

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
ENGENHARIA AMBIENTAL

GABRIEL MAGDALON

EFEITO E FUNÇÃO DE METAIS COMO MICRONUTRIENTES OU EM TRAÇOS  
NA OBTENÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO E DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS  
ATRAVÉS DE BIOPROCESSAMENTO ANAERÓBIO ACIDOGÊNICO DE UM  
MEIO CONTENDO XILOSE COMO FONTE DE CARBONO

São Carlos/SP  
2014

**GABRIEL MAGDALON**

**EFEITO E FUNÇÃO DE METAIS COMO MICRONUTRIENTES OU EM TRAÇOS  
NA OBTENÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO E DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS  
ATRAVÉS DE BIOPROCESSAMENTO ANAERÓBIO ACIDOGÊNICO DE UM  
MEIO CONTENDO XILOSE COMO FONTE DE CARBONO**

Trabalho de Graduação apresentado a  
Escola de Engenharia de São Carlos da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Engenheiro  
Ambiental

Orientador:  
Dr. Gustavo Mockaitis

São Carlos/SP  
2014

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

M189e Magdalon, Gabriel  
Efeito e função de metais como micronutrientes ou em traços na obtenção de biohidrogênio e de ácidos orgânicos voláteis através de bioprocessamento anaeróbio acidogênico de um meio contendo xilose como fonte de carbono / Gabriel Magdalon; orientador Gustavo Mockaitis. São Carlos, 2014.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2014.

1. Biohidrogênio. 2. Metais em concentração de traços. 3. Ácidos voláteis. 4. Xilose. I. Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Gabriel Magdalon**

Título da Monografia: **Efeito e Função de Metais como Micronutrientes ou em Traços na Obtenção de Biohidrogênio e de Ácidos Orgânicos Voláteis Através de Bioprocessamento Anaeróbico Acidogênico de um Meio Contendo Xilose como Fonte de Carbono**

Data da Defesa: 08/08/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

**Marcelo Zaiat (Orientador(a))**

Aprovado

**Eugenio Foresti**

aprovado

**Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**

aprovado

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação  
**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus  
pais e irmã que sempre me  
incentivaram em toda minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Dr. Gustavo Mockaitis, pela sua ajuda, orientação e disposição para a realização deste trabalho.

Aos professores do laboratório que sempre foram muito prestativos e sempre me ajudaram quando precisei.

Aos técnicos e pós-graduandos que também sempre me ajudaram nos processos do laboratório.

Aos meus companheiros de trabalho, Giz, Marmita e Berna que sempre estiveram comigo no laboratório tanto para dar uma força quanto para passar um tempo fazendo companhia.

À todos meus amigos da ambiental por esses ótimos anos de graduação de amizades, de viagens e diversão.

Ao pessoal da república Chico Lopes onde eu morei durante minha graduação e também estiveram sempre me apoiando durante toda minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

*“O homem é do tamanho do seu sonho”*

Fernando Pessoa (1888 – 1935)

## RESUMO

MAGDALON, Gabriel (2014). **Efeito e função de metais como micronutrientes ou em traços na obtenção de biohidrogênio e de ácidos orgânicos voláteis através de bioprocessamento anaeróbico acidogênico de um meio contendo xilose como fonte de carbono.** Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Dentre os requerimentos nutricionais de qualquer sistema biológico, podem se destacar três grupos essenciais: os macronutrientes, micronutrientes e os elementos em quantidades de traços. Estes últimos são utilizados pelas células como cofatores na ativação ou desativação de enzimas alostéricas. Desta forma a carência ou excesso desses elementos podem trazer um problema no funcionamento de algumas enzimas e conseqüentemente podem ativar ou desativar algumas rotas metabólicas. Em um processo biológico, a produção de algum metabólito de interesse pode ser estimulada mediante a presença de um ou mais desses elementos que ativem uma rota metabólica de produção e desativem uma eventual rota de consumo, no entanto sem afetar o crescimento do organismo. No bioprocessamento anaeróbico de um meio contendo xilose como fonte de carbono, objetivando a obtenção de produtos de valor agregado como o hidrogênio como fonte energética e os ácidos orgânicos voláteis como subprodutos, uma composição adequada desses elementos pode aumentar a eficiência dos sistemas e trazer estabilidade na produção do hidrogênio e de ácidos orgânicos voláteis. Além disso, esse meio contendo xilose é constituído principalmente por pentoses que não são facilmente fermentescíveis, e alguns desses metais podem trazer resultados importantes no sentido de melhorar a degradabilidade dessas pentoses em ácidos orgânicos voláteis.

Considerando a importância e o ganho em estabilidade e eficiência que uma composição nutricional acertada pode conferir ao processamento anaeróbico na obtenção de hidrogênio e ácidos voláteis, o presente projeto propõe a investigação, em caráter fundamental, do efeito de metais em concentrações de traços e de micronutrientes, na produção de biohidrogênio e de ácidos orgânicos voláteis por meio de processos anaeróbicos acidogênicos utilizando um meio contendo xilose como fonte de carbono.

Palavras-chave: Biohidrogênio. Metais em concentração de traços. Ácidos voláteis. Xilose.

## ABSTRACT

MAGDALON, Gabriel (2014). **Effect and function of metals as micronutrients or in traces in the obtainment of biohydrogen and of organic acids through the acidogenic anaerobic bioprocessing of an environment containing xylose as source of carbon.** Monograph (Graduation) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Among the nutritional requirements of any biological system, three essential groups can be pointed out: the macronutrients, micronutrients and the elements in trace quantities. These last ones are utilized by the cells as cofactors in the activation or deactivation of allosteric enzymes. Therefore, the lack or excess of these elements can impair the functioning of some enzymes and consequently can activate or deactivate some metabolic pathways. In a biological process, the production of any metabolite of interest can be stimulated by the presence of one or more of these elements, which activate one metabolic pathway of production and deactivate one occasional pathway of expenditure, without affecting the organismal growth. In the anaerobic bioprocessing of a medium containing xylose as carbon source, aiming the acquirement of products of aggregate value such as hydrogen as the energetic source and organic acids as the sub products, an adequate composition of these elements can increase the system efficiency and promote stability in the production of hydrogen and volatile organic acids. Furthermore, the hydrolyzed part of sugar cane bagasse is mainly composed of pentoses that are not easily fermentable, and some of these metals can bring important results in order to improve the degradability of these pentoses in volatile organic acids.

Considering the importance and the gain in stability and efficiency that a right nutritional composition can promote in the anaerobic processing to obtain hydrogen and volatile acids, the present project proposes the investigation of the effects of micronutrients and metals in trace concentration in the production of biohydrogen and volatile organic acids through acidogenic anaerobic process utilizing a medium containing xylose as carbon source.

Keywords: Biohydrogen. Metals in trace quantities. Volatile acids. Xylose.

## **ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO**

- Visita à Dacar Industrial S.A., sediada em Tietê, SP, para buscar lodo do reator UASB que trata resíduos industriais de avícola, que foi utilizado nos experimentos.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PONTOS DE GERAÇÃO E CONSUMO DE HIDROGÊNIO (SPEECE, 1996).	20
FIGURA 2 – VARIAÇÃO TEMPORAL DE HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO - CONTROLE, HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO	31
FIGURA 3 - VARIAÇÃO TEMPORAL DE HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO - TRATAMENTO PH, HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO.	32
FIGURA 4 - VARIAÇÃO TEMPORAL DE HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO - TÉRMICO, HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO.	33
FIGURA 5 - VARIAÇÃO TEMPORAL DE HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO – PH - TÉRMICO, HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO.	34
FIGURA 6 - VARIAÇÃO TEMPORAL DE HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO – TÉRMICO - PH, HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO.	35
FIGURA 7 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO E GÁS CARBÔNICO – SÓDIO	37
FIGURA 8 – RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO – SÓDIO	37
FIGURA 9 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO E GÁS CARBÔNICO - ZINCO.	39
FIGURA 10 - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO - ZINCO.	40
FIGURA 11 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO – MAGNÉSIO	42
FIGURA 12 - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO – MAGNÉSIO	43
FIGURA 13 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO - NÍQUEL	46
FIGURA 14 - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO - NÍQUEL	47
FIGURA 15 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO - POTÁSSIO	49
FIGURA 16 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO - COBALTO	52
FIGURA 17 - - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO - COBALTO	53
FIGURA 18 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO – CÁLCIO	54
FIGURA 19 - - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO – CÁLCIO	55
FIGURA 20 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO – COBRE.	57
FIGURA 21 - - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO – COBRE	57
FIGURA 22 - VARIAÇÃO TEMPORAL DA PRODUÇÃO DE GÁS HIDROGÊNIO, METANO E GÁS CARBÔNICO – MANGANÊS	59
FIGURA 23 - RELAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE COM O RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO – MANGANÊS	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- - RENDIMENTO MÁXIMO DE AÇÚCAR A HIDROGÊNIO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS (MAINTINGUER, 2009)	19
TABELA 2 - - CULTURAS PURAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO (WANG E WAN, 2009)	23
TABELA 3 - RELAÇÃO DE METAIS A SEREM ADICIONADOS COMO MICRONUTRIENTES NO ENSAIO	28
TABELA 4 - RELAÇÃO DE METAIS A SEREM ADICIONADOS COMO TRAÇOS NO ENSAIO	28
TABELA 5 - MÉTODOS DE ANÁLISES	30
TABELA 6 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR	36
TABELA 7 - VALORES DOS ÁCIDOS E ÁLCOOIS MONITORADOS – SÓDIO	38
TABELA 8 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR	39
TABELA 9 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR.	41
TABELA 10- VALORES DOS ÁCIDOS MONITORADOS – MAGNÉSIO	44
TABELA 11 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR.	45
TABELA 12 - VALORES DOS ÁCIDOS MONITORADOS – NÍQUEL	47
TABELA 13 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR.	48
TABELA 14 - VALORES DOS ÁCIDOS E ÁLCOOIS MONITORADOS – POTÁSSIO	50
TABELA 15- VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR	51
TABELA 16 - VALORES DOS ÁCIDOS E ÁLCOOIS MONITORADOS - COBALTO	53
TABELA 17 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR.	54
TABELA 18 - VALORES DOS ÁCIDOS E ÁLCOOIS MONITORADOS – CÁLCIO	55
TABELA 19 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR.	56
TABELA 20 - VALORES DOS ÁCIDOS E ÁLCOOIS MONITORADOS - COBRE	58
TABELA 21 - VALOR DOS PARÂMETROS AJUSTADOS PELA CURVA NÃO LINEAR.	58
TABELA 22 - VALORES DOS ÁCIDOS E ÁLCOOIS MONITORADOS – MANGANÊS	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
CG	Cromatografia Gasosa
DQO	Demanda Química de Oxigênio
HPLC	Cromatografia Líquida
S/M	Relação Substrato/Micro-organismo
SVT	Sólidos Voláteis Totais
UASB	Up Flow Anaerobic Sludge Bad (Reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente)



## SUMÁRIO

1	Introdução.....	16
2	Objetivos.....	18
3	Revisão Bibliográfica.....	19
3.1	Produção de hidrogênio em processos fermentativos.....	19
3.1.1	Microrganismos Envolvidos na Produção de Hidrogênio.....	22
3.2	Importância do pH.....	25
3.3	Influência de nutrientes na produção fermentativa do hidrogênio.....	25
4	Materiais e métodos.....	27
4.1	Meio Nutriente Basal.....	27
4.2	Inóculo.....	27
4.3	Procedimento Experimental.....	27
4.4	Cinética.....	29
4.5	Análises Físico-químicas.....	29
4.6	Análises Cromatográficas.....	30
5	Resultados e discussão.....	31
5.1	Análise de pré-tratamentos.....	31
5.1.1	Controle.....	31
5.1.2	Pré-tratamento de pH.....	32
5.1.3	Pré-tratamento térmico.....	32
5.1.4	Pré-tratamento pH-térmico.....	33
5.1.5	Pré-tratamento térmico-pH.....	34
5.2	Análise da influência dos metais na produção de hidrogênio.....	35
5.2.1	Influência do sódio.....	35
5.2.2	Influência do zinco.....	38
5.2.3	Influência do magnésio.....	40
5.2.4	Influência do níquel.....	45
5.2.5	Influência do potássio.....	48
5.2.6	Influência do cobalto.....	51
5.2.7	Influência do cobre.....	56
5.2.8	Influência do manganês.....	58
6	Conclusão.....	61
7	Referências Bibliográficas.....	63

# 1 INTRODUÇÃO

Devido à grande demanda de energia pela população, fica cada vez mais em evidência a questão sobre as alternativas energéticas para substituir o combustível fóssil, que é o utilizado em maior escala atualmente.

Nesse cenário, o gás hidrogênio aparece como alternativa energética, devido ao benefício econômico e ambiental, pois sua combustão gera apenas água e não há emissão de carbono ao ser usado como combustível, além de ser 2,75 energeticamente mais eficiente do que qualquer outro hidrocarboneto ( $122 \text{ kJ.g}^{-1}$ ) e de poder ser usado na geração de energia elétrica, energia mecânica ou calor (Van Ginkel *et al.* 2001).

O hidrogênio pode ser produzido por diferentes processos, incluindo eletrólise da água, fotossíntese anoxigênica com compostos orgânicos por bactérias fototróficas, produção fermentativa de hidrogênio por meio de compostos orgânicos e sistemas híbridos utilizando bactérias fototróficas e fermentativas. (Levin *et al.* 2004).

A produção biológica de hidrogênio torna-se interessante pelo fato de as bactérias fermentativas terem um grande potencial para tratamento de águas residuárias e ao mesmo tempo serem produtoras de gás hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), que pode ser utilizado na geração de energia. Uma vasta gama de resíduos pode ser utilizada como substrato na via fermentativa (Das e Veziroglu 2001).

Podem-se utilizar diferentes substratos orgânicos na produção fermentativa de gás hidrogênio, como glicose, isômeros de hexoses, polímeros na forma de amido, celulose e hemicelulose. As produções de hidrogênio variam de acordo com cada substrato por depender da rota fermentativa e dos produtos finais gerados. Os ácidos orgânicos obtidos são, principalmente, láctico, acético e butírico. Na prática, a alta produtividade de  $\text{H}_2$  está relacionada com mistura de ácido acético e butírico e baixa produtividade com ácidos propiônicos e baixas produções de produtos finais (álcoois, ácido láctico)(Nath e Das 2004). Outros gases também podem estar presentes na mistura, como o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ), em pequenas quantidades (Das e Veziroglu 2001).

A produção de hidrogênio pode ser facilitada com a inibição da metanogênese por meio de pré-tratamento do inóculo, uma vez que as arqueias metanogênicas consomem hidrogênio nos processos anaeróbios. Esse pré-tratamento pode ser feito por meio de controle do pH e a quente. As bactérias produtoras de hidrogênio, formadoras

de esporos são comumente tolerantes a condições ambientais extremas (Kawagoshi *et al.* 2005).

São vários os microrganismos capazes de produzir hidrogênio e ácidos orgânicos a partir de carboidratos, como as *Enterobacter*, *Bacillus* e *Klebsiella*, porém a mais promissora são da espécie *Clostridium*, por apresentar rápido metabolismo e altos rendimentos de produção de hidrogênio (Shida, 2008).

Entre as várias configurações de reatores existentes, os de mistura completa (CSTR) são os mais utilizados para a produção fermentativa de hidrogênio (Hawkes *et al.* 2007). Porém, para a produção de hidrogênio a partir de carboidratos complexos, como o amido, por exemplo, torna-se interessante a configuração de reator em batelada, pois a matéria orgânica particulada pode dificultar a operação em outras configurações.

Alguns resíduos apresentam complexidade ao serem metabolizados devido à sua estrutura molecular que dificulta o acoplamento dessas substâncias em sítios enzimáticos. O estudo da aplicação de micronutrientes para possibilitar o metabolismo de substâncias dificilmente fermentescíveis é de grande importância para a compreensão das rotas metabólicas que regem a produção de hidrogênio e ácidos voláteis pela acidogênese.

Várias fontes de inóculo têm sido utilizadas com boa eficiência na produção biológica de hidrogênio, como amostras de solo, lodo se estação de tratamento de esgoto, águas residuárias diversas, amostra de aterro sanitário, dentre outros. Porém, a grande maioria dos inóculos foram testados em clima temperado, podendo não ter a mesma eficiência em climas tropicais como no Brasil.

Assim, esse trabalho tem como objetivo testar a influência de metais em concentração de micronutrientes e em traços na produção biológica de hidrogênio utilizando inóculo proveniente de um reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando água residuária de abatedouro de aves (Dacar Industrial S.A.), sediada em Tietê, SP.

## **2 OBJETIVOS**

- Testar a influência de metais em concentração de micronutrientes e em traços na produção biológica de hidrogênio em reatores em batelada;
- Avaliar a geração dos produtos intermediários, tais como produção de ácidos orgânicos voláteis e alcoóis nos reatores em batelada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Produção de hidrogênio em processos fermentativos

O hidrogênio pode ser produzido por bactérias anaeróbias utilizando substratos ricos em carboidratos. As reações de fermentação podem ocorrer em condições mesofílicas (25-40°C), termofílicas (40-60°C), termofílica extrema (65-80°C) ou hipertermofílica (>80°C). No processo da fermentação é produzido uma mistura de biogás, contendo principalmente gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) e carbônico (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), monóxido de carbono (CO), sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e outros produtos, como ácidos (ático, acético, butírico, entre outros) e alcoóis (etanol, butanol, entre outros) (Levin *et al.* 2004). A distribuição dos produtos pode ser diferente, dependendo dos microrganismos presentes, do estado de oxidação do substrato e das condições ambientais (pH e pressão parcial de hidrogênio) (Hallenbeck e Ghosh 2009).

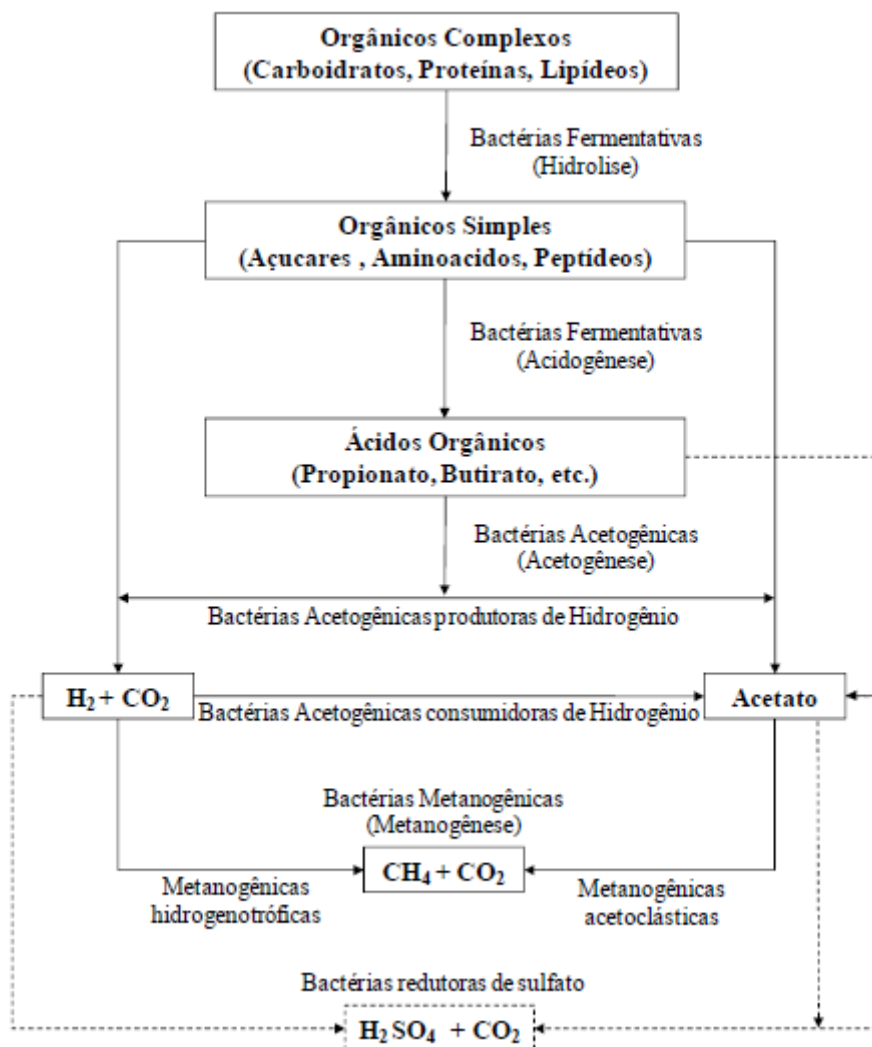
Esse processo mostra-se interessante, pois não necessita de luz nem de culturas puras de microrganismos, apresenta boa estabilidade na produção de hidrogênio, os custos são relativamente baixos e os ácidos produzidos podem ser usados por indústrias químicas e de alimentos (Rojas, 2010).

Entre os substratos que podem ser utilizados, os mais estudados são a glicose, a sacarose e a xilose. Na tabela 1 são apresentados os rendimentos máximos de conversão de açúcares a hidrogênio nos processos fermentativos.

**Tabela 1 - - Rendimento máximo de açúcar a hidrogênio em processos fermentativos (Maintinguer, 2009)**

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

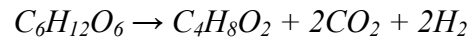
Speece (1996) descreveu a digestão anaeróbia como sendo um processo complexo que envolve diversas classes de microrganismos e várias fases intermediárias. Os componentes complexos dos substratos são hidrolisados em compostos mais simples (açúcares, aminoácidos e peptídeos). Os produtos gerados são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, sendo convertidos em ácidos orgânicos, alcoóis e biogás. Os ácidos orgânicos com mais de dois carbonos são convertidos em acetato e gás hidrogênio pelas bactérias homoacetogênicas e sintróficas (produtoras obrigatórias de hidrogênio), e o gás hidrogênio e o acetato são convertidos em metano pelas arqueias metanogênicas. O esquema desse processo é apresentado na Figura 1.



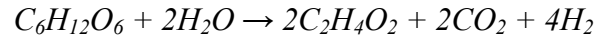
**Figura 1- Pontos de geração e consumo de hidrogênio (Speece, 1996).**

Mosey (1983) descreveu o processo de digestão anaeróbia e considerou as seguintes reações de degradação da glicose:

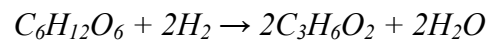
### Processo acidogênico



glicose      ác. butírico

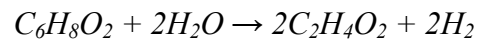


glicose              ác. acético

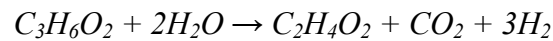


Glicose              ác. propiônico

### Processo acetogênico

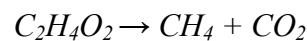


ác. butírico              ác. acético

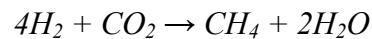


ác. propiônico              ác. acético

### Processo metanogênico



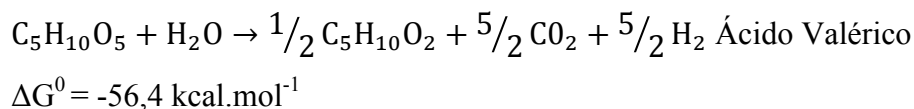
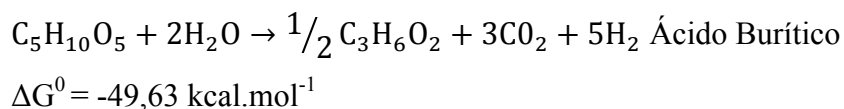
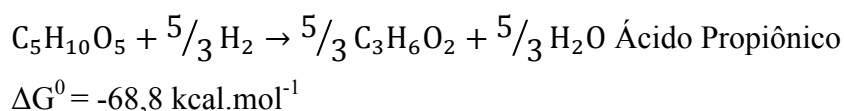
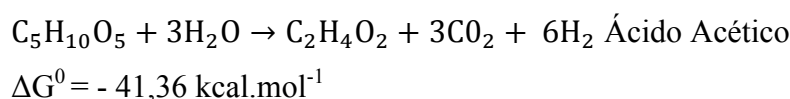
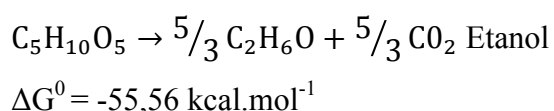
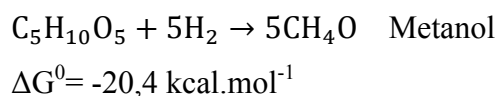
ác. acético



Portanto, torna-se desejável inibir as arqueias metanogênicas para haver um desequilíbrio anaeróbio objetivando a obtenção de hidrogênio e ácidos orgânicos (Rojas, 2010).

Vários estudos abordam os processos de inibição das arqueias metanogênicas e acúmulo de gás hidrogênio. Entre os fatores que influenciam estão o pH, a temperatura, a configuração do reator, o inóculo, o substrato, nutrientes, material suporte e tempo de detenção hidráulica. (Hawkes *et al.* 2007; Hallenbeck e Ghosh 2009).

As principais reações envolvendo a xilose estão descritas a seguir. Os valores de  $\Delta G^0$  foram retirados de Tavares (2008).



### 3.1.1 Microrganismos Envolvidos na Produção de Hidrogênio

Existem diversos grupos de microrganismos envolvidos na produção de hidrogênio, classificados em quatro grupos: anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, aeróbios e fototróficos (Fang *et al.*, 2006). As principais bactérias fermentativas conhecidas para a produção de hidrogênio incluem espécies de *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (Maintinguer, 2008).

As bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium*, conhecidos como microrganismos acidofílicos, que vivem em pH próximo de 4,0, são descritos na maioria dos trabalhos como sendo os principais responsáveis pela produção anaeróbia de hidrogênio (Fang *et al.*, 2006), devido a seu rápido metabolismo e sua capacidade de formar esporos. Segundo Khanal *et al.* (2004), o gênero *Clostridium* produz hidrogênio

utilizando a atividade das enzimas piruvato-ferrodoxina-oxidorreductase e desidrogenase. Baixos valores de pH podem inibir a atividade da desidrogenase, sendo este fator importante na produção de hidrogênio. Os gêneros *Clostridium* podem produzir hidrogênio a partir da degradação de proteínas, aminoácidos ou carboidratos.

Em processos anaeróbios, quando o pH cai para menos de 4,5, o hidrogênio é produzido durante a fase exponencial de crescimento do *Clostridium*, produzindo solventes na fase estacionária. Essa mudança de rota acontece possivelmente devido ao acúmulo de ácidos graxos voláteis e hidrogênio na fase de crescimento exponencial.

A Tabela 2, realizada por Wang e Wan (2009), apresenta estudos realizados com culturas puras em diferentes configurações de reatores, nos quais *Clostridium* e *Enterobacter* foram os principais microrganismos produtores de hidrogênio.

**Tabela 2 - - Culturas puras utilizadas para produção de hidrogênio (Wang e Wan, 2009)**

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Produtividade de H <sub>2</sub>	Referência
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT – BT 08	Celobiose	Batelada	5.4 mol.mol <sup>-1</sup> celobiose	Kumar e Das (2000)
<i>Escherichia coli</i> MC13-4	Glicose	Batelada	1.2 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Ishikawa <i>et al.</i> (2006)
<i>Escherichia coli</i>	Glicose	Batelada	2.0 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Bisaillon <i>et al.</i> (2006)
<i>Escherichia coli</i>	Glicose	Contínuo	2.0 mol.mol <sup>-1</sup> 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>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glicose	Batelada	1.0 mol.mol <sup>-1</sup> 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 <sup>-1</sup> 01	Glicerol	Batelada	0.6 mol.mol <sup>-1</sup> glicerol	Nakashimada <i>et al.</i> (2001)

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Produtividade de de H <sub>2</sub>	Referência
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Amido	Batelada	1.09 mol.mol <sup>-1</sup> <sup>1</sup> amido	Fabiano e Perego (2002)
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Molasses	Contínuo	3.5 mol.mol <sup>-1</sup> sugar	Tanisho e Ishiwata (1995)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Glicose	Contínuo	-	Kumar e Das (2001)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glicose	Batelada	2.0 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Chin, Chen e Chou (2003)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glicose	Contínuo	1.08 mol.mol <sup>-1</sup> <sup>1</sup> glicose	Zang <i>et al.</i> (2006)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Xilose	Batelada	0.73 mol.mol <sup>-1</sup> <sup>1</sup> xilose	Lo <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	Amido	Batelada	9.95 mol.g COD	Chen <i>et al.</i> (2007)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	Sacarose	Batelada	2.07 mol.mol <sup>-1</sup> <sup>1</sup> hexose	Lo <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Esgoto quitinoso	Batelada	2.2 mol.mol <sup>-1</sup> substrato	Levin <i>et al.</i> (2006)
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Biomassa celulósica	Batelada	2.3 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Collet <i>et al.</i> (2004)
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	Contínuo	3.0 mol.mol <sup>-1</sup> lactose	Taguchi <i>et al.</i> (1996)
<i>Clostridium</i> sp. strain no.2	Celulose	Contínuo	0.3 mol.mol <sup>-1</sup> 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>Thermoanaerobacterium thermosuccharolyticum</i> KU001	Glicose	Batelada	2.4 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Ueno <i>et al.</i> (2001)

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Produtividade de H <sub>2</sub>	Referência
<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 <sup>-1</sup> 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 <sup>-1</sup> glicose	Oh <i>et al.</i> (2008)
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glicose	Contínuo	1.93 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Xing <i>et al.</i> (2008)

### 3.2 Importância do pH

O pH é um parâmetro de grande importância para a produção de hidrogênio, Fang e Liu (2002) constataram que o pH afeta diretamente a velocidade de produção de hidrogênio e a ação dos microrganismos hidrogenotróficos (consumidores de hidrogênio). No trabalho realizado pelos autores, onde foi operado um reator em batelada degradando glicose anaerobiamente, não houve consumo de hidrogênio por arqueias metanogênicas para pH menores que 5,5. Observou-se que a manutenção do pH em 5,5 não permitiu a produção de metano no sistema.

### 3.3 Influência de nutrientes na produção fermentativa do hidrogênio

Elementos traços podem ser definidos como “qualquer elemento químico que ocorre em pequenas quantidades em organismos, mas é essencial para vários processos fisiológicos e bioquímicos”. Vários desses elementos traços são metais.

Os metais essenciais normalmente estão presentes no sistema de enzimas como cofatores ou sendo essenciais para o sistema da enzima. Porém, todos os metais são potencialmente tóxicos, podendo inibir a atividade microbiológica.

A enzimologia da metanogênese e da acidogênese tem sido estudada extensivamente. Várias dessas enzimas contêm metais como cofatores e coenzimas,

como cobalto, níquel, ferro, zinco, molibdênio e/ou tungstênio, o que explica a grande dependência da presença e disponibilidade desses metais na metanogênese (Zandvoort *et al.* 2006).

Speece e McCarty (1962) realizaram os primeiros trabalhos demonstrando a importância de alguns metais em concentração traços nos processos anaeróbios. Com a difusão dos digestores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB), vários metais vêm sendo estudados como micronutrientes e em traços, principalmente para a fermentação do metano.

Alguns resíduos que podem ser utilizados como fonte de carbono para a produção biológica de hidrogênio e ácidos voláteis apresentam complexidade ao serem metabolizados devido à sua estrutura molecular que dificulta o acoplamento dessas substâncias em sítios enzimáticos. A aplicação de micronutrientes objetivando possibilitar o metabolismo de substâncias dificilmente fermentescíveis torna-se importante para a compreensão das rotas metabólicas que regem a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis pela acidogênese.

A literatura aborda amplamente o tema para metanogênese, já para a produção de hidrogênio os estudos são incipientes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Meio de Nutriente Basal

A investigação sobre a influência dos metais na obtenção do hidrogênio e dos ácidos voláteis foi conduzido em um meio contendo xilose como fonte de carbono. A concentração de matéria orgânica foi de  $5000 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  em termos de DQO e foi adicionado  $\text{SeO}_2$  ( $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $3,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e  $(\text{NH}_3)_2\text{CO}$  ( $8,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) como nutrientes em todas as condições experimentais, tal que a relação C/N/P do meio nutriente foi mantida em  $\text{C/N} = 140$  e  $\text{C/P} = 980$ , adaptada pelos trabalhos realizados por Del Nery (1987) e Rojas (2010), respectivamente para culturas anaeróbias e para maximização da produção acidogênica de hidrogênio. O pH do meio líquido foi ajustado para 6,0.

### 4.2 Inóculo

O inóculo utilizado é proveniente de um reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando água residuária de abatedouro de aves (Dacar Industrial S.A.), sediada em Tietê, SP.

### 4.3 Procedimento Experimental

Foram avaliadas as influências de dois fatores na produção de biohidrogênio e ácidos voláteis a partir da xilose: o metal (como micronutriente ou em concentração traços) e a concentração do metal. Foram avaliados 9 metais em três concentrações distintas. Os metais relacionados na Tabela 3 foram avaliados como micronutrientes e foram adicionados ao meio nas concentrações de 1, 5 e  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Já os metais discriminados na Tabela 4 foram avaliados como metais em concentração traço e foram adicionados ao meio nas concentrações de 250, 750 e  $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ambas as tabelas relacionam as composições das soluções “*stock*” de cada metal.

**Tabela 3 - Relação de metais a serem adicionados como micronutrientes no ensaio**

Metal	Concentração "Stock" (g.L <sup>-1</sup> )	Composto Fonte
Sódio (Na)	<b>2,54</b>	<b>NaCl</b>
Potássio (K)	<b>1,91</b>	<b>KCl</b>
Magnésio (Mg)	<b>4,66</b>	<b>MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O</b>
Cálcio (Ca)	<b>2,77</b>	<b>CaCl<sub>2</sub></b>

**Tabela 4 - Relação de metais a serem adicionados como traços no ensaio**

Metal	Concentração "Stock" (g.L <sup>-1</sup> )	Composto Fonte
Manganês (Mn)	<b>9,0</b>	<b>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>
Cobre (Cu)	6,7	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Zinco (Zn)	5,2	ZnCl <sub>2</sub>
Cobalto (Co)	7,0	CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Níquel (Ni)	10,1	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O

Os primeiros ensaios foram conduzidos em frascos Duran de 2000 mL de capacidade (1000 mL de volume útil) e posteriormente os experimentos foram realizados em frascos Duran de 500 mL de capacidade (250 mL de volume útil). Primeiramente foram adicionados o meio basal e a solução "stock" do metal a ser estudado na concentração de interesse e assim lacrado e autoclavados. Inoculado posteriormente nos frascos contendo meio nutriente já autoclavado e resfriado para que a concentração de biomassa no ensaio fosse de 500 mg·L<sup>-1</sup>, o que corresponde a uma relação S/M (substrato/microrganismo) de 0,1 mg O<sub>2</sub>·mg SVT<sup>-1</sup>. Os experimentos posteriores foram calculados para que a concentração de biomassa fosse de 2500 mg·L<sup>-1</sup>, correspondendo a uma relação S/M (substrato/microrganismo) de 0,5 mg O<sub>2</sub>·mg SVT<sup>-1</sup> e para os experimentos realizados nos frascos de 500 mL, a concentração de biomassa e de microrganismos foi de 1000 mg·L<sup>-1</sup>, correspondendo a uma relação S/M (substrato/microrganismos) de 1 mg O<sub>2</sub>·mg SVT<sup>-1</sup>.

Os frascos foram mantidos em um Shacker ajustado à temperatura de 30° Celsius com frequência de agitação de 100 rpm. No decorrer do ensaio foi monitorado o crescimento da biomassa, para determinação das fases lag, crescimento exponencial e estabilização. Este monitoramento foi conduzido pela aferição da pressão do *headspace*

dos frascos Duran. As amostras contidas nos frascos foram submetidas à análise de composição do biogás por meio de cromatografia gasosa (detector TCD) e determinação de carboidratos totais (Dubois *et al.* 1956), além da análise dos ácidos voláteis e dos carboidratos por cromatografia líquida – HPLC. Este procedimento foi idealizado com base no protocolo estabelecido por (Speece, 1996), para identificação da necessidade e função de metais em traços em sistemas anaeróbios.

#### 4.4 Cinética

O parâmetro cinético aparente foi obtido a partir do ajuste dos resultados dos perfis produção de H<sub>2</sub> e de consumo de matéria orgânica ao modelo de cinética microbiana de Monod. No entanto, dada à baixa concentração de substrato no ensaio, o modelo foi simplificado para um modelo de primeira ordem residual, cuja forma integrada está demonstrada pela Equação 1.

$$C(t) = C_R + (C_I - C_R) \cdot e^{-k_1^{app} \cdot t} \quad \text{Equação 1}$$

Na qual  $C(t)$  é a concentração de xilose (mg.L<sup>-1</sup>);  $C_R$  é concentração residual de xilose (mg.L<sup>-1</sup>);  $C_I$  é a concentração inicial de xilose (mg.L<sup>-1</sup>);  $t$  é o tempo percorrido do experimento (horas) e  $k_1^{app}$  é a constante cinética aparente (horas<sup>-1</sup>).

O modelo foi aplicado aos resultados obtidos nos perfis de concentração de xilose, para a obtenção dos parâmetros cinéticos aparentes e das condições de contorno  $C_I$  e  $C_R$ . O ajuste foi realizado utilizando-se o software Microcal Origin<sup>®</sup> v 8.1, pelo algoritmo de interações de Levenberg-Marquadt.

#### 4.5 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas foram efetuadas periodicamente. Todas as análises foram realizadas em amostras filtradas em membrana 0,45 µm, exceto os sólidos voláteis totais. Os métodos utilizados nas análises de xilose, DQO, pH, composição do biogás, produção do biogás e dos sólidos voláteis totais estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Métodos de análises**

Análise	Método
Xilose	Dubois et al.(1956)
DQO	Standard Methods (APHA, 1998)
pH	Standard Methods (APHA, 1998)
Composição do Biogás	Cromatografia gasosa
Produção do Biogás	Vazão Volumétrica
Sólidos Voláteis Totais (SVT)	Standard Methods (APHA, 1998)

#### 4.6 Análises Cromatográficas

As análises de composição do biogás foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu<sup>®</sup> modelo CG-2010, com uma coluna capilar Supelco Carboxen<sup>®</sup> 1010 PLOT (30 m x 0,32 mm), utilizando um detector de condutividade térmica (TCD) a 230 °C e um injetor operando em *splitless* a 220 °C e o gás de arraste foi argônio. Estas análises permitiram a detecção e quantificação de N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> em fase gasosa.

A composição da fase líquida foi determinada por um cromatógrafo líquido (HPLC) modelo Shimadzu<sup>®</sup> modular, utilizando um sistema de bombas LC-10AD, um forno para coluna CTO-20A, um controlador SCL-10A, um detector de matriz luminosa (PDA – *Photo Diode Array*) ajustado para varredura compreendendo uma faixa de comprimentos de onda de 190 a 370 nm (região UV), com passo de 1 nm, sendo realizada a leitura do cromatograma em 210 nm e um detector de refratometria RID-10A com temperatura de célula de 35 °C. A fase fixa compreendeu uma coluna BIO-RAD Aminex<sup>®</sup> HPX-87H 3000 x 7,8 mm, com pré-coluna de mesmo tipo, operando a temperatura constante de 43 °C. O eluente utilizado foi uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,005 mol·L<sup>-1</sup>, na vazão de 0,5 ml·min<sup>-1</sup> sendo o volume injetado de 100 µL. A integração e identificação dos picos foi realizada através do software Shimadzu Class-VP<sup>®</sup> versão 5.032.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizado um experimento para avaliar a influência de diferentes tipos de pré-tratamento do inoculo, com o intuito de selecionar as bactérias acidogênicas, responsáveis pela produção de hidrogênio e inibir as arqueias metanogênicas.

O experimento consistiu em cinco condições experimentais como pré-tratamento, que serão descritas a seguir. O ensaio foi conduzido em frascos Duran de 300 mL de volume total e 100 mL de volume útil, à temperatura de 30 °C e sob agitação à 100 rpm.

### 5.1 Análise de pré-tratamentos

#### 5.1.1 Controle

O ensaio controle consistiu na inoculação do lodo Dacar nenhum pré-tratamento, com o objetivo de ser utilizada como base de comparação. A Figura 2 mostra a produção dos gases ao longo do ensaio.

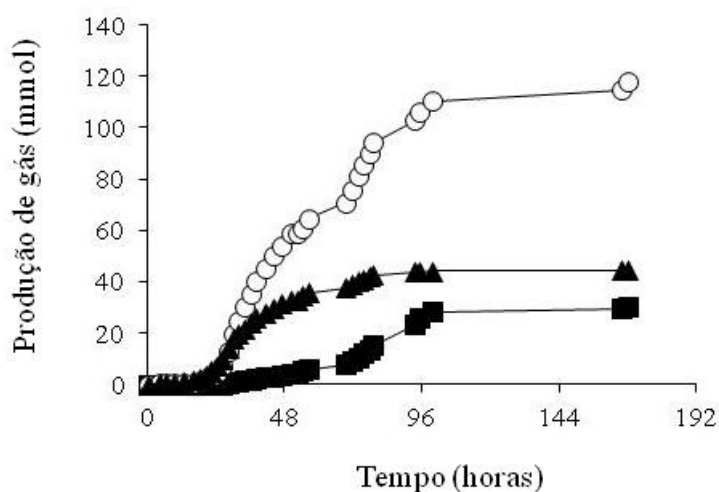





Figura 2 – Variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico - controle,  hidrogênio,  metano e  gás carbônico

Observa-se que houve maior produção de gás carbônico, metano e hidrogênio, atingindo aproximadamente 120, 40 e 30 mmol, respectivamente. A fase log iniciou em

torno de 24 horas de experimento, terminando em cerca de 96 horas. Com os resultados obtidos nesse experimento, foi possível ter uma base de comparação para os outros pré-tratamentos testados.

### 5.1.2 Pré-tratamento químico

Esse pré-tratamento consistiu em ajustar o pH do lodo para 3,0 com ácido clorídrico (HCl) e após 24 horas ajustá-lo para 6,0 com hidróxido de sódio (NaOH). A produção dos gases nesse ensaio pode ser verificada pela Figura 3.

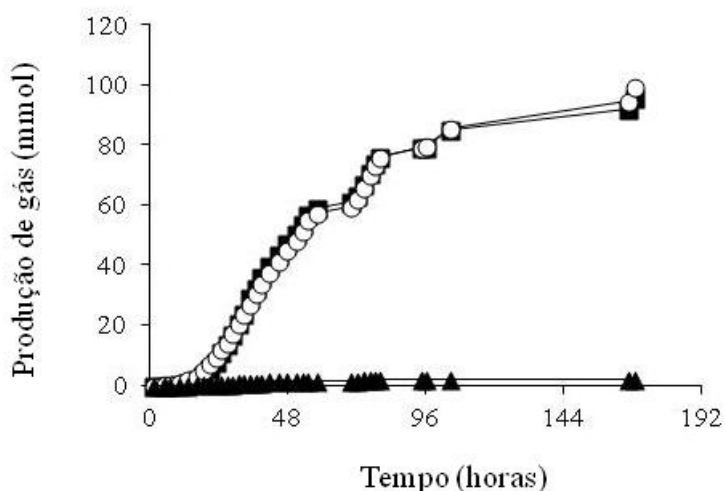


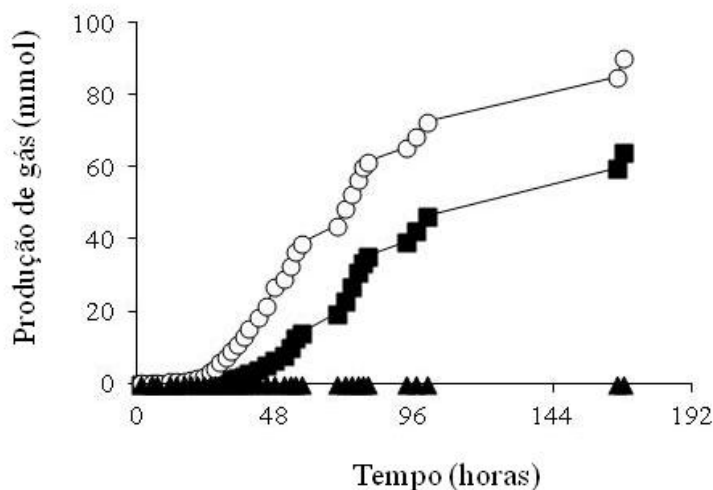
Figura 3 - Variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico - tratamento pH,




■ hidrogênio, ▲ metano e ○ gás carbônico.

Observa-se pela Figura 3 que a produção de hidrogênio foi aproximadamente igual à de gás carbônico, atingindo cerca de 100 mmol. Esse pré-tratamento mostrou-se interessante também por inibir a produção de metano. Assim como na condição controle, o crescimento exponencial iniciou-se em torno de 24 horas e cessou em 96 horas.

### 5.1.3 Pré-tratamento térmico

Esse pré-tratamento consistiu em aquecer o lodo a 90 °C por 20 minutos em banho maria. A Figura 4 mostra a produção dos gases ao longo do experimento.



**Figura 4 - Variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico - térmico,  hidrogênio,  metano e  gás carbônico.**

Ao analisar a Figura 4, observa-se que o pré-tratamento térmico mostrou-se interessante pelo fato de inibir a produção de metano, porém a produção de hidrogênio, de aproximadamente 65 mmol foi inferior se comparado ao pré-tratamento de pH. ode-se notar também que o tempo de ensaio não se estabilizou em 96 horas, sendo não prático para utilizá-lo nos futuros experimentos.

#### 5.1.4 Pré-tratamento químico-térmico

Além de avaliar os pré-tratamentos separadamente, foi interessante testar se o pré-tratamento químico seguido do térmico influenciaria positivamente na produção de hidrogênio.

A metodologia utilizada foi as mesmas que as anteriores, primeiramente ajustou-se o pH do lodo para 3,0 com ácido clorídrico (HCl), após 24 horas foi ajustado para 6,0 com hidróxido de sódio (NaOH) e posteriormente foi realizado o procedimento utilizado no pré-tratamento térmico, aquecendo o lodo para 90 °C por 20 minutos em banho maria.

A produção dos gases nesse ensaio pode ser observada na Figura 5.

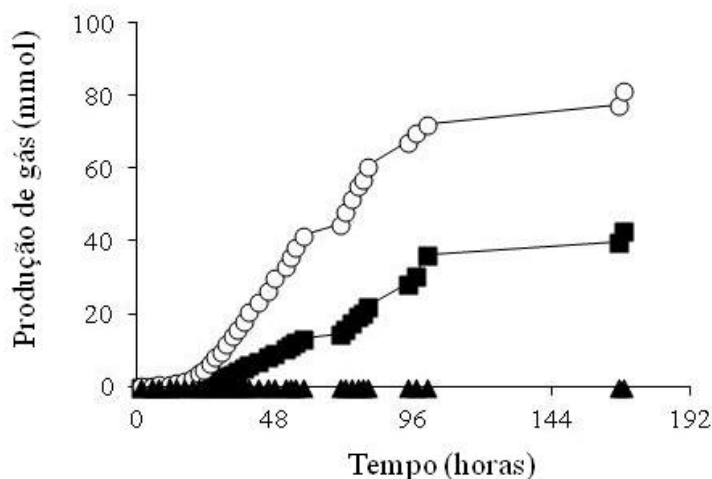


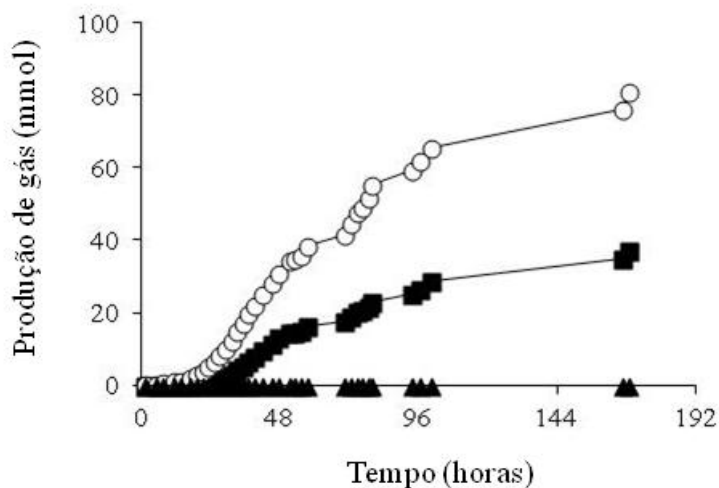
Figura 5 - Variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico – pH - térmico, **■** hidrogênio, **▲** metano e **○** gás carbônico.




Observa-se pela Figura 5 que a produção de metano foi inibida, da mesma maneira que ocorreu nos pré-tratamentos químico e térmico. A produção de hidrogênio foi inferior se comparada aos pré-tratamento realizados separadamente, alcançando cerca de 40 mmol. O gás carbônico atingiu aproximadamente 80 mmol. A fase log iniciou-se em torno de 24 horas e estabilizou-se em 96 horas.

### 5.1.5 Pré-tratamento térmico-químico

Esse pré-tratamento foi similar ao analisado no item 5.1.4, apenas invertendo a ordem dos pré-tratamentos, sendo primeiro o térmico e posteriormente o químico.

A produção dos gases pode ser analisada pela Figura 6.



**Figura 6 - Variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico – térmico - pH,  hidrogênio,  metano e  gás carbônico.**

O comportamento da produção de gases observado pela Figura 6 é similar ao analisado pelo item 5.1.4. A produção de metano foi inibida pelo pré-tratamento e a produção de hidrogênio e gás carbônico foram de aproximadamente 40 e 80 mmol, respectivamente. A fase log iniciou-se em torno de 24 horas e cessou em cerca de 96 horas.

## 5.2 Análise da influência dos metais na produção de hidrogênio

Os experimentos conduzidos para avaliar a influência dos metais na produção de hidrogênio analisaram os metais em pares. O pré-tratamento químico foi escolhido, por apresentar maior produção de gás hidrogênio e não conter produção de metano. O inóculo foi pré-tratado e deixado a temperatura ambiente por 3 dias antes do início do experimento, para manter a biomassa ativa.

### 5.2.1 Influência do sódio

Esse primeiro experimento foi um ensaio exploratório para testar a influência do sódio (Na) variando suas concentrações e utilizando frascos Duran de 2000 mL e 500 mg O<sub>2</sub>.mg SVT<sup>-1</sup> para as condições (1a) e (1b), as condições (1c), (1d) e (1e) foram realizadas em frascos de 500 mL e com relação S/M de 1 mg O<sub>2</sub>.mg SVT<sup>-1</sup>. Devido a extensão do experimento, de aproximadamente 400 horas, decidiu-se por aumentar a carga de biomassa nos próximos experimentos para encurtar com os frascos de 2000 mL.

### Parâmetro cinético aparente

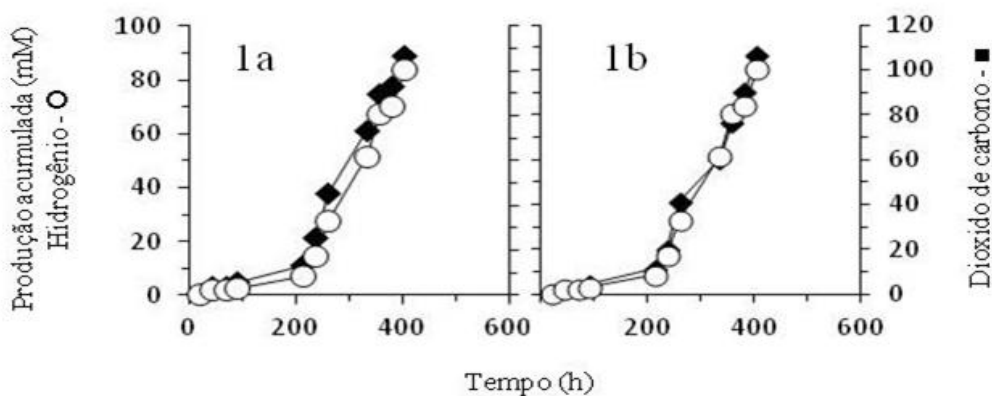
A Tabela 6 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 6 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear**

<b>Condição</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>k_1^{app}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>C_I</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>1a - Na 1 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,63	0,004 ± 0,002	3950 ± 895
<b>1b - Na 5 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,91	0,006 ± 0,001	4158 ± 435
<b>1c - Na 1 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,024 ± 0,0053	602 ± 21
<b>1d - Na 5 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,025 ± 0,0042	607 ± 15
<b>1e - Na 10 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,024 ± 0,0062	603 ± 26

Observa-se pela Tabela 6, que a curva ajustada para a condição 1a apresentou o pior ajuste, obtendo R<sup>2</sup> com valor de 0,63. Esse mau ajuste pode influenciar na comparação dos resultados. Para as condições (c) e (d) e (e) os ajustes foram melhores, provavelmente por haver menor quantidade de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

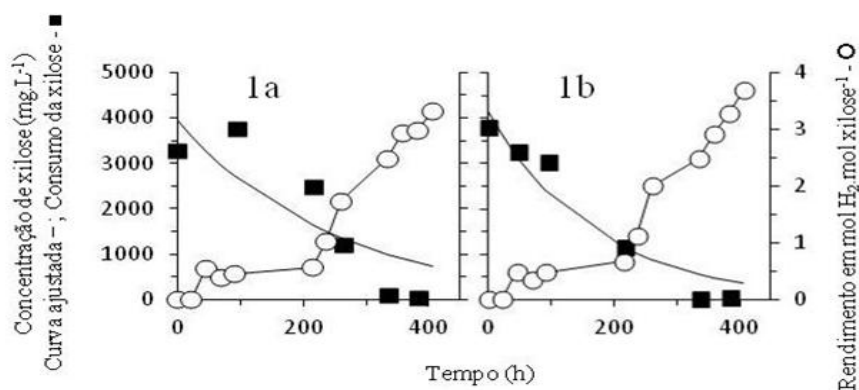
Foi avaliado o efeito da influência do sódio na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. Para as condições em que o experimento foi conduzido em frascos Duran de 2000 mL houve produção de hidrogênio, porém, nas condições em que o experimento foi realizado em frascos Duran de 500 mL não houve produção de gás em nenhuma condição. A Figura 7 apresenta a variação temporal de gás hidrogênio e gás carbônico nas condições 1a e 1b, nas concentrações de sódio de 1 e 5 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 7 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio e gás carbônico – sódio**

Pode-se observar pela Figura 7 que a produção de gás carbônico em mmol é maior do que a de hidrogênio nas duas condições. A produção absoluta de gás hidrogênio e gás carbônico foi superior na condição 1b, produzindo 93 mmol de hidrogênio e 106 mmol de gás carbônico. A fase log teve início em aproximadamente 210 horas e a maior produção do biogás se deu em aproximadamente 400 horas.

Na Figura 8 está apresentado a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1, e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio ( $y$ ) em relação à xilose, para todas as condições analisadas.



**Figura 8 – Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio – sódio**

Observa-se pela Figura 8, que apesar de a produção absoluta do hidrogênio ter sido superior na condição 1b, o rendimento foi maior na condição 1a, atingindo aproximadamente  $4,16 \text{ mol H}_2.\text{mol xilose}^{-1}$ . Essa diferença de resultados deve-se possivelmente ao mau ajuste da curva na condição 1a, não sendo possível usar a curva como comparação entre as concentrações. É possível observar que ocorreu maior

rendimento de hidrogênio por xilose a partir de aproximadamente 220 horas, hora próxima à que se inicia a fase log, como mostrado na Figura 7. A produção de metano foi ausente em todas as condições analisadas.

Na Tabela 7 encontra-se as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição nos frascos de 500 mL.

**Tabela 7 - Valores dos ácidos e álcoois monitorados – sódio**

<b>Ácido</b>	<b>Condição 1c</b>	<b>Condição 1d</b>	<b>Condição 1e</b>
Metanol	0	0	183,101
Etanol	0	0	39,877
Acético	82,040	79,668	71,550
Propiônico	1,781	3,030	0,082
Butírico	1,342	8,804	0
Valérico	0	0	10,216

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no final dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

Por não ter havido produção de gás hidrogênio em nenhuma das condições, pode-se dizer que provavelmente houve consumo de gás hidrogênio na homoacetogênese em todas as condições, devido à alta concentração de ácido acético em todas as condições e a ausência de gás hidrogênio. Na condição 1e foi produzido também metanol e etanol, sendo o metanol consumidor de hidrogênio e o etanol produtor de gás carbônico.

### 5.2.2 Influência do zinco

Esse experimento foi um ensaio exploratório para testar a influência do zinco (Zn), variando suas concentrações e utilizando frascos Duran de 2000 mL e 500 mg  $\text{O}_2.\text{mg SVT}^{-1}$ .

#### Parâmetro cinético aparente

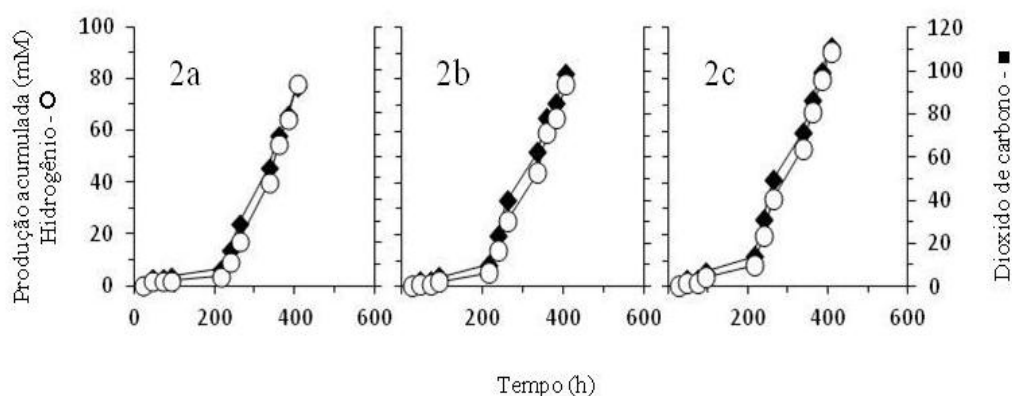
A Tabela 8 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 8 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear**

Condição	R <sup>2</sup>	k <sub>1</sub> <sup>app</sup> (h <sup>-1</sup> )	C <sub>I</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
2a - Zn 250 µg.L <sup>-1</sup>	0,81	0,005 ± 0,002	3489 ± 603
2b - Zn 750 µg.L <sup>-1</sup>	0,87	0,006 ± 0,001	3966 ± 537
2c - Zn 1000 µg.L <sup>-1</sup>	0,91	0,006 ± 0,001	4277 ± 430

Todas as condições apresentaram bons ajustes, sendo ligeiramente inferior na condição 2a, onde o ajuste foi de 0,81.

Foi avaliado o efeito da influência do zinco na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 9 apresenta a variação temporal de gás hidrogênio e gás carbônico nas concentrações de zinco de 250, 750 e 1000 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

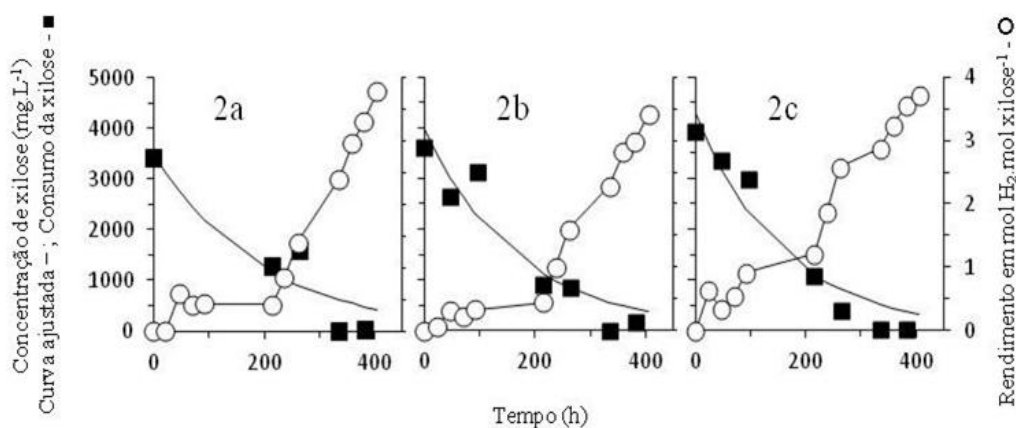


**Figura 9 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio e gás carbônico - zinco.**

Ao analisar as produções absolutas de gás hidrogênio e de gás carbônico na Figura 9, pode-se observar que há maior produção de gás carbônico em relação ao hidrogênio, assim como ocorreu nas condições onde se variou a concentração de sódio. A concentração de zinco apresentou maiores produções tanto de hidrogênio quanto de gás carbônico quanto maior foi sua concentração, obtendo maior produção na condição 2c, produzindo 92 mmol de gás hidrogênio e 109 mmol de gás carbônico.

A fase log iniciou-se com aproximadamente 210 horas, atingindo maiores produções de biogás em 400 horas.

Na Figura 10 está apresentado a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1, e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio (y) em relação à xilose, para todas as condições avaliadas.



**Figura 10 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio - zinco.**

Apesar de a produção absoluta ter sido maior na condição 2c, como visto na Figura 9, observa-se pela Figura 10 que o rendimento de produção de hidrogênio por xilose é melhor na condição 2a, atingindo  $3,78 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol xilose}^{-1}$ . Essa diferença entre os resultados deve-se a menor massa de xilose no início do ensaio na condição 2a, como visto na Tabela 8.

O maior rendimento de hidrogênio coincide com a hora em que se inicia a fase log observada na Figura 9, em aproximadamente 210 horas após o início do experimento.

A produção de metano foi ausente em todas as condições analisadas.

### 5.2.3 Influência do magnésio

Para encurtar o ensaio, optou-se por aumentar a carga de biomassa para  $2500 \text{ mg O}_2 \cdot \text{mg SVT}^{-1}$ , diminuindo o tempo de ensaio para aproximadamente 230 horas nas condições 3a, 3b e 3c, onde foram utilizados frascos Duran de 2000 mL. As condições (3d), (3e) e (3f) foram realizadas em frascos de 500 mL e com relação S/M de  $1 \text{ mg O}_2 \cdot \text{mg SVT}^{-1}$ .

### Parâmetro cinético aparente

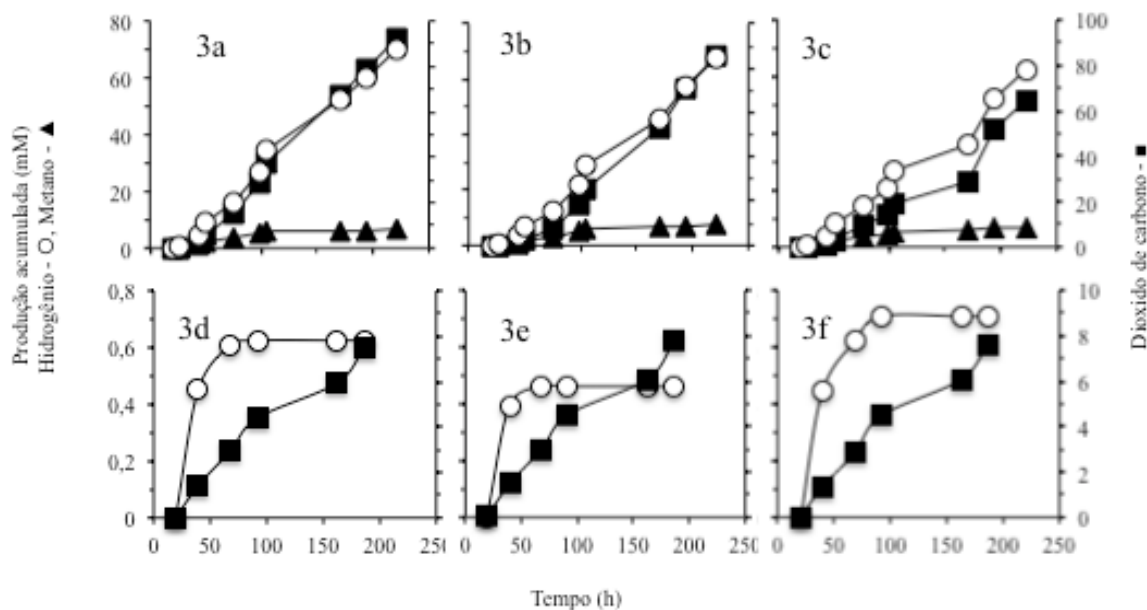
A Tabela 9 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 9 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear.**

<b>Condição</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>k_1^{app}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>C_I</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>3a - Mg 1 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,76	0,010 ± 0,004	5425 ± 1068
<b>3b - Mg 5 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,86	0,011 ± 0,003	4974 ± 715
<b>3c - Mg 10 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,86	0,010 ± 0,003	4697 ± 584
<b>3d - Mg 1 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,98	0,035 ± 0,0057	631 ± 39
<b>3e - Mg 5 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,98	0,035 ± 0,0062	621 ± 42
<b>3f - Mg 10 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,98	0,035 ± 0,0057	625 ± 39

Observa-se pela Tabela 9 que os piores ajustes se deram na condição 3a, podendo ter influência ao comparar com os outros resultados. Observa-se que para as condições 3d, 3e e 3f os ajustes obtiveram melhores resultados por haver menor quantidade de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

Foi avaliado o efeito da influência do magnésio na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 11 apresenta a variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico em todas as condições.



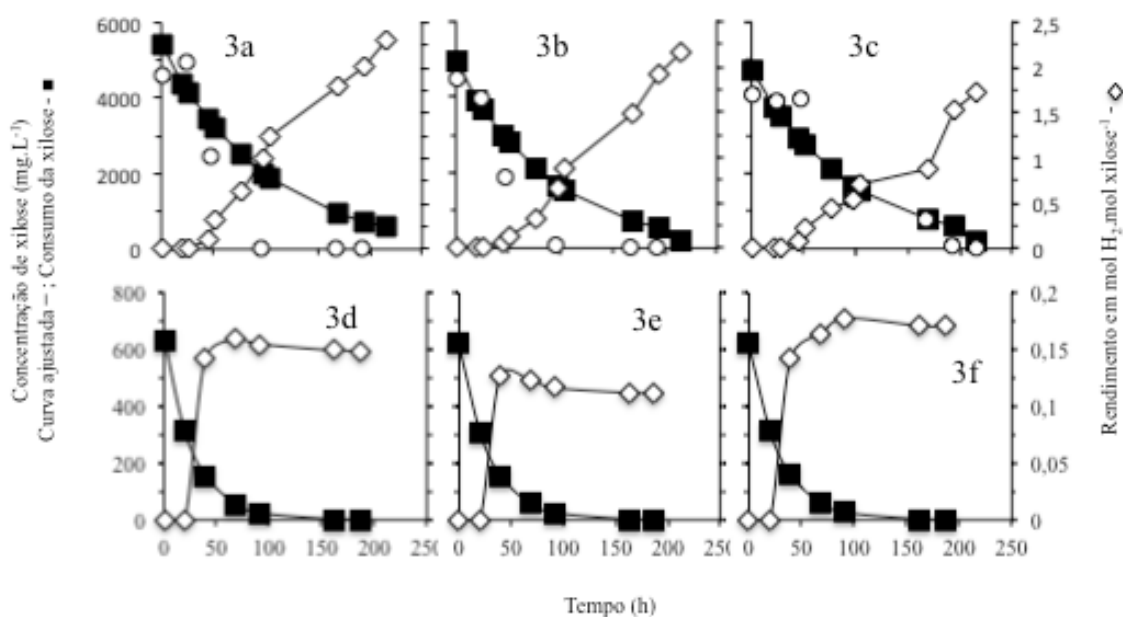
**Figura 11 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico – magnésio**

Pode-se observar pela Figura 11 que a produção de gás carbônico foi superior ao do hidrogênio nas 6 condições. Dentre as três condições nos experimentos com frascos de 2000 mL, a que apresentou maior produção de hidrogênio foi a 3a, produzindo aproximadamente 80 mmol, em comparação a 70 mmol na condição 3b e 50 mmol na condição 3c. Ao contrário do que aconteceu nos experimentos que avaliaram o sódio e o zinco, houve produção de metano, porém foi pouco expressiva ao longo do ensaio, não atingindo 10 mmol em nenhuma das condições. A fase log iniciou-se em torno de 35 horas e o pico da produção dos gases deu-se em torno de 220 horas.

Entre as três condições analisadas com frascos de 500 mL, a produção de hidrogênio foi superior na condição 3f, a qual a concentração de magnésio foi de 10 mg.L<sup>-1</sup>, produzindo aproximadamente 0,71 mmol, a segunda melhor produção ocorreu na condição 3d, com cerca de 0,62 mmol e a pior foi a condição 3e, produzindo cerca de 0,46 mmol. A produção de gás carbônico obtido foi similar nas três condições, atingindo aproximadamente 8 mmol. Não houve produção de metano em nenhuma das condições. A fase log teve início aproximadamente no mesmo tempo para as três condições, em torno de 20 horas, porém nesses experimentos a fase log foi mais curta, durando em torno de 30 horas. O tempo do experimento também foi próximo nas três condições, cerca de 200 horas cada uma.

Nota-se que a produção de gases entre as duas condições operatórias difere, tendo a produção nas condições onde foi utilizado frascos de 500 mL de aproximadamente 10% em relação às realizadas nos frascos de 2000 mL.

A Figura 12 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1, e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio (y) em relação à xilose, para todas as condições analisadas.



**Figura 12 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio – magnésio**

Observa-se pela Figura 12 que entre os experimentos realizados com frascos de 2000 mL, houve um maior rendimento na condição 3a, alcançando 2,27 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>, esse valor foi levemente superior ao da condição 3b, de 2,24 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>, a condição 3c mostrou-se relativamente inferior se comparada às outras duas, atingindo rendimento de apenas 1,83 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>. Nas três condições, pode-se observar que ocorreu maior rendimento da produção de hidrogênio por xilose a partir de 100 horas.

Para os experimentos realizados com frascos de 500 mL, observa-se pela Figura 12 que o rendimento na condição 3f foi ligeiramente superior, atingindo aproximadamente 0,17 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>, seguido das condições 9a e 9b, assim como podemos notar na Figura 25, onde houve maior produção de hidrogênio também nessa ordem. Pode-se notar que em todas as condições os rendimentos de hidrogênio iniciaram nas mesmas horas que na Figura 25, em torno de 20 horas de experimento.

Assim como na Figura 11, na qual a relação entre as condições operatórias mostrou que os experimentos realizados nos frascos de 500 mL obtiveram valores nos resultados de 1 para 10 em relação aos resultados com frascos de 2000 mL, para os rendimentos também pôde-se notar essa mesma tendência, obtendo valores nos resultados para os frascos de 500 mL de aproximadamente 10% dos obtidos nos frascos de 2000 mL.

A Tabela 10 contem as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição do experimento realizado com magnésio.

**Tabela 10 - Valores dos ácidos monitorados – magnésio**

Ácido	Condição 3a	Condição 3b	Condição 3c	Condição 3d	Condição 3e	Condição 3f
Metanol	68,6	55,6	47,6	0	0	0
Etanol	155,94	119,7	155,3	0	0	0
Acético	183,5	160,2	207,8	2,130	1,299	10,570
Propiônico	29,8	13,2	19,5	6,483	0	3,729
Butírico	497,9	438,0	470,6	0	0	0
Valérico	11,9	10,5	8,8	0	0	0

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no fim dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

De acordo com a estequiometria envolvendo o consumo de xilose e a produção de hidrogênio, nota-se que a máxima produção teórica de hidrogênio só é possível quando o produto formado é o ácido acético. Entretanto, outros ácidos foram produzidos, o que comprometeu a capacidade máxima teórica de produção de hidrogênio. Este fato está provavelmente ligado às populações heterogêneas de microrganismos que se desenvolveram nos reatores.

Entre as condições que foram realizadas nos frascos de 2000 mL, pode-se observar pela que houve maior produção de ácido butírico nas três condições se comparado aos outros ácidos, apesar do ácido acético apresentar a maior produção teórica de hidrogênio de 6 mols, a produção de ácido butírico gera um máximo teórico de 5 mols de hidrogênio, sendo o segundo ácido mais favorável para produção de hidrogênio. As maiores produção de ácido butírico e acético foram, nas condições 3a, 3b e 3c, de 498, 438 e 570  $\text{mg.L}^{-1}$  e 183, 183 e 208  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Esse resultado não condiz com os resultados obtidos pela Figura 12, do rendimento de xilose em cada condição, pois a condição 3c apresentou melhores resultados quanto as produções de ácido butírico e acético, porém apresentou o pior rendimento de xilose.

Possivelmente essa diferença deve-se a produção de outros metabolitos que consomem o hidrogênio.

Observa-se pela Tabela 10 que a houve produção de ácido propiônico e de metanol, porém se compará-los com os valores dos ácidos produtores de hidrogênio nota-se que eles tiveram produções bem inferiores, sendo um fator positivo, uma vez que há o consumo de hidrogênio na produção de ácido propiônico e metanol.

A produção dos outros ácidos foi bem inferior se comparado ao ácido butírico e mesmo ao ácido acético, reafirmando que o metabolismo dos microrganismos estava direcionado para a geração de hidrogênio.

Para as condições que foram realizadas com frascos Duran de 500 mL, como o esperado, pode-se notar pela Tabela 8 que a condição 3f teve uma produção superior de ácido acético em relação às outras condições, essa mesma condição teve maior rendimento na conversão de xilose em hidrogênio, segundo a Figura 12.

#### 5.2.4 Influência do níquel

Assim como nos experimentos com magnésio, optou-se por aumentar a carga de biomassa para  $2500 \text{ mg.L}^{-1}$ , diminuindo o tempo de ensaio para aproximadamente 230 horas nas condições 4a, 4b e 4c. As condições 4d, 4e e 4f foram realizadas em frascos de 500 mL e com relação S/M de  $1 \text{ mg O}_2.\text{mg SVT}^{-1}$ , não houve produção de gases de nenhuma das condições realizadas nos frascos de 500 mL.

##### Parâmetro cinético aparente

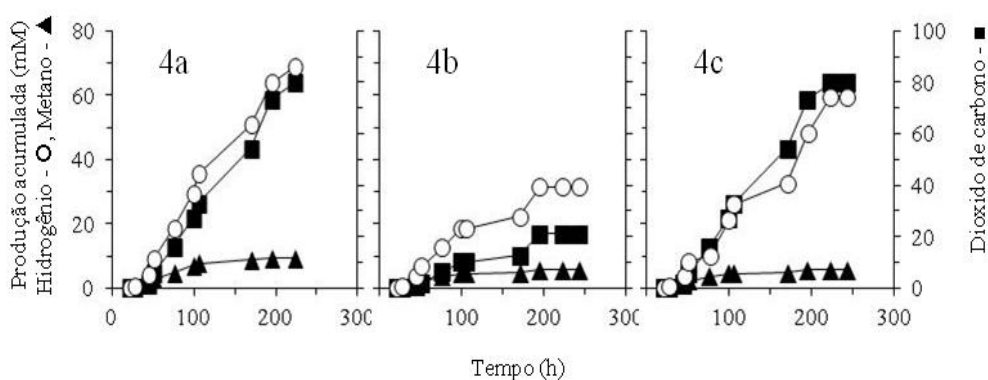
A Tabela 11 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 11 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear.**

Condição	$R^2$	$k_1^{app} (\text{h}^{-1})$	$C_I (\text{mg.L}^{-1})$
4a - Ni $250 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,73	$0,009 \pm 0,003$	$4407 \pm 892$
4b - Ni $750 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,96	$0,012 \pm 0,002$	$6537 \pm 599$
4c - Ni $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,86	$0,010 \pm 0,002$	$6095 \pm 739$
4d - Ni $250 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,99	$0,028 \pm 0,0052$	$614 \pm 14$
4e - Ni $750 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,99	$0,024 \pm 0,0065$	$602 \pm 29$
4f - Ni $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,99	$0,024 \pm 0,0063$	$604 \pm 29$

Observa-se pela Tabela 11 que os valores de  $C_1$  para as condições 4b e 4c foram consideravelmente maiores do que na condição 4a, podendo ter influência nos resultados. As condições 4d, 4e e 4f apresentaram bons ajustes, provavelmente devido aos poucos resultados de xilose medidos.

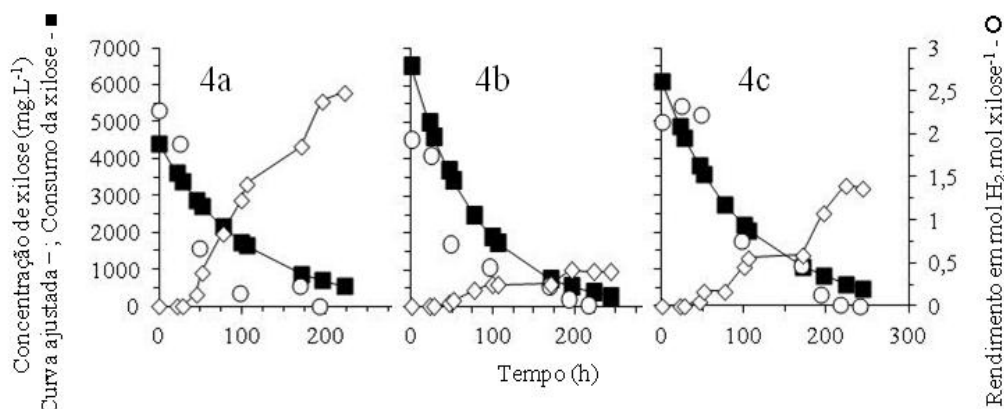
Foi avaliado o efeito da influência do níquel na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 13 mostra a variação temporal da produção dos gases hidrogênio, metano e carbônico, nas concentrações de níquel de 250, 750 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Figura 13 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico - níquel**

Pode-se observar pela Figura 13 que a produção de hidrogênio foi bem superior na condição 4a, apresentando aproximadamente 64 mmol, a segunda melhor produção ocorreu na condição 4c, com cerca de 52 mmol e a pior foi a condição 4b, produzindo apenas 17 mmol. A produção de gás carbônico seguiu o comportamento do hidrogênio, sendo superior na condição 4a, seguidas das condições 4c e 4b. Houve produção de metano, porém pouco expressiva, não ultrapassando 10 mmol em nenhuma das condições. A fase log variou entre as condições, iniciando em torno de 60 horas na condição 4a e na 4b, e em 82 horas na condição 4c. O tempo do experimento nas condições 4b e 4c foram superiores, chegando a aproximadamente 250 horas.

A Figura 14 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1 e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio em relação à xilose ( $y$ ), para as três condições analisadas.



**Figura 14 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio - níquel**

Pela Figura 14, observa-se que o rendimento na condição 4a foi bem superior ao das outras, atingindo aproximadamente  $2,5 \text{ mol H}_2.\text{mol xilose}^{-1}$ , seguida pela condição 4c e 4b, com rendimentos de  $1,4$  e  $0,4 \text{ mol H}_2.\text{mol xilose}^{-1}$ , respectivamente. Pode-se notar que em todas as condições, o rendimento de hidrogênio por xilose iniciou-se em torno de 50 horas de experimento, estabilizando-se em aproximadamente 200 horas.

Na Tabela 12 contém as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição do experimento realizado com níquel.

**Tabela 12 - Valores dos ácidos monitorados – níquel**

Ácido	Condição 4a	Condição 4b	Condição 4c	Condição 4d	Condição 4e	Condição 4f
Metanol	80,2	72,2	69,0	0	3,428	20,591
Etanol	182,2	155,9	170,5	0	0	0
Acético	209,9	188,7	205,8	79,318	86,225	39,353
Propiônico	19,1	20,2	22,9	0,633	0	5,671
Butírico	467,8	516,1	540,8	4,868	4,118	0
Valérico	10,2	10,5	37,5	0	0	50,902

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no fim dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

As produções de ácido butírico e acético nas condições 4a, 4b e 4c foram  $467, 656$  e  $553 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $210, 199$  e  $237 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Esses resultados não condizem com os resultados da Figura 14, pois a condição 4a obteve melhor rendimento na conversão de xilose em hidrogênio, porém esta condição não foi a que aprestou maior produção de ácido butírico nem de ácido acético. Possivelmente nas condições 4b e 4c consumiram-se  $\text{H}_2$  na produção de metabólitos, fazendo com que a conversão de xilose em hidrogênio fosse prejudicada.

A produção de ácido propiônico para essas condições foi bem inferior do que os ácidos produtores de hidrogênio, sendo um fator positivo, uma vez que há o consumo de hidrogênio na produção de ácido propiônico. Foi produzido uma concentração relevante de metanol, sendo este consumidor de hidrogênio, podendo ter influenciado na diferença entre as produções de ácidos produtores de hidrogênio e os gráficos de conversão de xilose em hidrogênio.

A produção dos outros ácidos foi bem inferior se comparado ao ácido butírico e mesmo ao ácido acético, reafirmando que o metabolismo dos microrganismos estava direcionado para a geração de hidrogênio.

As três condições dos experimentos realizados com frascos de 500 mL não apresentaram produção de gás hidrogênio e o resultado mostra que havia uma grande concentração de ácido acético nas três condições, sendo que deve ter ocorrido consumo de gás hidrogênio na homoacetogênese para a produção de acetato nas três condições, além de nas condições 4e e 4f também ter metanol presente, outro consumidor de hidrogênio.

### 5.2.5 Influência do potássio

Para os experimentos para avaliar o potássio utilizou-se a carga de biomassa de 1000 mg.L<sup>-1</sup> e do substrato também de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos em frascos Duran de 500 mL de volume total, sendo 250 mL de volume útil, devido à disponibilidade de materiais.

#### Parâmetro cinético aparente

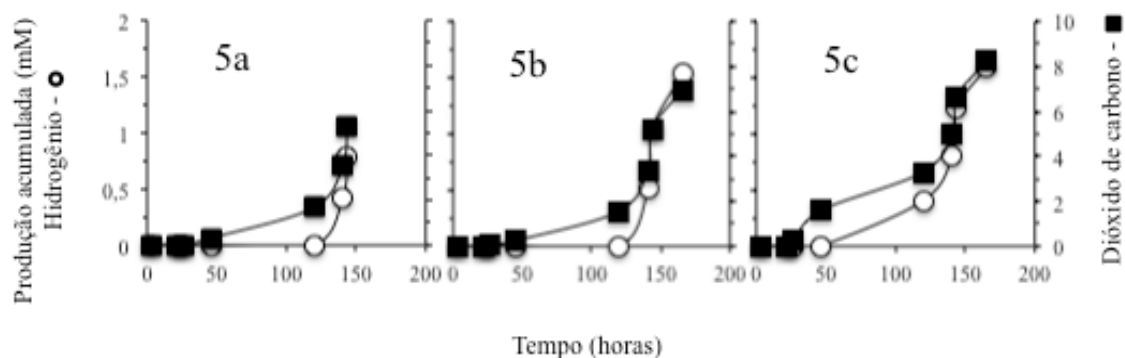
A Tabela 13 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 13 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear.**

<b>Condição</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>k_1^{app}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>C_I</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>K 1 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,055 ± 0,006	632 ± 23
<b>K 5 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,054 ± 0,009	618 ± 36
<b>K 10 mg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,053 ± 0,007	604 ± 27

Observa-se pela Tabela 13 que os ajustes foram bons, isso deve-se à menor quantidade de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

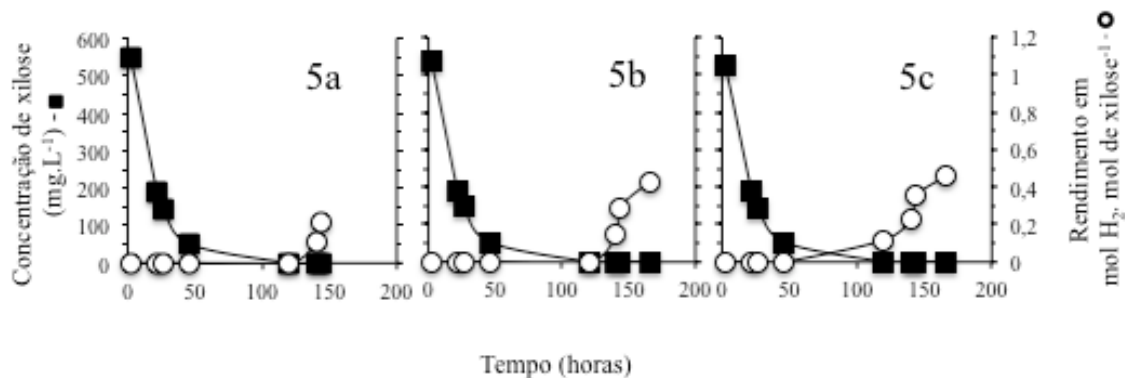
Foi avaliado o efeito da influência do potássio na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 15 apresenta a variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico nas concentrações de potássio de 1, 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 15 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico - potássio**

Dentre as condições dos experimentos com potássio, a produção de hidrogênio foi superior na condição 5c, apresentando aproximadamente 1,59 mmol, a segunda melhor produção ocorreu na condição 5b, com cerca de 1,53 mmol e a pior foi a condição 5a, produzindo apenas 0,79 mmol. A produção de gás carbônico seguiu o comportamento do hidrogênio, sendo superior na condição 5c, seguidas das condições 5b e 5a. Não houve produção de metano em nenhuma das condições. A fase log variou entre as condições, iniciando em torno de 50 horas na condição 5c e em 120 horas nas condições 5b e 5c. O tempo do experimento nas condições 5b e 5c foram superiores, chegando a aproximadamente 170 horas.

A Figura 16 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1 e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio em relação à xilose (y), para as três condições analisadas.



**Figura 16 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio - potássio**

Pela Figura 16, observa-se que o rendimento na condição 5c e 5b foram superiores, atingindo aproximadamente 0,46 e 0,43 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>, respectivamente, já a condição 5a apresentou rendimento de aproximadamente 0,22 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>. Pode-se notar que na condição 5c, o rendimento de hidrogênio por xilose iniciou-se em torno de 50 horas de experimento, estabilizando-se em aproximadamente 150 horas, nas condições 5a e 5b os rendimentos iniciaram em torno de 120 horas, coincidindo com a Figura 17, onde a produção dos gases iniciaram também nesse tempo de experimento.

Na Tabela 14 encontra-se as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição.

**Tabela 14 - Valores dos ácidos e álcoois monitorados – potássio**

Ácido	Condição 5a	Condição 5b	Condição 5c
Metanol	0	0	0
Etanol	0	0	0
Acético	15,761	36,888	23,968
Propiônico	1,990	4,612	0
Butírico	21,459	43,559	28,248
Valérico	0	4,452	4,578

Os valores representam as concentrações em mg.L<sup>-1</sup> no final dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

Observa-se pela Tabela 14 que as condições 5b e 5c tiveram maiores produções de ácido acético, butírico e valérico, condizendo com a Figura 16, onde é possível notar o maior rendimento de produção de hidrogênio nas condições 5b e 5c. Apesar da condição 5b ter tido maior produção de ácido acético e butírico, ela também produziu ácido propiônico, ácido que consome hidrogênio na sua produção, apresentando um rendimento ligeiramente inferior do que a condição 5c, como podemos observar na Figura 18. A maior concentração de ácidos que produzem hidrogênio constata que o

metabolismo dos microrganismos estavam direcionados para a produção de gás hidrogênio.

### 5.2.6 Influência do cobalto

Para os experimentos para avaliar o cobalto, optou-se pela relação S/M de 1, sendo 1000 mg.L<sup>-1</sup> de biomassa e 1000 mg.L<sup>-1</sup> de microrganismos.

#### Parâmetro cinético aparente

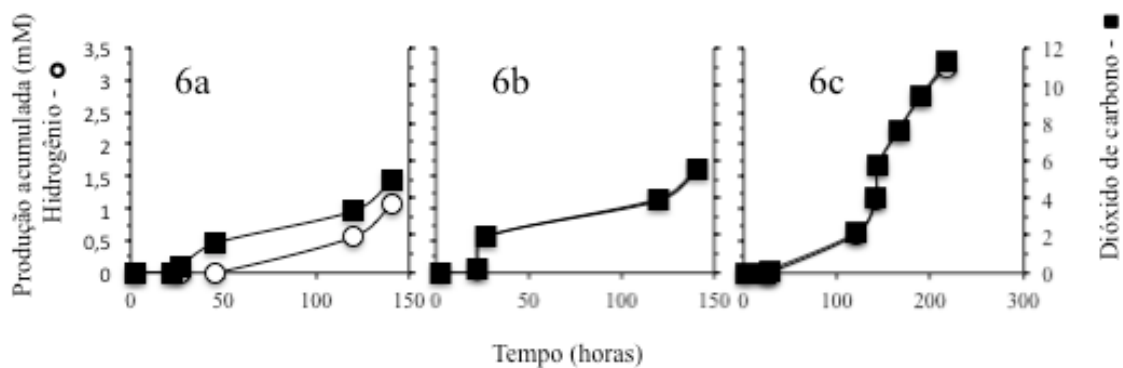
A Tabela 15 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 15 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear**

<b>Condição</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>k_1^{app}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>C_I</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Co 250 µg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,054 ± 0,006	615 ± 25
<b>Co 750 µg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,054 ± 0,007	619 ± 31
<b>Co 1000 µg.L<sup>-1</sup></b>	0,99	0,050 ± 0,005	559 ± 19

Observa-se pela Tabela 15 que os ajustes foram bons também, devido ao menor número de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

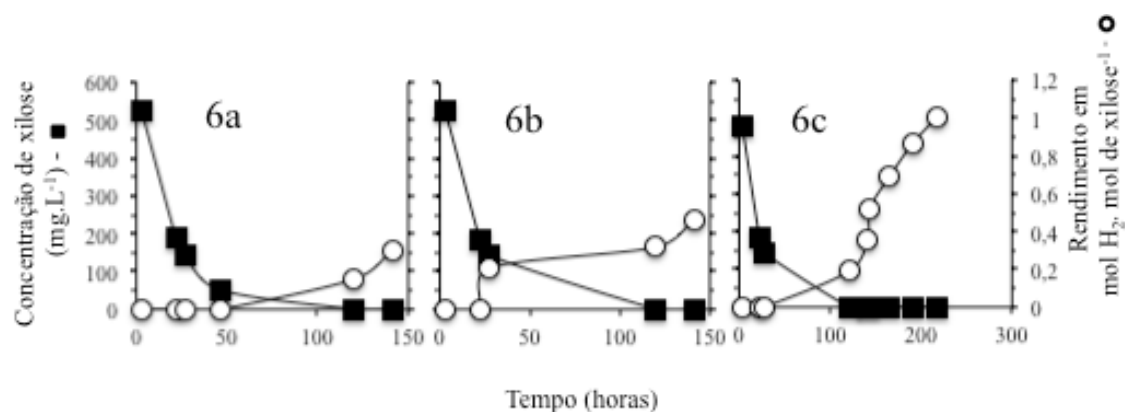
Foi avaliado o efeito da influência do cobalto na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 17 mostra a variação temporal da produção dos gases hidrogênio, metano e carbônico, nas concentrações de cobalto de 250, 750 e 1000 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 17 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico - cobalto**

Pode-se observar pela Figura 17 que a produção dos gases manteve o comportamento dos experimentos anteriores por estar nas mesmas condições. Dentre as condições dos experimentos com cobalto, a produção de hidrogênio foi bem superior na condição 6c, produzindo aproximadamente 3,2 mmol, a segunda melhor produção ocorreu na condição 6b, com cerca de 1,66 mmol e a pior foi a condição 6a, produzindo apenas 1,08 mmol. A produção de gás carbônico seguiu o comportamento do hidrogênio, sendo superior na condição 6c, produzindo 11,25 mmol de dióxido de carbono, porém apresentou valores próximos nas condições 6a e 6b, de aproximadamente 5,5 mmol. Não houve produção de metano em nenhuma das condições. A fase log variou entre as condições, iniciando em torno de 25 horas nas condições 6b e 6c e em 50 horas na condição 6a. O tempo do experimento na condição 6c foi superior, chegando a aproximadamente 300 horas, já nas condições 6a e 6b o experimento durou cerca de 150 horas.

A Figura 18 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1 e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio em relação à xilose (y), para as três condições analisadas.



**Figura 18 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio - cobalto**

Pela Figura 18, observa-se que o rendimento na condição 6c foi bem superior, atingindo aproximadamente  $1,0 \text{ mol H}_2.\text{mol xilose}^{-1}$ , seguido da condição 6b, atingindo cerca de  $0,47$  e da condição 6a com quase  $0,31 \text{ mol H}_2.\text{mol xilose}^{-1}$ . Pode-se notar que em todas as condições os rendimentos de hidrogênio iniciaram nas mesmas horas que na Figura 19.

Na Tabela 16 encontra-se as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição do experimento realizado com cobalto.

**Tabela 16 - Valores dos ácidos e álcoois monitorados - cobalto**

Ácido	Condição 6a	Condição 6b	Condição 6c
Metanol	0	0	0
Etanol	0	0	0
Acético	38,394	30,107	37,516
Propiônico	0	0,690	0,973
Butírico	46,295	42,412	40,643
Valérico	4,230	0	0

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no final dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

Pela Tabela 16 é possível constatar que houve maior produção de ácidos produtores de hidrogênio na condição 6a, e nessa condição a produção de ácido propiônico foi zero, sendo também um fator positivo, porém, pela Figura 20, essa condição foi a que obteve menor rendimento de produção de hidrogênio. Essa diferença entre os resultados pode ser explicado pela possível influência negativa de metabólitos na produção de gás hidrogênio, pois a condição 6c supostamente apresentaria concentrações mais altas de ácidos que produzem hidrogênio.

### Influência do cálcio

Os experimentos para avaliar a influência do cálcio seguiram as mesmas condições dos ensaios com potássio e cobalto, ou seja, com frascos Duran de 500 mL de volume total.

#### Parâmetro cinético aparente

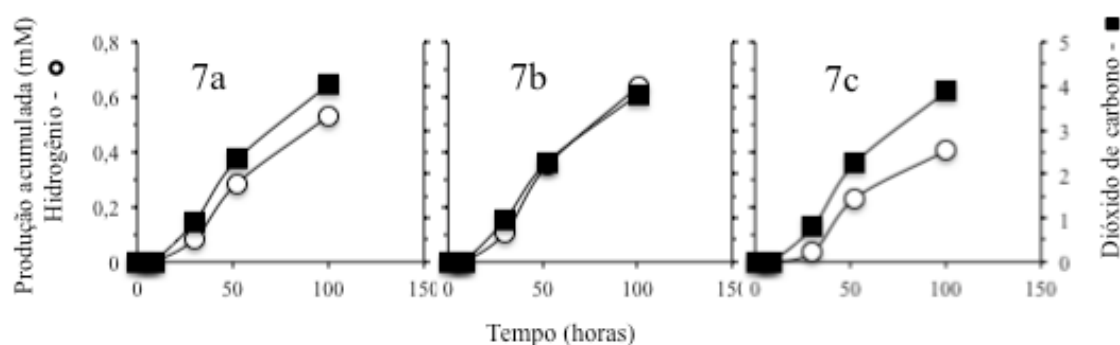
A Tabela 17 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 17 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear.**

Condição	$R^2$	$k_1^{app} (h^{-1})$	$C_I (mg.L^{-1})$
Ca 1 mg.L <sup>-1</sup>	0,99	$0,14 \pm 1,85.10^{-6}$	$683 \pm 0,001$
Ca 5 mg.L <sup>-1</sup>	0,99	$0,14 \pm 1,85.10^{-6}$	$683 \pm 0,001$
Ca 10 mg.L <sup>-1</sup>	0,99	$0,13 \pm 2,57.10^{-6}$	$592 \pm 0,002$

Observa-se pela Tabela 17 que os ajustes continuaram bons, por haver menor quantidade de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

Foi avaliado o efeito da influência do cálcio na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 19 apresenta a variação temporal de hidrogênio, metano e gás carbônico nas concentrações de cálcio de 1, 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

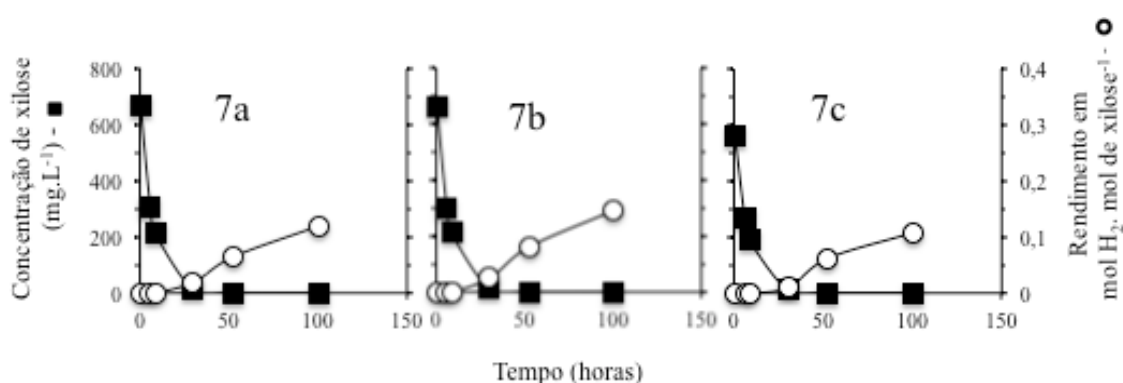


**Figura 19 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico – cálcio**

Dentre as condições dos experimentos com cálcio, a produção de hidrogênio foi superior na condição 7b, produzindo aproximadamente 0,64 mmol, a segunda melhor

produção ocorreu na condição 7a, com cerca de 0,53 mmol e a pior foi a condição 7c, produzindo apenas 0,41 mmol. A produção de gás carbônico não seguiu o comportamento do hidrogênio, as três condições apresentaram comportamento similares, produzindo cerca de 4 mmol cada. Não houve produção de metano em nenhuma das condições. A fase log teve início aproximadamente no mesmo tempo para as três condições, em torno de 12 horas. O tempo do experimento também foi próximo nas três condições, cerca de 100 horas cada uma.

A Figura 20 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1 e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio em relação à xilose ( $y$ ), para as três condições analisadas.



**Figura 20 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio – cálcio**

Observa-se pela Figura 20 que o rendimento na condição 7b foi ligeiramente superior, atingindo aproximadamente  $0,15 \text{ mol H}_2.\text{mol xilose}^{-1}$ , seguido das condições 7a e 7c, respectivamente. Pode-se notar que em todas as condições os rendimentos de hidrogênio iniciaram nas mesmas horas que na Figura 21.

Na Tabela 18 encontra-se as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição.

**Tabela 18 - Valores dos ácidos e álcoois monitorados – cálcio**

Ácido	Condição 7a	Condição 7b	Condição 7c
Metanol	0	0	0
Etanol	0	0	0
Acético	13,897	12,556	1,207
Propiônico	2,615	0,815	42,956
Butírico	1,017	0	0
Valérico	4,303	0	3,903

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no final dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

Nota-se pela Tabela 18 que houve uma grande produção de ácido propiônico na condição 7c e uma baixa produção de ácido acético, explicando seu menor rendimento em produção de hidrogênio. As condições 7a e 7b apresentaram comportamentos similares em relação aos rendimentos, sendo que a condição 7b foi ligeiramente superior, possivelmente devido à maior produção de ácido propiônico na condição 7a.

### 5.2.7 Influência do cobre

Os experimentos para avaliar a influência do cobre seguiram as mesmas condições dos ensaios com potássio e cobalto, ou seja, com frascos Duran de 500 mL de volume total.

#### Parâmetro cinético aparente

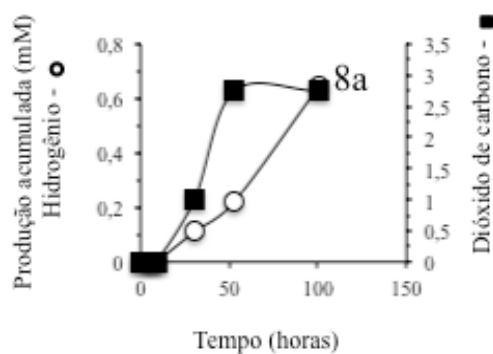
A Tabela 19 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 19 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear.**

Condição	$R^2$	$k_1^{app} (h^{-1})$	$C_I (mg.L^{-1})$
<b>Cu 250 <math>\mu g.L^{-1}</math></b>	0,99	$0,13 \pm 1,89.10^{-6}$	$677 \pm 0,001$
<b>Cu 750 <math>\mu g.L^{-1}</math></b>	0,99	$0,13 \pm 3,64.10^{-6}$	$510 \pm 0,002$
<b>Cu 1000 <math>\mu g.L^{-1}</math></b>	0,99	$0,14 \pm 1,91.10^{-6}$	$674 \pm 0,001$

Observa-se pela Tabela 19 que os ajustes continuaram bons, por haver menor quantidade de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

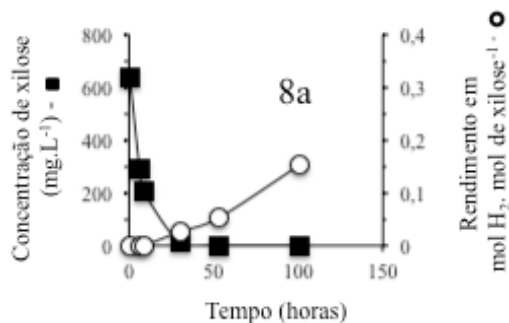
Foi avaliado o efeito da influência do cobre na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 21 mostra a variação temporal da produção dos gases hidrogênio, metano e carbônico apenas na concentração de cobre de 250  $\mu g.L^{-1}$  (8a), pois as condições com 750 e 1000  $\mu g.L^{-1}$  (8b e 8c) não apresentaram produção de hidrogênio, porém apresentaram produção de ácido que será mostrado mais adiante.



**Figura 21 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico – cobre.**

Na condição onde foi avaliado a influência de cobre na concentração de 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , a produção de hidrogênio atingiu aproximadamente 0,65 mmol, enquanto a de dióxido de carbono cerca de 2,75 mmol. O experimento durou cerca de 100 horas e teve o início da fase log em torno de 12 horas.

A Figura 22 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1 e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio em relação à xilose (y), para a condição analisada.



**Figura 22 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio – cobre**

A condição apresentou rendimento de aproximadamente 0,15 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup> e o comportamento é semelhante ao da Figura 21, apresentando um crescimento do rendimento em torno de 12 horas.

Na Tabela 20 encontra-se as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição.

**Tabela 20 - Valores dos ácidos e álcoois monitorados - cobre**

Ácido	Condição 8a	Condição 8b	Condição 8c
Metanol	4,376	0	0
Etanol	0	0	0
Acético	0,432	24,031	12,734
Propiônico	47,038	1,846	0
Butírico	0	0	3,248
Valérico	4,712	4,099	3,958

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no final dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

Apesar da alta concentração de ácido propiônico e de metanol na condição 8a, essa foi a única que produziu gás hidrogênio. Torna-se difícil a interpretação desses resultados, possivelmente isto pode ser explicado pela produção de ácido acético nas condições 8b e 8c, pois esse ácido tanto produz quanto consome hidrogênio, sendo que provavelmente o metabolismo dos microrganismos favoreceu a homoacetogênese no sentido do consumo de hidrogênio, ou seja, o consumo do gás hidrogênio para a produção de ácido acético no meio líquido, através da reação exposta abaixo:



### 5.2.8 Influência do manganês

Os experimentos para avaliar a influência do manganês mantiveram as mesmas condições dos experimentos anteriores, ou seja, a relação S/M igual a 1 e frascos Duran de 500 mL de volume.

#### Parâmetro cinético aparente

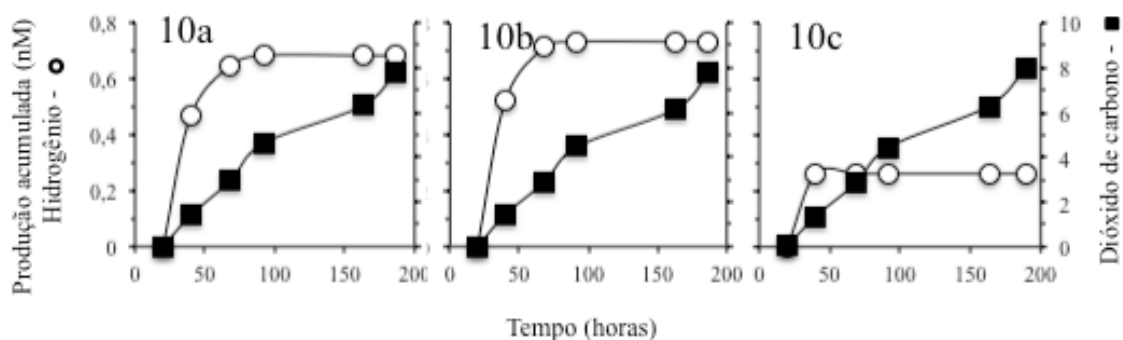
A Tabela 21 mostra os valores dos parâmetros da equação das curvas não lineares pela Equação 1. Foi necessário forçar o valor de  $C_R$  para zero, para que o modelo convergisse para um valor fisicamente coerente.

**Tabela 21 - Valor dos parâmetros ajustados pela curva não linear.**

Condição	$R^2$	$k_1^{app} (\text{h}^{-1})$	$C_I (\text{mg.L}^{-1})$
<b>Mn 250 <math>\mu\text{g.L}^{-1}</math></b>	0,98	$0,034 \pm 0,0053$	$625 \pm 37$
<b>Mn 750 <math>\mu\text{g.L}^{-1}</math></b>	0,98	$0,035 \pm 0,0066$	$627 \pm 46$
<b>Mn 1000 <math>\mu\text{g.L}^{-1}</math></b>	0,98	$0,036 \pm 0,0061$	$634 \pm 42$

Observa-se pela Tabela 21 que os ajustes continuaram bons, por haver menor quantidade de valores medidos de xilose, fazendo com que a curva se ajusta-se melhor aos pontos obtidos.

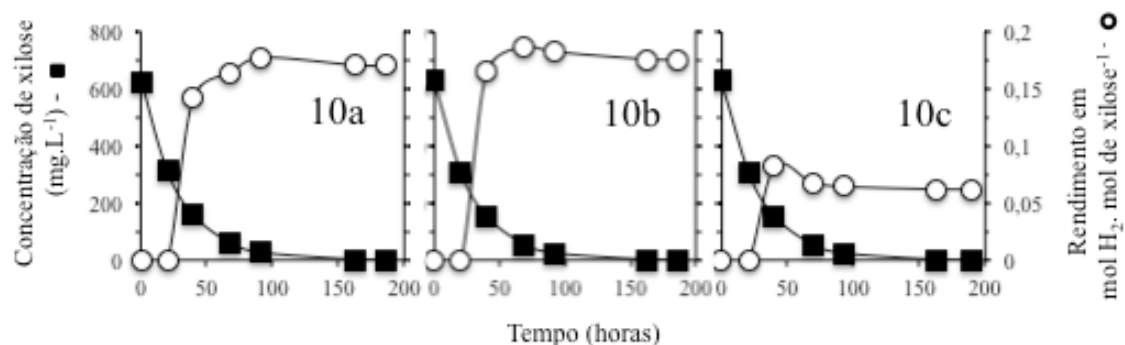
Foi avaliado o efeito da influência do manganês na produção do biogás ao longo do ensaio, assim como o consumo da xilose. A Figura 23 mostra a variação temporal da produção dos gases hidrogênio, metano e carbônico, nas concentrações de manganês de 250, 750 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Figura 23 - Variação temporal da produção de gás hidrogênio, metano e gás carbônico – manganês**

Pode-se observar pela Figura 23 que a condição 10b obteve uma produção de hidrogênio um pouco superior do que a condição 10a, produzindo 0,73 e 0,68 mmol, respectivamente. A condição 10c produziu apenas 0,26 mmol. As três condições tiveram produção de gás carbônico bem similar, produzindo aproximadamente 8 mmol cada uma. Todas as condições tiveram comportamento semelhante quanto à fase log e à duração do experimento, iniciando em 20 horas de experimento e finalizando em torno de 200 horas.

A Figura 24 apresenta a variação temporal do consumo da xilose, ajustada pela Equação 1 e a taxa de rendimento de produção do hidrogênio em relação à xilose ( $y$ ), para as três condições analisadas.



**Figura 24 - Relação do consumo de xilose com o rendimento da produção de hidrogênio – manganês**

Analisando a Figura 24, é possível observar que a condição 10b obteve maior rendimento de produção de gás hidrogênio, atingindo  $0,18 \text{ mol H}_2. \text{ mol xilose}^{-1}$ , seguido da condição 10a, com aproximadamente  $0,16 \text{ mol H}_2. \text{ mol xilose}^{-1}$ , a condição 10c obteve rendimento de apenas  $0,06 \text{ mol H}_2. \text{ mol xilose}^{-1}$ , seguindo o mesmo comportamento apresentado na Figura 23.

Na Tabela 22 encontra-se as produções de ácidos e álcoois obtidas em cada condição.

**Tabela 22 - Valores dos ácidos e álcoois monitorados – manganês**

Ácido	Condição 10a	Condição 10b	Condição 10c
Metanol	0	0	0
Etanol	0	0	0
Acético	3,349	5,660	62,006
Propiônico	2,126	0	0
Butírico	0	0	39,571
Valérico	0	0	0

Os valores representam as concentrações em  $\text{mg.L}^{-1}$  no final dos experimentos. Os valores de 0 representam abaixo do nível de detecção.

Ao analisar a Figura 24 com a Tabela 22 nota-se que possivelmente o equilíbrio da reação de homoacetogênese na condição 10c favoreceu o consumo de hidrogênio para a produção de acetato, pois mesmo havendo uma alta concentração dos ácidos acético e butírico em relação às outras condições, a condição apresentou pior rendimento de hidrogênio em relação à xilose. Portanto, pode-se dizer que grande parte do hidrogênio produzido foi consumido para a produção de acetato, segundo a reação 1, exposta acima.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a realização dos experimentos permitem concluir que os metais influenciam na produção do hidrogênio em reatores em batelada, pois cada condição teve comportamento diferente da outra.

O pré-tratamento realizado com o inoculo mostrou-se eficiente na remoção das arqueias metanogênicas, uma vez que não houve produção de metano nas condições com sódio e zinco e baixa produção nas condições com magnésio e níquel.

A produção de hidrogênio apresentou comportamento satisfatório em todas as condições para os experimentos realizados com frascos Duran de 2 litros de volume total e relação S/M de 0,5, alcançando rendimentos para as melhores condições com sódio, zinco, magnésio e níquel de 4,16, 3,78, 2,27 e 2,5 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>, de um máximo teórico de 6 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>.

Para as condições onde os frascos utilizados foram de 500 ml de capacidade e a relação S/M foi de 1, os melhores resultados foram com cobalto nas concentrações de 1000 e 750 µg.L<sup>-1</sup> e de potássio nas concentrações de 10 e 5 mg.L<sup>-1</sup>, produzindo 1,0, 0,47 e 0,46 e 0,43 mol H<sub>2</sub>.mol xilose<sup>-1</sup>.

A produção de ácidos foi satisfatória para os experimentos nos frascos de 2000 mL, pois apesar de não haver predominância de ácido acético em nenhuma das condições analisadas, o ácido butírico mostrou-se em maior quantidade, sendo o segundo melhor ácido para a produção de hidrogênio. A produção de ácido propiônico foi irrelevante em todas as condições, sendo este um fator positivo, pois há consumo de hidrogênio na produção deste ácido.

Para os experimentos realizados em frascos de 500 mL, os resultados dos ácidos foram satisfatórios, com predominância na maioria das vezes do ácido acético, o que fez com que algumas vezes não houvesse produção de gás hidrogênio devido à homoacetogênese ocorrida no meio, favorecendo o consumo de hidrogênio para a produção de acetato. Tanto nos experimentos analisando o níquel, sódio e cobre houve condição onde foi encontrado no meio líquido metanol, grande consumidor de hidrogênio também, inibindo sua produção para a fase gasosa.

Pode-se notar uma diferença marcante entre os resultados com condições operatórias diferentes, tanto em relação às concentrações de substrato e biomassa, que para os frascos de 2 litros foram de 5000 mg.L<sup>-1</sup> de biomassa e de 500 e 2500 mg.L<sup>-1</sup> de substrato e para os frascos de 500 mL foram de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de biomassa e 1000 mg.L<sup>-1</sup>

de substrato quanto à respeito do volume útil, diminuindo de 1000 mL para 250 mL. Os melhores rendimentos de conversão de xilose à hidrogênio para os frascos de 2 L e de 500 mL foram de 4,16 e 1,0 mol H<sub>2</sub>. mol xilose<sup>-1</sup>, respectivamente. Em todas as condições com os frascos maiores houve produção de hidrogênio, fato que não foi comprovado com os frascos de 500 mL, portanto provavelmente pode-se dizer que a tanto a relação quanto concentração total de substrato e microrganismo no meio influem nas produções de gases.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bisaillon A., Turcot J., Hallenbeck PC. (2006). The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. In *J Hydrogen energy*, n. 31, p. 1504-8
- 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.
- 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. and T. N. Veziroglu (2001). "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature." *International Journal of Hydrogen Energy* **26**(1): 13-28.
- Del Nery, V. (1987). Utilização de lodo anaeróbico imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Dubois, M., K. A. Gilles, et al. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry* **28**(3): 350-356.
- Fabiano B., Perego P. (2002). Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy*, n. 27, p. 149-56.
- Fang, H.; Liu, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Biores. Technol.*, v. 82, p. 87-93, 2002.
- Fang, H P H, Liu H (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82:87-93.
- 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. and D. Ghosh (2009). "Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?" *Trends in Biotechnology* **27**(5): 287-297.

- Hawkes, F. R., I. Hussey, et al. (2007). "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress." International Journal of Hydrogen Energy **32**(2): 172-184.
- Ishikawa M, Yamamura S, Takamura Y, Sode K, Tamiya E, Tomiyama M. (2006). Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable biofuel cell system. *Int J Hydrogen Energy*, n. 31, p. 1484-9.
- 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.
- Kanai T, Imanaka H, Nakajima A, Uwamori K, Omori Y, Fukui T. (2005). Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biotechnol*, n. 116, p. 271-82.
- Kawagoshi, Y., N. Hino, et al. (2005). "Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production." Journal of Bioscience and Bioengineering **100**(5): 524-530.
- Kumar N., Das D.(2001). Continuous hydrogen production by immobilizes *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic material as solid matrices. *Enzyme Microb Technol*, n. 29, p. 180-7.
- Kumar N., Das D. (2000). Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem*, n. 35, p. 589-93.
- Levin, D. B., L. Pitt, et al. (2004). "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application." International Journal of Hydrogen Energy **29**(2): 173-185.
- Levin DB., Islam R., Cicek N., Sparling R. (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrate. *Process Biochem*, n. 31, p. 1496-503.
- Lo YC., Chen WM., Hung CH., Chen SD., Chang JS. (2008). Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res*, n. 42, p. 827-42.
- Mosey, F. E. (1983). "MATHEMATICAL-MODELING OF THE ANAEROBIC-DIGESTION PROCESS - REGULATORY MECHANISMS FOR THE FORMATION OF SHORT-CHAIN VOLATILE ACIDS FROM GLUCOSE." Water Science and Technology **15**(8-9): 209-232.

- 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.
- Nath, K. and D. Das (2004). "Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches." *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**(5): 520-529.
- 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.
- 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.
- Pan CM, Fan YT, Xing Y, Hou HW, Zhang ML. (2008). Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fan2. *Bioresour Technol*, n. 99, p. 3146-54.
- 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.
- Rojas, M. P. A. (2010). Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo e fluxo ascendente. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. Dissertação (Mestrado).
- Speece, R. E. (1996). "Oxygen supplementation by U-Tube to the Tombigbee River." *Water Science and Technology* **34**(12): 83-90.
- Speece, R. E. and P. L. McCarty (1962). "NUTRIENT REQUIREMENTS AND BIOLOGICAL SOLIDS ACCUMULATION IN ANAEROBIC DIGESTION." *Journal Water Pollution Control Federation* **34**(3): 229-230.
- 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 blocks. *Int J Hydrogen energy*, n. 20, p. 541-5.

- Tavares, A. (2008). Modelagem matemática da degradação da glicose, com produção de hidrogênio em um reator de leito fixo. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. Dissertação (Mestrado).
- Turcot J., Bisailon 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, et al. (2001). "Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration." *Environmental Science & Technology* **35**(24): 4726-4730.
- 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 Hydrogen Energy*, n. 32, p. 748-54.
- Wang, J L & W. Wan (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799-811.
- 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.
- Zandvoort, M. H., E. D. van Hullebusch, et al. (2006). "Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies." *Engineering in Life Sciences* **6**(3): 293-301.
- 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.