{-1}$ com 48hs de operação dos reatores em batelada (Tabela 18).

Um co-produto de interesse e de valor agregado é o etanol, que foi detectado no efluente citrícola e continuou sendo gerado durante a operação. Com 24h de operação, foi detectado $487,4 \text{ mg L}^{-1}$ no ensaio (I) na proporção 80% EC e, em 48 horas de operação os valores máximos de 682,9 e 771,6 mg L^{-1} nos ensaios (III) em 100% EC + lodo granular e ensaio (II) em 100% EC (Tabela 18).

Nos resultados obtidos de produção ácidos graxos voláteis e álcoois, vale ressaltar que com a presença do efluente bruto citrícola como fonte de carbono para os inóculos, mostrou-se um produção gradativa e/ou acumulativa de etanol, ácido acético e ácido butírico para o ensaio III da etapa 7, com lodo granular pré-tratado termicamente (Tabela 18). Entretanto, na etapa 6 ocorreu a produção desses metabólicos de forma crescente com o decorrer da operação dos reatores em batelada nos ensaios nas condições 3, 4 e 5 para o inóculo 3. Esse resultado ressalta que, a presença do efluente bruto citrícola, em proporções graduais de porcentagem nos ensaios, favoreceu produções de metabólicos de valor agregado como etanol, ácido acético, ácido butírico e propiônico. A obtenção da cultura mista de bactérias anaeróbias mostrou-se adaptada ao efluente bruto citrícola, do qual contribuiu com os altos valores de etanol, produção de ácidos graxos voláteis e simultaneamente a produção de hidrogênio.

Tabela 18. Variação temporal dos produtos intermediários gerados nos reatores anaeróbios alimentados com efluente bruto citrícola, para os inóculos dos Ensaios: (I) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (80% efluente bruto citrícola; (II) *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii* (100% efluente bruto citrícola) e (III) lodo anaeróbio granular de um reator UASB tratado termicamente.

Tempo (h)	Metanol (mg L ⁻¹)	Etanol (mg L ⁻¹)	Ác. Acético (mg L ⁻¹)	Ác. Propiônico (mg L ⁻¹)	Ác. Butírico (mg L ⁻¹)	Ác. Isovalérico (mg L ⁻¹)
Ensaio (I)						
0	229,6±17	444,4±3	80,1±22	211,0±56	6,7±2	85,3±18
9	84,6±47	204,8±73	317,1±277	162,1±13	103,2±69	69,6±15
24	235,6±9	487,4±37	74,3±15	176,9±40	80,6±31	84,0±31
33	139,9±85	334,4±172	80,3±40	168,3±63	49,0±21	83,7±6
48	209,5±145	448,9±223	137,9±23	203,7±27	26,3±18	66,7±8
72	90,6±9	271,6±45	90,9±19	136,7±68	15,0±10	77,2±38
Ensaio (II)						
0	399,9±20	745,5±41	174,9±77	341,6±314	9,1±2	152,9±26
9	354,2±54	682,2±70	172,9±26	424,5±92	8,9±1	147,0±9
24	310,3±70	607,7±107	157,3±31	358,0±169	11,5±2	139,8±4
33	410,7±20	799,3±56	142,5±39	121,9±29	62,1±15	129,7±24
48	380,0±6	771,6±38	152,2±7	381,4±47	46,5±6	156,1±6
72	245,1±35	532,6±70	121,0±17	142,6±41	82,2±6	104,9±5
Ensaio (III)						
0	279,8±52	482,5±94	69,1±3	194,3±20	6,4±1	83,4±12
9	253,7±34	464,3±57	66,4±30	178,9±33	3,9±1	97,4±7
24	200,5±44	448,2±21	91,6±4	161,8±14	24,3±14	33,1±43
33	223,1±176	513,9±374	105,9±27	172,8±34	54,6±12	6,5±3
48	269,1±37	682,9±27	116,1±81	146,4±21	56,6±10	6,8±3
72	303,7±24	673,8±23	113,5±17	118,1±87	43,2±43	8,1±3

Camargo et al (2021), obteve uma cepa de cascas e bagaços de citros do qual foi identificada como 99% similar à *Enterococcus casseliflavus*. Foi realizado ensaio utilizando 2 g L⁻¹ de resíduo sólido de citrus em reatores em batelada com 10 % da cultura isolada como inóculo por 30 h de operação. Dentre os principais metabólitos obtidos, destacou-se o ácido propiônico com 184 mg L⁻¹. Os autores também testaram a concentração de limoneno na produção de ácidos orgânicos e álcoois. Observaram nos ensaios com 2.000 mg L⁻¹ de limoneno o rendimento foi de apenas 0,3 mol de H₂ por mol de glicose. Notaram um aumento proporcional na produção de propiônico ao aumento da concentração de limoneno, sendo observados nos ensaios com 100 mg limoneno L⁻¹ (14 mg propiônico L⁻¹) e nos ensaios com 2.000 mg limoneno L⁻¹ (964 mg propiônico L⁻¹). Fato que já foi apontado por Ruiz e Flotats (2016), relação proporcional entre a concentração de limoneno e a produção de

propiónico. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com esta afirmação dos autores, destacando-se os ensaios I e II da etapa 7 que tem o aumento da proporção de efluente bruto citrícola nos ensaios de 80% para 100%, observando-se assim o aumento da produção de propiônico de um ensaio para outro, sendo que no ensaio I observou uma produção de 211,0 mg L⁻¹ e no ensaio II observou 381, 4 mg L⁻¹ de ácido propiônico. Conforme a literatura, a produção de ácido propiônico não é favorável à obtenção de hidrogênio, sendo inclusive um indicador de inibição da digestão anaeróbia (XING et al., 2016). Entretanto, em nenhum dos experimentos foram obtidas concentrações superiores ao limite inibitório, de 1.000 mg L⁻¹ (SHEN et al., 2018). Fato encontrado em todos os ensaios realizados em todas as etapas deste trabalho, os valores de ácido propiônico não foi inibitório para os ensaios, pois foram obtidos valores inferiores ao limite.

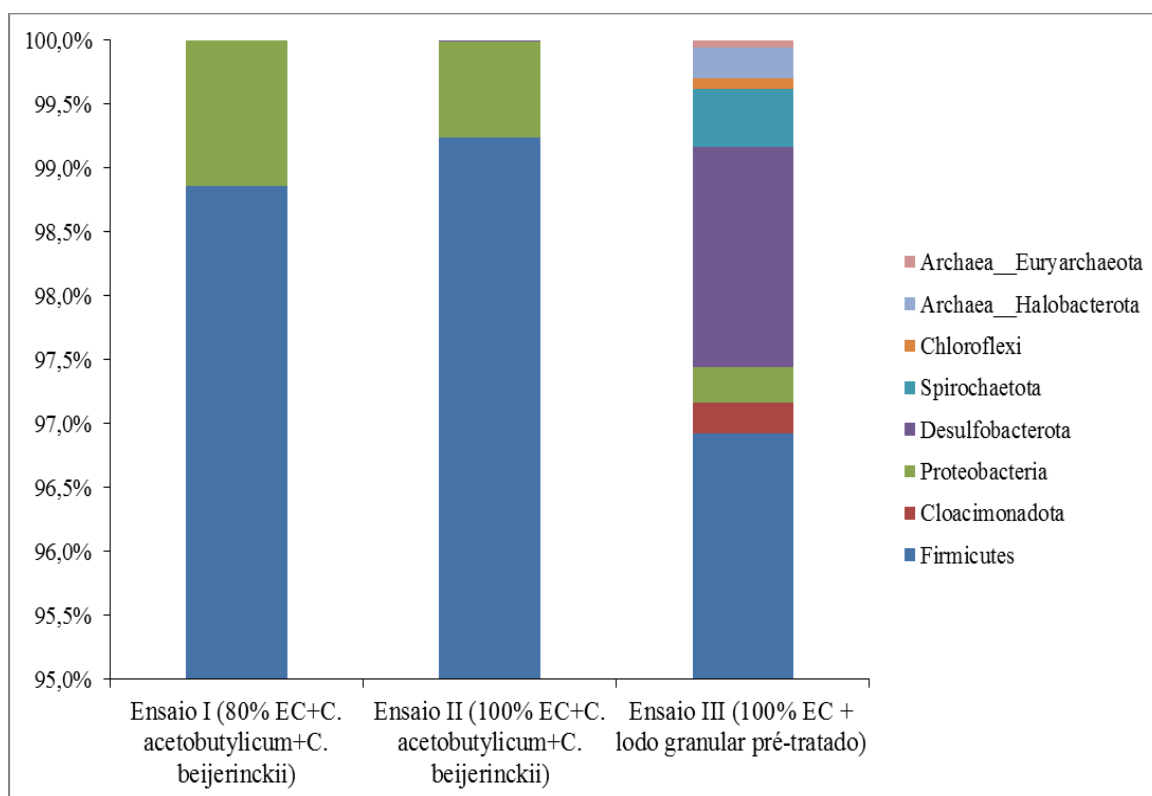
Silva (2015) realizou experimentos com vinhaça bruta e vinhaça autoclavada, em reatores anaeróbios em batelada, em temperatura termofílica e obteve rendimento máximo de hidrogênio de 1,52 mol H₂ / mol glicose em lodo UASB termofílico e 1,65 mol H₂ / mol glicose em cultura isolada do lodo UASB termofílico (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*). No presente estudo, utilizando efluente bruto citrícola, em 100% foram obtidos rendimentos de 0,40; 0,71; 1,60 e 1,98 mol H₂ / mol glicose, respectivamente para cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculos 3), lodo granular pré-tratado termicamente (inóculo 4) e a mistura dos inóculos de cepas puras do gênero *Clostridium* em 100% e 80% EC (ensaios I e II). Camargo, (2021) vias de degradação da celulose origem das cascas e bagaços de citros pela via acetogênica, com os parâmetros operacionais dos reatores anaeróbios em batelada em (44 °C, 40% de *headspace*, pH 5,5 e 15 g L⁻¹ de substrato) resultou na identificação de *Clostridium* e *Paraclostridium* os gêneros mais abundantes. São microrganismos intimamente relacionados a hidrólise e glicólise, etapas presente em ambos os trabalhos de estudo.

5.7.1 Identificação biomolecular: etapa 7 (ensaio I (80% EC + *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*); ensaio II (100% EC + *C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*) e: ensaio III (100% EC + lodo granular pré-tratado) (Amostras 7, 8 e 9).

Ao final da operação dos reatores anaeróbios em batelada foi realizada a identificação molecular dos ensaios com inóculo 4 (100% EC) ensaio (III) e a mistura de inóculos 1 e 2 em (100% EC e 80% EC) (ensaios I e II). A Figura 40 mostra as abundâncias relativas dos filos predominantes: *Firmicutes* (97%) e *Desulfobacterota* (1,7%) para lodo

granular (ensaio III) e; *Firmicutes* (99%) e *Proteobacteria* (1%) nos ensaios da mistura dos inóculos de culturas puras (ensaios I e II).

Figura 40. Abundâncias relativas (%) das taxonomias de Filo das amostras identificadas: ensaio I (80% EC + C. a + C. b); ensaio II (100% EC + C. a + C. b) e; ensaio III (100% EC + lodo granular pré-tratado).



As abundâncias relativas dos principais gêneros identificados no ensaio III foram *Clostridium* (23%), *Paraclostridium* (29%) e *Romboutsia* (29%). O ensaio II (mistura das culturas puras em 100% EC) apresentou abundâncias relativas predominantes de *Clostridium* (96%) e; no ensaio III (mistura das culturas puras em 80% EC) *Clostridium* (67%), *Paraclostridium* (22%) e *Bacillus* (4%).

O gênero *Clostridium* é eficiente na degradação de carboidratos simples e complexos (MAZARELI *et al.*, 2019), além de serem capazes de produzir hidrogênio e solventes (etanol e butanol). São formadores de endósporos em condições de estresse como alterações de temperatura, substâncias tóxicas, falta de substrato, escassez de nutrientes (KIM, *et al.*, 2006) e resistente à faixas de pH abaixo de 6 (LUTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011); característica que foi observada nos ensaios realizados deste trabalho, produção de hidrogênio e solventes em pH na faixa de 6 a 5,0.

Rabelo et al. (2020) isolaram uma cepa de *Paraclostridium* a partir de bagaço de cana-de-açúcar e indicaram que o gênero *Paraclostridium* está presente em resíduos lignocelulósicos para obtenção de hidrogênio. Yang et al. (2019), verificou a presença de *Paraclostridium* em lodo anaeróbio de esgoto doméstico, além de sua dominância comumente associada à elevada obtenção de hidrogênio em reatores anaeróbios, com concomitante produção de ácido acético. Outro gênero identificado no ensaio foi *Romboutsia*, bastonetes anaeróbios e Gram-positivos, gênero dentro da família *Peptostreptococcaceae*, abrange uma ampla gama de capacidades metabólicas em relação à utilização de carboidratos, fermentação de aminoácidos únicos, respiração anaeróbia e produtos finais como ácidos graxos voláteis como metabólicos. Possuem capacidade de fermentar carboidratos por meio da glicólise e possuem a via não oxidativa da pentose fosfato, além de serem capazes de produzir formiato, acetato e lactato (GERRITSEN, et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

O efluente bruto citrícola composto por glicose, frutose e sacarose, além da presença de ácidos como acético e butírico contribuiu para constituição nutricional que possibilitou avaliar o uso como substrato na produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos.

A cultura mista de bactérias anaeróbias, advinda do próprio efluente bruto da agroindústria da laranja, revelou diversidade elevada de bactérias produtoras de H₂ e etanol, nos gêneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Geobacillus*. Além disso, mostrou-se mais adaptada ao consumo de açúcares e ácidos graxos voláteis do efluente bruto citrícola na fermentação, com potencial na produção de hidrogênio e álcoois, principalmente etanol. Além disso, apresentou resultados promissores na geração de H₂ quando comparado às culturas puras de *Clostridium*, que são reconhecidas em produção desse gás

Os componentes nutricionais dos meios de cultivo testados beneficiaram bactérias fermentativas presentes nos inóculos testados, elevando a produção de H₂. Reatores operados sob modo estático e agitação, em diferentes meios de cultivo, com cultura mista de bactérias anaeróbias e culturas puras fermentativas, não apresentaram diferenças nas gerações de hidrogênio. Entretanto, os meios de cultivo RCM e PYG se mostraram eficientes na produção de ácidos orgânicos voláteis e etanol.

Reatores inoculados as culturas puras de cepa *Clostridium* (inóculos 1 e 2) produziram H₂ em glicose e efluente citrícola. Controversamente, os reatores inoculados com cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3) o principal produto final foi o etanol e etanol e H₂ nos reatores alimentados com glicose e efluente citrícola, respectivamente.

Proporções percentuais gradativas de efluente bruto citrícola em reatores anaeróbios em batelada foram favoráveis à produção de H_2 com as culturas puras (inóculos 1 e 2) até a proporção 80% efluente citrícola e 20% meio nutricional RCM. A cultura mista de bactérias anaeróbias (inóculo 3), se mostrou adaptada ao meio contendo o efluente bruto citrícola e resultou na produção de H_2 , etanol e ácidos graxos voláteis. A condição 100% efluente citrícola se mostrou inibitória para as culturas puras devido à baixa produção de H_2 comparada a cultura mista de bactérias anaeróbias, e também pelo fato da alta concentração de ácidos presentes na degradação do efluente.

O lodo granular pré-tratado termicamente, com ampla diversidade de bactérias anaeróbias não se destacou na produção de H_2 e etanol com efluente bruto citrícola em comparação a mistura das culturas puras.

A mistura das culturas puras (inóculos 1 e 2) (*C. acetobutylicum* + *C. beijerinckii*) foi eficiente na produção de H_2 , nos reatores operados com a proporção 80% de efluente citrícola como fonte de carbono.

A avaliação de diferentes fontes de inóculo revelou a ocorrência de rotas metabólicas distintas, com a produção de H_2 inóculo, ácido graxos voláteis e álcoois. A presença do efluente bruto citrícola em reatores anaeróbios com culturas puras e lodo granular causou a modificação da comunidade microbiana destes inóculos, que foram capazes de gerar H_2 e etanol.

A alta demanda das indústrias de processamento da laranja para a produção de suco para exportação provoca um excedente de resíduos, principalmente o efluente citrícola gerado a partir do processo de lavagem dos frutos e dos equipamentos após a extração do suco. A utilização deste efluente citrícola como substratos para processo anaeróbio visando a produção de biocombustíveis e a obtenção de cultura mista autóctones adaptada aos compostos presentes no efluente, além da capacidade de produção de H_2 , ácidos orgânicos e etanol, torna-se o processo econômico e viável industrialmente em comparação a utilização de culturas puras com alto custo experimental.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTURO

Aumento de escala de reator anaeróbio para produção de H_2 e Etanol;

Produção de metano a partir de efluente bruto citrícola com lodo granular e consórcio anaeróbio citrícola.

REFERÊNCIAS

- ABBRESCIA, A.; MARTINO, P. L.; PANELLI, D. et al. The respiratory chains of four strains of the alkaliphilic *Bacillus clausii*. **FEBS Open Bio**, v.4, p. 714-721, ISSN 2211-5463,2014.
- ACS, N.; BAGI, Z.; RAKHELY, G.; MINAROVICS, J., et al. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. **Bioresource Technology**,v.186,p.286-293,ISSN 0960-8524, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.098>.
- ADORNO, M. A. T., HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. "Developmet 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. 05, pp. 406-414, 2014.
- AL-SHORGANI, N.K.N., KALIL, M.S., YUSOFF, W.M.W., HAMID, A.A. Impact of pH and butyric acid on butanol production during batch fermentation using a new local isolate of *Clostridium acetobutylicum* YM1. **Saudi Journal Biological Sciences**; v.25, p.339–48, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.03.020>.
- ALY, S.S., *et al.* Identification of factors that accelerate hydrogen production by *Clostridium butyricum* RAK25832 using casamino acids as a nitrogen source, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, pp. 5300-5313, 2018.
- AMORIM, E. L. C., SADER, L. T., SILVA, E. L. Effect os substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 166, p.1248-1263, 2012.
- AN, Q. et al. "Investigation on hydrogen production from paper sludge without inoculation and its enhancement by *Clostridium thermocellum*", **Bioresouce Technology**, v. 263, pp.120-127, 2018.
- ANGELIS, M., GOBBETT, M. **Lactobacillus spp: General Characteristics**. Book: Reference Module in Food Science DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9. 2016
- APHA, A. and W. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2005.
- AQUINO, S. F. . et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (ame) em lodos anaeróbios. **Engenharia sanitaria ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.
- ATASOY, M., OWUSU-AGYEMAN, I., PLAZA, E., CETECIOGLU, Z. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: current status and future challenges. **Bioresource Technology**, v.268, p. 773-786, 2018.
- ATOLANI,O.; ADAMU, N.;OGUNTOYE,O. S.;et al. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial potentials of the Citrus sinensis seed oil for sustainable cosmeceutical production, **Heliyon**, v. 6, 2020.
- BHARATHIRAJA, B., JAYAMUTHUNAGAI, J., SUDHARSANAA, T., BHARGHAVI, A., PRAVEENKUMAR, R., CHAKRAVARTHY, M., YUVARAJ, D. Biobutanol - Um biocombustível iminente para o futuro: uma revisão sobre as técnicas de processamento upstream e downstream. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 68, p.788-807, 2017.
- BRAR, K. K.; CORTEZ, A. A.; PELLEGRINI, V. O. A. AMULYA, K. et al.An overview on progress, advances, and future outlook for biohydrogen production technology.**International Journal**

of **Hydrogen Energy**, ISSN 0360-3199, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.01.156>.

CALLAHAN, B. J., SANKARAN, K., FUKUYAMA, J. A., MCMURDIE, P.J., HOLMES, S.P. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. **F1000Research**. v.5, p.1492, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2>

CALLAHAN, B.J., MCMURDIE, P.J., ROSEN, M.J., HAN, A.W., JOHNSON, A.J.A., HOLMES, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. **Nature methods**.v.13,p.581, 2016.

CAMARGO, F. P., SAKAMOTO, I.K., BIZE, A., DUARTE, I.C.S., SILVA, E.L., VARESCHE, M.B.A. Screening design of nutritional and physicochemical parameters on bio-hydrogen and volatile fatty acids production from Citrus Peel Waste in batch reactors. **International Journal Hydrogen Energy**; v.46, p.7794–809, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.084>.

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

CHANDRASEKHAR, K.; LEE, Y.; LEE, D. Biohydrogen production: strategies to improve process efficiency through microbial routes. **International Journal Molecular Sciences**, v.16, p. 8266-8293, 2015.

CHENG, Y.; CHON, K.; REN, X.; KOU, Y.; HWANG, M.; CHAE, K. Bioaugmentation treatment of a novel microbial consortium for degradation of organic pollutants in tannery wastewater under a full-scale oxic process, **Biochemical Engineering Journal**, v. 175,p.108131, 2021,ISSN 1369-703X, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108131>.

Citrus: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service, 2022. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>

CLEMENTE, E.; FLORES, A. C.; OLIVEIRA, D. M. Características da Farinha de resíduos do Processamento de Laranja. 2012. p. 256- 269. **Universidade Estadual de Maringá – UEM**, Paraná, Maringá, 2012.

DAREIOTI, M. A.; KORNAROS, M. Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 407–415, 2014.

DAUGHTRY, K. V., JOHANNIGSMEIER, S. D., DAWES, R., KLAENHAMMER, T. R., BARRANGOU, R. Phenotypic and genotypic diversity of *Lactobacillus buchneri* strains isolated from spoiled, fermented cucumber. **International Journal of Food Microbiology**, v.280, p.46-56, 2018

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DÜRRE, P. Fermentative production of butanol — the academic perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.331-336, 2011.

EBRAHIMIAN, F.; KARIMI, K. Efficient biohydrogen and advanced biofuel coproduction from municipal solid waste through a clean process. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122656, 2020.

ERGAL, I.; FUCHS, W.; HASIBAR, B.; THALLINGER, B.; BOCHMANN, G.; RITTMANN, S.K. The physiology and biotechnology of dark fermentative biohydrogen production, **Biotechnology Advances**, v.36, Issue 8, p.2165-2186, ISSN 0734-9750, 2018, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.005>.

ETCHEBEHERE, C. et al. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3371–3384, 2016.

Ezekoye, v.; Adinde, r.; Ezekoye, d.; Ofomatah, a. Syntheses and characterization of biodiesel from citrus sinensis seed oil, **Scientific African**, v.6, 2019.

FALCO, M.; RAURICH, G.; MADRID, O. A. Study of the influence of a bioabsorbent derived from orange peel on a filtering soil using seawater irrigation by capillarity. **International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)**, v.7, p. 8-17, 2021. Disponível em: [Http://hdl.handle.net/2117/344013](http://hdl.handle.net/2117/344013).

FAO. 2021. **Citrus Fruit Statistical Compendium 2020**. Rome. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>

FAOSTAT. **Food and agriculture data. food and agriculture organization FAO**, Rome (2020), Available online at. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Accessed 05 January 2022.

FONSECA, B.C., BORTOLUCCI, J., DA SILVA T.M., DOS PASSOS, V.F., DE GOUVÊA, P.F., DINAMARCO, T.M., et al. Butyric acid as sole product from xylose fermentation by a non solventogenic *Clostridium beijerinckii* strain under controlled pH and nutritional conditions. **Bioresource Technology Reports**; v.10, p.100426, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100426>.

FONSECA, B.C., GUAZZARONI, M.E., REGINATTO, V. Fermentative production of H₂ from different concentrations of galactose by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br21. **International Journal Hydrogen Energy**; v.41, p.21109–20, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.110>.

FONSECA, B.C., SCHMIDELL, W., REGINATTO, V. Impact of glucose concentration on productivity and yield of hydrogen production by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br21. **Canadian Journal of Chemical Engineering**; v.97, p.1092–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cjce.23327>.

GARCÍA, V.; J PÄKKILÄ, J.; OJAMOB, H.; MUURINENA, E.; L. KEISKI, R.L. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 964–980, 2011.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, pp. 5488–5491, 2000

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J-P. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10660-10673, 2010.

GUERRERO, K., GALLARDO, R., PAREDES, I., QUINTERO, J., MAU, S., CONEJEROS, R., et al. Continuous biohydrogen production by a degenerated strain of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **International Journal Hydrogen Energy**; v.46, p.5100–11, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.104>.

HAMILTON, C. et al. "Effect of the nitrogen source on the hydrogen production metabolism and hydrogenases of *Clostridium butyricum* CWBI1009", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, pp.5451-5462, 2018.

HALLENBECK, P. C. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. **Water Science & Technology**, v.52, p.21-29, 2005.

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

HALLENBECK, P. C., LAZARO, C. Z., SAGIR, E. 3.10 – Biohydrogen. **Comprehensive Biotechnology**, v.3, p.128-139, 2019

HAUS, S.; JABBARI, S.; MILLAT, T.; JANSSEN, H.; FISCHER, R.-J.; BAHL, H.; WOLKENHAUER, O. A systems biology approach to investigate the effect of pH induced gene regulation on solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. **BMC Systems Biology**, v.5, p.10. doi:10.1186/1752-0509-5-10, (2011).

HERBERT, D., PHILIPPS, O. S., STRANG, R. E. Carbohydrate analysis. **Methods Enzym**, 5B, p. 265-277, 1971.

HUZIR, I.; AZIZ, M. M.; ISMAIL, S. B.; ABDULLAH, B.; MAHMOOD, N. A.; UMOR, N. A.; MUHAMMAD, S. A. F. Agro-industrial waste to biobutanol production: Eco-friendly biofuels for next generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.94, p.476-485, 2018.

HUANG, Y., LI, W.; ZHAO, L.; SHEN, T.; SUN, J., CHEN, H.; KONG, Q.; NAWAZ, M. A.; BIE, Z. Melon fruit sugar and amino acid contents are affected by fruit setting method under protected cultivation. **Science Hort**, v.214, p. 288-294, 2017.

KHAMAISEH, E. I.; KALIL, M. S.; DADA, O.; YUSOFF, W. M. W. Date Fruit as Carbon Source in RCM-Modified Medium to Produce Biobutanol by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357. **Journal of Applied Sciences**, v. 12, n. 11, p. 1160-1165, 2012.

KIM, D. H., S. K. HAN, S. H. KIM & H. S. SHIN. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31, p.2158-2169, 2006.

KOECK, D. E. et al. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. **Journal of Biotechnology**, v.188, p.136-137, 2014

IEA. 2021. **Net Zero by 2050**, IEA, Disponível em: <https://www.iea.org/reports/net-zero-by-2050>.

JIN, G.B.C.; JIN, B.; MONIS, P.; SAINT, C. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production, **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 375-387, ISSN 0734-9750, 2011.

JOHN, I.; POLA, J.; THANABALAN, M.; APPUSAMY, A. Bioethanol production from musambi peel by acid catalyzed steam pretreatment and enzymatic saccharification: Optimization of delignification using taguchi design. **Waste and Biomass Valorization**, v.11, p. 2631-2643, 2020. Disponível em: 10.1007/s12649-018-00565-x

JOSHI, S.; MISHRA, S. Recent advances in biofuel production through metabolic engineering, **Bioresource Technology**, V. 352, p.127037, 2022, ISSN 0960-8524, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127037>.

KAWAGOSHI, Y., HINO, N., FUJIMOTO, A., NAKAO, M., FUJITA, Y., SUGIMURA, S., et al. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. **Journal Bioscience Bioengineering**; v.100, p.524–30, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.100.524>.

KUMAR, G.; CHO, S. K.; SIVAGURUNATHAN, P.; ANBURAJAN, P., et al. Insights into evolutionary trends in molecular biology tools in microbial screening for biohydrogen production through dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.43, Issue 43, p.19885-19901, ISSN 0360-3199, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.040>.

LAY, J. Y.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. "Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor", **Water Research**, v.32, pp.3673-3679, 1998.

LEE, S.M.; CHO, M. O.; PARK, C.H.; CHUNG, Y.C.; KIM, J.H.; SANG, B. I.; UM, Y. Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate. **Energy Fuels**, v. 22, p. 3459-3464, 2008.

LI, H.G.; MA, X.X.; ZHANG, Q.H.; LUO, W.; WU, Y.; LI, X. Enhanced butanol production by solvent tolerance *Clostridium acetobutylicum* SE25 from cassava flour in a fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v.221, p.412-418, 2016.

LI, C.; FANG, H. H. P. "Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures", **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.37, pp.1-39, 2007.

LIAKOU, V., PATERAKI, C., PALAIOGEORGOU, A. M., KOPSAHELIS, N., CASTRO, A. M., FREIRE, D. M. G., NYCHAS, G. J., PAPANIKOLAOU, S., KOUTINAS, A. Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2,3-butanediol. **Food and Bioproducts Processing**, v.108, p. 27-36, 2018

LIN, P. Y.; WHANG, L. M.; WU, Y. R.; REN, W. J.; HSIAO, C. J.; LI, S. L.; CHANG, J. S. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 12, p. 1728–1735, 2007

LIU, D.; YANG, Z.; WANG, P.; NIU, H., et al. Towards acetone-uncoupled biofuels production in solventogenic *Clostridium* through reducing power conservation. **Metabolic Engineering**, v.47, p.102-112, ISSN 1096-7176, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.012>.

LERTSRIWONG, S., GLINWONG, C. Newly-isolated hydrogen-producing bacteria and biohydrogen production by *Bacillus coagulans* MO11 and *Clostridium beijerinckii* CN on molasses and agricultural wastewater. **Internacional Journal Hydrogen Energy**; v.45, p.26812–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.032>.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. **Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 634–647, 2011.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; BARAL, E. R. et al. Bio-sorbents, industrially important chemicals and novel materials from citrus processing waste as a sustainable and renewable bioresource: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p.61-82, 2020, ISSN 2090-1232, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.01.007>.

MAINTINGUER, S.I., FERNANDES, B.S., DUARTE, I.C.S., SAAVEDRA, N.K., ADORNO, M.A.T., VARESCHE, M.B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal Hydrogen Energy**; v.33, p.4309–17, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.053>.

MAINTINGUER, S.I., LAZARO, C.Z., PACHIEGA, R., VARESCHE, M.B.A., SEQUINEL, R., DE OLIVEIRA, J.E. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. **International Journal Hydrogen Energy**;v.42, p.152–60, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.104>.

MAMMA, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**,v.99, Issue 7, p.2373-2383,ISSN 0960-8524,2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.018>.

MANTZOURIDOU, F.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste.**Biochemical Engineering Journal**,v.101, p.1-8, ISSN 1369-703X, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.013>.

MARTIEN,J. I.; AMADOR-NOGUEZ,D. Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production,**Current Opinion in Biotechnology**, V. 43, P. 118-126,ISSN 0958-1669, 2017.

MARTÍN, M. A. et al. Kinetic evaluation of the psychrophilic anaerobic digestion of synthetic domestic sewage using an upflow filter. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 131–137, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A. , CAETANO, N. S. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1077-1084, 2018.

MAZARELI, R. C. D. S. et al. Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: screening design of factors that affect hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, n. 105573, 2020.

MAZARELI, R. C. S., SAKAMOTO, I. K., SILVA, E. L., VARESCHE, M. B. A. *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. **Journal os Environmental Management**, v.247, p.178-186, 2019.

MCMURDIE, P.J., HOLMES, S. Phyloseq: An r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**.v.8, p.61217. 2013

MEHMOOD, M. A.; SHAHID, A.; MALIK, S.; WANG, N. *et al.*Advances in developing metabolically engineered microbial platforms to produce fourth-generation biofuels and high-value biochemicals, **Bioresource Technology**,V. 337, p.125510, 2021,ISSN 0960-8524,Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125510>

MITRA, R.; BALACHANDAR, G.; SINGH, V.; SINHA, P.; DAS, D. Improvement in energy recovery by dark fermentative biohydrogen followed by biobutanol production process using obligate anaerobes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 4880-4892, 2017.

MONOT, F.; ENGASSER, J.-M.; PETITDEMANGE, H. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 19(6), 422–426. doi:10.1007/bf00454381, 1984.

MONA, S.; KUMAR, S. S.; KUMAR, V.; PARVEEN, K., et al. Green technology for sustainable biohydrogen production (waste to energy): A review.**Science of The Total Environment**,v.728,p.138481, ISSN 0048-9697, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138481>.

MUND, N. K.; LIU, Y.; CHEN, S. Advances in metabolic engineering of cyanobacteria for production of biofuels, **Fuel**, v.322, p.124117, 2022, ISSN 0016-2361, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124117>.

NABGAN, W.; ABDULLAH, T. A.; NABGAN, B.; JALIL, A. A., et al. Catalytic biohydrogen production from organic waste materials: A literature review and bibliometric analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.46, Issue 60, p.30903-30925, 2021.

NANDA et al. Fermentative production of butanol: Perspectives on synthetic biology. **New Biotechnology**, v. 37, p.210-221, 2017.

NDABA, B.; CHIYANZU, I.; MARX, S. *n*-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. **Biotechnology Reports**, v.8, p.1-9, 2015.

NIGHOJKAR, S.; PHANSE, Y.; SINHA, D.; NIGHOJKAR, A.; KUMAR, A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochemistry**, v.41, Issue 5, p.1136-1140, ISSN 1359-5113, 2006.

NOVIK, G., SAVICH, V., MEEROVSKAYA, O. *Geobacillus* Bacteria: Potential Commercial Applications in Industry, Bioremediation, and Bioenergy Production. **Growing Handling of Bacterial Cultures**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.76053>.

OSMAN, A.I.; QASIM, U.; JAMIL, F.; et al. Bioethanol and biodiesel: Bibliometric mapping, policies and future needs, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 152, p.111677, 2021, ISSN 1364-0321, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111677>.

PACHIEGA, R. et al. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 155–163, 2019.

PAPOUTSAKIS, E. T. Engineering solventogenic clostridia, **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.420-429, ISSN 0958-1669, 2008.

PINTO, T.; ALSINA-FLORES, X.; GERNAEY, K. V.; JUNICKE, H. Alone or together? A review on pure and mixed microbial cultures for butanol production, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.147, p.111244, ISSN 1364-0321, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111244>.

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v.101, Issue 11, p.4246-4250, ISSN 0960-8524, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.077>.

RAMEY, D.; Yang, S. **Production of Butyric Acid and Butanol from Biomass**. Book, 2004.

RABELO, C. A. B. S. et al. Isolation of *Paraclostridium* CR4 from sugarcane bagasse and its evaluation in the bioconversion of lignocellulosic feedstock into hydrogen by monitoring cellulase gene expression. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136868, 2020.

REN, N., XING, D., RITTMANN, B.E., ZHAO, L., XIE, T. AND ZHAO, X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, v.9, p.1112-1125, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01234.x>

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E. R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, Issue 4, p.606-614, ISSN 0960-3085, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.002>.

RODRIGUES, C.V., RIOS ALCARAZ F.A, NESPECA, M.G., RODRIGUES, A.V., MOTTERAN, F., ADORNO, M.A.T., et al. Biohydrogen production in an integrated biosystem using crude glycerol from waste cooking oils. **Renew Energy**; v.162, p.701–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.061>.

RUIZ, B.; FLOTATS, X. Effect of limonene on batch anaerobic digestion of citrus peel waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 9–18, 2016.

ROUSSOS, P. A. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece, **Scientia Horticulturae**, v.129, p. 253-258, ISSN 0304-4238, 2011.

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

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

SANTIAGO, S.G., TRABLY, E., LATRILLE, E., BUITRÓN, G., MORENO-ANDRADE, I. The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter*, *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. **Letters in Applied Microbiology**; v.69, p.138–47, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.13191>.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P.S.; KHOO, K.S.; SHOW, P.; CAROLIN, C. F., et al. Biohydrogen from organic wastes as a clean and environment-friendly energy source: Production pathways, feedstock types, and future prospects. **Bioresource Technology**, v.342, 126021, ISSN 0960-8524, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126021>.

SATARI, B.; KARIMI, K. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. **Resources, Conservation and Recycling**, V. 129, P. 153-167, ISSN 0921-3449, 2018, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>.

SEKOAI, P. T.; GHIMIRE, A.; EZEOKOLI, O. T.; et al. Valorization of volatile fatty acids from the dark fermentation waste Streams-A promising pathway for a biorefinery concept, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 143, p.110971, 2021, ISSN 1364-0321, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110971>.

SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M. H.; LEE, Y. R. Converting citrus wastes into value added products: economical and environment friendly approaches. **Nutrition**, v.34, p. 29-46, 2017.

SHEN, F. et al. Effect of organic loading rate on anaerobic co-digestion of rice straw and pig manure with or without biological pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 155– 162, 2018.

SHIDA, G. M.; SADER, L. T.; AMORIM, E. L. C.; et al. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p.16925-16934, 2012.

SHINTO, H., et al. “Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation”, **Process Biochemistry**, v.43, pp.1452-1461, 2008.

SILES, J.A.; VARGAS, F.; GUTIERREZ, M. C.; CHICA, A. F.; MARTIN, M. A. Integral valorisation of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting

technologies. **Bioresource Technology**,v.211, p.173-182,ISSN 0960-8524, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.056>.

SILES, j. a.; martin, m. a.; chica, a. f.; martin, a. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing.**Bioresource Technology**,v.101, p.6315-6321,ISSN 0960-8524,2010.

SILVA, V. RATTI, R.P.; SAKAMOTO, I.K.; ANDRADE, M.V.F.; VARESCHE, M.B.A. Biotechnological products in batch reactors obtained from cellulose, glucose and xylose using thermophilic anaerobic consortium.**Renewable Energy**,v.125, p.537-545,ISSN 0960-1481, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.02.124>.

SILVA, V. C. Obtenção anaeróbia de etanol em reator em batelada a partir de glicose, xilose e celulose em condições termófila. Dissertação de Mestrado – Programa em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, 2015.

SOARES, J. F.; CONFORTIN, T. C.; TODERO, I.; MAYER,F.D.; MAZUTTI, M. A. Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: technological challenges and future prospects. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.117 , p. 109484, 2020.

SOARES, L.A., *et al.* “Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse”, **Biomass and Bioenergy**, v. 117, p. 78-85, 2018.

SONG, Z. X. et al. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and biohydrogen production by dark fermentation. **International journal of hydrogen energy**, v. 37, n. 7, p. 5631–5636, 2012.

SURI, S.; SINGH, A.; NEMA, P. K.Current applications of citrus fruit processing waste: A scientific outlook, **Applied Food Research**,v.2, Issue 1,p.100050, ISSN 2772-5022, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100050>.

TREVISAN, A. P. Atributos do reator anaeróbio contínuo de tubos múltiplos no controle da carga orgânica volumétrica específica na fase acidogênica visando à produção de hidrogênio, 2020.

TORQUATO, L. D. M. et al. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. **Waste Management**, v. 59, p. 181–193, 2017.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. “Hydrogen Production by Fermentative consortia”, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, pp.1000-1013, 2009.

VASIEE, A. et al. Probiotic characterization of *Pediococcus* strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 5, p. 471–479, 2020.

VEZA, I.; SAID, M. F. M.; LATIFF, Z. A. Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. **Biomass and Bioenergy**,V.144,2021,p.105919,ISSN 0961-9534. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105919>.

WANG, X., HE, Q., YANG, Y., WANG, J., HANING, K., HA, Y., WU, B., HE, M., ZHANG, Y., BAO, J., CONTRERAS, L. M., YANG, S. Advances and prospects in metalolic engeneering of *Zymomonas mobilis*. **Metabolic Engineering**, 2018.

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

WEIDE, ET AL. Use of organic waste for biohydrogen production and volatile fatty acids via dark fermentation and further processing to methane. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.44, p.24110-24125, 2019.

WIDMER, W.;ZHOU,W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation, **Bioresource Technology**,v.101, p.5242-5249,2010.

WIKANDARI, R.; YOUNGSUKKASEM,S.; MILLATI, R.; TAHERZADEH,M. J. Performance of semi-continuous membrane bioreactor in biogas production from toxic feedstock containing d-Limonene, **Bioresource Technology**,v.170,p.350-355, 2014.

XIN, B. et al. Co-utilization of glycerol and lignocellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium diolis*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

XUE, C. et al. “Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*”, **Biotechnology Advances**, v.35, pp.310-322, 2017.

YADAV, M.; JOSHI, C.; PARITOSH, K.; THAKUR, J., et al. Organic waste conversion through anaerobic digestion: A critical insight into the metabolic pathways and microbial interactions. **Metabolic Engineering**,v.69,p.323-337,ISSN 1096-7176, 2022,Disponível em:<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.11.014>

YADAV, V., SARKER, A., YADAV, A.,MIFTAH, A, O.,BILAL,M., IQBAL, H. M. N. Integrated biorefinery approach to valorize citrus waste: A sustainable solution for resource recovery and environmental management,**Chemosphere**,V.293, ,ISSN 0045-6535, 2022.

YANG, G.; YIN, Y.; WANG, J. Microbial community diversity during fermentative hydrogen production inoculating various pretreated cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 26, p. 13147–13156, 2019

ZEMA, D. A.; CALABRO, P. S.; FOLINO, A.; TAMBURINO, V.; ZAPPIA, G.; ZIMBONE, S. M. Valorisation of citrus processing waste: A review. **Waste Management**, v.80, p. 252-273, 2018, Disponível em: [10.1016/j.wasman.2018.09.024](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024).

ZIARA, R. M., MILLER, D. N., SUBBIAH, J., DVORAK, B. I. Lactate wastewater dark fermentation: The effect os temperature and initial pH on bio-hydrogen production and microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2019.

ZHANG, H.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. E.Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor.**Water Research**,v.40, Issue 4,p.728-734,ISSN 0043-1354, 2006. Disponível em:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.041>.

ZHOU, M.; YAN, B.; WONG, J.W.; ZHANG, Y. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: a mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways.**Bioresource Technology**, v. 248, p. 68-78, 2018. Disponível em: [10.1016/j.biortech.2017.06.121](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121)

ZHAO, P.; FAN, S.; TIAN, L.; PAN, C.; FAN, Y.; HOU, H.Hydrogen production characteristics from dark fermentation of maltose by an isolated strain F.P 01. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 7189-7193,ISSN 0360-3199, 2010