

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

GABRIEL SIGOLO RUAS GONÇALVES

**Influência da relação carbono/fósforo (C/P) na produção
de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**

São Carlos/SP
2014

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

INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO CARBONO/FÓSFORO
(C/P) NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR
ANAERÓBIO DE LEITO FIXO

Aluno: Gabriel Sigolo Ruas Gonçalves
Orientadora: Dra. Mélida Del Pilar Anzola Rojas

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

São Carlos/SP
2014

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

Ficha catalográfica pelo Serviço de Biblioteca – EESC/USP

G635i Gonçalves, Gabriel Sigolo Ruas
Influência da relação carbono/fósforo (c/p) na
produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito
fixo / Gabriel Sigolo Ruas Gonçalves ; orientadora Mélida
Del Pilar Anzola Rojas. -- São Carlos, 2014.

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

1. Produção de hidrogênio. 2. Águas residuárias.
3. Processo anaeróbio. 4. Biorreatore. 5. Bioenergia.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Gabriel Sigolo Ruas Gonçalves

Data da Defesa: 17/11/2014

Comissão Julgadora:

Mélida del Pilar Anzola Rojas (Orientador(a))

Adriana Ferreira Maluf Braga

Lucas Tadeu Fuess

Resultado:

APROVADO

Aprovado

Aprovado



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todos os sacrifícios e restrições que passaram para que todos seus filhos tivessem uma educação de qualidade.

À Nê, minha melhor amiga e companheira que me deu suporte quando mais precisei durante minha graduação.

Ao professor Marcelo Zaiat, por todas as oportunidades que me proporcionou durante minha graduação.

A Pilar, por tantas coisas que é impossível que sejam listadas.

Ao Eduardo e a Adriana, pela ajuda diária e pela troca de experiências.

A Janja pelo apoio técnico.

A Fapesp pelo financiamento desse projeto (Processo 2011/05624-7).

Aos meus amigos: Bruno Garcia, Gabriel Magdalon, Luísa Mattiello e Ricardo de Almeida, pelos momentos de descontração.

E a todos os outros que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer).

RESUMO

GONÇALVES, G. S. R. *Influência da carbono/fósforo (C/P) na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo.* Trabalho de graduação – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

Este projeto avaliou o efeito da relação carbono/fósforo (C/P) na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo empacotado de fluxo ascendente alimentado com água residuária sintética a 25°C. O projeto foi dividido em 4 etapas nas diferentes relações C/P: 96, 191, 382 e 765. Cada etapa durou aproximadamente 60 dias. Conduziu-se o ensaio hidrodinâmico com Tempo de Detenção Hidráulica teórica (TDH_{teo}) de 2 horas. Foram monitoradas as variáveis Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), pH_{efluente}, sacarose, ácidos voláteis, álcoois, composição (hidrogênio, dióxido de carbono e metano) e a vazão do biogás produzido. Os valores médios de rendimentos obtidos de H₂ foram de 0,47; 0,94; 0,31 e 0,62 mol H₂.mol sac⁻¹ para as relações C/P de: 96, 191, 382 e 765, respectivamente. Quanto à produção do biogás, obteve-se concentrações médias de H₂ de 56,1; 58,1; 60,0 e 57,0%, para as relações C/P de: 96, 191, 382 e 765, respectivamente. Os produtos intermediários gerados foram similares nas diferentes etapas, sendo os mais relevantes o etanol e os ácidos acético e butírico. A perda de biomassa no sistema foi maior para relação C/P=96. Ao longo de todas as 4 operações, houve uma queda na produção de biogás, possivelmente ocasionada pela redução gradual do TDH, devido a colmatação do leito motivado pelo crescimento celular, fenômeno que talvez tenha dificultado que o processo de acidogênese fosse concluído.

Palavras chave: Produção de hidrogênio, Águas residuária, Processo anaeróbio, Biorreator, Bioenergia.

ABSTRACT

GONCALVES, G. S. R. *Influence of carbon/phosphorus (C/P) ratio on the hydrogen production in a fixed-bed anaerobic reactor.* Undergraduate work – School of Engineering of São Carlos, Department of hydraulics and sanitation, University of São Paulo, São Carlos, 2014.

This Project evaluated the effect of the carbon/phosphorus (C/P) ratio on hydrogen production in an up-flow fixed-bed anaerobic reactor fed with synthetic wastewater, operated at 25°C and with a hydraulic detention time (HDT) of 2 hours. The experimental protocol was divided in 4 stages in which the ratio C/P ranged from 96 to 765. Each stage lasted 60 days approximately. It were monitored the chemical oxygen demand (COD), Volatile Suspended Solids (VSS), pH_{effluent}, sucrose, volatile acids, alcohols, composition (hydrogen, carbon dioxide and methane), and the gas flow produced. The mean values of hydrogen productivity were 0,47; 0,94; 0,31 e 0,62 mol.H₂.mol.suc⁻¹, for C/P ratios of 96, 191, 382 e 765, respectively. The average content of H₂ was 56,1; 58,1; 60,0 e 57,0%, for C/P ratios of 96, 191, 382 and 765, respectively. The intermediate products were similarly produced in all stages, so that the most relevant were ethanol, acetic and butyric acids. Biomass losses mainly occurred at ratio C/P=96. Throughout the stages, the biogas production declined, possibly because of the gradual reduction of the HDT, due to the clog up of the media, phenomena that might had hindered the completion of acidogenesis.

Keywords: Hydrogen production, Wastewater, Anaerobic process, Bioreactor, Bioenergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema experimental para a produção do hidrogênio (Anzola-Rojas, 2010).....	9
Figura 2 - Meio suporte para imobilização da biomassa - polietileno de baixa densidade.	10
Figura 3 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio com reator não imobilizado.	18
Figura 4 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio após operação C/P= 765.....	19
Figura 5 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio após operação C/P=382.....	19
Figura 6 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio após operação C/P= 96.....	20
Figura 7 - Identificação de zonas mortas	21
Figura 8 - Curvas E vs. t/TDHmédio.....	22
Figura 9 - Variação temporal da conversão de sacarose.....	24
Figura 10 - Variação temporal da produção de biogás.	25
Figura 11 - Variação temporal da composição do biogás.....	27
Figura 12 - Vazão molar de hidrogênio.	28
Figura 13 - Variação temporal do rendimento de hidrogênio.....	29
Figura 14 - Produção volumétrica de H ₂	30
Figura 15 - Variação temporal da concentração de SSV.....	31
Figura 16 - Valores de pH efluente para as diferentes concentrações C/P.....	31
Figura 17 – Total de metabólitos intermediários (TMI) e distribuição percentual entre a média total dos produtos intermediários produzidos nas relações C/P=765, 382 e 96	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de uma célula bacteriana (Madigan <i>et al</i> , 2005).	6
Tabela 2 - Composição de água resíduária sintética (Del Nery, 1987).	11
Tabela 3 - Concentrações de fosfatos para diferentes relações C/P.	11
Tabela 4 - Variáveis de monitoramento.....	14
Tabela 5 - TDH médio e variância.....	20
Tabela 6 - Volume útil e de zonas mortas nos reatores.	21
Tabela 7 - Distribuição das zonas mortas nos reatores.....	22
Tabela 8 - Resposta dos modelos de escoamento.	23
Tabela 9 - Recuperação do traçador.	24
Tabela 10 - Valores na conversão de sacarose na etapa de estabilização.....	24
Tabela 11 - Vazão de biogás.....	26
Tabela 12 - Composição média do biogás na etapa estabilizada.....	27
Tabela 13 - Valores para vazão molar de hidrogênio.	28
Tabela 14 - Rendimento de hidrogênio na etapa estabilizada.	28
Tabela 15 - Produção Volumétrica de Hidrogênio.	29
Tabela 16 - Valores para Sólidos Suspensos Voláteis nos reatores.....	30
Tabela 17 - Concentração média de metabólitos intermediários produzidos durante toda operação para as diferentes relações C/P = 96, 382 e 765.....	32
Tabela 18 - Balanço final médio de massa em DQO para as relações C/P de 96, 382 e 765.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP - Adenosina difosfato
- ATP - Adenosina trifosfato
- COV - Carga Orgânica Volumétrica
- C/N - Proporção carbono/nitrogênio
- C/P - Proporção carbono/fósforo
- DQO - Demanda Química de oxigênio
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EESC - Escola de Engenharia de São Carlos
- LPB - Laboratório de Processos Biológicos
- N - Nitrogênio
- P - Fósforo
- pH - Potencial hidrogeniônico
- SSV - Sólidos Suspensos Voláteis
- RNA - Ácido Ribonucleico
- TDH - Tempo de detenção hidráulica
- VEPH - Velocidade específica de produção de hidrogênio

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Hidrogênio	4
3.2 Meios de Produção do Hidrogênio	4
3.3 Microrganismos envolvidos	5
3.4 Nutrientes: foco no fósforo	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4.1 Reator	9
4.2 Meio Suporte	10
4.3 Meio de alimentação	10
4.4 Porosidade do leito	11
4.5 Ensaio hidrodinâmico	12
4.6 Inoculação	13
4.7 Operação e detalhamento do sistema de reatores em bancada	13
4.8 Medição da produção de hidrogênio, monitoramento e análises físico-químicas dos demais parâmetros	14
4.8.1 Análise de biogás por cromatografia	15
4.8.2 Análise de ácidos voláteis e álcoois por cromatografia	15
4.9 Cálculos	16
4.9.1 Vazão molar	16
4.9.2 Rendimento	16
4.9.3 Produção volumétrica	17
4.9.4 Balanço de carbono	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18

5.1	Ensaios hidrodinâmicos	18
5.2	Produção de Hidrogênio	24
5.3	Produtos Intermediários	32
5.4	Balanço de Carbono (DQO)	34
6.	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

A demanda crescente por energia associada à grande dependência de combustíveis fósseis na nossa atual economia vem agravando problemas relacionados com a emissão de dióxido de carbono na atmosfera. Para reduzir esse impacto, esforços devem ser direcionados em pesquisas que apontem e viabilizem economicamente alternativas energéticas mais limpas.

Dentre as alternativas energéticas em estudo está o hidrogênio, visado principalmente para o setor de transporte onde pode ser usado em células a combustível. O comércio de hidrogênio movimenta 50 milhões de toneladas ao redor do mundo, com taxa de crescimento de quase 10% por ano. Baseados nas estimativas do programa nacional de hidrogênio dos Estados Unidos, a contribuição de hidrogênio para o mercado total de energia poderá atingir 10% no ano 2025 (Argun *et al.*, 2008; Oztekin *et al.* 2008).

O hidrogênio é um combustível limpo porque o único produto gerado na combustão com oxigênio é a água, portanto, não produz gases do efeito estufa (Suzuki, 1982; Das & Veziroglu, 2001; Van Ginkel & Sung, 2001; Ren *et al.* 2007; Argun *et al.*, 2008, Oztekin *et al.* 2008). A combustão do hidrogênio nos veículos é 50% mais eficiente do que a gasolina (Cheong *et al.* 2007), pois o conteúdo energético (calor de combustão) é cerca de 122 kJ/g, ou seja, 2,75 vezes maior que o obtido com qualquer combustível derivado dos hidrocarbonetos (Argun *et al.*, 2008; Lay *et al.*, 1999).

A principal dificuldade encontrada na utilização do gás hidrogênio como combustível é o fato de não ser propriamente uma “fonte” enérgica, já que não é encontrado na forma pura (H_2) no meio ambiente, sendo assim necessária sua produção, a qual muitas vezes por um custo elevado (Argun *et al.*, 2008). Os processos mais utilizados para produção de hidrogênio são: a eletrólise da água, os processos de decomposição térmica e os processos biológicos (Lay *et al.*, 1999).

O hidrogênio comercializado hoje, em sua maioria, é oriundo do gás natural, de óleos pesados, do carvão, e da eletrólise (Suzuki 1982; Nath 2003). Nesse contexto, a produção biológica do gás hidrogênio dentre os atuais processos produtivos talvez seja a única forma de produção que sustente a argumentação ecológica associada a sua utilização. A produção de hidrogênio utilizando microrganismos vem se mostrando uma tecnologia viável em diversos laboratórios (Cheong *et al.*, 2007; Alzate *et al.*, 2007). Os

processos biológicos ainda apresentam vantagem econômica quando comparados à eletrólise e a decomposição térmica da água a partir de fontes combustíveis não fósseis, superando até os custos para a produção de combustíveis fósseis (Cheong *et al.*, 2007).

A produção biológica de hidrogênio, que usa como matéria prima a fração orgânica presente no esgoto ou em outras águas residuárias, também agregaria valor comercial ao tratamento dessas mesmas águas inicialmente visto unicamente como despesa. Muitas bactérias fermentativas anaeróbias são capazes de gerar elevadas quantidades de hidrogênio a partir de carboidratos (Cheong *et al.*, 2007), além de produzi-lo durante o dia e a noite com uma velocidade constante já que não dependem de uma fonte de energia externa, diferentemente das bactérias fototróficas (Alzate *et al.* 2007; Das & Veziroglu, 2001; Lee *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Em um tratamento anaeróbio, os poluentes orgânicos são convertidos em hidrogênio, juntamente há formação dos ácidos voláteis e álcoois (Cheong *et al.*, 2007). Porém a produção do hidrogênio está sujeita a diversos fatores como: configuração do reator, tempo de detenção hidráulica (TDH), concentração do substrato, temperatura, carga orgânica volumétrica (COV), condição de mistura do afluente, origem do inóculo, pH e concentração de macro e micro nutrientes (Noike & Mizuno, 2000; Logan *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2006; Anzola-Rojas, 2010; Lima e Zaiat, 2012; Penteado, 2012). Quanto às características da água residuária, deve-se atentar às necessidades nutricionais dos microrganismos como macronutrientes (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre) e micronutrientes (potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, cobalto, cobre, molibdênio e zinco) para gerar energia e realizar suas funções vitais (Brucha, 2007). Geralmente, a partir da composição química das células é possível se encontrar um valor aproximado das necessidades nutricionais dos microrganismos (Chernicharo, 1997).

Assim, a avaliação da influência dos macro e micronutrientes no metabolismo dos organismos produtores de hidrogênio é de extrema importância para avaliação das rotas de degradação dos compostos orgânicos, com resultados diretos sobre a produtividade de hidrogênio. Estudos já vêm sendo realizados para esse fim como é o caso do nitrogênio (Anzola-Rojas 2010). Nesse sentido, este trabalho avaliou o papel de um dos principais macronutrientes, o fósforo, em reator anaeróbio aplicado à produção de hidrogênio a partir de água residuária sintética.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse projeto foi avaliar o efeito da relação carbono/fósforo na produção biológica de gás hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fixo, com fluxo ascendente a partir de água residuária sintética.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a vazão molar, o rendimento e a produção volumétrica do gás hidrogênio para as relações C/P: 765, 382, 191 e 96. (gC/gP).
- Determinar a porcentagem de gás hidrogênio na composição do biogás para cada relação de C/P.
- Avaliar a distribuição de ácidos voláteis e álcoois produzidos para cada relação C/P.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hidrogênio

O hidrogênio é o elemento mais simples e mais abundante do universo, estimam que represente aproximadamente 75% em massa e 90% em número. No universo é possível encontrá-lo em sua forma elementar (H_2) facilmente, compondo a maior parte das estrelas servindo-as como combustível natural.

Na Terra o hidrogênio não é encontrado em porções significativas sua forma elementar, mas está amplamente presente em diversos compostos sejam orgânicos ou inorgânicos como os hidrocarbonetos e a água (Das & Verziroglu, 2001).

Além de combustível, o hidrogênio pode ser usado para evitar a oxidação e corrosão de metais quando submetidos ao processo de hidrogenação (Das & Verziroglu, 2001) e em outros diferentes campos industriais, como por exemplo no resfriamento de geradores elétricos, como combustível em foguetes e em automóveis.

Aproximadamente cinquenta milhões de toneladas de hidrogênio são comercializados anualmente, essa comercialização mundial tem crescido a taxa de 10% ao ano segundo dados do programa nacional de hidrogênio dos EUA, podendo chegar a uma contribuição de 10% no mercado energético total no ano de 2025 (Lin & Lay, 2004a, 2004b, 2005, Leite *et al.*, 2008).

3.2 Meios de Produção do Hidrogênio

Grande parte do hidrogênio comercializado (96%) ainda depende de combustíveis fósseis como gás natural, petróleo e carvão, para sua produção (Vijayaraghavan & Soom, 2004). Das & Veziroglu (2001) listaram os processos de reforma do vapor do gás natural, craqueamento térmico do gás natural, oxidação parcial da nafta e gaseificação do carvão como as principais formas de se produzir o gás hidrogênio.

Outros processos menos utilizados, que fazem uso de fontes primárias não fósseis, como a eletrólise da água, processos termoquímicos, radiolíticos e biológicos também são conhecidos (Lay *et al.*, 1999). Dentre esses, os processos biológicos possuem a vantagem de apresentar o menor gasto energético de produção.

A produção biológica pode ser realizada com a biofotólise da água por meio de algas e cianobactérias, foto-decomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas ou produção fermentativa de hidrogênio a partir de compostos orgânicos, este último modo apresenta como vantagens a velocidade de produção mais alta, baixo custo de implementação, independência a luz ou de culturas puras de microrganismos, com geração de produtos intermediários com valor econômico (ácidos butírico, acético, propiónico e etanol) que podem ser usados nas industriais químicas e finalmente o tratamento de efluentes concomitante a produção do hidrogênio (Argun *et al.* 2008, Oztekin *et al.* 2008, Wang & Wan, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009, Fernandes 2008, Leite *et al.*, 2008).

3.3 Microrganismos envolvidos

Diferentes grupos de organismos podem gerar hidrogênio, como por exemplo, algas verdes, cianobactérias, bactérias fotossintéticas e as bactérias fermentativas (Das & Veziroglu, 2001). Dentre as bactérias fermentativas, as mais comuns são dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*.

Muitos estudos tem sido realizados com diferentes culturas e diferentes configurações de reatores, o gênero *clostridum* foi indicado como um dos principais produtores de hidrogênio em processos biológicos (Maitinguer, 2008).

O gênero *Clostridium* pode produzir hidrogênio a partir da degradação de proteínas, aminoácidos, e carboidratos. Espécies desse gênero têm sido alvo de pesquisa devido à sua capacidade de fermentar vários substratos em produtos com valor econômico como a acetona, butanol e etanol (Mathews & Wang, 2009)

Clostridium também se destacam, além de possuírem alto potencial para produção de hidrogênio, por seu rápido metabolismo, sua capacidade de formar esporos e de produção tanto em condições mesofílicas ou termofílicas com pH entre 5 e 6 (Krupp & Widmann, 2009). Porém as condições físico-químicas do sistema produtivo devem ser observadas, já que valores de pH baixos e em alguns casos onde o gás hidrogênio se apresenta em altas concentrações no meio líquido podem inibir a atividade da desidrogenase, enzima piruvato que é utilizada pelo gênero *Clostridium* (Khanal *et al.*, 2004).

3.4 Nutrientes: foco no fósforo

Segundo Oztekin *et al.* (2008), não só os parâmetros físico-químicos do meio mas também a concentração nutricional afetam significativamente a produção de hidrogênio na fermentação anaeróbia. Apesar das dificuldades na determinação das concentrações de macro e micro nutrientes ideais para determinadas culturas, é possível ter uma base das necessidades nutricionais de determinado microrganismo, analisando a composição química celular do mesmo (Chernicharo, 1997).

Madigan *et.al.*(2005) estudaram a distribuição química da massa bacteriana (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química de uma célula bacteriana (Madigan *et al.*, 2005).

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

O material celular seco é composto principalmente de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, esses elementos juntos representam em torno de 95% do peso seco celular. O restante é composto por elementos traços, ou seja elementos de menor expressão na composição celular: potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, cobalto, cobre, molibdênio e zinco.

Dentre os principais nutrientes está o fósforo com papel fundamental na estruturação geral da célula, através da membrana celular que envolve a célula e as diferentes organelas; no controle celular, através do DNA e RNA que são responsáveis pelos comandos celulares; e no transporte e armazenamento energético, que é realizado através das adeninas tri e di fosfatos (ATPs e ADPs).

Os elementos carbono, nitrogênio e fósforo juntamente com o ferro são fundamentais na produção de gás hidrogênio. Em baixas ou elevadas concentrações esses

nutrientes reduzem o rendimento e a velocidade de produção de hidrogênio porque podem atuar como fator limitante, mudar as rotas metabólicas, reduzir a atividade biológica, causar efeitos inibitórios, variar as culturas microbianas dominantes e os produtos da fermentação (Oztekin *et al.*, 2008).

Segundo Odum (1983), o fator limitante é considerado como a quantidade mínima necessária de um material para a manutenção das funções vitais dos organismos, ou seja, a condição que se aproxima ou excede os limites de tolerância, assim é possível que um elemento seja considerado fator limitante não só nos casos de insuficiência, mas também por excesso.

Algumas pesquisas que avaliaram diferentes relações C/P, procurando melhorar a produção de hidrogênio, foram realizadas e são apresentadas a seguir. Argun *et al.* (2008) variaram as relações C/N entre 20 e 200 e C/P entre 50 e 1000 utilizando uma solução substrato de pó de trigo e lodo de estação de tratamento de águas residuárias de uma empresa de levedura. A concentração de N foi ajustada com ureia e a concentração de P com KH_2PO_4 . A mais elevada velocidade específica de produção de hidrogênio (VEPH) foi verificada nas relações $\text{C/N} = 200$ e $\text{C/P} = 1000$ ($8.0 \text{ mg-H}_2\text{g}^{-1}\text{biomassa h}^{-1}$), requerendo baixas concentrações de N e P. Elevadas concentrações de N e P provocaram inibição na formação de hidrogênio na fermentação anaeróbia, provavelmente por mudanças nas rotas metabólicas. Argun *et al.* (2008) concluíram que são requeridos baixos conteúdos de N e P para melhorar a produção e a produtividade de hidrogênio devido à estequiometria do metabolismo anaeróbico.

Ostekin *et al.* (2008) variaram as relações C/N entre 0 e 100, C/P entre 0 e 250 e C/FeII entre 0 e 170. O substrato utilizado foi solução de pó de trigo hidrolisada e o inóculo lodo de estação de tratamento de águas residuárias de cervejaria. A concentração de N foi ajustada com ureia, o P com KH_2PO_4 e o FeII com FeSO_4 . As melhores relações registradas foram $\text{C/N} = 50$, $\text{C/P} = 100$ e $\text{C/FeII} = 50$ com um rendimento de $2,74 \text{ molH}_2\text{mol}^{-1}\text{glicose}$ e VEPH de $90 \text{ mLH}_2 \text{ g}^{-1} \text{ biomassa h}^{-1}$.

A interação entre os conteúdos de nitrogênio e fósforo tiveram importantes efeitos sobre a produção de hidrogênio. Baixas concentrações de nitrogênio ($\text{C/N} > 50$) e fósforo ($\text{C/P} > 100$) poderiam limitar o rendimento na produção de hidrogênio, embora elevadas concentrações de N ($\text{C/N} < 50$) e P ($\text{C/P} < 100$) inibiram a formação de hidrogênio por fermentação anaeróbia, provavelmente por mudanças nas rotas metabólicas, semelhante com o ocorrido no estudo de Argun *et al.* (2008). Dentre essas interações, a melhor faixa

de concentrações de nitrogênio e fósforo ainda precisa ser determinada, para otimizar a produção de hidrogênio.

Peixoto (2008) testou a produção de hidrogênio em um reator de leito fixo de fluxo ascendente utilizando efluente de indústria de refrigerantes. Foram comparados os resultados do experimento do reator operado com e sem adição de meio contendo os nutrientes (adição do meio proposto por Del Nery, 1987). O maior rendimento foi alcançado pelo reator sem adição de nutrientes, pois atingiu $4,2 \text{ molH}_2\text{mol}^{-1}$ de substrato em contraste com $2,5 \text{ molH}_2\text{mol}^{-1}$ de substrato obtida pelo reator cujo afluente continha suplementação nutricional. O autor concluiu que a adição de macro e micro nutrientes pode propiciar a existência de microrganismos que não são reconhecidos como produtores de hidrogênio (ex. leveduras).

Os trabalhos anteriores demonstraram uma grande influência da relação C/P na produção de hidrogênio tanto em reatores tipo batelada como no experimento realizado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/USP – São Carlos) por Peixoto (2008). A razão para a avaliação da relação C/P em um reator de leito fixo e fluxo ascendente é encontrar uma relação C/P mais adequada para uma produção máxima de hidrogênio, uma vez que na atual literatura não está estabelecido tal informação para reatores com essa configuração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reator

O estudo foi desenvolvido em um reator biológico, escala de bancada, anaeróbio de leito fixo, empacotado de fluxo ascendente com as seguintes características: tubo de acrílico com diâmetro interno de 80 mm, diâmetro externo de 88 mm e 750 mm de comprimento perfazendo um volume total de 3,7 L. O reator continha três compartimentos: entrada do afluente, saída de efluente e leito, separados por telas de aço inoxidável (5 mm de abertura), fixadas por haste de 5 mm de espessura, feito no mesmo material. As dimensões foram adotadas em acordo com trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) (Fernandes, 2008; Peixoto, 2008; Anzola-Rojas, 2010).

O leito apresentava comprimento de 50 cm e cinco pontos de amostragem, igualmente espaçados para a obtenção de dados de concentração em função do comprimento. A parte superior do leito foi vedada para evitar possíveis vazamentos de gases e apresentava tubo de saída do efluente com formato em “L”, com a extremidade acompanhando o sentido do fluxo de gás e líquido a fim de evitar perdas. O estudo foi desenvolvido em sistema similar ao apresentado na Figura 1.

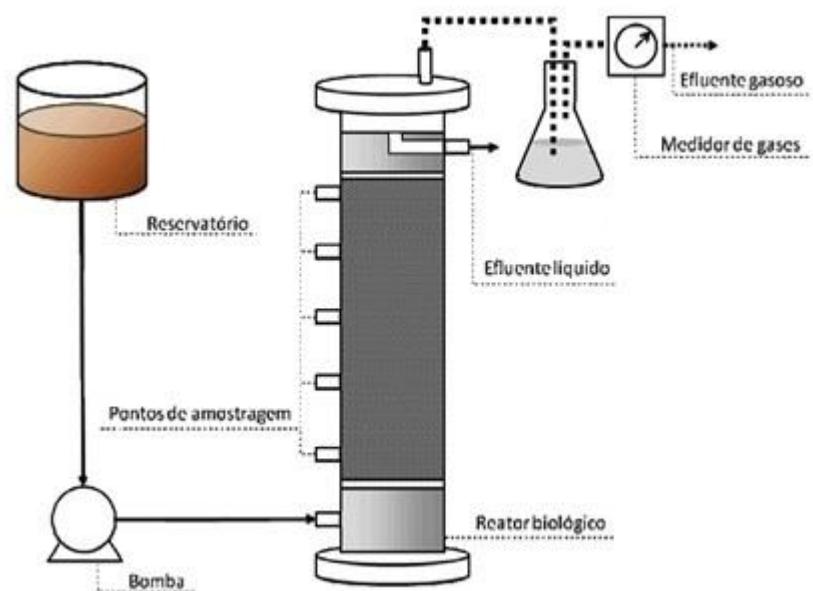


Figura 1 - Sistema experimental para a produção do hidrogênio (Anzola-Rojas, 2010)

A bomba utilizada foi Prominent® Concept Plus e a capacidade do reservatório era de 40 litros, suficiente para alimentação diária. Um erlenmeyer vedado foi usado como proteção do medidor volumétrico de gases, evitando o acesso de líquido.

4.2 Meio Suporte

O meio suporte utilizado para imobilização da biomassa foi polietileno de baixa densidade na forma de pellets cilíndricos obtido de usina de reciclagem de plástico com tamanho médio de 4,2 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro, densidade aparente de $0,4 \text{ g.mL}^{-1}$ e área superficial de $2,05 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (Figura 2).



Figura 2 - Meio suporte para imobilização da biomassa - polietileno de baixa densidade.

4.3 Meio de alimentação

O reator em escala de bancada foi alimentado com afluente preparado à base de sacarose (Tabela 2). O macronutriente fósforo foi dosado na forma de fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico e fosfato de sódiodibásico para o controle das relações C/P. A relação C/N foi mantida em 140 com adição de ureia, sendo esta relação ótima para a produção de hidrogênio segundo Anzola-Rojas (2010).

A DQO da água residuária sintética foi mantida sempre em 2000 mg.L^{-1} . Além disso, bicarbonato de sódio (500 mg.L^{-1}) e ácido clorídrico ($0,45 \text{ ml de ácido.L}^{-1} - 10 \text{ mol.L}^{-1}$) foram adicionados para manter o pH do afluente próximo de 6,5, já que trabalhos anteriores indicaram ser este o pH necessário no reservatório para obter-se um pH de 5,5 logo na entrada do reator, sendo o segundo valor mais recomendado para a produção de

hidrogênio (Fernandes, 2008; Peixoto, 2008). As relações C/P foram determinadas de acordo com Del Nery (1987), na qual é relatada que para baixas concentrações de nitrogênio são necessárias altas relações C/P. As demais proporções dos sais de fósforo usados também foram estabelecidas por Del Nery (1987) segundo

Tabela 3.

Tabela 2 - Composição de água resíduária sintética (Del Nery, 1987).

Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)
Sacarose	1781,24
Ureia	11,5
Sulfato de níquel	0,5
Sulfato ferroso	2,5
Cloreto férrico	0,25
Cloreto de cálcio	2,06
Cloreto de cobalto	0,04
Óxido de selênio	0,036

Fonte: Adaptada de Del Nery (1987).

Tabela 3 - Concentrações de fosfatos para diferentes relações C/P.

Fosfatos para diferentes C/P	96	191	382	765
Etapa	4	2	1	3
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	21,44	10,72	5,36
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	5,2	2,6	1,3
Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	10,8	5,4	2,7

Fonte: Adaptada de Del Nery (1987).

4.4 Porosidade do leito

Para a medida da porosidade do leito, o material suporte foi disposto dentro do reator, adicionou-se água até a completa imersão do material e em seguida esta foi drenada. O volume drenado de água foi quantificado com auxílio de provetas e o procedimento foi repetido três vezes. A medida da porosidade do leito (p_L) foi determinada pela (Equação 1).

$$p_L[\%] = \frac{v_{L_{ms}}}{v_{L_0}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual, $v_{L_{ms}}$ é o volume líquido com o leito preenchido com o material suporte e v_{L_0} é o volume líquido do leito vazio calculado pela (Equação 2).

$$v_{L_0} = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot h_L \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual, D corresponde ao diâmetro interno do leito e h_L ao comprimento do leito.

4.5 Ensaio hidrodinâmico

Determinada a medida de porosidade do leito, foi realizado o ensaio hidrodinâmico com objetivo de se observar o padrão de escoamento do reator. Seguindo-se a metodologia Levenspiel (2000) foi realizado um estímulo na forma de pulso no reator utilizando-se dextrana azul como traçador. De acordo com testes realizados por Jimenez *et al.* (1988), a dextrana azul sofre menor interferência sobre o material suporte e a biomassa devido a sua elevada massa molar.

A montagem do experimento consistiu em adequar a vazão do reator necessária para um tempo de detenção hidráulica teórico (TDH_{teo}) de 2h usando água da torneira como líquido afluente. Na mangueira de alimentação, logo antes da válvula de entrada de afluente do reator, aplicou-se um pulso de 50 mL de dextrana azul, em seguida, a cada três minutos, amostras do efluente líquido (10 mL) foram coletadas em tubos de ensaio por 2 horas e 40 minutos. O ensaio foi realizado com reator limpo, isto é, sem a imobilização da biomassa e passados os 60 dias aproximados de cada operação, o ensaio hidrodinâmico era repetido mantendo-se, a vazão do início do projeto, volume do pulso de dextrana e padrão de coleta descrito acima.

Ao fim da segunda etapa o reator foi desmontado precipitadamente por engano devido a obras no laboratório, logo não se realizou o ensaio ao final dessa operação. Foram usadas duas concentrações diferentes de dextrana nos ensaios, os dois primeiros foram realizados com uma concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e nos dois últimos com uma concentração de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, para facilitar a detecção da dextrana pelo equipamento. Em todos os ensaios realizados as amostras foram lidas no espectrofotômetro num comprimento de onda de 650 nm e foram traçadas as curvas de concentração (C) em função do tempo (t).

Por meio das curvas obtidas, foi possível calcular o TDH médio ($\bar{\theta}h$) ou TDH real (Equação 3), a variância (σ^2) (Equação 4) e a variância adimensional (σ_Θ^2) (Equação 5) (Levenspiel, 2000):

$$\bar{\theta}h = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) \cdot dt} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - \bar{\theta}h)^2 \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) \cdot dt} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{\theta}h^2} \quad (\text{Equação 5})$$

Foi utilizado o modelo de tanques em série (Equação 6) e o modelo de dispersão (Equação 7) para tanques fechados descritos por Levenspiel (2000) para representar o tipo de escoamento nos diferentes ensaios.

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{1}{N} \quad (\text{Equação 6})$$

$$\sigma_{\theta}^2 = 2 \left(\frac{D}{uL} \right) - 2 \left(\frac{D}{uL} \right)^2 \left[1 - e^{-\frac{uL}{D}} \right] \quad (\text{Equação 7})$$

4.6 Inoculação

Nas 4 etapas, a inoculação foi realizada com inóculo proveniente da autofermentação do meio. Preparou-se um meio em água de abastecimento contendo os mesmos substratos e concentrações usadas na alimentação durante a operação. O meio permaneceu em descanso por três dias em recipiente aberto para estimular a fermentação natural, vinda do contato entre o substrato presente na água e os microrganismos presentes na atmosfera.

Passado esse período, foi realizada a imobilização, efetuada através da recirculação por uma semana do meio obtido pela autofermentação, como proposto por Leite *et al.* (2008).

4.7 Operação e detalhamento do sistema de reatores em bancada

Foi avaliada a produção de hidrogênio para quatro diferentes relações C/P: 96, 191, 382, 765 (gC/gP) em busca da melhor para produção de hidrogênio. As relações C/P

foram calculadas de acordo com a porcentagem em massa de carbono e fósforo dos elementos sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) que constituíram parte do meio.

O experimento foi realizado em quatro etapas, cada qual com uma relação C/P. O sistema foi operado em modo contínuo à temperatura controlada de 25°C por meio de câmara climatizada. O TDH aplicado foi fixado em 2h durante 60 dias aproximadamente para todas as etapas, em acordo com trabalhos realizados no LPB (Fernandes, 2008; Peixoto, 2008, Anzola-Rojas, 2010). O afluente então deixava o reservatório para ser recalcado para o reator, cujo leito era submetido ao fluxo ascendente do substrato.

4.8 Medição da produção de hidrogênio, monitoramento e análises físico-químicas dos demais parâmetros

As análises para o monitoramento do reator e a frequência em que elas foram realizadas estão relacionadas na Tabela 4. Amostras da fase líquida (afluente e efluente) foram coletadas para análises de DQO, SSV, pH, sacarose, ácidos voláteis e álcoois.

Tabela 4 - Variáveis de monitoramento.

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

Amostras da fase gasosa foram obtidas para análise da composição (hidrogênio, dióxido de carbono e metano) e a vazão do gás produzido foi medida por medidor de vazão MilligasCounter da Ritter®.

4.8.1 Análise de biogás por cromatografia

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

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

Gás de arraste: Argônio.

Temperatura inicial do injetor: 200°C.

Temperatura inicial do detector: 230°C.

Vazão do gás de make up (Ar): 12 $mL \cdot min^{-1}$.

Detector: condutividade térmica.

Volume de amostra: 200 μL .

4.8.2 Análise de ácidos voláteis e álcoois por cromatografia

As análises de ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), acetona e álcoois (metanol, etanol e n-butanol) foram feitas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID, Flame Ionization Dector), empregando o método de “headspace” estático desenvolvido no LPB – EESC – USP. Usou-se ácido crotônico (padrão para os ácidos) e isobutanol (padrão para alcoóis e acetona) em meio ácido (ácido sulfúrico) (Adorno *et al*, 2014).

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

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

Temperatura do injetor: 250°C.

Temperatura do detector: 280°C.

Razão do Split: 1,0.

Fluxo do gás de arraste (H_2): 30 $mL \cdot min^{-1}$.

Fluxo do make-up ou gás auxiliar (N_2): 30 $mL \cdot min^{-1}$.

Fluxo do gás da chama (ar sintético): 300 $mL \cdot min^{-1}$.

Volume da amostra injetada: 400 μL .

Seringa de 2,5 mL.

Temperatura da seringa: 90°C.

Temperatura de incubação da amostra: 100°C.

O preparo das amostras foi feito em frascos – padrão de vidro com capacidade de 10 mL, com tampa rosqueável e septo de silicone com 18 mm de diâmetro. Foram adicionados 1 g de NaCl, 2 mL de amostra, 70 µL de solução de isobutanol, 100 µ L de solução de ácido crotônico (700 mg.L⁻¹) e 200 µ L de solução de H₂SO₄ 2 mol.L⁻¹.

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

4.9 Cálculos

Os dados obtidos foram analisado usando o software Microsoft Excel® para obtenção dos parâmetros de vazão molar, rendimento e produção volumétrica.

4.9.1 Vazão molar

A vazão molar de hidrogênio em µmol.h⁻¹ (v_{H_2}) foi calculada através da equação 8, sendo: Q_{biogás} (vazão do biogás) em mL.h⁻¹, a razão entre volume marcado no medidor e o seu respectivo tempo de medição; n_{H_2} (número de mols de hidrogênio) a multiplicação entre a porcentagem de hidrogênio medida pela cromatografia e o número de mols (n) da amostra de biogás determinada pela equação dos gases ideias (equação 9); e V_i o volume em mL da amostra injetada.

$$v_{H_2} = \frac{Q_{biogás} \cdot n_{H_2}}{V_i} \quad \text{Equação 8}$$

$$n = \frac{P \cdot V_i}{R \cdot T} \quad \text{Equação 9}$$

Onde P é a pressão do gás em atm, V_i dado em mL, R a constante universal dos gases ideias e T a temperatura absoluta. Foi considerada P = 1atm e T = 298k (25°C).

4.9.2 Rendimento

O rendimento do hidrogênio (Y_{H_2}) foi calculado através da equação 10 sendo V_s a velocidade de conversão da sacarose determinada pela equação 11.

$$Y_{H_2} = \frac{v_{H_2}}{v_s} \quad \text{Equação 10}$$

$$v_s = \frac{Q \cdot (C_{S_0} - C_S)}{MM_S} \quad \text{Equação 11}$$

Sendo Q em L.h⁻¹, a vazão do reator; C_{S₀} em mg.L⁻¹, a concentração afluente; e C_S em mg.L⁻¹, a concentração efluente; e MM_S a massa molar da sacarose.

4.9.3 Produção volumétrica

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) dada em mLH₂.h⁻¹.L⁻¹, foi calculada através da equação 12, sendo V_u em L o volume útil do reator.

$$PVH = \frac{Q_{biogás} \cdot \% H_2}{V_u} \quad \text{Equação 12}$$

4.9.4 Balanço de carbono

O balanço de carbono foi feito através de análises de DQO para validar a consistência dos dados obtidos (equação 13 e 14).

$$DQO_{af} = DQO_{ef} \quad \text{Equação 13}$$

$$DQO_{ef} = DQO_{t(PSF)} + DQO_x + DQO_{SE} + DQO_{H_2} \quad \text{Equação 14}$$

Sendo que DQO_{af} corresponde a DQO afluente; DQO_{ef} a DQO efluente; DQO_{t(PSF)} à DQO teórica dos produtos solúveis da fermentação; DQO_x à DQO da biomassa; DQO_{SE} à DQO da sacarose efluente conforme Reação 13; e DQO_{H₂} à DQO envolvida na produção de hidrogênio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios hidrodinâmicos

Com auxílio das (Equação 1 (Equação 2, foi possível determinar a porosidade do leito como igual a 59%. Na Figura 3, pôde-se confirmar o comportamento pistonado já esperado para o reator não colmatado. Entretanto, o pico foi observado aos 80 minutos de ensaio, antes do previsto teórico de 120 minutos, sugerindo então a existência de zonas mortas ao longo do reator. Nas Figura 4-6, correspondentes a todos os ensaios pós operação, o comportamento oposto ao pistonado (mistura) foi o predominante.

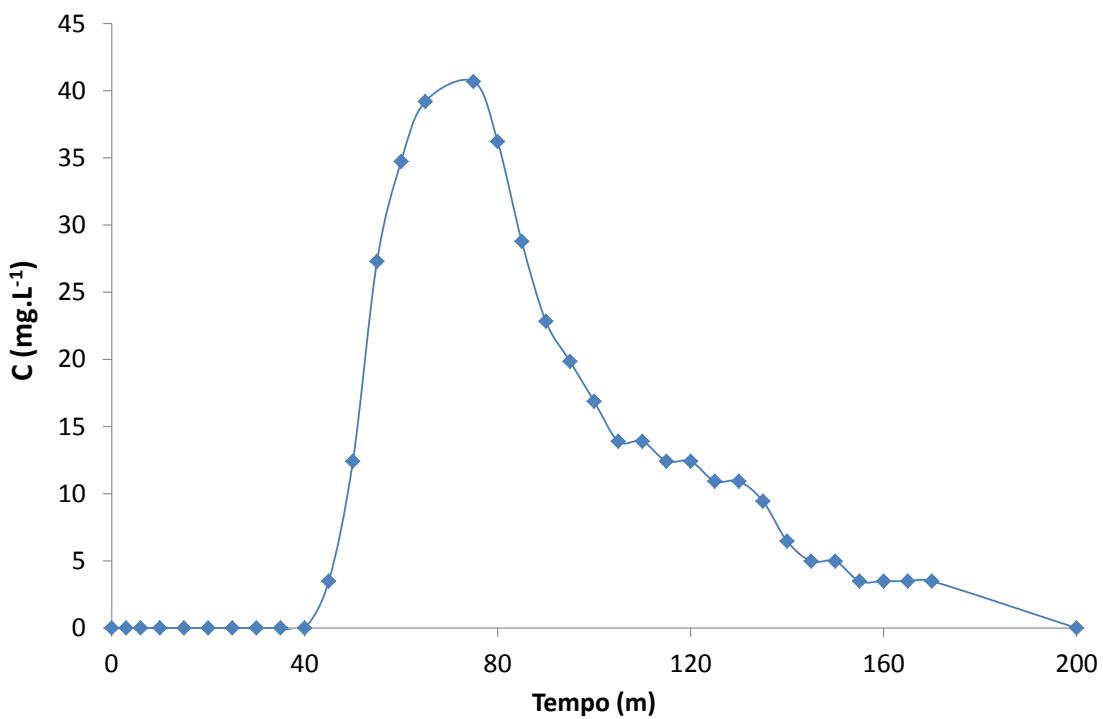


Figura 3 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio com reator não imobilizado.

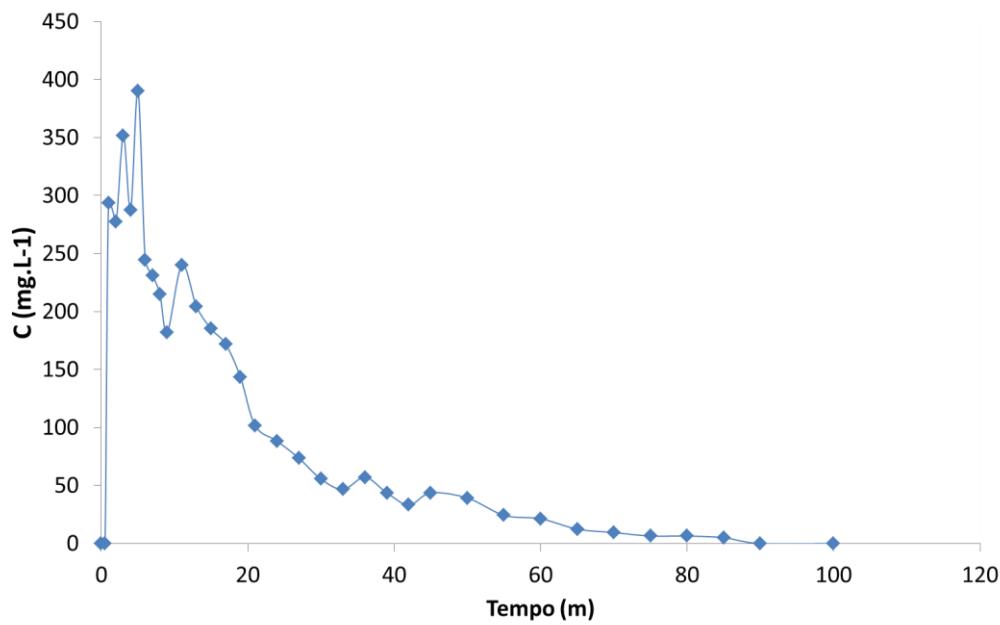


Figura 4 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio após operação C/P= 765.

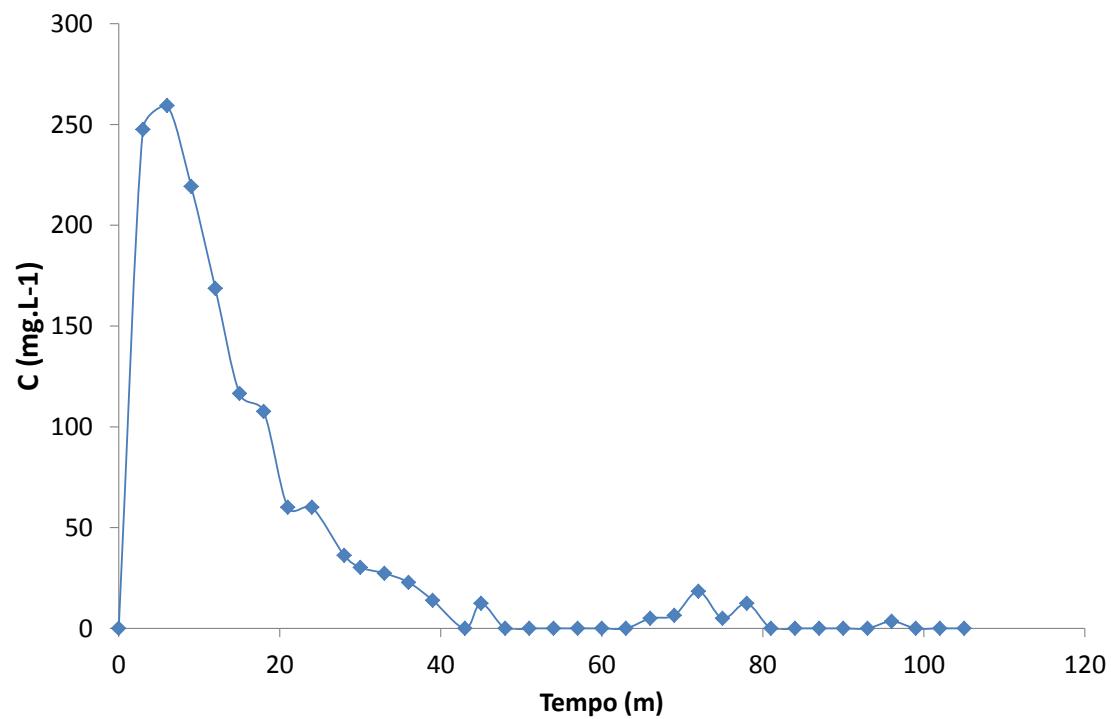


Figura 5 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio após operação C/P=382.

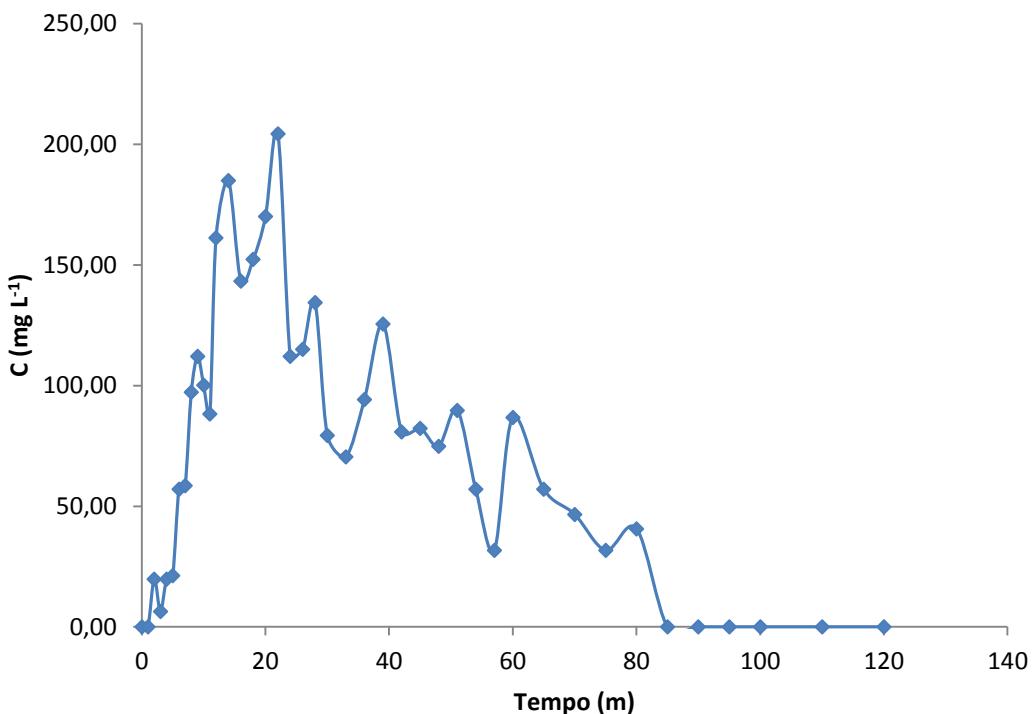


Figura 6 - Concentração do traçador em função do tempo, ensaio após operação C/P= 96.

Tabela 5 mostra um TDH médio menor que o TDH teórico (120 min) em todos os ensaios, indicando que havia no leito, caminhos preferenciais e zonas mortas diminuindo o volume útil em todos os casos.

Tabela 5 - TDH médio e variância.

Reator	TDH _{médio} (min)	σ (min ²)	σ^2 (ad)
Sem biomassa	89,6	837,5	0,05
C/P=765	12,0	166,4	1,15
C/P=382	14,8	214,0	0,98
C/P=96	27,5	332,2	0,44

Foi recalculado o volume útil, identificando e quantificando as possíveis zonas mortas do reator. A ausência do traçador no compartimento de saída detectada no primeiro ensaio acusou-o como maior volume inerte do reator (Figura 7). O volume e a porcentagem total das zonas mortas são apresentados na Tabela 6.



Figura 7 - Identificação de zonas mortas

Tabela 6 - Volume útil e de zonas mortas nos reatores.

Material suporte	Volume útil teórico (mL)	Volume útil hidrodinâmico (mL)	Total zonas mortas (mL)	% Total de zonas mortas
Sem biomassa	2300	1717,3	582,7	25,3
C/P=765	2300	230,8	2069,2	90,0
C/P=382	2300	283,6	2016,4	87,7
C/P=96	2300	526,6	1773,4	77,1

É possível verificar a porcentagem volumétrica colmatada do reator após as operações, encontrando-se a diferença no porcentual total de zonas mortas de cada operação com ensaio no qual o reator não estava immobilizado. Essas diferenças foram iguais a 62,4%, 64,7% e 51,8%, observadas para C/P=96, 382, 765 etapas respectivamente. Foi observada que para as maiores concentrações de fósforo menor é o percentual colmatado do reator. Sugerindo uma correlação entre a concentração do fósforo e o crescimento de biomassa.

Na Tabela 7 é apresentada a distribuição do volume das zonas mortas dentro do reator. O compartimento de saída possui 6,5 cm de altura morta, sendo responsável por 56,1% do volume da zona morta do reator. Os 43,9% restantes apresentam-se distribuídos

ao longo do leito (zona morta intrínseca), onde parte se deu por caminhos preferenciais. O volume morto intrínseco no leito devido aos caminhos preferenciais foi considerado o mesmo obtido no ensaio com reator sem biomassa em todas as outras etapas. A colmatação mínima faz referência ao volume mínimo ocupado pela biomassa dentro do reator ao final da operação, é chamada mínima porque havia a possibilidade de que a biomassa estivesse também ocupando parte do volume considerado como caminhos preferenciais.

Tabela 7 - Distribuição das zonas mortas nos reatores.

Reator	Total	Zona Morta Intrínseca no leito			Compartimento de		
	Zonas Mortas	Caminhos preferenciais	Colmatação mínima	saída (headspace + saída)	(mL)	%	
	(mL)	(mL)	%	(mL)	%	(mL)	%
Sem biomassa	582,7	256	43,9	0	0	326,7	56,1
C/P=765	2069,2	256	12,4	1486,5	71,8	326,7	15,8
C/P=382	2016,4	256	12,7	1433,7	71,1	326,7	16,2
C/P=96	1773,4	256	14,4	1190,7	67,1	326,7	18,4

A seguir foram elaboradas as curvas E em função do adimensional $t/TDH_{\text{médio}}$ para o cálculo do número de reatores em série (N) e o número de dispersão (D/uL) (Figura 8).

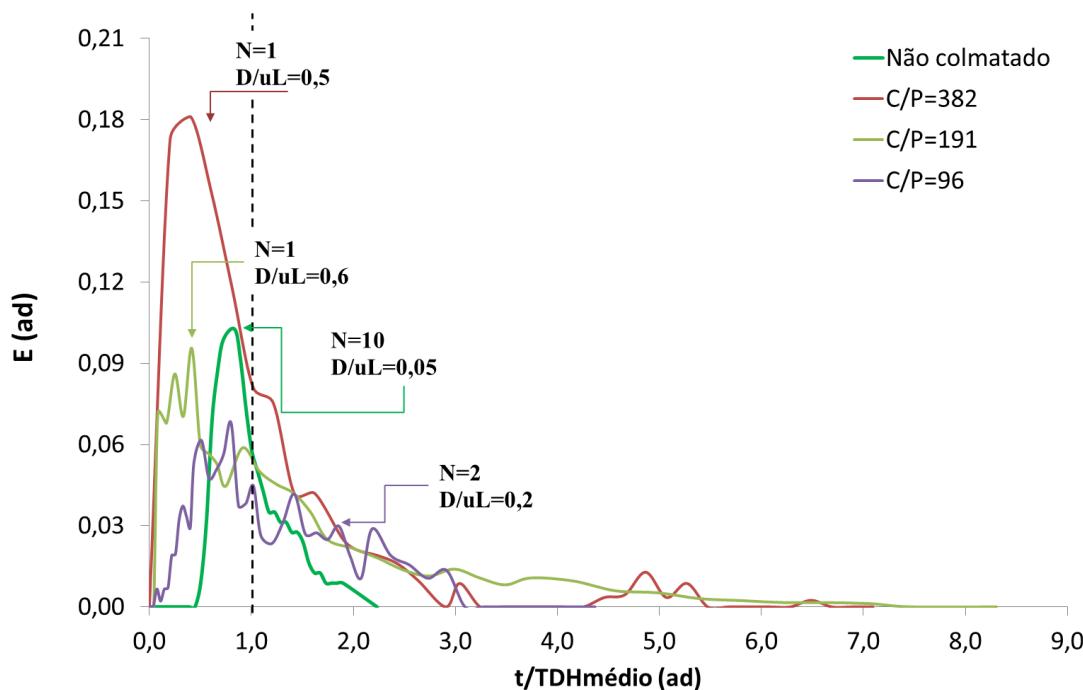


Figura 8 - Curvas E vs. $t/TDH_{\text{médio}}$.

Segundo Levenspiel (2000), o D/uL com tendência a zero indica dispersão negligenciável (escoamento pistonado) e o D/uL tendendo ao infinito indica escoamento com mistura perfeita. Pode-se observar que o regime de escoamento do reator no início da operação apresentava uma tendência ao fluxo pistonado com D/uL de 0,046. Isto também pode ser demonstrado através do parâmetro N igual a 11. Os resultados no término das operações revelaram um comportamento aposto ao inicial, reator não inoculado, com D/uL de 0,574, 0,488 e 0,220 e N iguais a 1, 1 e 2 para C/P=765, C/P=382 e C/P=96, respectivamente, notou-se um comportamento mais semelhante a mistura perfeita. Esse fato provavelmente ocorreu devido a dois fatores: ao baixo TDH somado aos menores espaços intersticiais (devido à colmatação do meio) que provocam uma maior mistura, originando um gradiente maior de velocidade (Tabela 8). Apesar de D/uL se manter dentro do limite recomendado por Levenspiel (2000) para escolha do modelo de dispersão, foi observada uma certa assimetria entre a Figura 3 e o modelo apresentado por Levenspiel (2000), levantando então a possibilidade do modelo não ter se ajustado perfeitamente.

Tabela 8 - Resposta dos modelos de escoamento.

Reator	N	D/u.L
Sem biomassa	11	0,046
C/P=765	1	0,574
C/P=382	1	0,488
C/P=96	2	0,220

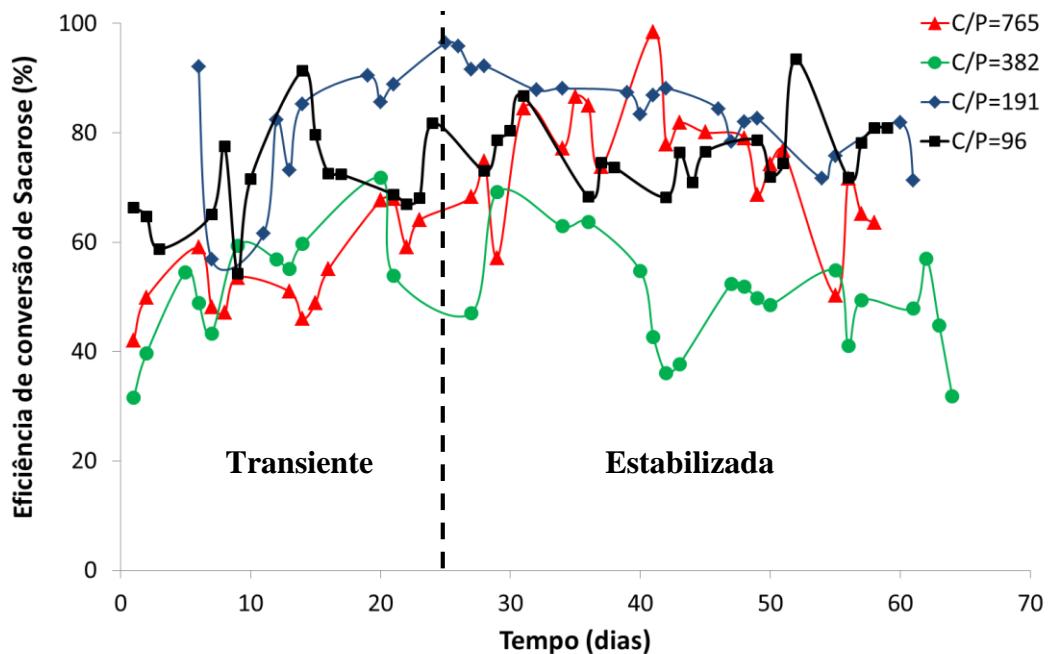
Jimenez *et. al.* (1988) utilizaram a concentração final do traçador sobre a concentração inicial ($C_{(f)}/C_{(i)}$) para avaliar o comportamento do traçador no leito. Com o leito de polietileno sem imobilização da biomassa foi possível recuperar 42% do traçador injetado (Tabela 9), provavelmente devido ao fenômeno de difusão e provável adsorção no leito. No segundo ensaio a recuperação do traçador foi de 82%. Essa maior recuperação é devida ao menor tempo de exposição e sua menor área de contato com o leito de polietileno dificultando os fenômenos de difusão e adsorção. Similar ao ocorrido no segundo ensaio, os ensaios da terceira operação e da quarta operação apresentaram recuperação do traçador de 81% e 84%, respectivamente.

Tabela 9 - Recuperação do traçador.

Rreator	$\frac{C(f)}{C(i)}$
Sem biomassa	0,42
C/P=765	0,81
C/P=382	0,82
C/P=96	0,84

5.2 Produção de Hidrogênio

Para melhor utilização dos dados obtidos, os mesmos foram divididos em duas partes, etapa transitória e etapa estabilizada. Essa determinação foi feita baseando-se nos dados de conversão de sacarose (Figura 9) devido à dificuldade de definir com base nos dados de produção de biogás ou outro parâmetro. Observou-se que aproximadamente por volta do vigésimo quinto dia de operação ocorria à alteração de etapas.

**Figura 9 - Variação temporal da conversão de sacarose.**

Os valores de conversão da sacarose na etapa de estabilização estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores na conversão de sacarose na etapa de estabilização.

C/P	Conversão de Sacarose (E) [%]	
	Máximo	Média
765	86,6	74,8 \pm 8,0
382	69,1	53,0 \pm 7,6
191	96,4	84,8 \pm 4,2
96	86,7	75,8 \pm 4,8

A produção de hidrogênio foi acompanhada nas quatro etapas (C/P de 96, 191, 382 e 765) com medições volumétricas do biogás, utilizando o aparelho MilliGasCounter da Ritter® e análises qualitativas em cromatografia gasosa. A Figura 10 mostra a curva de produção do biogás e suas médias são apresentadas na Tabela 11. Nos primeiros 30 dias de operação, o experimento de C/P = 96 apresentou as maiores vazões, e após queda brusca da produção logo no início da etapa estabilizada não apresentou tendência clara de declínio na produção do biogás, sugerindo uma vida útil mais longa que das outras operações, possivelmente devido a menor colmatação do leito. Dentre as etapas estabilizadas, a relação C/P de 191 apresentou maiores vazões, com uma transição entre suas etapas mais branda no que tange a produção de hidrogênio. A operação com C/P de 765, abaixo da concentração recomendada por Del Nery (1987), apresentou as menores produções por quase todo seu período de operação.

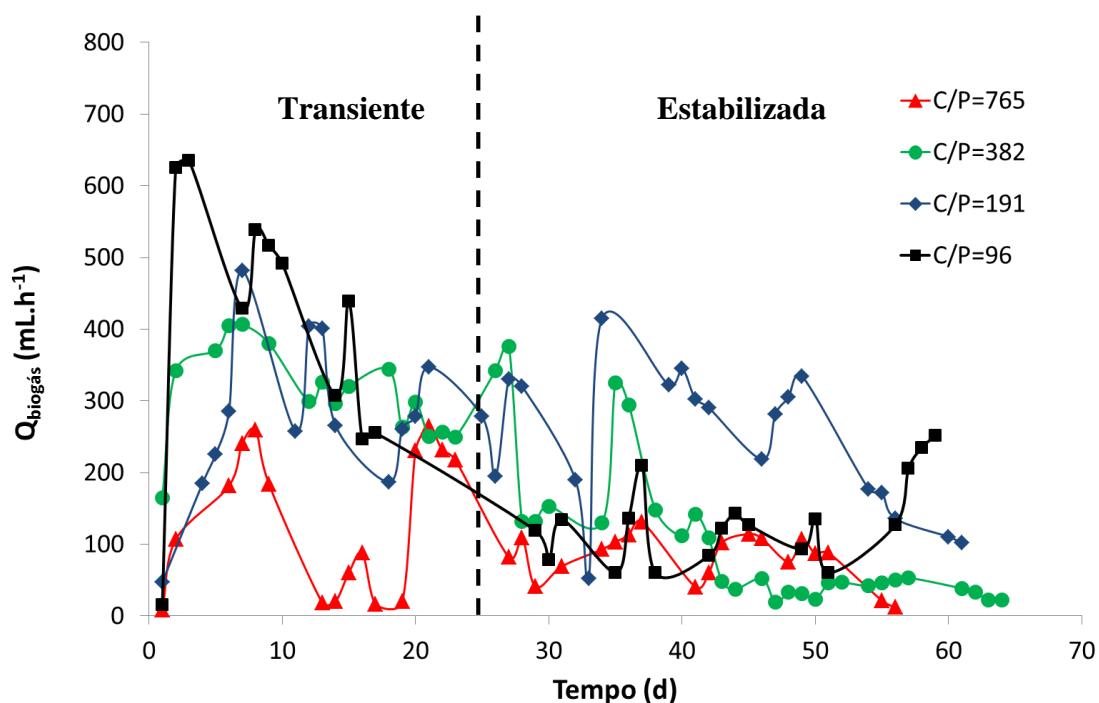


Figura 10 - Variação temporal da produção de biogás.

Os comportamentos de produção de biogás foram similares em todas as operações, atingindo picos de produção em uma semana, mantendo altas vazões por cerca de 20 a 30 dias, e com um posterior decréscimo na produção do biogás. Essa redução na produção do biogás pode estar relacionada com a redução da carga orgânica volumétrica específica e o envelhecimento da comunidade bacteriana (Anzola-Rojas, 2014). Diferentemente das outras operações a relação C/P igual a 96 quando finalizada não possuía uma tendência de redução na produção do biogás. Isso pode ter ocorrido devido à colonização menos acelerada do reator pela comunidade bacteriana, fenômeno confirmado pelo ensaio hidrodinâmico da etapa.

Tabela 11 - Vazão de biogás.

C/P	Vazão de biogás ($Q_{\text{biogás}}$) [mL.h ⁻¹]					
	Etapa Transiente		Etapa Estabilizada		Máximo	Média
	Máximo	Média	Máximo	Média		
765	264,6	134,3	±100,6	131,4	82,0	±33,5
382	406,8	310,9	±65,0	376,1	104,9	±103,5
191	481,8	279,0	±107,9	415,2	242,2	±100,0
96	635,0	408,9	187,0	251,5	132,3	±58,8

A cromatografia gasosa foi usada para definir os percentuais de H₂ e CO₂ no biogás. Os resultados são apresentados na Figura 11 e Tabela 12. Pode-se observar que em todas as fases a concentração de hidrogênio e gás carbônico no biogás apresentou a mesma dinâmica. Ao longo da operação, o hidrogênio apresentou-se em concentrações mais elevadas e gradativamente decaiu até atingir os valores próximos ao do gás carbônico, mas raramente foi superado. O metano não foi detectado em nenhuma relação C/P, indicando a inibição de microrganismos metanogênicos.

Com os dados de produção volumétrica de biogás e as porcentagens de hidrogênio no biogás foi possível determinar a vazão molar de hidrogênio (Figura 12 - Vazão molar de hidrogênio), com valores máximos alcançados iguais a 15,0 mmol-H₂.h⁻¹ quando o reator era operado com relação C/P de 96, durante a fase transiente. Observou-se, principalmente devido à queda na vazão de biogás, a diminuição da vazão molar de hidrogênio para todas as relações C/P (.

Tabela 13).

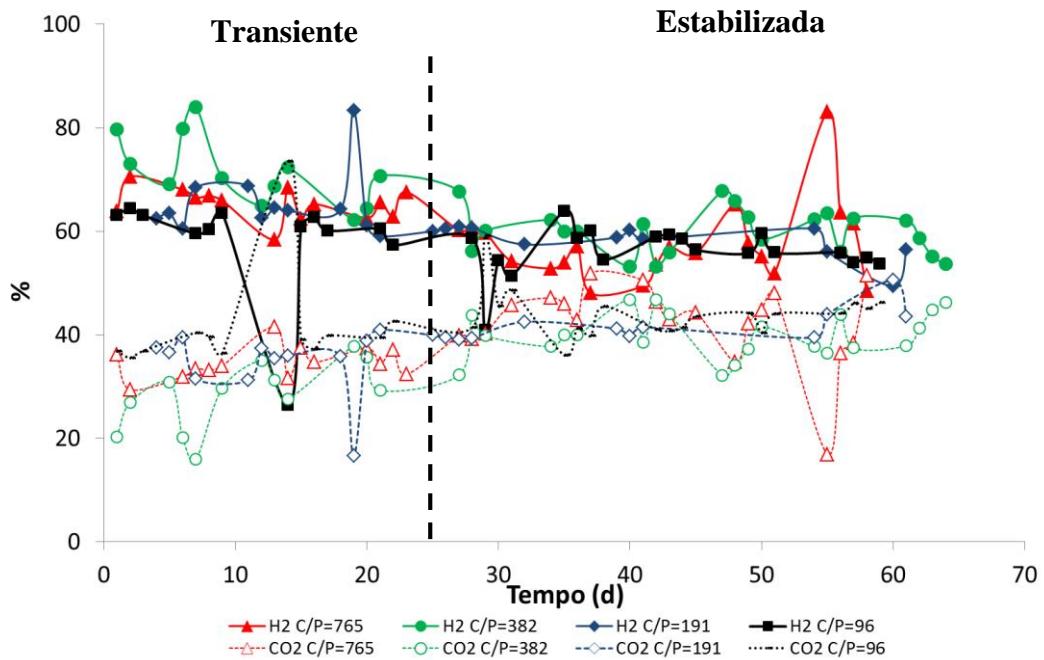


Figura 11 - Variação temporal da composição do biogás.

Tabela 12 - Composição média do biogás na etapa estabilizada.

C/P	H ₂ [%]		CO ₂ [%]	
	Máximo	Média	Máximo	Média
765	83,0	57,5 ± 7,7	51,9	42,5 ± 7,7
382	67,8	60,0 ± 4,4	46,8	40,0 ± 4,4
191	60,9	58,1 ± 3,4	50,6	41,9 ± 3,4
96	63,9	56,1 ± 4,7	59,1	43,9 ± 4,7

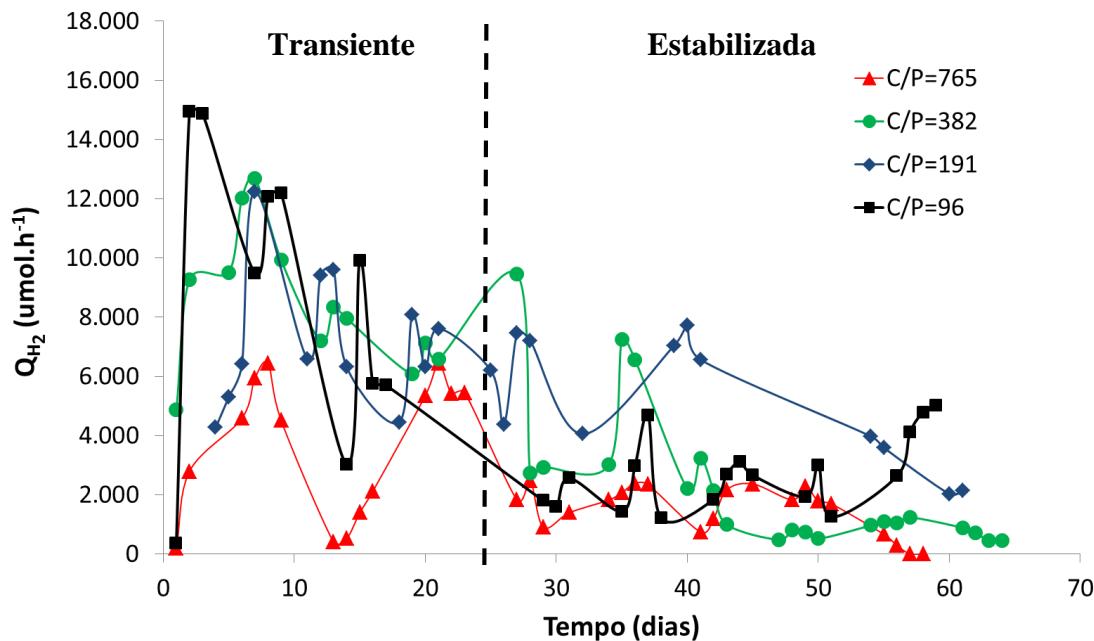


Figura 12 - Vazão molar de hidrogênio.

Tabela 13 - Valores para vazão molar de hidrogênio.

C/P	Vazão Molar de H ₂ [mmol-H ₂ .h ⁻¹]					
	Etapa Transiente		Etapa Estabilizada			
	Máximo	Média	Máximo	Média		
765	6,5	3,7	2,5	1,5	±0,8	
382	12,7	8,5	9,5	2,3	±2,4	
191	12,3	7,1	7,7	5,1	±2,2	
96	15,0	8,8	5,0	2,7	±1,2	

A Figura 13 e Tabela 14 apresentam os rendimentos da produção, em mols de hidrogênio gerado por mol de sacarose fornecida na alimentação (mol-H₂.mol-Sac⁻¹).

Tabela 14 - Rendimento de hidrogênio na etapa estabilizada.

C/P	Rendimento (Y _{H₂}) [mol-H ₂ .mol-sac ⁻¹]			
	Máximo	Média		
765	0,55	0,31	±	0,16
382	2,97	0,62	±	0,72
191	1,57	0,94	±	0,38
96	0,79	0,47	±	0,18

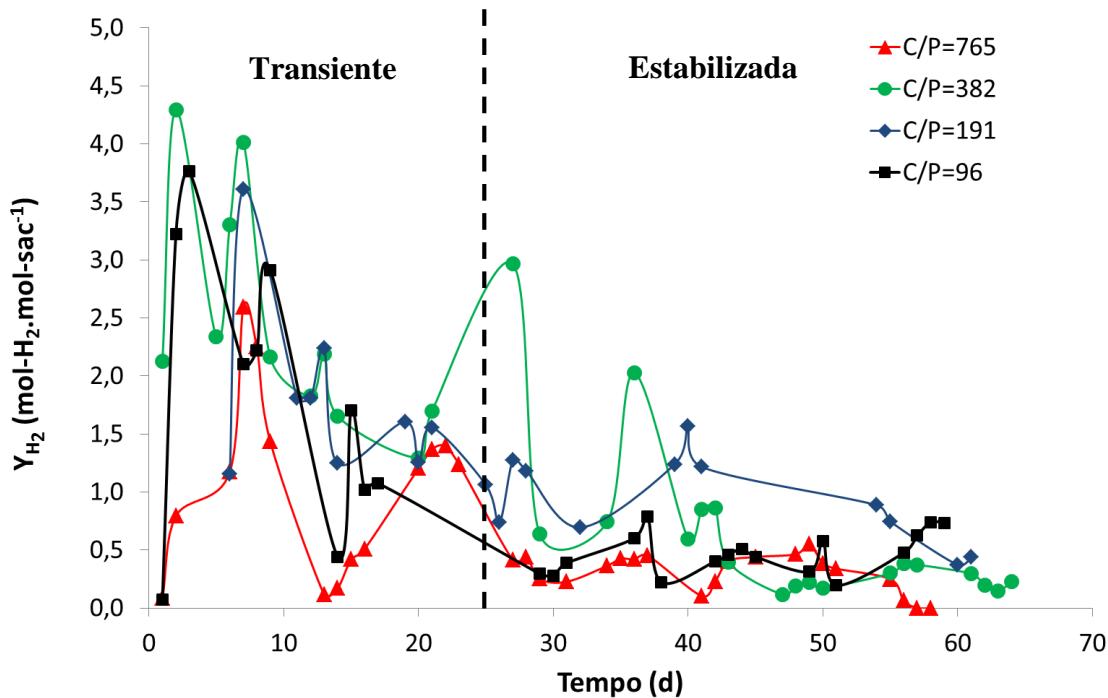


Figura 13 - Variação temporal do rendimento de hidrogênio.

O maior rendimento alcançado foi de $4,3 \text{ mol.H}_2.\text{mol sac}^{-1}$ na operação onde a concentração foi a recomendada por Del Nery (1987) - C/P 382. Quando operado na relação C/P igual a 191 o reator apresentou o melhor rendimento na etapa estabilizada, com valor aproximado de 1,6 e média de $1 \text{ mol.H}_2.\text{mol sac}^{-1}$.

Outra forma de analisar os dados obtidos é através da produção volumétrica de hidrogênio, a qual é calculada dividindo a vazão de hidrogênio pelo volume útil do reator (Figura 14 e Tabela 15).

Tabela 15 - Produção Volumétrica de Hidrogênio.

C/P	Produção Volumétrica de H ₂ [ml·H ₂ ·h ⁻¹ ·L ⁻¹]					
	Etapa Transiente		Etapa Estabilizada		Máximo	Média
	Máximo	Média	Máximo	Média		
765	75,5	43,2	±27,6	28,9	28,9	±7,9
382	148,6	99,1	±27,4	110,8	26,6	±28,7
191	143,4	83,6	±26,2	90,5	59,8	±25,2
96	175,1	103,4	±58,2	58,8	32,1	±14,3

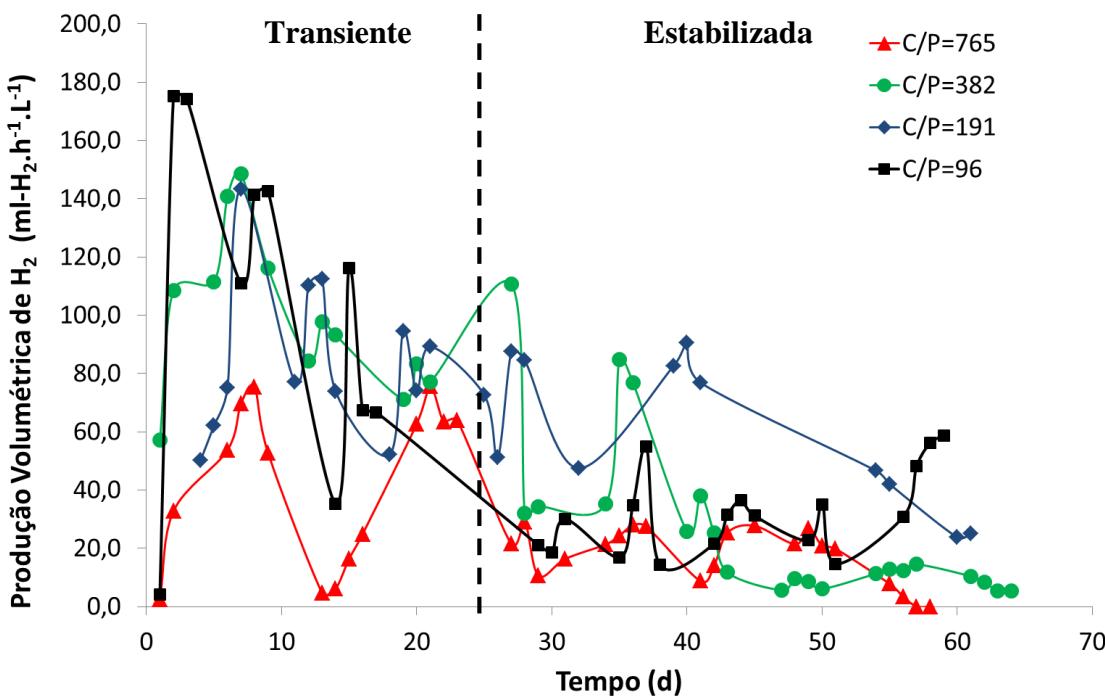


Figura 14 - Produção volumétrica de H₂.

Outro parâmetro analisado foi a concentração de sólidos em suspensão voláteis (SSV) (Figura 15), que quantifica o arraste de biomassa e de polímeros extracelulares para fora do sistema. A grande variação de SSV deve-se ao fato de o desprendimento do material do meio ocorrer de forma intermitente.

Observa-se na Tabela 16 uma maior perda de sólidos no reator operado com relação C/P de 96. Por isso, o mesmo reator apresentou a menor colmatação entre os demais, evidenciando que maiores concentrações de fósforo podem interferir na aderência das bactérias junto ao leito.

Tabela 16 - Valores para Sólidos Suspensos Voláteis nos reatores.

C/P	Sólidos Suspensos Voláteis mg.L ⁻¹					
	Etapa Transiente		Etapa Estabilizada			
	Máximo	Média	Máximo	Média	Máximo	Média
382	25,1	18,3	9,6	101,0	47,5	27,7
765	55,0	20,9	19,5	88,0	42,3	25,5
191	108,0	40,5	34,0	76,4	58,9	20,9
96	110,0	44,0	32,8	162,0	91,0	30,0

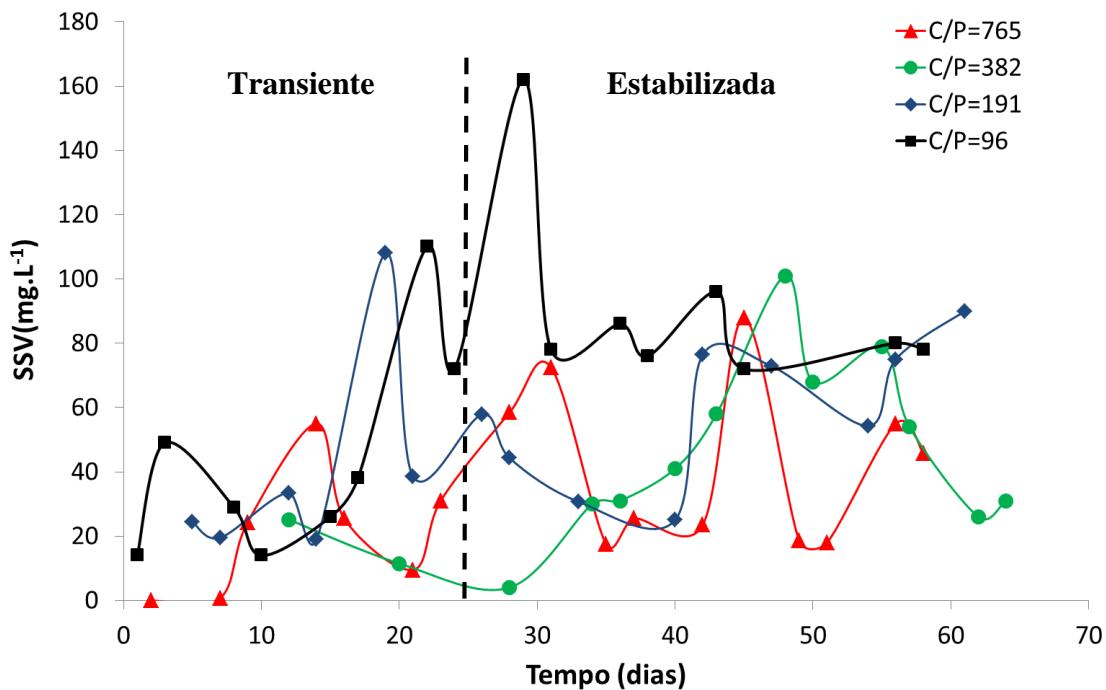


Figura 15 - Variação temporal da concentração de SSV.

A Figura 16 apresenta a variação dos valores de pH nos efluentes dos reatores ao longo do tempo de operação. Os valores de pH do efluente na operação C/P=382 permaneceram entre 4,5 e 5,2. Para C/P=765 o valor decresceu até o dia 30. Valores mais baixos entre 3,9 e 4,3 foram observados com maior frequência, indicando maiores produções de ácidos no efluente.

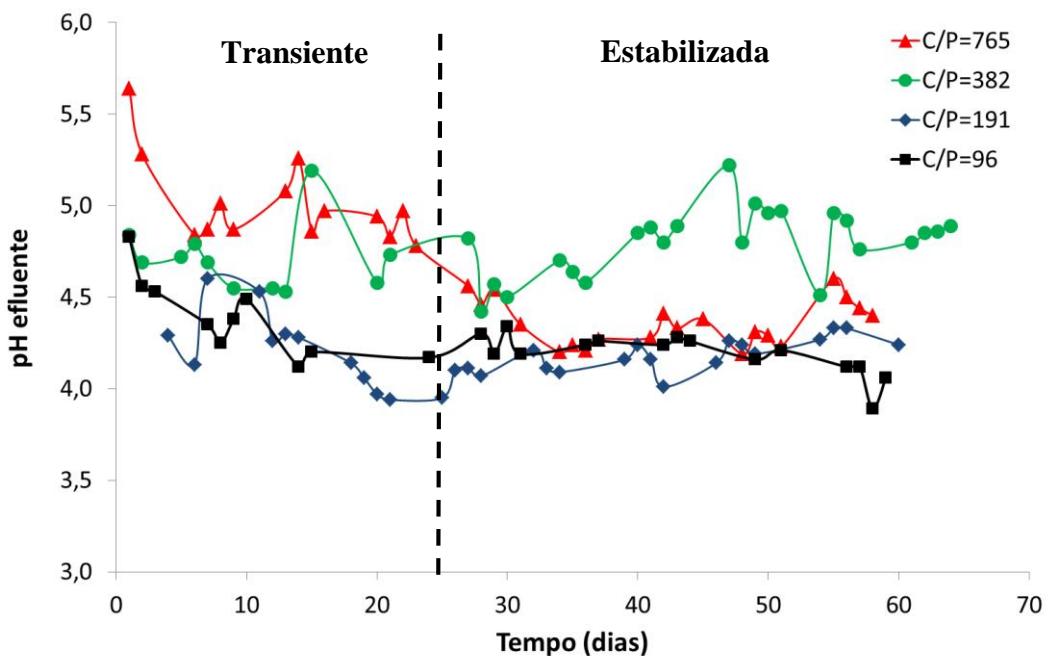


Figura 16 - Valores de pH efluente para as diferentes concentrações C/P.

5.3 Produtos Intermediários

Durante o processo fermentativo foram observadas várias rotas metabólicas, e principalmente a rota do tipo acetato, butirato e do etanol. Na Tabela 17 é apresentada as concentrações temporais para C/P=96, 382 e 765. Infelizmente as amostradas de ácidos da operação C/P=191 foram perdidas e não puderam ser analisadas.

Tabela 17 - Concentração média de metabólitos intermediários produzidos durante toda operação para as diferentes relações C/P = 96, 382 e 765

Metabólitos	mg.L-DQO ⁻¹		
	C/P 96	382	765
Met ¹	0,0	116,9	5,1
Et ²	119,2	245,9	186,5
H-Ac ³	436,8	260,2	289
H-Pr ⁴	43,9	38,7	48,9
H-IsoBu ⁵	62,0	47,4	5,6
H-Bu ⁶	488,4	165,4	87,4
TMI ⁷	1086,1	874,4	644,4

¹metanol, ²etanol, ³ácido acético, ⁴ácido propiônico, ⁵ácido isobutírico, ⁶ácido butírico,
⁷Total de Metabolitos Intermediários

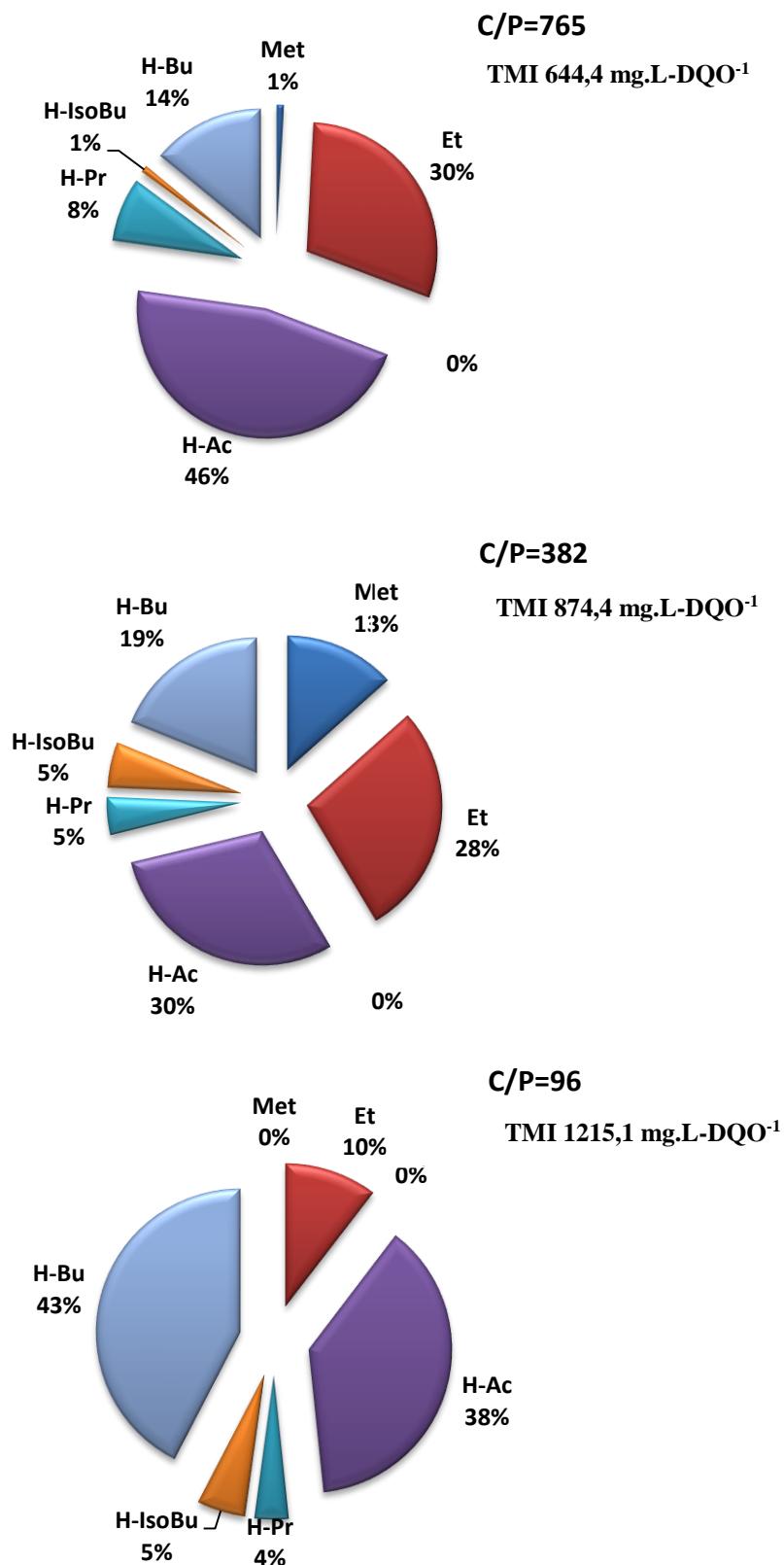


Figura 17 – Total de metabólitos intermediários (TMI) e distribuição percentual entre a média total dos produtos intermediários produzidos nas relações C/P=765, 382 e 96

Met (metanol), Et (etanol), H-Ac (ácido acético), H-Pr (ácido propiónico), H-IsoBu (ácido isobutírico), H-Bu (ácido butírico), ⁷Total de Metabolitos Intermediários.

Pôde-se notar com os resultados das três operações que a produção de ácidos e álcoois é sensível a concentração de fósforo, sendo maior para menores relações C/P apresentando média total dos metabólitos intermediários de 644,4; 874,4 e 1215,1 mg.L-DQO⁻¹, para C/P de 765, 382 e 96 respectivamente.

Na Figura 17 acima, é possível notar que para uma relação C/P igual a 765 observou-se maior representatividade do ácido acético, e menores gerações de metano e do ácido isobutírico.

5.4 Balanço de Carbono (DQO)

Os balanços de massas final médio do carbono para ambas as fases foram mensurados em DQO e são apresentados na Tabela 18. Para o balanço foram comparadas DQO de entrada (afluente) com a DQO de saída (efluente) somada a DQO dos metabolitos produzidos. A porcentagem da DQO não identificada pode estar associada a produtos intermediários que não foram analisados como o ácido lático, ácido fórmico, entre outros (Amorim 2009), além de incorporação à biomassa.

Durante a menor concentração estudada (C/P = 765) ocorreu a maior diferença no balanço de massa. Isso pode ser interpretado como uma maior geração de produtos intermediários não analisados.

Tabela 18 - Balanço final médio de massa em DQO para as relações C/P de 96, 382 e 765.

	mg.L-DQO ⁻¹		
	C/P		
	96	382	765
Sacarose afluente	2183,4	2030,8	1931,9
TMI ¹	1207,6	770,4	644,4
Sacarose efluente	506,4	922,1	674,4
Total DQO efluente	1714,0	1692,5	1318,8
$\frac{DQO_{efl. \ Total}}{DQO_{afl.}}$	74,3%	83,4%	68,5%

¹Total de Metabolitos Intermediários

6. CONCLUSÃO

Foi avaliada, em reator de leito fixo empacotado de fluxo ascendente, a influência das relações C/P de 96, 191, 382 e 765, sobre a produção de hidrogênio. Os resultados mostraram que a concentração de 191 obteve os melhores valores médios, durante a etapa estabilizada, para a vazão molar ($5,1 \text{ mmol-H}_2.\text{h}^{-1}$), rendimento ($0,94 \text{ mol-H}_2.\text{mol-sac}^{-1}$) e produção volumétrica ($59,8 \text{ ml-H}_2.\text{h}^{-1}.\text{L}^{-1}$). A concentração média de H_2 e CO_2 no biogás produzido nesta etapa foi de 58,1 e 41,9% respectivamente sem produção de CH_4 .

A concentração de fósforo também afetou a produção de metabólitos intermediários, onde as maiores produções foram observadas para as maiores concentrações. Entretanto, o ácido acético, etanol e ácido butírico se apresentaram em maiores concentrações para todas as concentrações C/P onde foram avaliados. Esta variação pode ter sido causada por uma influência do fosforo sobre as rotas metabólicas.

A aderência da biomassa ao leito também foi afetada pela concentração de fósforo, de modo que, para maiores concentrações foi observada uma menor colmatação do reator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adorno, M.A.T.; Hirasawa, J.S.; Varesche, M.B.A. (2014). Development and Validation of two Methods to quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry.* v.5, 406-414.
- APHA - American Public Health Association (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater.* 20.ed. Washington: AWWA/APHA/WEF., s.p.
- Alzate, L.; Sebastian, P.J.; Pérez, A.; Eapen, D. (2007). *Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater.* *International Journal of Hydrogen Energy,* v. 32, p. 3141 – 3146.
- Amorim, E.L.C. (2009). *Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado.* Tese (Doutorado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, Brasil.
- Anzola-Rojas, M.D.A. (2010). *Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo.* Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Anzola-Rojas, M.D.A. (2014). *Estratégias para a produção continua de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo.* Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Argun, H.; Kargi, F.; Kapdan, I.; Oztekin, R. (2008) *Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N an C/P ratio hydrogen yield and formation rate.* *International Journal of Hydrogen Energy,* v. 33, p. 1813 – 1819.
- Brucha, G. (2007). *Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana natural dos sedimentos do Estuário de Santos – São Vicente, Estado de São Paulo.* Tese (doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- Cheong, D.; Hansen, C.(2007) *Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes.* Bioresource Technology, v. 98, p. 2229 – 2239.
- Chernicharo, C.A.L.(1997) *Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas resíduárias.* v. 5, 246p, DESA, UFMG.
- Das, D.; Veziroglu, T. (2001). *Hydrogen production by biological processes: a survey of literature.* International Journal of Hydrogen Energy, v. 26, p. 13 – 28..
- Del Nery, V. (1987). *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo.* Dissertação (mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- Dubois, S. M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. L.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956). *Colorimetric Methods for determination of sugar and related substance.* Analytical Chemistry, v.228,p. 13-21.
- Hallenbeck, P. C. & D. Ghosh (2009) *Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward.* Trends in Biotechnology, 27, 287-297.
- Fernandes, B. S. 2008. *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo.* In Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, 100. São Carlos: Universidade de São Paulo.
- Jimenez, B.; Noyola, A.; Capdeville, B.; Roustan, M.; Faup, G. (1988) *Dextran blue colorant as a reliable tracer in submerged filters.* Wat. Res., v 22, n 10, pp 1253 – 1257.
- Khanal, S. K., W. H. Chen, L. Li & S. W. Sung (2004) *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products.* International Journal of Hydrogen Energy, 29, 1123-1131.
- Krupp, M. & R. Widmann (2009) *Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale.* International Journal of Hydrogen Energy, 34, 4509-4516.
- Lay, J.J., Lee, Y.J., & Noike, T. (1999). *Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste.* Water res., 33:2579-2586.
- Lee, K.; Lo, YS. ; Lo, YC.; Lin, P.; Chang, J. (2003). *H₂ production with anaerobic sludge using activated – carbon supported packed – bed bioreactors.* Biotechnology Letters, v. 25, p. 133 – 138.

- Leite, J. A.C.; Fernandes, B. S.; Pozzi, E.; Barboza, M.; Zaiat, M. (2008). *Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 579 – 586.
- Levenspiel, O. (2000) *Engenharia das reações químicas*. 3 ed. São Paulo : Edgard Blucher.
- Lima, M.F.D; Zaiat, M. (2012) The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor Hydrongen Energy. V. 37 p.9630 - 9635
- Lin, C.; Lay, C. (2004a) *Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora*. International Journal of hidrogen engergy, v. 29, p. 41-45.
- Lin, C.; Lay, C.(2004b). *Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora*. International journal of hydrogen energy, v.29, p.275-281.
- Lin, C.; Lay, C. (2005). *A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 30, p. 285 – 292.
- Logan, B. E.; Oh, S. E.; Kim, I. S.; Van Ginkel, S.(2002). *Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers*. Environ Sci Technol., v. 36, p. 2530–2535.
- Madigan, M., Martinko, J. Parker, J. (2005). *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall.
- Maintinguier, S. I., B. S. Fernandes, I. C. S. Duarte, N. K. Saavedra, M. A. T. Adorno & M. B. Varesche (2008) *Fermentative hydrogen production by microbial consortium*. International. Journal of Hydrogen Energy, n. 33, p. 4309-4317.
- Mathews, J. & G. Y. Wang (2009) *Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production*. International Journal of Hydrogen Energy, 34, 7404-7416.
- Mu Y, Yu HQ. *Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules I: physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules*. Biotechnol Bioeng 2006; 94(5): 980-987.
- Nath K, Das D. (2003). *Hydrogen from biomass*. Curr Sci; 85:265–71.

- Noike, T.; Mizuno, O. (2000). *Hydrogen fermentation of organic municipal wastes.* Water Sci Technol., v. 42, n. 12, p. 155–162.
- Odum, E. P. (1983). *Basic Ecology*. CBS College Publishing.
- Oh, S.-E., Min, B., Logan, B.E. (2004). *Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells*. Environ. Sci. Technol. 38 (18), 4900–4904.
- Oztekin, R.; Kapdan, I.; Kargui, F.; Argun, H. (2008). *Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation*. International Journal of Hydrogen Energy, 33, 4083-4090.
- Peixoto, G. (2008). *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Penteado, E.D. 2012, *Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Ren, N.; Xing, D.; Rittman, B.; Zhao, L.; Xie, T.; Zhao, X. (2007). *Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production*. Environmental Microbiology, v. 9 (5), p. 1112 – 1125.
- Suzuki, Y. (1982); *On hydrogen as fuel gas*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 7, n. 3, p. 227 – 230.
- Van Ginkel, S.; Sung, S. (2001). *Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration*. Environmental Science & Technology, v. 35 (24), p. 4726 –4730.
- Vijayaraghavan, K.; Soom, M. A. M. (2004). *Trends in biological hydrogen production a review*. International Journal of Hydrogen Energy.
- Wang, J. L. & W. Wan. (2009). *Factors influencing fermentative hydrogen production: A review*. International Journal of Hydrogen Energy, 34, 799-811.
- Wang XJ, Ren NQ, Xiang WS, Guo WQ. (2007) *Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49*. International Journal Hydrogen Energy, n. 32, p. 748–54.