MÉLIDA DEL PILAR ANZOLA ROJAS

INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO C/N NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR
ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

São Carlos, SP
2010

MÉLIDA DEL PILAR ANZOLA ROJAS

INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO C/N NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR
ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

Dissertação apresentada ao Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Professor Dr. Marcelo Zaiat

São Carlos, SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

A741i Anzola Rojas, Mérida Del Pilar
Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em
reator anaeróbico de leito fixo / Mérida Del Pilar Anzola
Rojas ; orientador Marcelo Zaiat. -- São Carlos, 2010.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Engenharia Hidráulica e Saneamento) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São
Paulo, 2010.

1. Hidrogênio - produção. 2. Relação
carbono/nitrogênio. 3. Fermentação. 4. Sacarose.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Ingeniero **MELIDA DEL PILAR ANZOLA ROJAS.**

Dissertação defendida e julgada em 29/03/2010 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT – (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **EDSON LUIZ SILVA**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **LUIZ OLINTO MONTEGGIA**
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS)

Aprovada

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

DEDICATORIA

*A mi mami Nohora Rojas Orozco por su
incomparable apoyo siempre para seguir
adelante, a pesar de todo.*

AGRADECIMENTOS

À minha família por seu carinho e força durante o decurso deste trabalho.

Ao professor Marcelo Zaiat, pela sua orientação, escuta nos momentos difíceis e por sua dedicação quando precisei.

Aos professores Eugenio Foresti, Maria Bernadete Varesche, Wiclef Dymurgo pelos aportes e ensinamentos.

Ao Eduardo Amorim por suas oportunas explicações e sua disposição sempre.

Ao Wilton Silva pela companhia e colaboração na primeira fase experimental deste trabalho e pelas ajudas nos cálculos químicos.

A Julinha por todas as revisões feitas, calibração dos medidores de gás e por que mais que uma colega foi uma amiga.

A Beto e Jesús pelo seu apoio e companhia no recomeço de tudo.

A minha amiga Adis sempre disposta em todo o que precisei.

Ao pessoal do LPB: Carol, Dagoberto, Julinha, Janja, Sandra, Isabel, Elô, Betão, Renata, Anaflávia, Bruna, Guilherme, Jorge e Gustavo pela colaboração e disposição durante minha fase experimental.

Ao Ministério das Relações Exteriores do Brasil pela concessão da bolsa da agencia financiadora (CNPq).

A FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto temático

Aos meus amigos Cesitar, Soledad, Edwin, Gabrielito, Yovana, Luis, Heiller, Karen y Guido por todos os momentos de alegria.

E a todos os que de alguma maneira contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

Rojas, M.P.A. *Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2010.

O presente trabalho avaliou o efeito da relação C/N na produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária sintética a base de sacarose. Reatores de leito fixo e fluxo ascendente, com polietileno de baixa densidade reciclado para adesão da biomassa, foram operados a 25°C e com um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 2 horas. Analisaram-se diferentes relações C/N (40, 90, 140 e 190), usando a sacarose e a uréia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os valores médios de produtividade de H₂ foram de 0,6 mol-H₂.mol-sac⁻¹, 1,3 mol-H₂.mol-sac⁻¹, 2,2 mol-H₂.mol-sac⁻¹ e 1,7 mol-H₂.mol-sac⁻¹ quando operados os reatores com relações C/N iguais a 40, 90, 140 e 190, respectivamente. Encontrou-se um valor ótimo para C/N de 137, que resultaria em produtividade de H₂ de 3,5 mol-H₂.mol-sac⁻¹, valor igual ao alcançado na relação C/N de 140. O biogás produzido foi composto de H₂ e CO₂, com valores médios percentuais para o H₂ de 53%, 49%, 61% e 52% para as relações C/N de 40, 90, 140 e 190, respectivamente. Os principais produtos intermediários produzidos durante a produção de H₂ foram similares em todas as relações C/N, sendo principalmente detectados ácido acético, ácido butírico e etanol. Sob excesso de nitrogênio, o crescimento da biomassa foi maior com efeitos negativos sobre a produção de hidrogênio, enquanto carência de nitrogênio permitiu o controle do crescimento da biomassa e resultou em maiores produtividades de hidrogênio. Durante os experimentos observou-se queda na produção do biogás provavelmente por atuação de bactérias hidrogênio-oxidantes.

Palavras chave: produção de hidrogênio, relação carbono/nitrogênio, fermentação, sacarose.

ABSTRACT

Rojas, M.P.A. *Influence of the carbon/nitrogen ratio on the hydrogen production in a fixed-bed anaerobic reactor*. Dissertation (Master degree) – School of Engineering of São Carlos, Department of Hydraulics and Sanitation, University of São Paulo, São Carlos, 2010.

This study evaluated the effect of the carbon/nitrogen (C/N) ratio on the hydrogen production from a sucrose-based synthetic wastewater. Up-flow fixed-bed anaerobic reactors with recycled low-density polyethylene for biomass attachment, were operated at 25°C and with a 2 hours time of hydraulic detention. Several C/N relationship were studied (40, 90, 140 and 190), using sucrose and urea as carbon and nitrogen sources, respectively. The average value of the hydrogen productivity were 0,6 mol-H₂.mol-suc⁻¹, 1,3 mol-H₂.mol-suc⁻¹, 2,7 mol-H₂.mol-suc⁻¹ e 1,7 mol-H₂.mol-suc⁻¹ they were reached when the reactors were operated with C/N of 40, 90, 140 and 190, respectively. It was found an optimal value for C/N of 137, which would result in productivity of 3,5 mol-H₂.mol-suc⁻¹, an amount equal to that achieved in the C/N relationship of 140. Biogas produced was composed of H₂ and CO₂, with average H₂ content 53%, 49%, 61% and 52% for C/N of 40,90, 140 e 190, respectively. The mainly intermediary products during H₂ fermentation were similar for all the C/N ratios, being specially detected acetic acid, butyric acid and ethanol. Under excess of nitrogen the biomass growth is higher with negative effects on hydrogen production while deprivation of nitrogen permits the control of biomass growth and results in higher hydrogen productivity. During the experiments it was been observed decline in the biogas production, probably because of the action of the hydrogen-oxidizing bacteria.

Keywords: hydrogen production, carbon/nitrogen ratio, fermentation, sucrose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Fermentação anaeróbia a partir de glicose (Hallenbeck e Ghosh, 2009)	9
Figura 3.2 – Pontos de geração e consumo de hidrogênio (Chernicharo, 1997; Speece, 1996)	10
Figura 3.3 – Rota metabólica simplificada para degradação da glicose e produção de vários metabolitos pelo <i>C. acetobutylicum</i> (Mathews e Wang, 2009)	12
Figura 4.1 – Esquema geral dos experimentos realizados	21
Figura 4.2 – Aparato experimental para produção de hidrogênio	22
Figura 5.1 – Produção de biogás (Q_g) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	34
Figura 5.2 – Eficiência de remoção de sacarose (E) nos reatores em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	35
Figura 5.3 – Distribuição em porcentagem de H_2 ($\%_{H_2}$) no biogás em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲) e de CO_2 ($\%_{CO_2}$) na C/N 40 (□), 90 (○), 140 (◇) e 190 (△)	36
Figura 5.4 – Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	38
Figura 5.5 - Produtividade de H_2 (Y_{H_2}) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	39
Figura 5.6 – Produção volumétrica de hidrogênio (HPR) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	40
Figura 5.7 – Sólidos Totais (ST) no interstício no final da operação	42

Figura 5.8 – Concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente dos reatores em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	43
Figura 5.9 – Valores de produtividade máxima de H ₂ em função da relação C/N	44
Figura 5.10 – Geração de produtos intermediários (C _{PI}) na produção de hidrogênio a partir da fermentação de sacarose para C/N de 40 e 90 - (▲) Ácido Acético, (■) Etanol, (●) Ácido Butírico, (▲) n-Butanol, (■) Ácido Propiônico, (○) Acetona	46
Figura 5.11 – Geração de produtos intermediários (C _{PI}) na produção de hidrogênio a partir da fermentação de sacarose para C/N de 140 e 190 - (▲) Ácido Acético, (■) Etanol, (●) Ácido Butírico, (▲) n-Butanol, (■) Ácido Propiônico, (○) Acetona	47
Figura 5.12 – Distribuição porcentual média dos ácidos no meio líquido	49
Figura 5.13 – Distribuição porcentual média dos alcoóis e acetona no meio líquido	50
Figura 5.14 – pH no efluente dos reatores em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	51
Figura 5.15 – Pontos de coleta para os perfis espaciais	55
Figura 5.16 – Perfil espacial de pH em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	55
Figura 5.17 - Perfil espacial de eficiência de remoção de sacarose (E) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)	56
Figura 5.18 – Perfil espacial de geração de produtos intermediários (C _{PI}) na produção de hidrogênio a partir da fermentação de sacarose (▲) Ácido Acético, (■) Etanol, (●) Ácido Butírico, (▲) n-Butanol, (■) Ácido Propiônico	56
Figura 5.19 – Curvas DTR	57

LISTA DE SÍMBOLOS

Q	Vazão de líquido no reator
V	Volume útil do reator
θ	Tempo de detenção hidráulica teórico aplicado
v_s	Velocidade de conversão de sacarose
C_{So}	Concentração de sacarose no meio afluente
C_{Sf}	Concentração de sacarose no efluente
C_{PI}	Concentração de produtos intermediários
MM_s	massa molar da sacarose
Q_g	Vazão de biogás
V_m	Volume de gás marcado pelo medidor
F_m	Fator de calibração do medidor do gás
$\%_{H_2}$	Porcentagem de hidrogênio no biogás
$\%_{CO_2}$	Porcentagem de dióxido de carbono no biogás
$\%_{CH_4}$	Porcentagem de metano no biogás
n_{H_2}	Quantidade de hidrogênio no biogás
n_{CO_2}	Quantidade de dióxido de carbono no biogás
n_{CH_4}	Quantidade de metano no biogás
P	Pressão de gás
V_i	Volume de gás injetado
R	Constante universal dos gases ideais
T	Temperatura absoluta
v_{H_2}	Vazão molar de hidrogênio

Y_{H_2}	Produtividade de hidrogênio
HPR	Produção volumétrica de hidrogênio
C	Concentração do traçador
C_{max}	Concentração máxima do traçador
$\bar{\theta}h$	Tempo de detenção hidráulica médio
σ^2	Variância
$\frac{D}{u.L}$	Número de dispersão
N	Número de reatores

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Rendimento máximo de açúcar a hidrogênio em processos fermentativos (Maintinguer, 2009)	9
Tabela 3.2 – Culturas puras utilizadas para produção de hidrogênio (Wang e Wan 2009)	13
Tabela 3.3 – Composição química de uma célula bacteriana (Madigan, 2005)	15
Tabela 4.1 – Composição de água residuária sintética (Del Nery, 1987).	23
Tabela 4.2 – Análises de monitoramento no reator	25
Tabela 5.1 – Valores máximos e médios de vazão de biogás produzido (Q_g)	34
Tabela 5.2 – Valores médios de eficiência de remoção de sacarose (E) na etapa de estabilização	36
Tabela 5.3 – Distribuição em porcentagem de H_2 ($\%_{H_2}$) e CO_2 ($\%_{CO_2}$) no biogás	37
Tabela 5.4 – Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) em diferentes relações C/N	38
Tabela 5.5 – Valores máximos e médios de produtividade de H_2 (Y_{H_2})	39
Tabela 5.6 - Valores máximos e médios de produção volumétrica de hidrogênio (HPR)	40
Tabela 5.7 – Valores médios dos sólidos suspensos voláteis (SSV) no afluente dos reatores	43
Tabela 5.8 - Concentração média dos produtos gerados na fermentação de H_2	48
Tabela 5.9 – Dados obtidos das curvas DTR	58
Tabela 5.10 – Número de dispersão e número de tanques de mistura completa em serie	58

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivo geral	5
2.2	Objetivos específicos	5
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1	O hidrogênio	7
3.2	Métodos de produção de hidrogênio	7
3.3	Alguns microrganismos que participam na produção do hidrogênio	11
3.4	Influência de nutrientes na produção fermentativa do hidrogênio: foco na influência do nitrogênio	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Reatores	21
4.2	Meio suporte	22
4.3	Meio de alimentação	23
4.4	Inoculação	24
4.5	Operação dos reatores em bancada	24
4.6	Medição da produção de hidrogênio, monitoramento e análises dos demais parâmetros	25
4.7	Cálculos	27
4.8	Estudos hidrodinâmicos	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

5.1	Produção de hidrogênio	33
5.2	Geração de produtos de fermentação em meio líquido	45
5.3	Instabilidade na produtividade de hidrogênio	50
5.4	Perfis de parâmetros de monitoramento ao longo do reator	54
5.5	Comportamento hidrodinâmico do reator	57
6.	CONCLUSÕES	61
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o elevado crescimento populacional tem aumentado a demanda de energia e consequentemente tem levado ao uso excessivo de combustíveis fósseis. Devido a essa crescente demanda e a necessidade de combustíveis limpos, muitos estudos têm focado a produção de hidrogênio como fonte de energia alternativa.

O hidrogênio é um combustível considerado limpo porque o único produto gerado na combustão com oxigênio é a água, não produzindo, portanto, gases do efeito estufa (Das e Veziroglu 2001, Argun *et al.* 2008, Van Ginkel, Sung e Lay 2001, Lin e Lay 2004, Ren *et al.* 2007, Oztekin *et al.* 2008, Suzuki 1982). A combustão do hidrogênio nos veículos é 50% mais eficiente do que a gasolina (Cheong e Hansen 2007), pois o conteúdo energético (calor de combustão) é de 122 kJ/g, ou seja, 2,75 vezes maior que o obtido com qualquer combustível baseado em hidrocarbonetos (Argun *et al.* 2008).

A principal dificuldade na utilização do gás hidrogênio como combustível, além dos riscos de armazenamento e de transporte (Gerboni e Salvador 2009), é a indisponibilidade da forma pura (H_2) na natureza e o elevado custo dos métodos de produção (Argun *et al.* 2008). Processos como a eletrólise e a decomposição térmica da água a partir de fontes combustíveis não - fósseis são muito caros quando comparados com métodos utilizados para a produção de combustíveis fósseis (Cheong e Hansen 2007).

Cinquenta milhões de toneladas de hidrogênio são comercializadas no mundo, com taxa de crescimento de quase 10% por ano. Baseados nas estimativas do programa nacional de hidrogênio dos Estados Unidos, a contribuição de hidrogênio para o mercado total de energia

poderá ser quase 10% para o ano 2025 (Argun *et al.* 2008; Oztekin *et al.* 2008). Atualmente, 40% do hidrogênio é produzido a partir de gás natural, 30% de óleos de alta densidade e da nafta, 8% a partir do carvão, 4% da eletrólise e 1% é produzido a partir de biomassa (Das, 2009).

A produção biológica de hidrogênio é cada vez mais importante por duas razões: pela utilização dos recursos energéticos renováveis e porque as plantas produtivas podem ser operadas à temperatura e pressão ambientes (Das, 2009). O uso de fontes mais baratas, como águas residuárias com quantidades consideráveis de fração orgânica biodegradável faz com que a produção de hidrogênio seja um processo sustentável, visto que essas águas são abundantes, estão disponíveis e seu tratamento é obrigatório (Babu, Mohan e Sarma, 2009).

O hidrogênio pode ser produzido biologicamente por fermentação ou por meio de organismos fototróficos. O processo anaeróbio fermentativo envolve bactérias anaeróbias estritas e facultativas (Ren *et al.* 2007) e os compostos orgânicos são convertidos em ácidos orgânicos e alcoóis, com liberação do hidrogênio (Cheong e Hansen, 2007). Muitas bactérias fermentativas anaeróbias são capazes de gerar elevadas quantidades de hidrogênio a partir de carboidratos, além de produzi-lo durante o dia e a noite à velocidade constante já que não dependem de uma fonte de energia externa, como o caso das bactérias fototróficas (Alzate-Gaviria *et al.* 2007; Das, 2009).

Vários fatores reconhecidamente afetam a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios como temperatura, pH, tipo e condição operacional do reator, forma de inoculação, origem e tratamento do inóculo, característica das águas residuárias, entre outros. As características das águas residuárias são de extrema importância, pois a produção de hidrogênio dependerá da composição de compostos orgânicos, sendo os carboidratos os principais compostos de interesse no processo, e da composição de macro (nitrogênio, fósforo e enxofre) e micronutrientes (potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, cobalto, cobre,

molibdênio e zinco), essenciais para o metabolismo. Dentre os macronutrientes, o nitrogênio é o mais requerido pelos microrganismos e o metabolismo pode ser alterado pela deficiência ou excesso desse nutriente no meio. No caso da produção de hidrogênio, a disponibilidade de nitrogênio pode ser fator de grande importância para aumento da produtividade do hidrogênio, como foi observado por Lin e Lay (2004) e Peixoto (2007). Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar a influência da relação entre o conteúdo de carbono e nitrogênio (C/N) na produção de hidrogênio, por meio da avaliação de diferentes relações C/N (40, 90, 140 e 190) em um reator de leito fixo de fluxo ascendente, utilizado para a produção de hidrogênio, tendo como afluente água residuária sintética a base de sacarose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente projeto foi a avaliação da relação carbono/nitrogênio na produção biológica de gás hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo, com fluxo ascendente, tendo sacarose como fonte de carbono e uréia como fonte de nitrogênio.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a vazão molar, produtividade e produção volumétrica de gás hidrogênio para as relações C/N: 40, 90, 140 e 190 e buscar a relação que maximize esses parâmetros.
- Determinar a porcentagem de gás hidrogênio na composição do biogás adquirido para cada relação de C/N.
- Avaliar a distribuição de ácidos voláteis e alcoóis produzidos para cada relação C/N.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O hidrogênio

O hidrogênio é o mais abundante elemento no universo e encontra-se amplamente distribuído na Terra em combinação com outros elementos, sendo a água o principal composto (Das e Veziroglu, 2001). É possível encontrar hidrogênio em todos os componentes da matéria viva e de muitos minerais. Além de todos os ácidos conterem hidrogênio, este também faz parte essencial dos hidrocarbonetos e de uma grande variedade de outras substâncias orgânicas. Em estado livre o hidrogênio só se encontra em pequenas quantidades na atmosfera.

Segundo Das & Veziroglu (2001), o hidrogênio pode ser usado como reagente nos processos de hidrogenação, também para remover quimicamente os traços de O_2 e evitar a oxidação e corrosão. É utilizado como combustível em motores de foguete, refrigerante em geradores elétricos e, agora é alvo de muitos estudos científicos como fonte de energia renovável (Wang e Wan 2009, Hallenbeck e Ghosh 2009).

3.2 Métodos de produção de hidrogênio

Das & Veziroglu (2001) resumiram os métodos de produção de hidrogênio a partir de combustíveis fósseis, biomassa e água. Dentre desses, a partir de combustíveis fósseis estão: a reforma do vapor do gás natural, *cracking* térmico do gás natural, oxidação parcial da nafta

e gaseificação do carvão; a partir de biomassa: a pirólise ou a gaseificação (que produz uma mistura de gases como, por exemplo, H_2 , CH_4 , CO_2 , CO , N_2); e a partir da água: a eletrólise, fotólise, processos termoquímicos, decomposição térmica direta ou termólise, além da produção biológica.

A produção biológica de hidrogênio pode ser dividida em: biofotólise de água usando algas e cianobactérias, fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas, produção fermentativa de hidrogênio a partir de compostos orgânicos e sistemas híbridos usando bactérias fotossintéticas e fermentativas.

Bioprocessos utilizados para produção de hidrogênio operado sob condições moderadas de temperatura e pressão (30 a 35°C, 1 atm) ocorrem com velocidades satisfatórias de produção. No entanto, essas velocidades são menores quando comparadas com as observadas nos processos químicos (Argun *et al.* 2008, Oztekin *et al.* 2008).

Por outro lado, a biofotólise de água por algas é bastante lenta, inibida pelo oxigênio do ar e é dependente da disponibilidade da luz solar. Assim, recursos renováveis como a biomassa oferecem vantagens especiais para produção de hidrogênio em comparação com outras matérias primas (Argun *et al.* 2008, Oztekin *et al.* 2008).

Na produção biológica por fermentação, o hidrogênio, ácidos voláteis e alcoóis são obtidos principalmente de carboidratos presentes em águas residuárias (Figura 3.1). Esse processo não necessita de luz nem de culturas puras de microrganismos, apresenta boa estabilidade na produção de hidrogênio e os custos de operação são relativamente baixos (Wang e Wan, 2009; Hallenbeck e Ghosh, 2009). Aliás, os ácidos produzidos (principalmente butírico, acético e propiônico) podem ser usados por indústrias químicas e de alimentos (Leite *et al.*, 2008). Na Tabela 3.1 são apresentados os rendimentos máximos de conversão de açúcares a hidrogênio nos processos fermentativos.

Figura 3.1 – Fermentação anaeróbica a partir de glicose (Hallenbeck e Ghosh, 2009)

Tabela 3.1 – Rendimento máximo de açúcar a hidrogênio em processos fermentativos (Maintinguer, 2009)

Açúcar	Rota Metabólica	mol-H ₂ .mol açúcar ⁻¹
Glicose	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 4H_2 + 2 CO_2$	4
	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_2CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2 CO_2$	2
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11} + 5 H_2O \rightarrow 4 CH_3COOH + 4 CO_2 + 8 H_2$	8
	$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2 CH_3CH_2CH_2COOH + 4 CO_2 + 4H_2$	4
Xilose	$C_5H_{10}O_5 + 3 H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3 CO_2 + 6 H_2$	6
	$C_5H_{10}O_5 + 2 H_2O \rightarrow \frac{1}{2} CH_3CH_2CH_2COOH + 3 CO_2 + 5H_2$	5

Speece (1996) descreve a digestão anaeróbica como um processo complexo que envolve diversas classes de microrganismos e várias fases intermediárias. Se o substrato contém componentes orgânicos complexos, estes são hidrolisados em compostos mais simples (polímeros em monômeros). Os produtos gerados anteriormente são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, sendo convertidos em ácidos orgânicos,

álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amoníaco e sulfato de hidrogênio. Os ácidos orgânicos com mais de dois carbonos são convertidos em acetato e gás hidrogênio pelas bactérias homoacetogênicas e sintróficas, sendo essas últimas também chamadas de produtoras obrigatórias de hidrogênio (*OHPA – obligate hydrogen producing acetogens*). Finalmente o acetato e o gás hidrogênio são convertidos em metano pelas arqueias metanogênicas. Um esquema desse processo é apresentado na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Pontos de geração e consumo de hidrogênio (Chernicharo, 1997; Speece, 1996)

No processo anaeróbico, o acúmulo de hidrogênio é devido ao desequilíbrio entre as bactérias produtoras de hidrogênio (acetogênicas) e as arqueias metanogênicas consumidoras de hidrogênio. Assim, um desequilíbrio anaeróbico é desejável quando o objetivo é a obtenção de hidrogênio e ácidos orgânicos (Leite *et al.* 2008).

Recentes relatos da literatura apresentam os principais fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio, entre eles o inóculo, tipo de reator, nitrogênio, fósforo, metais, temperatura e pH. No entanto, existem algumas discordâncias sobre a ótima condição de determinado fator na produção biológica de hidrogênio (Wang e Wan 2009, Babu *et al.* 2009, Das 2009, Hallenbeck e Ghosh 2009).

3.3 Alguns microrganismos que participam na produção do hidrogênio

Existem diferentes microrganismos que participam na geração biológica de hidrogênio, tais como as algas verdes, cianobactérias, bactérias fotossintéticas e as bactérias fermentativas (Das e Veziroglu, 2001). Segundo Maintinguer (2008), as principais bactérias fermentativas conhecidas para a produção de hidrogênio incluem espécies de *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*.

Os microrganismos pertencentes aos gêneros *Clostridium* são os mais importantes devido a seu alto potencial para produção de hidrogênio, pelo seu rápido metabolismo e sua capacidade de formar esporos. Esses organismos são capazes de produzir hidrogênio em condições mesofílicas ou termofílicas dentro de uma faixa de pH entre 5 e 6 (Krupp e Widmann, 2009). Segundo Khanal *et al.* (2004), o gênero *Clostridium* produz hidrogênio utilizando a atividade das enzimas piruvato – ferredoxina – oxidoredutase e desidrogenase. A atividade da desidrogenase pode ser inibida por valores baixos de pH, sendo este um fator importante na produção de hidrogênio. Em alguns casos, essa atividade também pode ser suprimida na presença de elevados níveis de hidrogênio.

Em um processo anaeróbio, o hidrogênio é produzido durante a fase exponencial de crescimento do *Clostridium*, com produção de solventes na fase estacionária. Isso acontece quando o pH cai para menos de 4,5. Aparentemente, o acúmulo de ácidos graxos voláteis e

hidrogênio na fase de crescimento exponencial provoca essa mudança de rota. Os gêneros *Clostridium* podem produzir hidrogênio a partir da degradação de proteínas, aminoácidos ou carboidratos. O *C. acetobutylicum* tem sido de grande interesse devido à sua capacidade de fermentar vários substratos em valiosos produtos finais como acetona, butanol e etanol (Figura 3.3) (Mathews e Wang, 2009).

Figura 3.3 – Rota metabólica simplificada para degradação da glicose e produção de vários metabólitos pelo *C. acetobutylicum* (Mathews e Wang, 2009)

Segundo Wang e Wan (2009), existem outros estudos realizados com culturas puras em diferentes configurações de reatores (Tabela 3.2), nos quais *Clostridium* e *Enterobacter* foram os principais microrganismos produtores de hidrogênio.

Tabela 3.2 – Culturas puras utilizadas para produção de hidrogênio (Wang e Wan 2009)

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Produtividade de H ₂	Referencia
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glicose	Batelada	2.0 mol.mol ⁻¹ Glicose	Chin, Chen e Chou (2003)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glicose	Contínuo	1.08 mol.mol ⁻¹ Glicose	Zang <i>et al.</i> (2006)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Xilose	Batelada	0.73 mol.mol ⁻¹ xilose	Lo <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	Amido	Batelada	9.95 mmol.g COD	Chen <i>et al.</i> (2007)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	Sacarose	Batelada	2.07 mol.mol ⁻¹ hexose	Lo <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Esgoto quitinoso	Batelada	2.2 mol.mol ⁻¹ substrato	Levin <i>et al.</i> (2006)
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Biomassa celulósica	Batelada	2.3 mol.mol ⁻¹ Glicose	Collet <i>et al.</i> (2004)
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	Contínuo	3.0 mol.mol ⁻¹ lactose	Taguchi <i>et al.</i> (1996)
<i>Clostridium</i> sp. strain no. 2	Celulose	Contínuo	0.3 mol.mol ⁻¹ Glicose	Pan <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glicose	Batelada	0.2 mol.L meio	Pan <i>et al.</i> (2008)
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glicose	Batelada	1.0 mol.mol ⁻¹ Glicose	Yokoi <i>et al.</i> (1995)
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	Glicose	Batelada	0.05 mol.L meio	Ogino <i>et al.</i> (2005)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glicose	Batelada	–	Jo <i>et al.</i> (2008)
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU ⁻¹ 01	Glicerol	Batelada	0.6 mol.mol ⁻¹ Glicerol	Nakashimada <i>et al.</i> (2001)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Amido	Batelada	1.09 mol.mol ⁻¹ amido	Fabiano e Perego (2002)
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Molasas	Contínuo	3.5 mol.mol ⁻¹ sugar	Tanisho e Ishiwata (1995)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Glicose	Contínuo	–	Kumar e Das (2001)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Sacarose	Batelada	6 mol.mol ⁻¹ Sacarose	Kumar e Das (2000)
Continua				

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Produtividade de H ₂	Referencia
Continuação e fim				
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Celobiose	Batelada	5.4 mol.mol ⁻¹ celobiose	Kumar e Das (2000)
<i>Escherichia coli</i> MC13-4	Glicose	Batelada	1.2 mol.mol ⁻¹ Glicose	Ishikawa <i>et al.</i> (2006)
<i>Escherichia coli</i>	Glicose	Batelada	2.0 mol.mol ⁻¹ Glicose	Bisaillon <i>et al.</i> (2006)
<i>Escherichia coli</i>	Glicose	Contínuo	2.0 mol.mol ⁻¹ Glicose	Turcot <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas</i> sp. GZ1	Lodo residual	Batelada	0.007 mol.g TCOD	Guo <i>et al.</i> (2008)
<i>Thermoanaerobacterium thermosucccharolyticum</i> KU001	Glicose	Batelada	2.4 mol.mol ⁻¹ Glicose	Ueno <i>et al.</i> (2001)
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Amido	Contínuo	–	Kanai <i>et al.</i> (2005)
Hydrogen-producing bacterial B49	Glicose	Batelada	0.1 ml.L meio	Wang <i>et al.</i> (2007)
<i>Ruminococcus albus</i>	Glicose	Batelada	2.52 mol.mol ⁻¹ Glicose	Ntaikou <i>et al.</i> (2008)
<i>Hafnia alvei</i>	Glicose	Batelada	–	Podesta <i>et al.</i> (1997)
<i>Citrobacter amalonaticus</i> Y19	Glicose	Batelada	8.7 mol.mol ⁻¹ Glicose	Oh <i>et al.</i> (2008)
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glicose	Contínuo	1.93 mol.mol ⁻¹ Glicose	Xing <i>et al.</i> (2008)

3.4 Influência de nutrientes na produção fermentativa do hidrogênio: foco na influência do nitrogênio

As condições ambientais e a composição de nutrientes afetam significativamente a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia (Oztekin *et al.* 2008). Geralmente, a partir da composição química das células são estabelecidas as necessidades nutricionais dos

microrganismos. Como a composição exata é raramente conhecida, os requisitos nutricionais são determinados com base na composição empírica da célula (Chernicharo, 1997).

As células contêm um grande número de moléculas pequenas, como a água, íons inorgânicos e substâncias orgânicas (Tabela 3.3), porém, consistem principalmente de grandes moléculas (polímeros) como proteínas e ácidos nucleicos (Madigan, 2005).

Tabela 3.3 – Composição química de uma célula bacteriana (Madigan, 2005)

Molécula	% peso úmido	% peso seco
Água	70	-
Total macromoléculas	26	96
Proteínas	15	60
Polissacarídeos	3	5
Lipídios	2	9
DNA	1	3
RNA	5	19
Total monômeros	3	3
Aminoácidos	0,5	0,5
Açúcar	2	2
Nucleotídeos	0,5	0,5
Íons inorgânicos	1	1
Total	100%	100%

A matéria sólida de uma célula microbiana contém, principalmente, além de hidrogênio e oxigênio que são derivados da água, carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Estes seis elementos representam cerca de 95% do peso seco celular. Muitos outros elementos estão em frações traços como: potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, cobalto, cobre, molibdênio e zinco. Assim, os nutrientes disponíveis para o desenvolvimento celular podem ser divididos em duas classes: os macronutrientes que são aqueles requeridos em grandes quantidades pela célula e os micronutrientes, necessários em quantidades extremamente

pequenas (Brucha, 2007).

O nitrogênio pode ser encontrado na célula microbiana em associação com compostos orgânicos e de forma reduzida (grupo amino), na constituição de proteínas, aminoácidos e coenzimas. As fontes de nitrogênio para as células microbianas são os aminoácidos, amônia e nitrato (Madigan, 1996).

Alguns dos estudos reportados indicaram que o nitrogênio e o ferro são os nutrientes mais importantes e essenciais para a produção de gás hidrogênio. Baixas ou elevadas concentrações desses nutrientes causam baixo rendimento e reduzidas velocidades de produção de hidrogênio porque podem atuar como fator limitante, mudar as rotas metabólicas, reduzir a atividade biológica, causar efeitos inibitórios, interferir nas culturas microbianas dominantes e nos produtos da fermentação (Oztekin *et al.* 2008).

Segundo Odum (1983), o fator limitante é considerado como a quantidade mínima necessária de um material para a manutenção das funções vitais dos organismos, ou seja, a condição que se aproxima ou exceda os limites de tolerância. Pode ocorrer um fator limitante não só por causa de insuficiência de algum material, mas também por excesso.

Várias pesquisas testaram diferentes relações C/N procurando melhorar a produção de hidrogênio. A influência da relação C/N é geralmente avaliada sobre o conteúdo de gás hidrogênio no biogás produzido, a produtividade na produção de hidrogênio (a habilidade de converter substrato em hidrogênio – quantidade de produto por quantidade de substrato) e a produção volumétrica de hidrogênio (velocidade de produção do hidrogênio no reator – quantidade de hidrogênio por volume de reator por tempo).

Lin e Lay (2004) testaram relações C/N de 40 até 130. O substrato utilizado foi sacarose (20 g-DQO.L⁻¹) e o inóculo foi lodo pertencente à Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Taichung, Taiwan. Inicialmente, o inóculo foi aquecido a 100°C por 45 minutos com o intuito de inibir as metanogênicas. O experimento foi feito em reatores em batelada de

125 mL de volume útil. Foram adicionados 30 mL de inóculo e 30 mL de substrato. Os frascos vedados foram colocados em um *shaker* a 150 rpm e $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 36 h.

Em comparação com o branco (sem adição de N), o melhor resultado obtido foi na relação C/N de 47 com uma produtividade de $4,8 \text{ mol-H}_2\cdot\text{mol-sac}^{-1}$ e uma velocidade de produção de hidrogênio de $270 \text{ mmol-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Na relação C/N=40, a produtividade e a velocidade de produção diminuíram em 55% e 80%, respectivamente. Igualmente na relação C/N de 98, a produtividade foi 55% menor, mas a velocidade de produção se manteve. A atividade de microrganismos produtores de hidrogênio exibiu uma característica dependente da relação C/N.

Cheong e Hansen (2007) compararam a produção de hidrogênio utilizando como inóculo lodo obtido de uma estação de tratamento de esterco de gado com e sem pré-tratamento. Este pré-tratamento consistiu em um choque térmico por 20 minutos a 95°C . O substrato utilizado foi água residuária sintética a base de glicose ($25000 \text{ mg-DQO}\cdot\text{L}^{-1}$). Valores de pH de 5, 6 e 7 foram avaliados e relações C/N de 12,5 e 30 foram aplicadas. O experimento foi realizado em reatores em batelada de 150 mL de volume útil e os frascos foram colocados em um *shaker* a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 121 h. Ao longo dos experimentos, com as duas relações C/N, não foi observado efeito significativo em relação ao teor de nitrogênio, posto que a produção de hidrogênio acumulado com pH igual a 7 e relação C/N de 30 foi de 69 mL-H_2 para ambos os inóculos. Para a relação C/N de 12,5, utilizando lodo com e sem pré-tratamento, a produção foi de 68 mL-H_2 e 72 mL-H_2 , respectivamente. A máxima velocidade específica de produção de hidrogênio foi de $25 \text{ mL-H}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ obtida com inóculo pré-tratado, pH igual a 5 e com relação C/N de 30.

Argun *et al.* (2008) variaram as relações C/N entre 20 e 200 e C/P entre 50 e 1000. O substrato utilizado foi solução de pó de trigo ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e o inóculo foi lodo oriundo da estação de tratamento de águas residuárias de uma empresa de levedura na Turquia. Inicialmente, o

inóculo foi fervido por 5 horas com o intuito de inibir as arqueias metanogênicas. A concentração de N foi ajustada com uréia e a concentração de P com KH_2PO_4 . O experimento foi feito em reatores em batelada de 2 L a 37°C com pH entre 6 e 7.

Os resultados mostraram que para elevadas concentrações de nitrogênio ($\text{C/N} < 46$) e com o aumento da relação C/P (50 a 950), a velocidade específica de produção de hidrogênio decresceu devido a limitações causadas por baixos conteúdos de fósforo quando o nitrogênio está em excesso. Entretanto, baixas concentrações de nitrogênio ($\text{C/N} > 46$), quando o nitrogênio foi o substrato limitante, a velocidade específica de produção de hidrogênio melhorava na medida em que a relação C/P aumentava, indicando baixos requerimentos de fósforo quando a concentração de nitrogênio é baixa.

A melhor produtividade foi de 23 $\text{mg-H}_2\text{.g-amido}^{-1}$ e a maior velocidade específica de produção de hidrogênio foi de 8.0 $\text{mg-H}_2\text{.g-biomassa}^{-1}\text{.h}^{-1}$, verificada nas relações $\text{C/N}=200$ e $\text{C/P}=1000$.

Ostekin *et al.* (2008) variaram as relações C/N entre 0 e 100, C/P entre 0 e 250 e C/Fe(II) entre 0 e 170. O substrato utilizado foi solução de pó de trigo hidrolisado com concentração de 15 g.L^{-1} . O inóculo foi lodo oriundo da estação de tratamento de águas residuárias de uma cervejaria na Turquia, inicialmente fervido por 5 horas com o intuito de inibir as metanogênicas. O nitrogênio foi ajustado com uréia, o fósforo com KH_2PO_4 , o Fe(II) com FeSO_4 e o pH foi mantido em 7. O experimento foi feito em reatores em batelada de 0,5 L, que foram vedados, incubados a 37°C e misturados manualmente várias vezes no dia.

A melhor produtividade de H_2 (2,84 $\text{mol-H}_2\text{.mol-glicose}^{-1}$) foi registrado nas relações C/N de 50, C/P de 125 e C/Fe(II) de 67 e a maior velocidade específica de produção de hidrogênio (96 $\text{mL-H}_2\text{.g-biomassa}^{-1}\text{.h}^{-1}$) nas relações C/N de 40, C/P de 125 e C/Fe(II) de 67. A interação entre os conteúdos de nitrogênio, fósforo e Fe(II) tiveram importantes efeitos sobre a produção de hidrogênio. Baixas concentrações de nitrogênio ($\text{C/N}>100$) e fósforo

(C/P>100) limitaram o rendimento na produção de hidrogênio que pode ter sido causada por limitações no crescimento microbiano e síntese da enzima necessária, embora, elevados conteúdos de N e P mostraram inibição na formação de hidrogênio, provavelmente por mudanças nas rotas metabólicas, semelhante com o estudo de Argun *et al.* (2008).

Peixoto (2008) testou a produção de hidrogênio em um reator de leito fixo de fluxo ascendente utilizando efluente de indústria de refrigerantes. Foram comparados os resultados do experimento quando o reator foi operado com e sem adição de meio contendo nutrientes alcançando uma relação C/N de 100. O maior rendimento foi alcançado pelo reator sem adição de nutrientes, no qual se atingiu $4,2 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol-substrato}^{-1}$ em contraste com $2,5 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol-substrato}^{-1}$ obtida pelo reator cujo afluente continha suplementação nutricional.

Os trabalhos de pesquisa já realizados e apresentados nessa revisão demonstraram a influência significativa da relação C/N na produção de hidrogênio. No entanto, a maioria desses trabalhos foi realizada em reatores em batelada típica, com pequeno volume e com concentrações muito altas de carboidratos. Apenas o trabalho de Peixoto (2008) foi realizado em reator contínuo, mas os resultados obtidos não foram conclusivos, pois apenas duas condições de relação C/N foram analisadas. Desta maneira, considerando que há uma lacuna no conhecimento acerca da influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reatores contínuos, que deve haver uma relação C/N ótima que maximize a produtividade de hidrogênio e que essa relação dificilmente poderá ser obtida por cálculos baseados em metabolismo e estequiometria, experimentos foram propostos em reatores contínuos de leito fixo para que um primeiro passo fosse dado rumo à elucidação das dúvidas levantadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 4.1 é apresentado o esquema geral dos experimentos realizados. Em cada fase dois reatores foram operados, cada um com uma relação C/N diferente.

Figura 4.1 – Esquema geral dos experimentos realizados

4.1 Reatores

O estudo foi desenvolvido em dois reatores biológicos, em escala de bancada, anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente, com as seguintes características: tubos de acrílico com diâmetro interno de 80 mm, diâmetro externo de 88 mm e 750 mm de comprimento perfazendo um volume total de 3,77 L. Cada reator continha três compartimentos: entrada do

afluente, saída de efluente e leito, separados por telas de aço inox (5 mm de abertura), fixadas por haste de 5 mm em aço inox. As dimensões adotadas estão de acordo com trabalhos realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) (Fernandes, 2008; Peixoto, 2008).

O leito apresentava comprimento de 50 cm e cinco pontos de amostragem, igualmente espaçados para a obtenção de dados de concentração em função do comprimento. A parte superior do leito era vedada para evitar possíveis vazamentos de gases e apresentava tubo em “L” com a extremidade apontando para o sentido oposto do fluxo gasoso e líquido. O estudo foi desenvolvido por dois sistemas idênticos conforme apresentado na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Aparato experimental para produção de hidrogênio

4.2 Meio suporte

O meio suporte utilizado para aderência da biomassa foi polietileno de baixa densidade obtido como apara de usina de reciclagem de plástico, de acordo com os trabalhos de Fernandes (2008) e Peixoto (2008).

4.3 Meio de alimentação

Os reatores em escala de bancada foram alimentados com afluente preparado sinteticamente à base de sacarose com demanda química de oxigênio (DQO) de aproximadamente 2000 mg.L^{-1} . O nitrogênio foi dosado na forma de uréia para o controle das relações C/N. Além disso, bicarbonato de sódio (500 mg.L^{-1}) e ácido clorídrico ($0,45 \text{ ml de ácido.L}^{-1} - 10 \text{ mol.L}^{-1}$) foram adicionados para controlar o pH próximo de 6,5, de acordo com os trabalhos de Fernandes (2008) e Peixoto (2008). A composição da água residuária sintética está apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição de água residuária sintética (Del Nery, 1987).

Composto	Concentração [mg.L⁻¹]
Sacarose	1781,24
Sulfato de níquel	0,50
Sulfato ferroso	2,5
Cloreto férrico	0,25
Cloreto de cálcio	2,06
Cloreto de cobalto	0,040
Óxido de selênio	0,036
Fosfato de potássio monobásico	5,36
Fosfato de potássio dibásico	1,30
Fosfato de sódio dibásico	2,7

4.4 Inoculação

A inoculação foi de forma natural, conforme proposta de Leite *et al.* (2008). O meio foi preparado com água de abastecimento e permaneceu em repouso por três dias em recipiente aberto antes do início da operação dos reatores, a fim de favorecer a primeira fermentação natural, obtida por meio de contato de microrganismos presentes na atmosfera com o substrato e provenientes da água de abastecimento utilizada na diluição. Essa solução foi recirculada nos reatores por cinco dias no intuito de obter aderência dos microrganismos no meio suporte. Parte do inóculo também foi obtida de prováveis microrganismos presentes no material suporte, o qual não foi esterilizado.

4.5 Operação dos reatores em bancada

Foi avaliada a produção de hidrogênio para quatro diferentes relações C/N: 40, 90, 140, e 190 (gC/gN). As relações C/N foram calculadas de acordo com a porcentagem em massa de carbono e nitrogênio dos compostos sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e uréia (CH_4N_2O), que constituíram parte do meio.

O experimento foi dividido em duas etapas. Em cada etapa foram testadas duas relações C/N, uma para cada reator, e o tempo de operação para cada etapa foi de 60 dias. Na primeira etapa foram testadas as relações C/N de 40 e 140 e na segunda, relações de 90 e 190.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado foi de 2 h, de acordo com trabalhos realizados por Fernandes (2008) e Peixoto (2008). Em ambas as etapas, o sistema foi operado em modo contínuo à temperatura controlada de 25°C.

4.6 Medição da produção de hidrogênio, monitoramento e análises dos demais parâmetros

Foram coletadas amostras simples do afluente e do efluente líquido para as análises apresentadas na Tabela 4.2. Foram coletadas, também, amostras gasosas para determinar a porcentagem de gás hidrogênio na composição do biogás para cada relação C/N.

Tabela 4.2 – Análises de monitoramento no reator

Análise	Método	Amostragem	Frequência (vezes/semana)
Produção de hidrogênio	Vazão Volumétrica	Saída de gases	4
Composição do biogás	Cromatografia gasosa	Saída de gases	4
Sacarose	Dubois <i>et al.</i> 1956	Afluente – Efluente	4
Ácidos Voláteis	Cromatografia gasosa	Efluente	4
Alcoóis	Cromatografia gasosa	Efluente	4
pH	APHA, 1998	Afluente – Efluente	4
Temperatura	APHA, 1998	Efluente	4
DQO	APHA, 1998	Afluente – Efluente	1
SSV	APHA, 1998	Efluente	2

4.6.1. Medição volumétrica de hidrogênio

A quantificação do volume de biogás produzido foi realizada por meio de medidor de gás on-line milligasCounter, da Ritter[®]. Os medidores estiveram acoplados durante todo o tempo de operação com o objetivo de manter a pressão dos reatores constante. Cada procedimento de medição da vazão volumétrica de hidrogênio consistiu em anotar o volume do biogás quantificado pelo medidor durante um tempo definido e multiplicado pela porcentagem de H₂.

4.6.2. *Análise de biogás por cromatografia*

A análise da composição do biogás gerado por cada reator (H_2 , CO_2 e CH_4) foi realizada no cromatógrafo a gás Shimadzu GC 2021[®] nas seguintes condições:

Coluna capilar: Carboxen 1010, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,53 mm e espessura da coluna de 0,30 μm .

Gás de arraste: Argônio.

Temperatura inicial do injetor: 200°C.

Temperatura inicial do detector: 230°C.

Vazão do gás de make up (Ar): 12 mL.min⁻¹.

Detector: condutividade térmica.

Volume de amostra: 100 μL .

4.6.3. *Análise de ácidos, acetona e álcoois por headspace*

As análises de ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capríco), acetona e álcoois (metanol, etanol e n-butanol) foram feitas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (*FID*, *Flame Ionization Dectector*), empregando o método de “*headspace*” estático desenvolvido no LPB – EESC – USP. Usou-se ácido crotônico (padrão para os ácidos) e isobutanol (padrão para alcoóis e acetona) em meio ácido (ácido sulfúrico).

Utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu GC2010[®] (software *GC Solution*) com as seguintes características:

Coluna HP-INNOWAX: comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme 25 μm .

Temperatura do injetor: 250°C.

Temperatura do detector: 280°C.

Razão do Split: 1,0.

Fluxo do gás de arraste (H_2): 30 mL.min⁻¹.

Fluxo do make-up ou gás auxiliar (N_2): 30 mL.min⁻¹.

Fluxo do gás da chama (ar sintético): 300 mL.min⁻¹.

Volume da amostra injetada: 400 µL.

Seringa de 2.5 mL.

Temperatura da seringa: 90°C.

Temperatura de incubação da amostra: 100°C.

O preparo das amostras foi feito em frascos – padrão de vidro com capacidade de 10 mL, com tampa rosqueável e septo de silicone com 18 mm de diâmetro. Foram adicionados 1 g de NaCl, 2 mL de amostra, 70 µL de solução de isobutanol, 100 µL de solução de ácido crotônico (700 mg.L⁻¹) e 200 µL de solução de H_2SO_4 2 mol.L⁻¹.

A determinação dos limites de detecção foi realizada por meio de cálculos estatísticos, com os resultados das curvas de calibração.

4.7 Cálculos

Conforme os resultados obtidos nas análises descritas anteriormente, utilizou-se como ferramenta o Microsoft Excel[®] para os cálculos da Equação 4.1 até a Equação 4.10, valores máximos, valores médios e desvio padrão. Cada equação se apresenta com as correspondentes unidades de medida.

Vazão de líquido no reator (Q):

$$Q [mL \cdot min^{-1}] = \frac{V}{\theta} \quad \text{Equação 4.1}$$

Na qual, V o volume útil do reator e θ o tempo de detenção hidráulica teórico aplicado.

Velocidade de conversão de sacarose (v_s):

$$v_s [mmol \cdot h^{-1}] = \frac{Q \cdot (C_{so} - C_{sf})}{MM_s} \quad \text{Equação 4.2}$$

Na qual, C_{so} é a concentração de sacarose no meio afluente, C_{sf} a concentração de sacarose no efluente e MM_s é a massa molar da sacarose.

Vazão de biogás (Q_g):

$$Q_g [mL \cdot h^{-1}] = \frac{V_m \cdot F_m}{t} \quad \text{Equação 4.3}$$

Na qual, V_m é o volume de gás marcado pelo medidor, o F_m é o fator de calibração do medidor obtido por calibração com bolhômetro padrão e t é o tempo da medida.

Distribuição em porcentagem de hidrogênio ($\%_{H_2}$), dióxido de carbono ($\%_{CO_2}$) e metano ($\%_{CH_4}$) no biogás:

$$\%_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n} \quad \text{Equação 4.4}$$

$$\%_{CO_2} = \frac{n_{CO_2}}{n} \quad \text{Equação 4.5}$$

$$\%_{CH_4} = \frac{n_{CH_4}}{n} \quad \text{Equação 4.6}$$

Na qual, n_{H_2} , n_{CO_2} e n_{CH_4} correspondem à quantidade de cada um dos gases contéudos no biogás: hidrogênio, dióxido de carbono e metano, respectivamente. Esse conteúdo foi medido por cromatografia e calculado pelas curvas de calibração do cromatógrafo. O valor de n corresponde ao número de mols totais na amostra de gás injetado, calculado usando a equação dos gases ideais (Equação 4.7).

$$n = \frac{R \cdot T}{P \cdot V_i} \quad \text{Equação 4.7}$$

Na qual, P é a pressão de gás, V_i o volume de gás injetado, R a constante universal dos gases ideais e T a temperatura absoluta. Nesse trabalho a pressão foi de 1 atm e a temperatura de 25°C (temperatura absoluta = 298 K).

Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}):

$$v_{H_2} [mmol \cdot h^{-1}] = \frac{Q_g \cdot n_{H_2}}{V_i} \quad \text{Equação 4.8}$$

Produtividade de hidrogênio (Y_{H_2}):

$$Y_{H_2} [molH_2 \cdot mol_{sac}^{-1}] = \frac{v_{H_2}}{v_S} \quad \text{Equação 4.9}$$

Produção volumétrica de hidrogênio (*HPR*):

$$HPR \left[mL_{H_2} \cdot h^{-1} \cdot L^{-1} \right] = \frac{Q_g \cdot \%_{H_2}}{V} \quad \text{Equação 4.10}$$

4.8 Estudos hidrodinâmicos

Foram realizados estudos hidrodinâmicos em ambos os reatores vazios e no final da operação com a finalidade de comparar as mudanças nas características do padrão de escoamento com o acúmulo de biomassa. O TDH utilizado foi de duas horas. Utilizou-se cloreto de sódio como traçador, o qual foi aplicado nos reatores na forma de estímulo degrau segundo a metodologia Levenspiel (2000).

A montagem do experimento foi feita conforme Peixoto (2008) e consistiu em instalar na saída do efluente um vertedor com uma sonda para detecção de condutividade, acoplada a um coletor de dados da Texas Instrument[®], que por sua vez foi acoplado a uma calculadora Texas TI-89[®]. Os sinais foram interpretados pela calculadora durante três vezes o TDH teórico (6 h).

Por meio da calculadora foram obtidos os dados experimentais da curva C (Concentração x Tempo). Com o auxílio do software Microcal Origin 8.0[®] foram calculadas as curvas F (Equação 4.11) e curvas E (Equação 4.12) para cada fase em ambos os reatores e foi determinado o TDH médio de acordo à Equação 4.13 (Levenspiel 2000).

$$F = \frac{C}{C_{max}} \quad \text{Equação 4.11}$$

$$E = \frac{dF}{dt} \quad \text{Equação 4.12}$$

$$\bar{\theta}h = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) \cdot dt} \quad \text{Equação 4.13}$$

Nas quais, $\bar{\theta}h$ é o TDH médio, C a concentração do traçador e t o tempo.

A variância (σ^2) das curvas, que indica a dispersão da distribuição, foi calculada com a Equação 4.14 (Levenspiel 2000):

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - \bar{\theta}h)^2 \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) \cdot dt} \quad \text{Equação 4.14}$$

A partir do cálculo da variância adimensional (Equação 4.15), foi calculado o número de dispersão (D/u.L) das curvas obtido com a Equação 4.16 segundo Levenspiel (2000) para dispersões de pequena intensidade.

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{\theta}h^2} \quad \text{Equação 4.15}$$

$$\sigma_{\theta}^2 = 2 \left[\frac{D}{u \cdot L} \right] \quad \text{Equação 4.16}$$

Utilizou-se o modelo de tanques de mistura completa em série e se calculou o número de reatores (N) a partir da Equação 4.17 (Levenspiel 2000):

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{1}{N} \quad \text{Equação 4.17}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados. A análise dos resultados foi dividida em produção de hidrogênio, geração de produtos de fermentação em meio líquido, instabilidade na produtividade de hidrogênio, perfis de parâmetros de monitoramento ao longo do reator e comportamento hidrodinâmico do reator.

5.1 Produção de hidrogênio

As variações temporais da vazão de biogás produzido (Q_g) para as relações C/N iguais a 40, 90, 140 e 190 estão apresentadas na Figura 5.1 e os valores máximos e médios estão apresentados na Tabela 5.1.

Observou-se claramente a influência da relação C/N na produção do biogás, indicando que quanto maior a relação C/N, maior a produção de biogás para relações C/N até 140. Para o experimento com C/N de 190 foi observada queda na produção de gás em relação ao valor obtido para C/N de 140, o que pode indicar inibição por deficiência de nitrogênio no sistema.

Figura 5.1 – Produção de biogás (Q_g) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Tabela 5.1 – Valores máximos e médios de vazão de biogás produzido (Q_g)

C/N	Q_g [mL.h ⁻¹]	
	Média	Máximo
40	131,1 ± 92,1	332,9
90	286,5 ± 172,4	576,0
140	423,4 ± 102,9	573,1
190	371,2 ± 122,7	552,3

É importante notar que, embora a relação C/N tenha influenciado a produção de biogás nos reatores, o comportamento foi o mesmo em todas as condições. Não houve estabilização da produção de biogás em nenhuma das relações C/N, com aumento contínuo até aproximadamente o 25º dia, quando o ponto de máximo foi atingido, seguido de tendência de queda na produção. Esse comportamento, instável será discutido posteriormente no item 5.3.

Dado que na Figura 5.1 não foi possível definir um período de estabilização do sistema a partir da produção de biogás, para melhor análise dos dados, o tempo de operação dos reatores foi dividido em duas etapas em relação ao consumo de sacarose. Como se

apresenta na Figura 5.2, a estabilização do processo ocorreu a partir do 25º dia. A duração da etapa transiente, estabelecida pelo consumo da sacarose, coincidiu com a máxima produção de biogás e, embora, após esse período a produção de biogás tenha decrescido, a eficiência de conversão da sacarose permaneceu inalterada.

Figura 5.2 – Eficiência de remoção de sacarose (E) nos reatores em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Observa-se na Figura 5.2 que o comportamento de degradação de sacarose foi semelhante em todas as relações C/N com porcentagens superiores a 88% na etapa de estabilização. Os valores médios de remoção estão apresentados na Tabela 5.2, os quais foram similares aos observados por Fernandes (2008) em reator preenchido com polietileno e operado com um TDH de 2 h, no qual foi atingido o valor de 84% de conversão de sacarose após doze dias de operação.

Tabela 5.2 – Valores médios de eficiência de remoção de sacarose (E) na etapa de estabilização

C/N	E [%]
40	88,4 ± 5,3
90	92,7 ± 7,1
140	88,5 ± 5,1
190	89,5 ± 9,7

Por meio das análises da cromatografia determinou-se a composição do biogás produzido e a porcentagem que representou o hidrogênio e o dióxido de carbono (Figura 5.3). Embora a produção de biogás tenha apresentado tendência de queda após 25 dias de operação (Figura 5.1), observou-se que as porcentagens de composição para os dois gases se mantiveram estáveis durante ambas as fases de operação dos reatores em todas as relações C/N. Durante o período experimental não foi observada a presença de metano no biogás indicando que não houve crescimento de microrganismos metanogênicos.

Figura 5.3 – Distribuição em porcentagem de H_2 ($\%_{H_2}$) no biogás em diferentes relações C/N: 40 (■), 90

(●), 140 (◆) e 190 (▲) e de CO_2 ($\%_{CO_2}$) na C/N 40 (□), 90 (○), 140 (◇) e 190 (△)

Conforme apresentado na Tabela 5.3, a porcentagem média mínima de hidrogênio foi 49% para a relação C/N de 90 e a média máxima foi de 61% para C/N de 140. Essa porcentagem de hidrogênio foi similar à observada no trabalho de O-Thong *et al.* (2008) em reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) alimentado com sacarose. Para o CO₂ a porcentagem média mínima foi de 28% na relação C/N de 40 e a média máxima de 35% para a C/N de 140. Assim como observado na produção de biogás, o percentual de hidrogênio no biogás decresceu para relação C/N de 190 em relação ao valor observado para a relação de 140. No entanto, nesse caso não foi observada a variação crescente nesse parâmetro quando se variou a relação C/N de 40 a 140.

Tabela 5.3 – Distribuição em porcentagem de H₂ (%_{H₂}) e CO₂ (%_{CO₂}) no biogás

C/N	% _{H₂}			% _{CO₂}		
	Média		Máximo	Média		Máximo
40	52,7	± 7,9	66,4	28,3	± 6,6	36,4
90	48,9	± 10,1	59,0	28,5	± 7,2	41,6
140	61,0	± 6,3	80,3	34,9	± 5,2	45,6
190	52,0	± 10,1	64,3	30,5	± 6,6	42,6

Com os valores de produção volumétrica de biogás e as porcentagens de hidrogênio no biogás foi determinada a vazão molar de hidrogênio (Figura 5.4). O valor máximo atingido foi de 16,2 mmol-H₂.h⁻¹ quando o reator operado com relação C/N de 140. Observou-se, da mesma forma que para a vazão de biogás, diminuição da vazão molar de hidrogênio na relação C/N de 190 em comparação com os valores obtidos na relação C/N de 140 (Tabela 5.4).

Figura 5.4 – Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Tabela 5.4 – Vazão molar de hidrogênio (v_{H_2}) em diferentes relações C/N

C/N	v_{H_2} [mmol-H ₂ .h ⁻¹]								
	Tempo total				Transiente (até dia 24)	Estabilização (desde dia 25)			
	Média		Máximo		Máximo	Média		Máximo	
40	3,0	±	2,1	6,5	6,5	2,1	±	1,7	5,2
90	6,2	±	3,7	13,3	13,3	5,5	±	3,6	11,6
140	10,4	±	3,0	16,2	14,4	10,3	±	3,2	16,2
190	8,2	±	2,9	12,7	11,5	8,4	±	2,5	12,7

O comportamento da produtividade de H_2 (Y_{H_2}) ao longo do tempo (em mol- H_2 .mol-sac $^{-1}$) está apresentado na Figura 5.5.

Figura 5.5 - Produtividade de H_2 (Y_{H_2}) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

O valor máximo de produtividade de H_2 foi observado na relação C/N de 140 com 3,5 mol- H_2 .mol-sac⁻¹. Esse valor é 43,5% do valor máximo teórico, estabelecido pela estequiometria da reação e considerando que toda a sacarose seria convertida a ácido acético. Em todas as relações C/N os valores máximos de produtividade (Tabela 5.5) foram alcançados durante a etapa transiente dos reatores.

Tabela 5.5 – Valores máximos e médios de produtividade de H_2 (Y_{H_2})

C/N	(Y_{H_2}) [mol- H_2 .mol-sac ⁻¹]					
	Tempo total		Transiente (até dia 24)	Estabilização (desde dia 25)		
	Média	Máximo	Máximo	Média	Máximo	
40	0,6 ± 0,5	1,7	1,7	0,4 ± 0,3	0,9	
90	1,3 ± 0,9	3,0	3,0	0,9 ± 0,6	2,0	
140	2,7 ± 0,6	3,5	3,5	2,0 ± 0,7	3,2	
190	1,7 ± 0,7	2,9	2,9	1,5 ± 0,7	2,6	

Em seguida, a vazão molar de hidrogênio foi dividida pelo volume útil do reator e foi determinada a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) (Figura 5.6), sendo $162,5 \text{ mL-H}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ o valor máximo calculado na relação C/N de 140.

Figura 5.6 – Produção volumétrica de hidrogênio (HPR) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Como observado para os outros parâmetros, se observa que no reator operado com relação C/N de 190 os valores máximos e médios de HPR (Tabela 5.6) foram menores em comparação com a relação à operação com C/N de 140.

Tabela 5.6 - Valores máximos e médios de produção volumétrica de hidrogênio (HPR)

C/N	HPR [$\text{mL-H}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$]							
	Tempo total				Transiente (até dia 24)	Estabilização (desde dia 25)		
	Média		Máximo		Máximo	Média		Máximo
40	28,9	± 20,4	62,3		62,3	20,3	± 16,2	49,4
90	59,2	± 35,7	127,8		127,8	53,0	± 34,3	111,4
140	104,3	± 30,2	162,5		144,7	103,7	± 32,4	162,5
190	82,5	± 29,2	128,0		115,8	84,7	± 25,5	128,0

Para todos os parâmetros analisados, o mesmo comportamento foi observado e ficou clara a influência da relação C/N sobre a produção do biogás, vazão molar de hidrogênio e produtividade, não sendo afetada a eficiência de conversão da sacarose. A diminuição da concentração da fonte de nitrogênio no meio, com consequente aumento da relação C/N, levou a condições favoráveis para a produção de hidrogênio com aumento da produtividade em 3,5 vezes quando a relação C/N foi aumentada de 40 a 140. É importante ressaltar que, nessa faixa de relações C/N, o aumento na produtividade de hidrogênio foi proporcional à diminuição da concentração da fonte de nitrogênio e, consequentemente, ao aumento da relação C/N.

Esse comportamento pode estar relacionado com o direcionamento da energia obtida no catabolismo quando a disponibilidade de nitrogênio variou. Com excesso de nitrogênio (baixas relações C/N), a energia pode ter sido principalmente utilizada para assimilação e crescimento celular, levando a menores produções de hidrogênio. Com o aumento da relação C/N, a deficiência nutricional provavelmente impediu a utilização de energia para crescimento, levando a um efeito benéfico na produção de hidrogênio. A queda observada na produtividade de hidrogênio para a relação C/N mais elevada pode indicar uma deficiência nutricional mais grave, levando à queda de produção e produtividade do hidrogênio e indicando que há uma relação C/N ótima para o processo.

Essas observações estão de acordo com as de Lin e Lay (2004), os quais sugeriram, com base em experimentos em reatores em batelada, que baixos teores de nitrogênio podem ser insuficientes para o crescimento celular.

A hipótese do crescimento celular favorecido por baixas relações C/N pode ser parcialmente comprovada pela análise de sólidos totais (ST) no reator, como indicativo da concentração da biomassa no leito do reator. No final da operação de cada reator foi quantificada a biomassa aderida e retida nos interstícios do material suporte como sólidos

totais (ST), com resultados apresentados na Figura 5.7. Nota-se que a concentração de biomassa, medida como ST, decaiu com o aumento da relação C/N, com estabilização para relação maior que 140. Essa queda na concentração da biomassa aderida indica, também, que a carga orgânica específica aplicada aumentou com o aumento da relação C/N, sendo o aumento desse parâmetro favorável para a produção de hidrogênio pela maior possibilidade de desestabilização do processo anaeróbio, essencial para liberação do H_2 .

Figura 5.7 – Sólidos Totais (ST) no interstício no final da operação

Outro parâmetro analisado foi a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente dos reatores a fim de monitorar o arraste da biomassa dos reatores (Figura 5.8 e Tabela 5.7). Utilizando a ferramenta de estatística ANOVA no Microsoft Excel[®] demonstrou-se que o arraste de biomassa na fase de estabilização dos reatores não apresenta diferença significativa em todos os reatores, indicando que os valores observados de concentração de biomassa no leito podem ser analisados sob uma mesma base, pois não houve diferenciação no descarte da biomassa do sistema, sendo a única variável relevante ao crescimento microbiano.

Figura 5.8 – Concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente dos reatores em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Tabela 5.7 – Valores médios dos sólidos suspensos voláteis (SSV) no afluente dos reatores

C/N	SSV [mg.L ⁻¹]			
	Tempo total		Estabilização (desde dia 25)	
40	42,0	± 38,5	22,4	± 8,6
90	29,9	± 16,1	27,7	± 17,5
140	26,6	± 18,2	24,3	± 15,7
190	31,7	± 19,7	37,6	± 24,9

Finalmente, com os valores máximos de produtividade em cada relação C/N, foi feita a análise matemática utilizando o programa Origin 8.0[®] no intuito de encontrar qual a relação C/N mais adequada para a melhor produção de hidrogênio em reatores deste tipo. Os valores foram ajustados a uma função polinomial de segunda ordem (Figura 5.9) e, em seguida, essa equação foi derivada para encontrar o valor máximo. Encontrou-se um valor ótimo para C/N

de 137, que resultaria em produtividade de H_2 de $3,5 \text{ mol-}H_2\text{-mol-sac}^{-1}$, valor igual ao alcançado na relação C/N de 140.

Figura 5.9 – Valores de produtividade máxima de H_2 em função da relação C/N

Os resultados obtidos indicam o crescimento de diferentes microrganismos produtores de hidrogênio, favorecidos pela fonte de carbono (sacarose) e o nitrogênio (uréia) no meio de alimentação. Provavelmente esses microrganismos são espécies pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter* ou *Klebsiella* de acordo com a pesquisa de Maintinguer *et al.* (2008) que caracterizaram a microbiota presente em reator anaeróbico em batelada aplicado à produção de hidrogênio. Análises da microbiologia molecular feitas na biomassa retirada dos reatores preenchidos com polietileno, alimentados com sacarose e com TDH de 0,5 h e 2,0 h, operados por Fernandes (2008), indicaram a presença de microrganismos que foram relacionados ao *Clostridium* com valores de similaridade variando de 97 a 99% (Saavedra, *et al.*, 2009). Considera-se que esses microrganismos também foram desenvolvidos neste trabalho devido à similaridade da configuração e operação dos reatores.

5.2 Geração de produtos de fermentação em meio líquido

Observou-se que, para todas as relações C/N estudadas, a geração de produtos solúveis foi similar (Figura 5.10 e Figura 5.11), sendo predominantes os ácidos acético e butírico e o etanol, sendo os dois primeiros os produtos indicadores de máxima produção de hidrogênio (Levin *et al.*, 2004). Note-se no item anterior que, embora, a produtividade nos reatores operados com relação C/N de 40 e C/N de 190 foi menor, a geração de ácido acético e butírico se manteve similar em comparação com as relações C/N de 90 e 140, isso consistente com a hipótese que a energia produzida foi utilizada para manutenção celular impedindo a liberação de H₂.

Figura 5.10 – Geração de produtos intermediários (C_{PI}) na produção de hidrogênio a partir da fermentação de sacarose para C/N de 40 e 90 - (▲) Ácido Acético, (■) Etanol, (●) Ácido Butírico, (▲) n-Butanol, (■) Ácido Propiônico, (○) Acetona

Figura 5.11 – Geração de produtos intermediários (C_{PI}) na produção de hidrogênio a partir da fermentação de sacarose para C/N de 140 e 190 - ($\blacktriangle$) Ácido Acético, ($\blacksquare$) Etanol, ($\bullet$) Ácido Butírico, ($\blacktriangle$) n-Butanol, ($\blacksquare$) Ácido Propiônico, ($\circ$) Acetona

A geração destes principais produtos poderia estar associada à participação de espécies como a do *Clostridium acetobutylicum*. A fermentação pelo *C. acetobutylicum* acontece em duas fases, sendo a primeira caracterizada pelo rápido crescimento e pelas elevadas velocidades de produção de hidrogênio junto com a produção de ácidos acético e butírico. A segunda fase é caracterizada por um crescimento mais lento, baixa produção de hidrogênio e pela produção de solventes. Essas fases são conhecidas como as fases acidogênica e solvetogênica, respectivamente (Mathews e Wang, 2009).

Outros produtos intermediários foram gerados como o ácido propiônico, n-butanol, acetona, ácido isobutírico, metanol, ácidos capróico, valérico e isovalérico, em quantidades menores que 50 mg.L⁻¹ (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Concentração média dos produtos gerados na fermentação de H₂

Produtos intermediários	Concentração média [mg.L ⁻¹]							
	C/N 40		C/N 90		C/N 140		C/N 190	
Etanol	483,4	± 108,6	322,0	± 125,1	469,4	± 132,9	330,2	± 112,0
Ac. Acético	365,8	± 172,7	314,2	± 119,1	343,3	± 95,5	389,1	± 143,3
Ac. Butírico	239,6	± 161,3	245,5	± 137,5	214,4	± 74,3	219,9	± 106,1
Ac. Propiônico	46,4	± 37,9	21,1	± 13,8	33,8	± 18,5	28,7	± 19,8
n-Butanol	24,9	± 2,0	25,0	± 5,4	32,5	± 13,1	27,5	± 8,0
Acetona	18,9	± 12,7	10,2	± 9,1	23,7	± 18,2	13,8	± 7,8
Ac. Isobutírico	7,8	± 23,6	3,4	± 5,9	14,6	± 21,9	11,5	± 15,1
Metanol	6,3	± 9,0	20,9	± 21,6	2,4	± 6,1	24,1	± 20,6
Ac. Capróico	2,3	± 6,3	2,9	± 6,6	0,0	± 0,0	1,0	± 3,1
Ac. Valérico	0,4	± 1,5	0,5	± 1,9	0,0	± 0,0	7,7	± 37,5
Ac. Isovalérico	0,0	± 0,0	4,0	± 22,1	0,0	± 0,0	6,9	± 37,5

Não há uma diferenciação clara entre as concentrações dos produtos de fermentação obtidos sob diferentes relações C/N, não sendo possível, portanto, diferenciar as operações apenas avaliando os produtos solúveis obtidos. A formação desses produtos coincide com

diversas pesquisas sobre produção biológica de hidrogênio, mas a quantidade e a distribuição não são similares devido às diferentes configurações de reatores e parâmetros de operação (Fan, Kay e Lay, 2006; Fernandes, 2008; Peixoto, 2008, O-Thong *et al.*, 2008; Fritsch, Hartmeier e Chand, 2008; Amorim, 2009; Maintinguer *et al.*, 2009, Barros, 2009).

A Figura 5.12 representa a porcentagem média de distribuição de cada um dos ácidos nas quatro relações C/N, sendo o principal o ácido acético com porcentagens entre 61,7% com relação C/N de 90 e 68,4% com C/N de 190, seguido do ácido butírico com porcentagens entre 28,1% com relação C/N de 40 e 28,8% com C/N de 140. Esta distribuição é similar com a de Fernandes (2008) quando operados os reatores com TDH de 2 h e com Maintinguer *et al.* (2008) na condição experimental de 1816,0 mg-sac.L⁻¹ em reator em batelada.

Figura 5.12 – Distribuição percentual média dos ácidos no meio líquido

A Figura 5.13 apresenta as porcentagens médias de distribuição de alcoóis e a acetona, sendo o principal produto o etanol com valores entre 83,9% com relação C/N de 190 e 92,2% com C/N de 40, coincidente com o trabalho de Fernandes (2008) quando operados os reatores

com TDH de 2 h e com o trabalho de Peixoto (2008) em ambos os reatores, com e sem adição de nutrientes.

Figura 5.13 – Distribuição percentual média dos alcoóis e acetona no meio líquido

5.3 Instabilidade na produtividade de hidrogênio

Como discutido anteriormente, a instabilidade da produção do biogás e da produtividade do hidrogênio, com aumento até o 25º dia de operação e subsequente queda até o 60º dia, foi observada em todos os experimentos, independente da relação C/N aplicada. Essa instabilidade já havia sido observada por Fernandes (2008) em reator e condições similares às aplicadas no presente trabalho. Naquele trabalho, a instabilidade foi creditada ao crescimento excessivo de organismos no leito do reator, levando a cargas orgânicas específicas decrescentes e com consequente queda na produtividade. No entanto, essa hipótese pode explicar em parte a instabilidade já que não só a produção de hidrogênio foi afetada, sendo o efeito deletério se estendido à produção global de gás no reator.

Esse comportamento instável e não desejável na geração do biogás não foi observado no meio líquido. Por meio das análises de conversão de sacarose e de geração de produtos solúveis, pôde-se observar que o processo se estabilizou a partir do 25º dia de operação, com manutenção dessa estabilidade até o final do experimento. Não houve sequer aumento na produção de intermediários mais reduzidos como o ácido propiônico que segundo Levin *et al.* (2004) está associado à baixa produção de H_2 . Além disso, o pH efluente se manteve constante, próximo a 4,5, em todos os ensaios (Figura 5.14). Portanto, nenhuma mudança de rota metabólica parece ter ocorrido durante o período experimental.

Assim, o problema da instabilidade parece estar associado exclusivamente ao biogás gerado, independente do processo fermentativo que parece ter ocorrido de forma estável e efetiva. Essa observação, aliada à intrigante queda de produção total de biogás (hidrogênio mais dióxido de carbono), chegando a valores nulos para relação C/N de 40 por volta do 60º dia de operação, leva à hipótese de consumo dos componentes do biogás por algum organismo que se desenvolveu no leito ao longo do tempo.

Figura 5.14 – pH no efluente dos reatores em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Se o problema está intrinsecamente relacionado com o biogás gerado, não havendo alteração significativa no processo fermentativo, a primeira hipótese levantada é a de consumo do hidrogênio por organismos metanogênicos hidrogenotróficos. No entanto, as análises de cromatografia não registraram produção de metano em nenhuma das relações C/N estudadas, permitindo que essa hipótese seja descartada.

Outra hipótese seria o consumo do hidrogênio por organismos redutores de sulfato, embora a relação DQO/sulfato seja muito alta no meio. No entanto, embora sulfeto não tenha sido analisado em meio líquido e no biogás, essa hipótese pode ser descartada, pois não se explica o consumo concomitante do CO₂ do biogás da mesma forma que não se explicaria no caso de ter havido metanogênese.

Uma terceira via que poderia explicar a queda na produção do biogás seria a ocorrência de homoacetogênese, com consumo do hidrogênio e do dióxido de carbono. Embora improvável de ocorrer no pH de operação dos reatores, essa rota explicaria o consumo concomitante do H₂ e do CO₂, mas levaria à produção de ácido acético, o que não foi verificado. Caso essa rota tivesse ocorrido, concentrações crescentes de ácido acético seriam observadas a partir do 25º dia de operação.

Descartar as anteriores hipóteses pode indicar a possível atuação de outro microrganismo consumidor desse biogás como, por exemplo, bactérias hidrogênio-oxidantes, com uso de oxigênio dissolvido no meio de alimentação. Uma grande variedade de bactérias é capaz de crescer com o H₂ como o único doador de elétrons e o O₂ como aceptor de elétrons usando a reação *knallgas* (Equação 5.1):

Equação 5.1

Apenas a ocorrência dessa reação (Equação 5.1) não poderia explicar a queda na produção de biogás, mas alguns organismos podem crescer autotroficamente, usando a reação do ciclo de Calvin para incorporar CO_2 , e são conhecidas como bactérias litotróficas hidrogênio-oxidantes. Todas essas bactérias contêm uma ou mais enzimas hidrogenases que tem como função vincular o H_2 e usá-lo para produzir ATP como redutor para o crescimento autotrófico (Madigan, 2005).

Gales *et al.* (2004), demonstraram o crescimento de bactérias com H_2 molecular como única fonte de energia e emissões de CO_2 como única fonte de carbono. Estas bactérias hidrogênio-oxidantes ou bactérias *Knallgas* usaram o O_2 como principal aceptor de elétrons. Os autores sugerem que estes microrganismos crescem primeiro na superfície da água porque na interface ar – água é o lugar onde o O_2 está mais disponível e devido ao alto coeficiente de difusão a concentração de H_2 é provavelmente homogênea. Após o crescimento superficial, ocorre o crescimento aderido quando há superfície disponível, levando à formação de biofilmes. Entre esses microrganismos foram identificadas espécies pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Delftia* e *Acinetobacter*. Sob condições autotróficas e estritamente anaeróbias, não foi observado crescimento bacteriano. Também sob condições autotróficas aeróbias, nenhum crescimento foi observado sem adição de H_2 . A presença dos três gases (H_2 , O_2 , CO_2) foi necessária para o crescimento em condições autotróficas, indicando que o O_2 deve ser o aceptor terminal de elétrons para a oxidação de hidrogênio e que a oxidação de H_2 é necessária para a fixação de CO_2 .

As espécies *Ralstonia* e *Burkholderia* poderiam ser características de ambientes oligotróficos já que aparecem com frequência em água ultra-pura em sistemas industriais. (Gales *et al.* 2004, Kulakov *et al.* 2002). Os microrganismos oligotróficos são capazes de se adaptar a ambientes severos que contêm menos de 1 ppm de moléculas orgânicas e

inorgânicas. Muitas dessas bactérias podem excretar polissacarídeos extracelulares permitindo a adesão a superfícies e resistência à desinfecção (Kulakov *et al.* 2002).

Maintinguer (2009) fez a caracterização do consórcio microbiano presente em reator anaeróbio em batelada aplicado à produção de hidrogênio. Por meio das análises de clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene RNAr 16S do consórcio microbiano foram obtidos 56 clones. Entre os clones analisados, 57% foram relacionados como pertencentes aos gêneros *Clostridium*, 30% a *Burkholderia*, 8% a *Klebsiella*, além de 5% a bactérias não cultivadas. Foram identificadas *Burkholderia* sp. e *Burkholderia cepacia* no consorcio microbiano favorecidas pela presença de peptona e sacarose.

Dado que as características desse trabalho foram semelhantes ao trabalho de Maintinguer (2009) em relação ao meio de alimentação à base de sacarose e a existência de H₂ e o CO₂ no biogás, pode-se supor a atuação de bactérias *Knallgas* no reator, possivelmente *Burkholderia* sp. Nesse caso, a mínima quantidade de O₂ presente no meio de alimentação ou decorrente da microaeração na alimentação pode ter servido comoceptor final de elétrons, similar ao observado por Gales *et al.* (2004).

5.4 Perfis de parâmetros de monitoramento ao longo do reator

Aos 60 dias de operação dos reatores em todas as relações C/N e finalizada a etapa de monitoramento, foram realizados os perfis espaciais de pH, eficiência de conversão de sacarose e produção de ácidos e álcoois, a fim observar e corroborar o comportamento do processo ao longo dos reatores e no futuro subsidiar estudos cinéticos. Os pontos de coleta foram marcados segundo a Figura 5.15, sendo o número 1 a entrada no reator, 2, 3, 4, 5 e 6 pontos de amostragem no leito e 7 a saída do efluente.

Figura 5.15 – Pontos de coleta para os perfis espaciais

No perfil espacial de pH (Figura 5.16) observa-se que no primeiro ponto de amostragem do reator o valor de pH cai para menos de 6 em comparação com o pH afluente de 6,5, comportamento similar em todas as relações C/N e coincidentes com o demonstrado por Fernandes (2008) e Peixoto (2008).

Figura 5.16 – Perfil espacial de pH em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

A eficiência de conversão de sacarose (Figura 5.17) variou de forma crescente ao longo do reator, indicando a distribuição de organismos ao longo do comprimento e um regime hidrodinâmico distanciado da mistura perfeita.

A geração de produtos no meio líquido (Figura 5.18) não seguiu padrão muito definido, mas principalmente ácido acético e etanol foram produzidos ao longo do comprimento dos reatores.

Figura 5.17 - Perfil espacial de eficiência de remoção de sacarose (E) em diferentes relações C/N: 40 (■), 90 (●), 140 (◆) e 190 (▲)

Figura 5.18 – Perfil espacial de geração de produtos intermediários (C_{PI}) na produção de hidrogênio a partir da fermentação de sacarose (▲) Ácido Acético, (■) Etanol, (●) Ácido Butírico, (▲) n-Butanol, (■) Ácido Propiônico

5.5 Comportamento hidrodinâmico do reator

Foram feitos os ensaios hidrodinâmicos em reatores sem biomassa e no final de cada fase de operação, ou seja, com 60 dias de operação em cada relação C/N. Seguindo a metodologia do item 4.12 e com o uso do programa Origin 8.0[®] foram traçadas as curvas F, ajustadas à sigmóide Boltzmann e transformadas em curvas E para posteriormente obter as curvas de distribuição do tempo de residência como se observa na Figura 5.19.

Figura 5.19 – Curvas DTR

Observa-se na Figura 5.18 que os reatores sem biomassa tiveram um comportamento similar mesmo que o material suporte não estivesse organizado de forma regular. A biomassa aderida ao suporte fez com que o comportamento do escoamento mudasse significativamente em relação aos reatores sem biomassa. Em ambas as condições, com e sem biomassa, o pico principal da curva ocorreu antes do TDH teórico (Tabela 5.9). Segundo Levenspiel (2000),

este comportamento sugere que em todas as condições houve zonas mortas ou caminhos preferenciais.

Tabela 5.9 – Dados obtidos das curvas DTR

Reator e C/N	TDH [h]	Variância (σ^2)
R2 sem biomassa	1,44	1.359.132
R1 sem biomassa	1,34	3.126.486
190 _{R1}	0,88	4.193.411
140 _{R1}	1,20	8.148.704
40 _{R2}	0,54	9.425.898

Os valores de variância (σ^2) nas relações C/N 190, 140 e 40 indicaram que a dispersão da distribuição aumentou quando a biomassa estava presente.

Na Tabela 5.10 são apresentados o número de dispersão e o número de tanques em serie. Note-se que houve grande variação no número de tanques em serie nos reatores sem biomassa, essa discrepância pode ter sido originada pela não uniformidade do material suporte, causando diferenças no grau de mistura entre ambos os reatores vazios.

Tabela 5.10 – Número de dispersão e número de tanques de mistura completa em serie

Reator e C/N	$\frac{D}{u \cdot L}$	N	Biomassa Intersticial [mg.g⁻¹_{suporte}]
40	0,0045	1	239,41
140	0,0005	5	130,46
190	0,0004	5	137,13
R1 sem biomassa	0,0001	15	-
R2 sem biomassa	0,0001	40	-

Observa-se que quanto maior o crescimento de biomassa, maior o número de dispersão (Tabela 5.10) e menor o número de tanques em serie (Tabela 5.10). Este comportamento sugere que o tipo de escoamento muda ao longo dos experimentos,

incrementado o grau de mistura, e diminuindo o volume útil devido à acumulação de biomassa nos interstícios do material suporte. Tal mudança foi observada principalmente no reator operado com relação C/N de 40 (Tabela 5.10). Sob excesso de nitrogênio, o crescimento da biomassa foi maior com efeitos negativos sobre a produção de hidrogênio, enquanto carência de nitrogênio permitiu o controle do crescimento da biomassa e resultou em maiores produtividades de hidrogênio.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos em reatores de leito fixo e fluxo ascendente com diferentes relações C/N (40, 90, 140 e 190), tendo sacarose como fonte de carbono e uréia como fonte de nitrogênio, permitem as seguintes conclusões:

A variação da relação C/N afetou a produção biológica de gás hidrogênio.

Os melhores valores de vazão molar, produtividade e produção volumétrica de hidrogênio foram de 16,2 mmol-H₂.h⁻¹, 3,5 mol-H₂.mol-sac⁻¹ e 162,5 mL-H₂.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Valores alcançados no reator operado com relação C/N igual a 140.

A análise matemática indicou que a relação C/N ótima para a produção de H₂ neste tipo de reator e nas condições operacionais empregadas foi igual a 137 para obter uma produtividade de H₂ de 3,5 mol-H₂.mol-sac⁻¹.

O biogás produzido foi composto principalmente por CO₂ e H₂, com porcentagens médias para o hidrogênio de 53%, 49%, 61% e 52% para relações C/N iguais a 40, 90, 140 e 190, respectivamente.

Em todas as relações C/N, a distribuição porcentual de geração dos principais ácidos no meio líquido foi superior a 61% e 25% para o ácido acético e o ácido butírico, respectivamente, com valores superiores a 83% para o etanol na distribuição de álcoois e acetona.

As hipóteses geradas pela queda na produção de biogás ao longo do tempo indicam a presença de bactérias *Knallgas* facultativas no reator.

O crescimento da biomassa intersticial mudou o tipo de escoamento ao longo dos reatores em comparação com os reatores sem biomassa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzate-Gaviria, L. M., P. J. Sebastian, A. Perez-Hernandez & D. Eapen (2007) Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 3141-3146.
- Amorim, E.L.C. *Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- Argun, H., F. Kargi, F. K. Kapdan & R. Oztekin (2008) Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1813-1819.
- Babu, V. L., S. V. Mohan & P. N. Sarma (2009) Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3305-3312.
- Barros, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidizado. São Carlos. Dissertação (Mestrado) DEQ-UFSCar, 2009.
- Bisaillon A, Turcot J, Hallenbeck PC. (2006) The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int J Hydrogen Energy*, n. 31, p. 1504-8.
- Brenner, K., L. C. You & F. H. Arnold (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26, 483-489.
- Brucha, G. 2007. Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do estuário de Santos-São Vicente, estado de São Paulo. In *Escola de Engenharia de São Carlos*, 237. São Carlos: Universidade de São Paulo.
- Chen SD, Sheu DS, Chen WM, Lo YC, Huang TI, Lin CY (2007) Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1. *Biotechnol Prog*, n. 23, p. 1312-20.
- Cheong, D. Y. & C. L. Hansen (2007) Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource Technology*, 98, 2229-2239.
- Chernicharo, C. A. L. 1997. *Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*.
- Chin HL, Chen ZS, Chou CP. (2003) Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol Prog*, n. 19, p. 383-8.
- Collet C, Adler N, Schwitzguebel JP, Peringer P. (2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy*, n. 29, p. 1479-85.
- Das, D. (2009) Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7349-7357.

- Das, D. & T. N. Veziroglu (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28.
- Del Nery, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1987.
- Dubois, S.M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.L.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Methods for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry*, v. 228, p. 13 – 21. 1956.
- Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *J Biosci Bioeng* 2001;91:339–43
- Fabiano B, Perego P. (2002) Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy*, n. 27, p. 149–56.
- Fernandes, B. S. 2008. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. In *Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos*, 100. São Carlos: Universidade de São Paulo.
- Fritsch, M.; Hartmeier, W.; Chang, J-S. (2008) Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fitting. *International Journal of Hydrogen Energy*, n. 33, p. 6549 - 6557.
- Gales, G., M. F. Libert, R. Sellier, L. Cournac, V. Chapon & T. Heulin (2004) Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *Fems Microbiology Letters*, 240, 155-162.
- Gerboni, R. & E. Salvador (2009) Hydrogen transportation systems: Elements of risk analysis. *Energy*, 34, 2223-2229.
- Guo L, Li XM, Bo X, Yang Q, Zeng GM, Liao DX (2008) Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresour Technol*, n. 99, p. 3651–8.
- Hallenbeck, P. C. & D. Ghosh (2009) Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27, 287-297.
- Jo JH, Lee DS, Park D, Choe WS, Park JM. (2008) Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour Technol*, n. 99 p. 2061–6.
- Ishikawa M, Yamamura S, Takamura Y, Sode K, Tamiya E, Tomiyama M. (2006) Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system. *Int J Hydrogen Energy*, n. 31, p. 1484–9.
- Kanai T, Imanaka H, Nakajima A, Uwamori K, Omori Y, Fukui T (2005) Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biotechnol*, n. 116, p. 271–82.
- Khanal, S. K., W. H. Chen, L. Li & S. W. Sung (2004) Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123-1131.
- Koskinen, P. E. P., A. H. Kaksonen & L. A. Puhakka (2007) The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 742-758.
- Krupp, M. & R. Widmann (2009) Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 4509-4516.

- Kulakov, L. A., M. B. McAlister, K. L. Ogden, M. J. Larkin & J. F. O'Hanlon (2002) Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1548-1555.
- Kumar N, Das D. (2001) Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microb Technol*, n. 29, p. 280-7.
- Kumar N, Das D. (2000) Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem*, n. 35, p. 589-93.
- Leite, J. A. C., B. S. Fernandes, E. Pozzi, M. Barboza & M. Zaiat (2008) Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 579-586.
- Levenspiel, O. 2000. *Engenharia das reações químicas*. São Paulo : Edgard Blucher.
- Levin, D.B.; Pitt, L.; Love, M. (2004) Biohydrogen production: prospect and limitation to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 173-175.
- Levin DB, Islam R, Cicek N, Sparling R. (2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Process Biochem*, n. 31 p. 1496-503.
- Lin, C. Y. & C. H. Lay (2004) Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 41-45.
- Lo YC, Chen WM, Hung CH, Chen SD, Chang JS. (2008) Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res*, n.42, p. 827-42.
- Ludwig, M., J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong & O. Lenz (2009) Oxygen-tolerant H₂ Oxidation by Membrane-bound NiFe Hydrogenases of *Ralstonia* Species COPING WITH LOW LEVEL H₂ IN AIR. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 465-477.
- Maintinguer, S. I. 2009. Obtenção e caracterização filogenérica de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbio em batelada aplicado à produção de hidrogênio. In *Escola e de Engenharia de São Carlos - Departamento de Hidráulica e Saneamento*, 167. São Carlos: Universidade de São Paulo.
- Maintinguer, S. I., B. S. Fernandes, I. C. S. Duarte, N. K. Saavedra, M. A. T. Adorno & M. B. Varesche (2008) Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, n. 33, p. 4309-4317.
- Madigan, M., Martinko, J. Parker, J. Brock biology of microorganisms. Prentice Hall, 2005.
- Mathews, J. & G. Y. Wang (2009) Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7404-7416.
- Ntaikou I, Gavala HN, Kornaros M, Lyberatos G. Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:1153-63.
- Nakashimada Y, Rachman MA, Kakizono T, Nishio N. (2002) Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int J Hydrogen Energy*, n. 27, p. 1399-405.
- O-Thong, S., P. Prasertsan, N. Intrasingkha, S. Dhamwichukorn & N. K. Birkeland (2008) Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1221-1231.
- Odum, E. P. Basic Ecology. CBS College Publishing. 1983.
- Ogino H, Miura T, Ishimi K, Seki M, Yoshida H. (2005) Hydrogen production from glucose by anaerobes. *Biotechnol Prog*, n.21, p. 1786-8.

- Oh YK, Kim HJ, Park S, Kim MS, Ryu DDY. (2008) Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Int J Hydrogen Energy*, n. 33, p. 1471–82.
- Oztekin, R., I. K. Kapdan, F. Kargi & H. Argun (2008) Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4083-4090.
- Pan CM, Fan YT, Xing Y, Hou HW, Zhang ML. (2008) Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. *Bioresour Technol*, n. 99 p. 3146–54.
- Peixoto, G. 2008. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes. In *Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento*, 107. São Carlos: Universidade de São Paulo.
- Podesta JJ, Gutierrez-Navarro AM, Estrella CN, Estes MA. (1997) Electrochemical measurement of trace concentrations of biological hydrogen produced by *Enterobacteriaceae*. *Res Microbiol*, n. 148, p. 87–93.
- Ren, N. Q., D. F. Xing, B. E. Rittmann, L. H. Zhao, T. H. Xie & X. Zhao (2007) Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9, 1112-1125.
- Saavedra, N K, Fernandes, B, Zaiat, M, Varesche, M B A. 2009. Microrganismos Responsáveis pela Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fixo In *Anais XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM Natal, RN 2009*.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998) 20th ed. American Public Health Association (APHA)/ American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Speece, R. E. 1996. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Nashville, Tenn. : Archae Press.
- Suzuki, Y. (1982) ON HYDROGEN AS FUEL GAS. *International Journal of Hydrogen Energy*, 7, 227-230.
- Taguchi F, Yamada K, Hasegawa K, Taki-Saito T, Hara K. (1996) Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. Strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *J Ferment Bioeng*, n. 82 p. 80–3.
- Tanisho S, Ishiwata Y. (1995) Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *Int J Hydrogen Energy*, n. 20, p.541–5.
- Turcot J, Bisaillon A, Hallenbeck PC. (2008) Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes. *Int J Hydrogen Energy*, n. 33, p. 1465–70.
- Ueno Y, Haruta S, Ishii M, Igarashi Y. (2001) Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *J Biosci Bioeng*, n. 92, p. 397–400.
- Van Ginkel, S., S. W. Sung & J. J. Lay (2001) Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technology*, 35, 4726-4730.
- Wang, J. L. & W. Wan (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799-811.
- Wang XJ, Ren NQ, Xiang WS, Guo WQ. (2007) Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. *Int J Hydrogen Energy*, n. 32, p. 748–54.

- Xing DF, Ren NQ, Wang AJ, Li QB, Feng YJ, Ma F. (2008) Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *Int J Hydrogen Energy*, n. 33, p. 1489–95.
- Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. (1995) Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J Ferment Bioeng*, n. 80 p. 571–4
- Zhang H, Bruns MA, Logan BE. (2006) Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res*, n. 40, p.728–34.